



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Estudio del impacto de la mezcla de los herbicidas glifosato y 2,4-D sobre comunidades microscópicas de agua dulce y la calidad del agua: aproximación ecotoxicológica en microcosmos y mesocosmos al aire libre

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

Lic. Verónica Laura Lozano

Directora: Dra. Haydée Norma Pizarro

Codirector: Dr. Marcelo Javier Wolansky

Consejera de estudios: Dra. Irina Izaguirre

Buenos Aires, Diciembre 2020.

Resumen / Abstract	3
Agradecimientos	4
Introducción	6
I. Agricultura y su proceso de industrialización en Argentina	7
II. Impactos de la agricultura industrial en los sistemas de agua dulce	10
III. Los herbicidas	15
III.1. Propiedades físicoquímicas, perfil plaguicida y efectos ecotoxicológicos del glifosato	16
III.2. Propiedades físicoquímicas, perfil plaguicida y efectos ecotoxicológicos del 2,4-D	20
IV. Las mezclas: incertidumbre sobre el impacto ecológico que puede ocasionar la contaminación con mezclas de plaguicidas	22
V. Estudios ecotoxicológicos y aproximaciones experimentales	24
V.1. Condiciones controladas de laboratorio vs. sistemas al aire libre – Cuestiones relacionadas a las dimensiones de las unidades experimentales.	25
V.2. Ensayos mono-específicos vs. ensayos con comunidades	27
V.3. Principios activos vs formulados comerciales	28
Objetivo general, objetivos específicos e hipótesis generales	30
Capítulo I: <i>Impacto del 2,4-D en aguas claras y turbias: aproximación en microcosmos</i>	33
Introducción	34
Materiales y Métodos	35
Resultados	39
Discusión	53
Resumen	59
Capítulo II: <i>Efecto de la mezcla de glifosato y 2,4-D sobre el fitoplancton y perifiton: aproximación en microcosmos</i>	60
Introducción	61
Experimento 1:	64
Materiales y Métodos	64
Resultados	68
Experimento 2:	74
Materiales y Métodos	74
Resultados	77
Discusión	81

Resumen	86
Capítulo III: Efecto de la mezcla de glifosato y 2,4-D sobre la estructura de comunidades microbianas de aguas claras y turbias: aproximación en mesocosmos al aire libre	87
Introducción	88
Materiales y Métodos	90
Experimento utilizando sistema en estado claro	98
Resultados	98
Discusión	115
Experimento utilizando sistema en estado turbio	123
Resultados	123
Discusión	138
Influencia del tipo de sistema (claro; turbio) sobre los resultados	143
Resumen	152
Capítulo IV: Efecto de la mezcla de glifosato y 2,4-D sobre variables funcionales de comunidades microbianas de aguas claras y turbias: aproximación en mesocosmos al aire libre	154
Introducción general del capítulo	155
Sección 1: Oxígeno disuelto	157
Introducción	159
Materiales y Métodos	161
Resultados	170
Discusión	174
Sección 2: Producción primaria	174
Introducción	174
Materiales y Métodos	175
Resultados	177
Discusión	180
Discusión general del capítulo: la importancia del uso de variables funcionales y estructurales	183
Resumen	186
Conclusiones generales	187
Referencias	193
Publicaciones relacionadas con esta tesis	205

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis fue estudiar el impacto de los herbicidas glifosato, 2,4-D y su mezcla sobre las comunidades microbianas de los cuerpos de agua dulce, con énfasis en las comunidades autótrofas. Para ello, se utilizaron distintas aproximaciones experimentales. En primer lugar se realizaron experimentos en microcosmos en condiciones controladas de laboratorio, ensayando con comunidades fitoplanctónicas consolidadas en estados contrastantes de turbidez y con la comunidad perifítica. En segundo lugar se realizaron dos experimentos en mesocosmos al aire libre utilizando agua en condiciones contrastantes, clara y turbia-orgánica, con el objetivo de estudiar la influencia de este factor sobre variables estructurales y funcionales. Los resultados obtenidos indican que los efectos de los herbicidas dependen de la forma en que se utilizan (principios activos vs formulados comerciales), del estado de turbidez del agua y sus comunidades, así como de la complejidad del sistema experimental estudiado. El efecto de la mezcla del glifosato y 2,4-D en proporción agronómica (1:0,45) fue mayormente aditivo, pero algunas variables mostraron antagonismo y sinergismo. Estos resultados resaltan la importancia de estudiar el impacto de los plaguicidas sobre sistemas de agua dulce en estados contrastantes, con comunidades establecidas complejas, a través del estudio de variables estructurales y funcionales.

ABSTRACT

The general objective of this thesis was to study the impact of glyphosate and 2,4-D herbicides and their mixture on the microbial communities of freshwater bodies, with emphasis on autotrophic communities. Different methodological approaches were used to achieve this objective. First, experiments were carried out in microcosms under controlled laboratory conditions, testing consolidated phytoplanktonic communities in contrasting turbidity states and with the periphyton community. Secondly, two experiments were carried out in out-door mesocosms using water in two contrasting conditions – clear and turbid-organic, with the aim of studying the influence of this factor on structural and functional variables. The results indicate that the effects of herbicides depend on the way they are used (active ingredients vs. commercial formulations), the state of turbidity of the water and their communities, as well as the complexity of the experimental system that is studied. The effect of the mixture of glyphosate and 2,4-D in agronomic ratio (1: 0.45) was mostly additive, but some variables showed antagonism and synergism. These results highlight the importance of studying the impact of pesticides on freshwater systems in contrasting states, with complex established communities, through the study of structural and functional variables.

Agradecimientos

A la **Educación Pública**, por haber caído en sus maravillosos brazos. A la Escuela Jorge Newbery D.E. 12 de la Ciudad de Buenos Aires, al Colegio Nacional de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Les pobres también llegamos.

Al **Pueblo**, porque en su incansable lucha cotidiana consiguió que durante más de una década se desarrollara una política de Estado que ha permitido a muchos jóvenes de nuestro país investigar. Volvimos mejores.

Al **Movimiento Nacional Campesino Indígena Vía Campesina**, a sus comunidades organizadas en los barrios y en el campo, por problematizarme cada día y enseñarme el dónde, el cómo y el cuándo colectivos.

A mis **compañeras y compañeros**, por permitirme desarrollar esta parte individual del camino, aguantarme las ausencias en la militancia y soñar juntas un mundo de justicia e igualdad.

A mi **familia**, por bancarme en las decisiones y acompañarnos en los dolores más profundos, estamos acá, quién lo hubiera imaginado... A mi vieja por su amor y lucha incondicionales. A mi viejo por las conversaciones científicas y políticas, porque como laburante nunca se dejó limitar, y soñó galaxias y revoluciones. A mis hermanes, cuñades, sobrines y suegros: gracias infinitas.

A mis **amigas**, por acompañarnos siempre, conviviendo o a miles de kilómetros de distancia.

A **Nacho**, por el amor y la paciencia... mucha paciencia.

A **Julia Irupé y Malena Eva**, para que nadie nunca las limite, las mujeres estamos listas para cambiar el mundo. Revolucionen todo, en el seno de su pueblo trabajador siempre. No hay ningún rincón del planeta mejor que el de los de abajo para ser individual y colectivamente.

A **Haydée**, por confiar en mí y motivarme a pensar, por comprender las circunstancias de la vida y siempre tirar para adelante, desde el primer día estuviste ahí y lo seguís estando. Fue mucho más que una dirección. Espero que la sigamos mucho tiempo!. A **Marcelo**, por acompañar este camino.

A todo el laboratorio de **Limnología**, por las bancadas, las catarsis, las discusiones, los festejos y las luchas. Un rincón donde nos compartimos con mucha humanidad y ternura.

Proyectos que financiaron esta tesis: PICT 2014.1586, UBACyT 20020130100248BA y PIP 11220130100399.

Hoy reanudo en un cómico enderezo la hora de ayer parada en su nostalgia... Me hacen sufrir las alas que me puse para volar, mas grito y se alzan, gimo y me acompañan, río y baten de a dos, como que están amándose y se odian sin embargo mis dos alas... se odian, se enderezan, se hacen amigas mías para llevarme por todas partes: allá está la canción, aquí la nada... más allá el Pueblo y más acá el Amor... Pero el Pueblo está también más acá... y antes estaba allá también, detrás del Pueblo el Pueblo... Hemos viajado por todos mis caprichos y el Pueblo osando el piso, amándose con alas como las mías... odiando su destino, odiándome y amándome sin alas, con millones de pies, con manos y cabezas y lenguas... y sus mil bocas dicen: "ahora, la suerte ya está echada..."

A. Zitarrosa, Guitarra Negra

INTRODUCCIÓN

I. Agricultura y su proceso de industrialización en Argentina

La agricultura se define como un conjunto de actividades vinculadas al cultivo de la tierra para la producción de alimentos y comienza simultáneamente en distintas regiones distantes del planeta hace unos 12,000 años. La aparición de la agricultura transformó radicalmente las formas de organización social y cultural de la humanidad. Si bien todavía existen poblaciones en el mundo con prácticas recolectoras y cazadoras, la agricultura se expandió en la mayor parte del mundo, diversificando de una manera extraordinaria las producciones, así como aumentando los valores nutricionales de las plantas y los animales.

La agricultura permitió el asentamiento de las poblaciones humanas y su crecimiento, pero fueron otros procesos los que contribuyeron posteriormente al crecimiento exponencial de la población humana (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). La mecanización de la agricultura y la dispersión de cultivos desde América del Sur hace 400 años primero, y luego los avances en salud pública junto con el descubrimiento de las vacunas y antibióticos, la revolución industrial y el uso masivo de los combustibles fósiles, fueron hitos fundamentales en la reducción de la mortalidad infantil y el aumento en la esperanza de vida (Fig. 1).

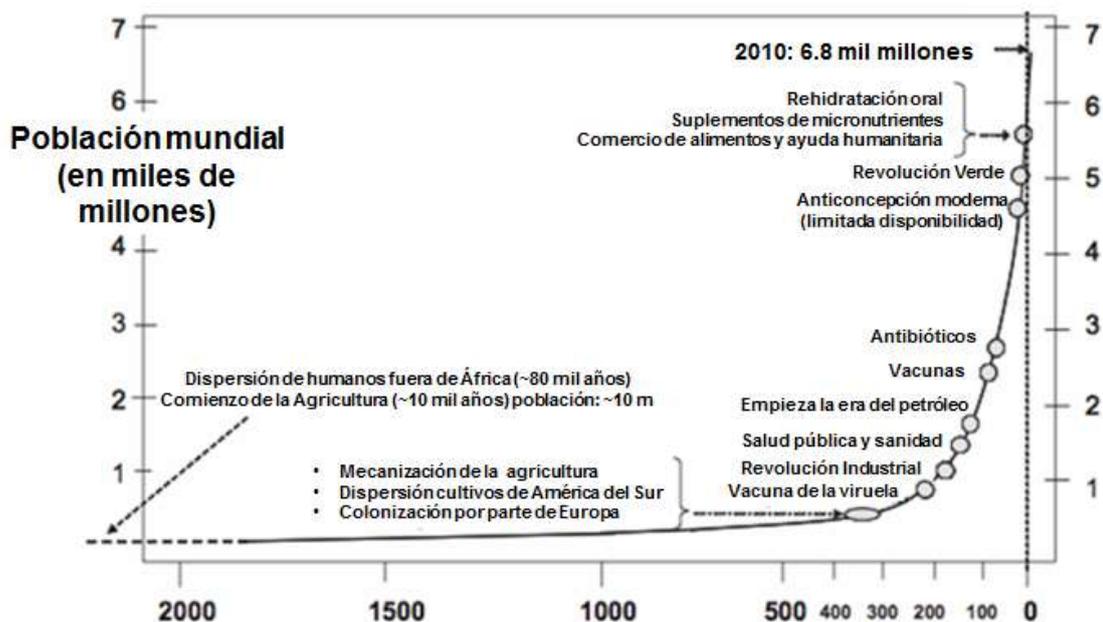


Fig. 1: Crecimiento de la población humana mundial y sus hitos impulsores de los últimos 2000 años. Tomado y traducido de Millennium Ecosystem Assessment (2005).

Luego de miles de años, la pérdida de fertilidad de los suelos comenzó a ser una limitante en la producción de alimentos (Foster & Magdoff, 1998). En 1905, el alemán Fritz Haber descubre el procedimiento químico para fijar nitrógeno y producir amoníaco líquido. En 1915 funda, junto con Karl Bosch, la primera planta de amoníaco en Alemania. Nació así la **Agricultura Química**, que reemplazó la utilización de abonos orgánicos como el guano, cuya explotación se había desarrollado en las islas del Pacífico durante los siglos XIX y XX. La síntesis de compuestos químicos no tardó mucho tiempo en dar origen a los primeros plaguicidas sintéticos.

La FAO define “plaguicida” o “plaguicida” a toda *“sustancia o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales. El término incluye a las sustancias utilizadas como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes de la cosecha o después de la misma cuando se desea proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte”*.

El primer plaguicida orgánico sintético, que fuera producido para su comercialización como insecticida en 1940, fue el dicloro-difenil-tricloroetano (1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano, DDT) (Carson, 1963). El DDT había sido descubierto previamente, pero fue el elevado número de soldados caídos a causa de la malaria y el tifus durante la primera guerra mundial lo que motivó su utilización durante la segunda guerra (Bishopp, 1945). Según algunos autores, el segundo plaguicida sintetizado fue el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que fue el primer herbicida sintético liberado al mercado en 1944 (Troyer, 2001).

Desde los años 60´ del siglo XX comienza a nivel mundial otro hito que promovió el crecimiento de la población mundial a través del aumento en la producción de alimentos, la denominada **Revolución Verde**. Entre los años 1960 y 2000 la producción agrícola mundial fue duplicada, pasando de mil a dos mil millones de toneladas (Khush, 2001). Este proceso se caracterizó por la

introducción de algunas de las formas de producción industrial en las prácticas de la agricultura durante la posguerra (Mazoyer & Roudart, 2007). Los avances en genética molecular dieron origen a la producción y comercialización de híbridos con semillas adaptadas por mutagénesis y posteriormente, al desarrollo de los organismos transgénicos. La primera planta transgénica fue obtenida en 1983 por Chilton y colaboradores (de Framond et al. 1983), lo que inició una “carrera biotecnológica” en la modificación de las plantas cultivables que continúa hasta la actualidad. Uno de los caracteres desarrollados mediante el uso de la transgénesis fue la tolerancia a herbicidas, lo que permitiría el manejo de las malezas de forma química.

La primera tolerancia a un herbicida que fue desarrollada por transgénesis fue la tolerancia al glifosato. Barry et al. (1992) extrajeron de una cepa tolerante a glifosato de la bacteria de suelo *Agrobacterium* sp. la secuencia del gen codificante para la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa, perteneciente a una vía metabólica vital para el crecimiento y supervivencia de las plantas. La enzima EPSP-sintasa había sido previamente establecida como el sitio blanco específico del glifosato en vegetales. A partir de la cepa CP4 de *Agrobacterium* sp. se desarrolló el organismo transgénico conocido hoy como “RR” (Roundup Ready®), siendo Roundup® la marca comercial de un formulado a base de glifosato de la compañía Monsanto® (Cohen & Morgan, 2008). En Argentina el primer cultivo transgénico aprobado fue la soja “RR” (Vara, 2004). Desde 1996 y hasta principios de 2019 fueron aprobados un total de 52 desarrollos agrobiotecnológicos del tipo transgénico por la Comisión Nacional de Biotecnología (CONABIA) que depende de la Secretaría de Agroindustria de la Nación (Secretaría de Agroindustria, 2019).

A partir de la aprobación para el uso y comercialización de la soja RR, comienza un abrupto aumento de la utilización de herbicidas en nuestro país. Este proceso se ve intensificado a partir del desarrollo de la denominada *siembra directa* con *barbecho químico*. La siembra directa es una práctica antigua, consistente en la no labranza con el fin de mantener la estructura del suelo, evitándose de ese modo los procesos de desertificación (Alapin, 2008). El barbecho químico consiste en la utilización de herbicidas y otros plaguicidas con el fin de eliminar las malezas antes de la siembra. Actualmente más del 90% de la producción agraria en Argentina se encuentra bajo sistema de siembra directa con

barbecho químico, siendo la soja y el maíz los cultivos con los mayores valores de adopción de esta práctica de manejo con valores de 93 y 94% respectivamente (Aapresid, 2018). El informe realizado por el CONICET sobre los impactos del glifosato en la salud humana y el ambiente estimó que la siembra directa con barbecho químico representa el 35% del consumo total de herbicidas, mientras que el cultivo de soja RR lo sigue con el 31% (Donadío de Gandolfi et al. 2016). Todo este proceso de transformación de la producción de granos en nuestro país derivó en que Argentina lidere, junto con Chile, el ranking mundial de utilización de herbicidas por hectárea (Fig. 2).

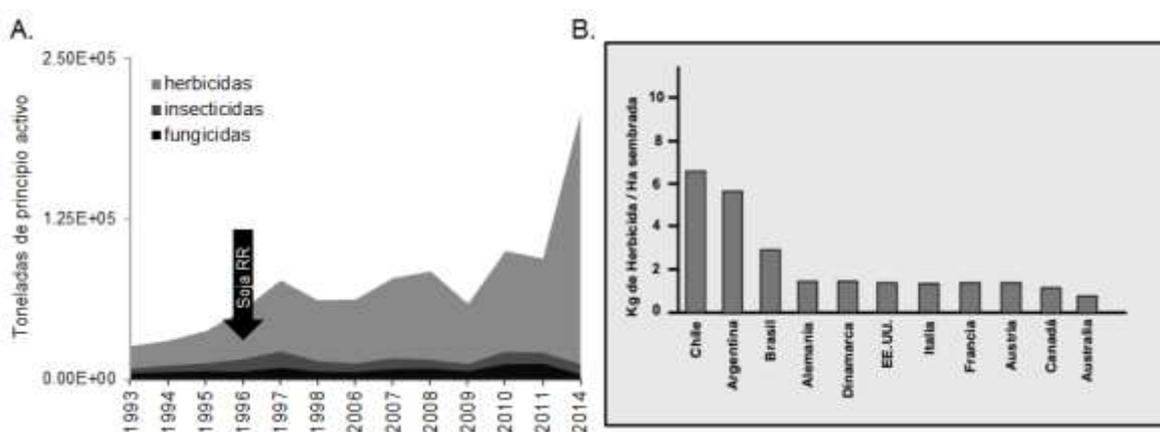


Fig. 2: Uso de plaguicidas en Argentina. A. Toneladas de plaguicidas aplicadas anualmente desde 1993 por tipo de producto y efecto del ingreso de los organismos transgénicos en los procesos agroproductivos en Argentina. Elaboración con datos tomados de FAOSTAT® (2019). B. Ranking mundial de utilización de herbicidas en países por hectárea sembrada. Tomado de INTA (2015).

II. Impactos de la agricultura industrial en los sistemas de agua dulce

El uso masivo de plaguicidas por vía terrestre y aérea produjo la contaminación de zonas aledañas y de los cursos de agua insertos en el paisaje agrícola de Argentina. Se estima que en la región núcleo de actividad agrícola de nuestro país (la región pampeana) existen varios miles de cuerpos de agua lénticos, ya sean transitorios o permanentes (Dukat et al. 2006). Los sistemas acuáticos lénticos naturales (lagunas, lagos, charcos) como aquellos artificiales (estanques, represas, etc.) son ecosistemas complejos que poseen funciones y prestan servicios ecosistémicos de gran importancia. Entre las funciones ecosistémicas se encuentran la producción primaria y secundaria, el reciclado de

nutrientes las que conllevan a los servicios de formación de suelos, la regulación climática y la capacidad de producir o absorber gases de efecto invernadero (Prairie & del Giorgio, 2013). En relación a los servicios que brindan estos ecosistemas, pueden clasificarse en tres grandes grupos: los de provisión como el agua de consumo, los de regulación de la calidad del agua e inundaciones y los servicios culturales como la recreación y el turismo (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Postel & Carpenter, 1997).

Las lagunas pueden clasificarse en cuatro grandes grupos de acuerdo a su estado trófico: oligotróficas, mesotróficas, eutróficas e hiper-eutróficas pudiendo caracterizarse por la concentración de clorofila α , cantidad de nutrientes y transparencia medida por la profundidad del disco de Secchi (Wetzel, 2001) (Tabla 1).

	Clorofila α ($\mu\text{g/L}$)	Fósforo Total ($\mu\text{g/L}$)	Nitrógeno Total ($\mu\text{g/L}$)	Profundidad del disco de Secchi (m)
Oligotróficas	0,3-5	3-18	307-1630	5,4-28,3
Mesotróficas	3-11	11-96	361-1387	1,5-8,1
Eutróficas	3-78	16-386	393-6.100	0,8-7
Hiper-eutróficas	100-150	750-1200	-	0,4-0,5

Tabla 1. Clasificación general de lagunas de acuerdo a sus condiciones tróficas. Adaptado de Wetzel (2001).

Las lagunas pampeanas son someras o poco profundas (<4 mts de profundidad media) y no estratifican térmicamente, por lo que presentan mezclas continuas o polimixis (Quiros et al. 2002). La mayoría de esas lagunas es del tipo eutróficas o hiper-eutróficas. Es conocido que las lagunas poco profundas pueden presentar un equilibrio dinámico entre los estados claro y turbio-orgánico; dichos estados pueden ser observados en distintos momentos para un mismo cuerpo de agua, proceso conocido como *estados alternativos* (Scheffer et al. 1993). Sin embargo, un tercer tipo de estado relacionado con la turbidez inorgánica es encontrado en la región pampeana, por lo que las lagunas presentes en esta región pueden hallarse en tres formas (Allende et al. 2009): 1. **estado claro**, caracterizado por la presencia de macrófitas sumergidas y flotantes y baja abundancia fitoplanctónica, con rangos informados de 2.200-4.700 ind/mL de especies del micro+nano fitoplancton y de 237.000-338.000 ind/mL para el picoplancton. 2. **estado turbio orgánico**, generado como consecuencia de la

abundancia relativamente alta de especies fitoplanctónicas, con abundancias en la región que van de 40.000 a 220.000 ind/mL y un amplio rango para el picoplancton (8.600-4.170.000 ind/mL) y 3. **estado turbio inorgánico**, caracterizado por la alta carga de sedimentos inorgánicos (Allende et al. 2009) (Fig. 3). Se conoce que a comienzos de los años 90 alrededor de la mitad de estas lagunas se encontraba en estado claro con alta riqueza de especies fitoplanctónicas, mientras que 20 años después la mayoría se encontraba en estado turbio con dominancia de algunas pocas especies (Izaguirre et al. 2012).

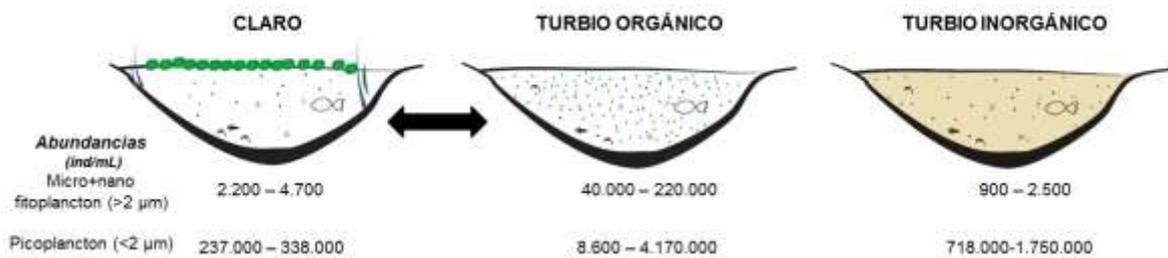


Fig. 3: Tipos de estados de las lagunas pampeanas y rangos de abundancias estimadas del micro+nano fitoplancton y picoplancton. Adaptado de Allende et al. 2009.

Los cuerpos de agua presentan diferentes comunidades que pueden todas ser afectadas directa o indirectamente por la contaminación. A su vez, existen interacciones tróficas entre estas comunidades, por lo que los efectos sobre una fracción pueden trasladarse a través de la trama trófica por fenómenos de tipo cascada o *Top-down*, o por fenómenos de propagación o *Bottom-up* (McQueen et al. 1989). Otras interacciones ecológicas, como competencia, facilitación, simbiosis, mutualismo, también relacionan a estas comunidades y las poblaciones que las componen entre sí. La base de la trama trófica del ecosistema acuático está conformada, principalmente, por la fracción fotoautótrofa, cuyo metabolismo genera la captación de carbono que resulta en la producción primaria. En las lagunas, la producción primaria es la suma de las producciones de las macrófitas y de las comunidades microbianas autótrofas del plancton (fitoplancton), perifiton y bentos. Si bien el fitoplancton suele ser el partícipe mayoritario en la producción primaria en los sistemas en estado turbio orgánico, la fracción autotrófica de las comunidades microbianas adheridas puede ser de mucha importancia en el aporte neto a la producción primaria, llegando a observarse un 77% de aporte del perifiton en lagunas en estado claro (Liboriussen & Jeppesen, 2003).

La **comunidad fitoplanctónica** está conformada por cianobacterias y algas. Las cianobacterias son organismos procariotas que se diferencian del resto de las bacterias por la presencia de clorofila α y por su capacidad de utilización del agua como dador de electrones en la fotosíntesis, lo que las asemeja funcionalmente a los autótrofos eucariotas. Pueden presentarse en forma unicelular, agregada y filamentosa, formas que pueden poseer células especializadas en la fijación del nitrógeno denominadas heterocitos, únicas de este grupo (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Todo el resto de los fotoautótrofos acuáticos son eucariotas y se los agrupa como algas, siendo esta agrupación de carácter polifilético. Los principales grupos de algas presentes en los sistemas de agua dulce son las algas verdes (Chlorophyta), las algas amarillo-verdosas (Xanthophyceae), las algas doradas (Chrysophyceae), las diatomeas (Bacillariophyceae), las criptomonas (Cryptophyceae), los dinoflagelados (Dinophyceae) y los euglenoides (Euglenophyceae). Las algas marrones y rojas (Phaeophyta y Rhodophyta) son muy poco frecuentes (Wetzel, 2001). El pigmento ubicuo y mayoritario en todos los autótrofos acuáticos es la clorofila α , mientras que las distintas clases algales y las cianobacterias presentan otros pigmentos accesorios característicos como las clorofilas β , c y d , los carotenos, las xantofilas y las biliproteínas.

De acuerdo al diámetro de los organismos presentes en el fitoplancton pueden definirse los siguientes grupos: pico-fitoplancton (0,2 – 2,0 μm), nano-fitoplancton (2,0 – 20 μm) y micro-fitoplancton (20 - 200 μm). En esta fracción, el tamaño de los organismos tiene implicancias ecológicas, ya que es un factor importante para la delimitación del tipo de absorción de los nutrientes, la presencia o ausencia de motilidad, el tiempo de reproducción posible y la presión de predación a la que son sometidos los organismos. Es conocido que las algas pequeñas tienen preponderancia en el fitoplancton de los lagos oligotróficos, mientras que en los lagos con mayor disponibilidad de nutrientes el tamaño de los organismos pertenecientes al fitoplancton es en promedio mayor (Margalef, 1967, Wetzel, 2001).

El **perifiton** es una comunidad compleja microscópica conformada por organismos heterotróficos y autotróficos, activos, inactivos o senescentes y detritus inorgánico y orgánico, inmersos en una matrix mucilaginoso de mucopolisacáridos adherida a sustratos sumergidos, inorgánicos u orgánicos (Wetzel, 2005). El

perifiton coloniza diferentes tipos de sustratos y dependiendo de sus características la comunidad toma diferentes nombres: epipsammon (arena), epixilon (madera), epipelon (arcilla), epifiton (plantas), epiliton (rocas), etc (Pouličková et al. 2008). Siendo una comunidad sésil embebida en una matriz mucilaginosa ha sido muchas veces utilizada como bioindicador ya que tiene la ventaja de resumir la historia de un sitio puntual. Dada su complejidad y estructura, presenta mayor resistencia a los impactos tanto físicos como químicos pudiendo preservar cierta independencia de la columna de agua gracias a un proceso de recirculación de la materia y la energía dentro de la propia matriz de la comunidad y a la dependencia con su sustrato (Azim et al. 2005).

La fracción heterótrofa de los cuerpos lénticos de agua dulce está conformada por el zooplancton (protozoos, flagelados heterótrofos, rotíferos, ciliados, copépodos, cladóceros, larvas), hongos, virus, bacterias, peces, anfibios, reptiles y aves acuáticas. En los sistemas acuáticos existe una importante contribución de las fracciones microbianas pelágicas en la circulación del carbono y los nutrientes conocida como “*microbial loop*” (Porter, 1996).

A partir de un nivel “umbral” de contaminación química (específico para cada contaminante y para las comunidades involucradas), en estos sistemas pueden ocurrir modificaciones estructurales y funcionales que pongan en riesgo y/o limiten los servicios ecosistémicos asociados. Uno de los procesos de deterioro ambiental de los cuerpos de agua en nuestro país es el desarrollo de floraciones de cianobacterias tóxicas como producto de dicha contaminación (O’Farrell et al. 2019). Las floraciones de cianobacterias tóxicas impiden la utilización de los cuerpos de agua tanto para la provisión de agua potable como para la recreación y conducen generalmente a la muerte masiva de peces y otros vertebrados (Havens, 2008). De hecho, algunos tipos de cianobacterias están siendo estudiadas por sus capacidades para utilizar algunos plaguicidas, como el glifosato, como fuente de fósforo y/o carbono (Forlani et al. 2008), lo que favorecería su proliferación. La contaminación de los cuerpos de agua dulce con fertilizantes se propone que es una de las posibles razones del aumento de estas floraciones (Harris & Smith, 2016), así como también un factor determinante del pasaje del estado claro al estado turbio orgánico de muchas lagunas insertas en el paisaje agrícola pampeano (Quirós et al. 2006). En los últimos años el herbicida glifosato ha sido

propuesto como otro impulsor de dicho proceso (Vera et al. 2010). Además, si bien tanto los fertilizantes como los plaguicidas pueden ser fuente de nutrientes que estimulan el crecimiento algal y de las cianobacterias directamente, al mismo tiempo pueden ser tóxicas para otras, favoreciendo de forma directa e indirecta el desarrollo poblacional diferencial de algunas especies por sobre otras (Xu et al. 2011, Sun et al. 2013)

III. Los herbicidas

Los herbicidas son plaguicidas diseñados para controlar el crecimiento poblacional de las plantas que se consideran “plagas”. Pueden ser aplicados en la producción agroalimentaria y también en otros ámbitos (por ej., mantenimiento de caminos y la traza del ferrocarril). Pueden ser clasificados de varios modos de acuerdo a su estructura química, sitio blanco primario en las malezas que se busca manejar, y su modo de acción biocida. Respecto a su espectro de acción pueden ser *selectivos* cuando sólo algún tipo de planta es afectado, o de *amplio espectro* si la gran mayoría de éstas lo son. En relación a su movilidad, pueden ser de *contacto* si no es absorbido a través de las raíces y su actividad principal se dirige a las hojas y tallos, o *sistémicos* si son transportados a través de toda la planta vía los haces vasculares. De acuerdo a su persistencia ambiental pueden ser *residuales* cuando son persistentes, o *no residuales* cuando se degradan rápidamente. Finalmente pueden ser clasificados según su modo de acción como los que inhiben la fotosíntesis y los que inhiben el crecimiento sin involucrar los fotosistemas vegetales (Vats, 2015).

Según los datos disponibles en Argentina, las clases de herbicidas más utilizadas pertenecen a los grupos de organofosforados, con 181.527 toneladas aplicadas en 2014, las amidas y carbamatos con 6.859 ton, y los ácidos fenoxicarboxílicos con 4.461 ton (FAOSTAT, 2019). Diversos herbicidas han sido detectados en los cuerpos de agua dulce de nuestro país, siendo los más ubicuos el glifosato y su producto de degradación AMPA y la atrazina que posee alta persistencia ambiental (Peruzzo et al. 2008, Aparicio et al. 2013, De Gerónimo et al. 2014, Ronco et al. 2016, Pérez et al. 2017, Castro Berman et al. 2018). En la Tabla 2 se muestran las concentraciones máximas reportadas en agua de los principales plaguicidas detectados en sistemas naturales en nuestro país. El

herbicida con los niveles máximos más altos fue el glifosato, con 73,000 µg/L en agua (Sasal et al. 2017) y 5 mg/Kg en sedimentos (Peruzzo et al. 2008), seguido por la atrazina (1,4 µg/L) (De Gerónimo et al. 2014) y el 2,4-D (0.99 µg/L) (Pérez et al. 2017).

	Concentración máxima en agua (µg/L)	Concentración máxima en sedimentos (µg/Kg)
Atrazina	1,4 (1), 0,11 (2)	2 (2)
Imazapic	0,048 (1)	
Metsulfuron	0,033 (1), 0,044 (2)	
Clorimuron-etil	0,701 (1)	
Glifosato	2,9 (2), 7,60 (3) , 0,7 (4), 4,52 (5), 700 (6), 73,000 (7), 1,90 (8)	18,5 (2), 235 (3), 3004 (4), 32,89 (5), 5000 (6)
AMPA	2 (2)	47,5 (2)
2,4-D	0,99 (2)	
Metolaclor	0,36 (2)	15 (2)
Acetoclor	0,48 (2)	61 (2)

(1) De Gerónimo et al. 2014 (2) Pérez et al. 2017 (3) Aparicio et al. 2013 (4) Ronco et al. 2016 (5) Castro Berman et al. 2018 (6) Peruzzo et al. 2008 (7) Sasal et al. 2017 (8) Primost et al. 2017.

Tabla 2. Concentración máxima registrada de herbicidas en muestreos de agua y sedimentos en Argentina.

III.1. Propiedades fisicoquímicas, perfil plaguicida y efectos ecotoxicológicos del glifosato

El glifosato es un herbicida organofosforado sistémico, derivado del aminoácido glicina y de amplio espectro que inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos a través de su interacción reversible con el sitio activo de la EPSP-sintasa. Esta enzima es la sexta de la ruta metabólica del ácido shikímico, un camino bioquímico a través del cual se sintetizan los aminoácidos esenciales fenilalanina, tirosina y triptófano en el cloroplasto (Powles & Yu, 2010) (Fig. 4). En las plantas, estos aminoácidos son fundamentales para la síntesis de proteínas, hormonas e intermediarios metabólicos con múltiples funciones biológicas (Tzin & Galili 2010). En su conjunto, los productos basados en glifosato son los formulados herbicidas más utilizadas en el mundo (Annett et al. 2014). El N-fosfometilglicina (glifosato, C₃H₈NO₅P) fue sintetizado por primera vez en 1950 por Henri Martin y

re-sintetizado 20 años después por Monsanto® que lo lanzó al mercado a mitad de los años 70 bajo la marca comercial Roundup® (Szekacs & Darva, 2012). Si bien el glifosato posee alta solubilidad en agua (12 g/L, 25°C), con el fin de aumentarla se lo sintetiza en forma de sales como isopropilamina (500 g/L), monoamonio (300 g/L) y potásica (900 g/L), entre otras (Dill et al. 2010, Annett et al. 2014). A su vez, las sales de glifosato son acompañadas por coadyuvantes que favorecen la absorción sistémica de los preparados comerciales en las plantas y le facilitan la penetración a través de la cutícula de las plantas.

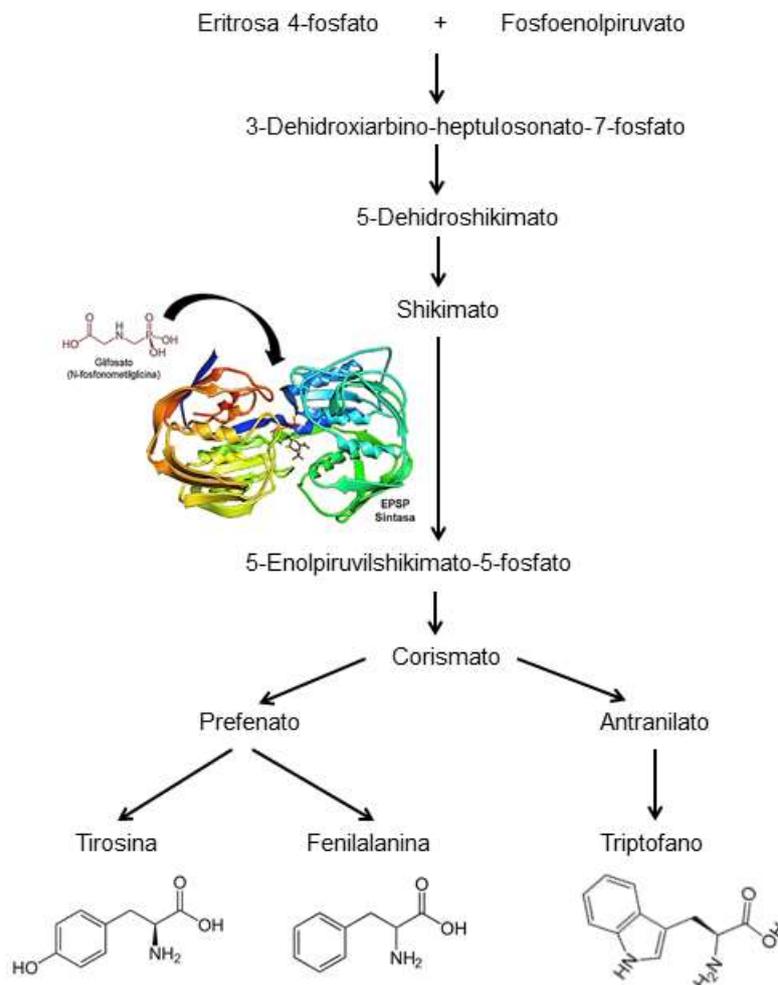


Fig. 4: Ruta del ácido shikímico e interacción molecular de glifosato con la enzima EPSP-sintasa. Se observa la interacción con el sitio activo de la enzima (en rojo glifosato, en marrón shikimato, sustrato de la enzima; el resto de los colores diferencian estructuras secundarias de la enzima). Imagen obtenida utilizando Autodock v.4. y la estructura molecular de la EPSP-sintasa disponible en PDB (Protein Data Bank). Adaptado de Annett et al. (2014).

La acción de glifosato en el sitio activo de la enzima, en competencia con uno de los sustratos de la EPSP-sintasa, el fosfoenolpiruvato (PEP), bloquea la biosíntesis de estos aminoácidos en detrimento de la viabilidad celular, causando finalmente la muerte de la planta entre 10 y 20 días luego de la aplicación (Singh & Shaner, 1998).

Los formulados son mezclas de sustancias, el ingrediente activo y los coadyuvantes, cuya composición suele ser confidencial, ya que no son de declaración obligatoria comercial, con excepción de los organismos de gobierno específicos donde esos datos son requeridos. Para varios casos de productos herbicidas que incluyen estos coadyuvantes, los mismos han sido considerados “inactivos” al momento del registro y su autorización para ser comercializados, por países de alta vigilancia epidemiológica (en contraposición a las moléculas que portan la acción específica en uno o más sitios blancos reconocidos, que se los llama “ingredientes activos, i.a.”). Sin embargo, al reconsiderarse el impacto de las aminas polietoxiladas utilizadas como surfactantes (polioxietilenamina, POEA; principal coadyuvante del producto herbicida Roundup®) se puso en cuestionamiento esa aparente inocuidad, ya que se observó toxicidad en ratas de hasta 100 veces más alta que la del ingrediente activo (Mesnage et al. 2013, Defarge et al. 2016). En particular, estudios sobre especies fitoplanctónicas de agua dulce han mostrado que otros constituyentes de los formulados comerciales de glifosato, como la fracción isopropilamina correspondiente a la síntesis de la sal, posee una toxicidad mayor a la del principio activo (Lipok et al. 2010).

Se conocen dos vías de degradación microbiana del glifosato en el ambiente, una a través del intermediario AMPA y la otra con el intermediario sarcosina (Fig. 5). De dichos procesos de biodegradación bacteriana han sido identificadas numerosas especies de bacterias involucradas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ochrobactrum anthropi*, *Agrobacterium radiobacter*, *Burkholderia pseudomallei*, etc. (Hove-Jensen et al. 2014).

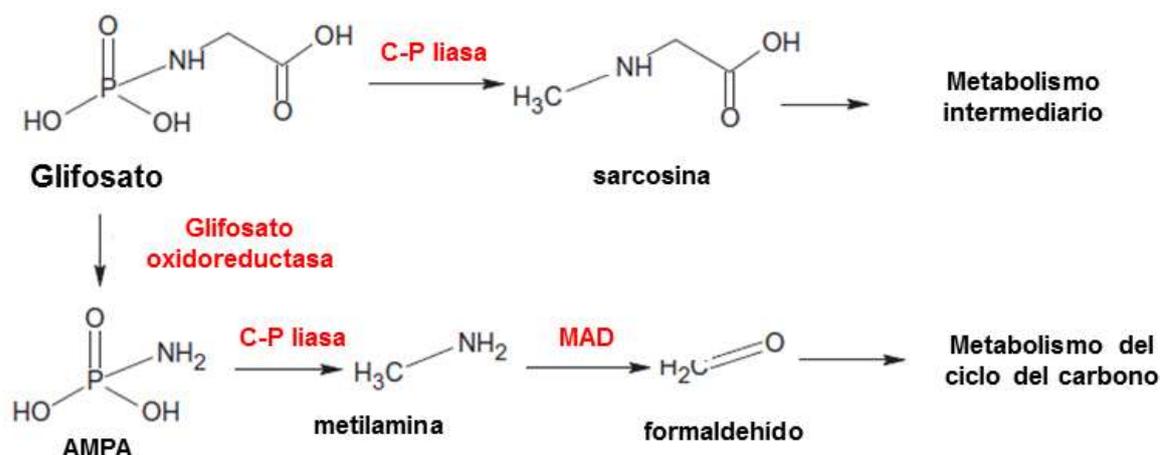


Fig. 5: Vías de biodegradación del glifosato en el ambiente. En rojo las enzimas involucradas y en negro los productos intermedios. MAD: Metilamina Oxidasa. Tomado de Singh & Singh, 2014.

Los impactos del glifosato sobre los sistemas de agua dulce han sido estudiados, ya sea como principio activo o como formulado comercial (ej. Glifosato Atanor[®], Roundup[®]). Uno de los fenómenos mejor descritos es la modificación de la microbiota acuática como consecuencia de la capacidad de utilización del glifosato como fuente de fósforo que presentan distintos microorganismos (Qiu et al. 2013), o por la tolerancia diferencial de éstos a nivel toxicológico (Lipok et al. 2010). El aumento de la abundancia microbiana como producto de la contaminación con glifosato o el formulado comercial conduce al deterioro de la calidad del agua, acelerando los procesos que conducen a la eutrofización (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2012), registrándose modificaciones a largo plazo (Vera et al. 2010). Modificaciones estructurales de las fracciones autotróficas acuáticas, como el fitoplancton y en el perifiton fueron observadas en distintos trabajos. Pérez et al. (2007) aplicaron dos concentraciones de Roundup[®] (6 y 12 mg/L) en un sistema experimental de mesocosmos al aire libre con comunidades microbianas establecidas, encontrando efectos significativos al cabo de 11 días. Este estudio reportó que hubo una reducción significativa de la abundancia total del micro+nano fitoplancton y un aumento de ~40 veces de la abundancia de las picocianobacterias. Un fenómeno similar fue observado en la comunidad perifítica, aumentando la proporción de algas muertas totales y aumentando ~4,5 veces el número de cianobacterias en esta comunidad. Vera et al. (2012), en un estudio realizado en mesocosmos al aire libre, demostraron que el Roundup[®] afecta

negativamente el proceso de colonización y sucesión del perifiton, mostrándose un claro retraso en la colonización atribuido al efecto toxicológico directo del Roundup®. En otros estudios se observó que la susceptibilidad de organismos como *Daphnia magna* (Cuhra et al. 2013) y sobre la larva de tipo nauplii de los calanoideos (Vera et al. 2012) entre otros, podría dar indicios de modificaciones a nivel del zooplancton. Esto último sugiere que existen efectos directos e indirectos del herbicida sobre las comunidades microbianas de los sistemas de agua dulce.

III.2. Propiedades fisicoquímicas, perfil plaguicida y efectos ecotoxicológicos del 2,4-D

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, $C_8H_6Cl_2O_3$) es un herbicida sistémico y selectivo del tipo auxínico que afecta la plasticidad de la pared de las células y el metabolismo de los ácidos nucleicos en plantas (Song, 2014). Se clasifica dentro de los herbicidas auxínicos por poseer una estructura química similar a la de la auxina natural ácido indolacético (AIA), lo que le confiere capacidad de interferir en las mismas rutas metabólicas. Se cree que las auxinas sintéticas acidifican las células vegetales al estimular la actividad de las bombas de protones de las membranas celulares (Seifertová et al. 2014). Su acción herbicida se basa en la sobre-estimulación del crecimiento de las células del haz vascular que, en el caso de las plantas dicotiledóneas, está organizado en forma de cambium (Song, 2014). La organización de los haces en las dicotiledóneas en forma de anillo trae aparejado una constricción causada por las propiedades auxínicas del 2,4-D, lo cual lleva a la muerte de la planta. En el caso de las monocotiledóneas, donde los haces se encuentran dispersos, esto no sucede. Esta característica le confiere al 2,4-D la propiedad de herbicida selectivo. Descubierta durante la segunda guerra mundial, comienza a ser comercializado en 1946 y es utilizado ampliamente para el control de malezas en cultivos como el arroz, el maíz y el trigo (Vencill, 2002). Actualmente el 2,4-D es el tercer herbicida más usado en Argentina (SENASA, 2017) siendo el primer herbicida que se utilizó de manera expandida a nivel mundial (Schulz & Segobye, 2016).

El 2,4-D, también es degradado en el ambiente por microorganismos, conociéndose dos vías. Una es a través del compuesto intermediario 4-clorofenol, y la otra a través de la formación de 3,5-diclorocatecol, siendo la primera vía la

más común (Fig. 6). Distintos géneros bacterianos son capaces de utilizar el 2,4-D como fuente de carbono y energía: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Arthrobacter* y *Burkholderia*, entre otros (Singh & Singh, 2014).

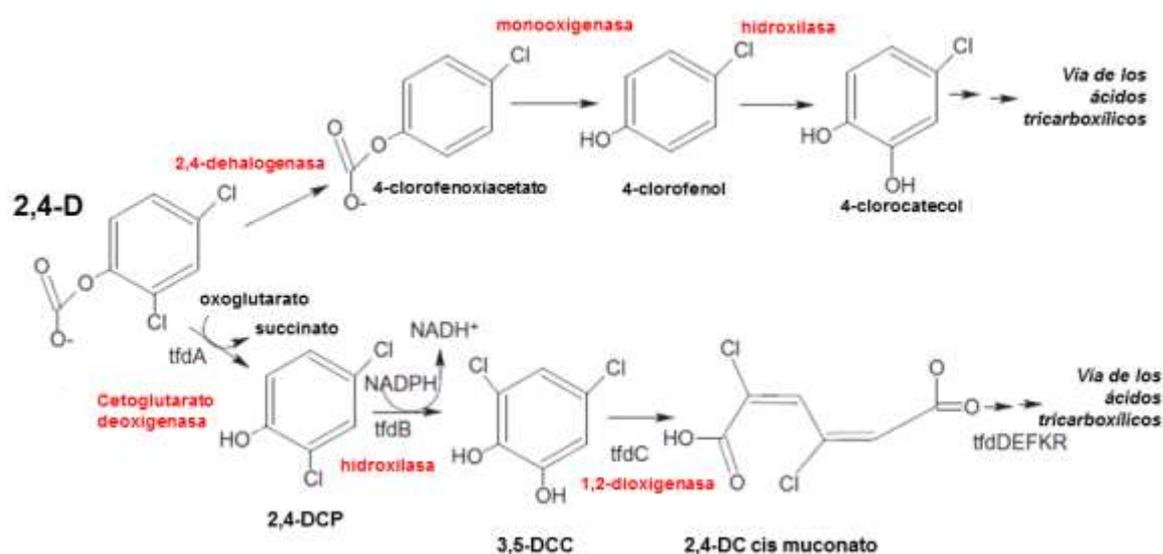


Fig. 6: Vías de biodegradación del 2,4-D en el ambiente. 2,4-DCP: 2,4-diclorofenol, 3,5-DCC: 3,5-diclorocatecol, tfdA, tfdB, tfdC y tfdDEFKR: genes bacterianos conocidos. Tomado de Singh & Singh, 2014.

Se ha reportado que bajas concentraciones (<2 mg/L) de 2,4-D estimulan el crecimiento de algunas especies fitoplanctónicas en los ecosistemas acuáticos, mientras altas concentraciones (>20 mg/L) son inhibitorias (Boyle, 1980, Kobraei & White, 1996, Wong, 2000). Respecto a otras comunidades, De Liphay et al. (2003) reportó efectos de bajas concentraciones (<40 µg/L) de 2,4-D, incluyendo modificación de la estructura de la comunidad bacteriana, observándose un crecimiento de las bacterias capaces de degradar el 2,4-D. En el mismo sentido, un aumento de las Actinobacterias fue detectado por Aguayo et al. (2014) en experimentos utilizando una concentración de 20 mg/L de 2,4-D en agua proveniente de un lago oligotrófico. A su vez se reportaron efectos inhibitorios sobre otros grupos bacterianos, resultando en la modificación del metabolismo y la diversidad genética de toda la comunidad.

IV. Las mezclas: incertidumbre sobre el impacto ecológico que puede ocasionar la contaminación con mezclas de plaguicidas

Es conocido que ningún contaminante ambiental se presenta en un ecosistema en forma aislada. En el caso particular de los plaguicidas, múltiples principios activos contaminan los ecosistemas junto con otras sustancias que pueden estar presentes en los formulados comerciales (coadyuvantes y otros principios activos), con otros contaminantes presentes en el agua que se utiliza para la dispersión, y/o como consecuencia de las mezclas que se realizan en los tanques de las pulverizadoras con el fin de optimizar el tiempo y el consumo de combustible (Ngowi et al. 2007) así como el de minimizar la degradación de los ingredientes activos. El estudio de los efectos combinados de los contaminantes desafía los modelos clásicos en toxicología y los sistemas de regulación (Monosson, 2004).

La imposibilidad de estudiar todas las mezclas posibles, tanto en la toxicología clásica, así como a nivel ambiental, ha estimulado la investigación de modelos experimentales *in-vitro* e *in-vivo* que puedan predecir la toxicidad de una mezcla a partir de la toxicidad de sus componentes. En este sentido dos conceptos sobre la aditividad fueron propuestos: la **adición de dosis** de compuestos con un sitio blanco primario común y un modo de acción similar (aditividad de *Loewe*), y la **adición de efectos** cuando se trata de compuestos con modos de acción diferentes e independientes (independencia de *Bliss*) (Rodea-Palomares et al. 2015). El modelo de adición de dosis postula que para un determinado punto final toxicológicamente relevante (*endpoint*) las sustancias con el mismo modo primario de acción (compartiendo un mismo blanco de acción a nivel celular-molecular) suman los efectos asociados a sus concentraciones ajustadas según su potencia relativa (respecto a una de las sustancias considerada el *index chemical*). Mientras que la adición de efectos implica que sustancias que pertenecen a distintas clases toxicológicas sumarán efectos (suma algebraica de magnitudes de cambio) a través de su accionar independiente sobre distintos blancos de acción. Estas acciones conjuntas implican predicciones de alta relevancia ecológica y regulatoria. Al considerar el impacto acumulativo de plaguicidas con distinto modo de acción, si se evalúan niveles individuales que no presentan toxicidad y se cumple la aditividad de efectos, se espera por defecto que la combinación de los

mismos resulte en una mezcla no tóxica ($\sim 0 + \sim 0 + \sim 0 \dots + \sim 0 \approx 0$). En cambio, al sumar concentraciones ajustadas por su potencia relativa puede ocurrir que exposiciones que separadamente son subtóxicas cuando se combinan causan toxicidad ($\sim 0 + \sim 0 + \sim 0 \dots + \sim 0 \neq 0$) (Wolansky et al. 2009). De este modo, la mezcla de dos o más sustancias tóxicas (por ej., plaguicidas) puede causar 3 tipos de respuesta: la suma de los efectos individuales de cada compuesto (**aditividad**), o que exista interacción (Hernández et al. 2017) y que sea menor a lo esperado (**antagonismo**) o mayor (**sinergismo**) (Groten et al. 2001).

En la actualidad existe alerta respecto al efecto adverso acumulativo que las mezclas de plaguicidas pueden causar en la salud humana y el ambiente. Diversos trabajos han demostrado que algunas mezclas de plaguicidas tienen efectos sinérgicos sobre distintos blancos. Thompson (1996) realizó una revisión sobre los efectos sinérgicos conocidos de mezclas de diversos plaguicidas. Si bien hasta ese momento las publicaciones mostraban en su mayoría la ocurrencia de aditividad, esa revisión encontró que había un número importante de sinergismos detectados, especialmente en el caso de los insecticidas que alteraban la actividad de enzimas involucradas en los caminos de detoxificación de alguno/s de ellos. Thompson (1996) advierte que eran muy pocos los trabajos que evaluaban concentraciones de relevancia ambiental, y que la modalidad de las acciones conjuntas de los plaguicidas puede ser dependiente de las concentraciones individuales que se combinan. En ese sentido, Backhaus (2004) observa que para algunas sustancias existe un efecto estimulador a bajas concentraciones, uno de los posibles casos del fenómeno conocido como *hormesis*. La hormesis es un tipo de respuesta que no sigue la típica curva monofásica de respuesta sigmoideal (Nweke & Ogbonna, 2017) (Fig. 7). Un comportamiento de hormesis en una o más de las sustancias combinadas puede alterar la modalidad de acción conjunta que se hipotetiza *a-priori*, pudiendo observarse antagonismo, aditividad o sinergismo dependiendo de las concentraciones individuales ensayadas.

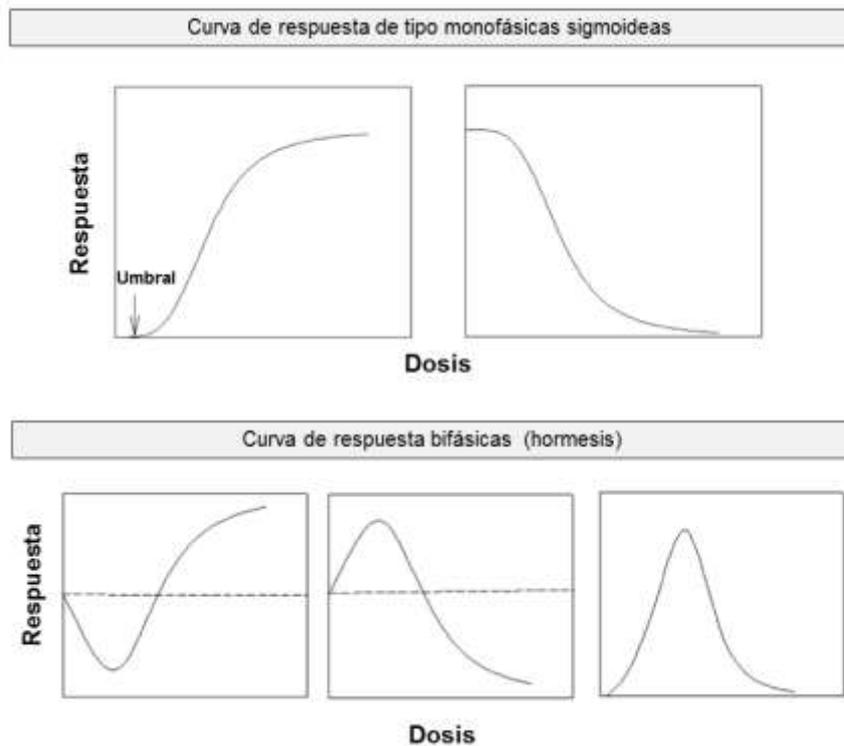


Fig. 7: Tipo de respuestas a un contaminante. Adaptado de Nweke & Ogbonna, 2017.

Si bien caracterizar experimentalmente los efectos de todas las combinaciones posibles de plaguicidas es en la práctica imposible de realizar, sumado a la complejidad de los numerosos ecosistemas donde pueden actuar, el hecho de que los plaguicidas sean utilizados en forma combinada presupone una situación particular que debe ser abordada por la comunidad científica para optimizar las estimaciones de los niveles máximos seguros de cada contaminante en cada escenario ecosistémico.

V. Estudios ecotoxicológicos y aproximaciones experimentales

En general, la mayor parte de los estudios publicados sobre la toxicidad acuática de los plaguicidas fueron realizados utilizando ensayos mono-específicos, examinando sólo ingredientes activos bajo condiciones controladas de laboratorio. Estas condiciones brindan reproducibilidad de los resultados obtenidos, reduciendo costos y tiempo, pero limitan la posibilidad de extrapolación de los resultados a escenarios realistas de exposición ambiental, disminuyendo la capacidad explicativa y predictiva de los mismos.

V.1. Condiciones controladas de laboratorio vs. sistemas al aire libre – Cuestiones relacionadas a las dimensiones de las unidades experimentales.

En general, el diseño experimental denominado “condiciones controladas de laboratorio” para los ensayos con comunidades acuáticas, implica que las cámaras de cultivo poseen fotoperiodos con luz/oscuridad con o sin gradiente, temperatura constante y varía el volumen de la unidad experimental (UE) y la presencia o no de agitación para mezclar y manipular la estratificación vertical. En el caso particular de los ensayos que utilizan una única especie o si incluyen comunidades fitoplanctónicas, estos aspectos si bien estandarizan y favorecen la reproducibilidad, alejan significativamente el escenario de experimentación de las condiciones naturales. Las condiciones experimentales pueden modificar no sólo la sensibilidad particular de un individuo/población, sino las relaciones inter-específicas, subestimando o sobreestimando los impactos. Por ejemplo, en la naturaleza las distintas poblaciones del fitoplancton ocupan distintas ubicaciones en la columna de agua, especialmente como resultado del gradiente lumínico. La falta de estratificación vertical lumínica puede aumentar la competencia inter-específica como consecuencia de la falta de partición del hábitat. En este sentido, el volumen de los recipientes utilizados es muy importante. La diferencia entre distintos volúmenes utilizados dependerá de las comunidades presentes y su complejidad. En general, lo que se considera *microcosmos* y *mesocosmos* en cuanto al volumen dependerá de los autores y es muy variable (Caquet et al. 2000). Si bien es más frecuente la utilización de microcosmos en condiciones controladas de laboratorio y de mesocosmos al aire libre, no existe exclusión ya que, por ejemplo, es posible utilizar grandes volúmenes en condiciones controladas así como también microvolúmenes en condiciones de aire libre. En esta tesis diferenciaremos microcosmos de mesocosmos teniendo en cuenta la complejidad de las comunidades presentes en uno u otro sistema y su estabilidad en el tiempo. Los microcosmos serán entonces recipientes con menor complejidad biológica que serán estables por menor tiempo, mientras que los mesocosmos abarcarán mayor complejidad de comunidades y mayor estabilidad. En esta visión experimental Lalli (1990) caracterizó a los mesocosmos como aquellos que poseen un tamaño que permite la toma de muestras y mediciones sin alterar profundamente la estructura y dinámica del sistema.

El uso de sistemas experimentales más realistas que las condiciones controladas de laboratorio no está exento de desafíos. La utilización de micro- y mesocosmos al aire libre dificulta la reproducibilidad, dado que las variables climáticas serán propias de cada experimento (temperatura, precipitaciones, irradiación, etc.) pudiendo alterar diferencialmente a las unidades experimentales, así como también por la posibilidad de llegada y colonización de organismos de manera diferencial. Además, en los trabajos al aire libre, como consecuencia de su complejidad y desafíos logísticos y operacionales, el número de réplicas es limitado, generalmente no superando las 3 o 4 unidades experimentales por tratamiento (Kennedy et al. 1999). En general, estos hechos tienen como consecuencia un aumento considerable de la varianza dentro de los grupos experimentales. A su vez, un aumento de la relación varianza/media puede restringir la posibilidad de encontrar significancias estadísticas aun cuando exista alta significancia biológica en las diferencias entre las unidades experimentales tratadas. Sin embargo, las condiciones no controladas aumentan considerablemente la capacidad explicativa y predictiva de los resultados obtenidos experimentalmente y su extrapolación a las condiciones naturales (Fig. 8).



Fig. 8: Resumen de aproximaciones en estudios ecotoxicológicos. Adaptado de Caquet et al. (2000).

V.2. Ensayos mono-específicos vs. ensayos con comunidades

Los ensayos mono-específicos son realizados, en general, sobre una única especie modelo, ignorando así la variabilidad natural de sensibilidad que existe en otras especies dentro del mismo grupo taxonómico (e.g. género, orden, etc.). Por ejemplo, la utilización del cladóceros planctónico *Daphnia magna* en ensayos ecotoxicológicos presupone que su sensibilidad se corresponde a la de todos los cladóceros y/o crustáceos planctónicos y la fracción zooplanctónica en general. En este sentido, un trabajo reciente de Huaraca et al. (2020) muestra una sensibilidad diferencial, medida como CL50, en tres especies de crustáceos (*Daphnia magna*, *Tisbe longicornis* y *Emerita analoga*) expuestos a un formulado comercial de glifosato. Sumado a que, en la búsqueda de reproducibilidad experimental, se utilizan individuos criados en laboratorio durante muchas generaciones, lo que genera mucha homogeneidad intra-poblacional. Esto lleva a posibles sobre y sub-estimaciones de la sensibilidad de un taxón en condiciones naturales. Por otro lado, la utilización de especies modelo como *Chlorella vulgaris* (Algae), *Daphnia Magna* (Crustacea), *Danio rerio* (Pisces) y *Xenopus Laevis* (Amphibia), pudiendo ser nativas pero no representativas en el ecosistema, dificulta la utilización de los resultados ecotoxicológicos obtenidos para predecir los efectos que la contaminación por un plaguicida puede producir en un ambiente en particular.

Los ensayos donde se examinan las especies separadamente pasan por alto la existencia fundamental de las interacciones ecológicas dentro de una misma comunidad incluídas las relaciones tróficas del ecosistema. Además de la propia competencia intrapoblacional, dentro de una comunidad los organismos de distintas especies compiten por los recursos. La competencia es una interacción fundamental en la determinación de la estructura de la comunidad presente en un lugar y momento específicos. Las características de las distintas especies de una comunidad así como los recursos y las condiciones condicionan las abundancias totales y relativas de las especies presentes (Relyea & Hoverman, 2006). La competencia y los efectos de tipo *bottom-up* (efecto cascada desde la base hacia arriba de la trama trófica) y *top-down* (desde arriba hacia abajo) son difícilmente predecibles a partir de ensayos mono-específicos, y sin embargo son observados muy frecuentemente en estudios ecotoxicológicos más complejos (Fleeguer et al. 2003). Existen dificultades respecto a la utilización de ensayos multi-específicos en

la predicción de los efectos de plaguicidas. ¿Cuántas especies y cuántos ensamblajes son suficientes? (Crane, 1997). Una aproximación posible es el de la selección de comunidades provenientes del sitio a estudiar que favorece la observación de los fenómenos a escala comunitaria y ecosistémicos de tipo indirectos (Wendt-Rasch et al. 2003).

V.3. Principios activos vs formulados comerciales

Al evaluar los principios activos puros queda la incertidumbre sobre la posible toxicidad de los coadyuvantes presentes en los formulados comerciales, y la interacción que pudieran tener éstos, por ejemplo, con el principio activo aumentando o disminuyendo su peligrosidad (Mullin et al. 2016). Considerados tradicionalmente como componentes inertes de los formulados, en los últimos años esta idea comienza a ser cuestionada a través de trabajos que muestran claramente que la presencia de ingredientes “inactivos” en los productos plaguicidas comerciales puede modificar la toxicidad del principio activo, al menos en algunos casos aumentándola (Mesnage & Antoniou, 2018). En relación a esto, los departamentos de investigación y desarrollo de la industria agroquímica buscan aprovechar las propiedades estabilizadoras y potenciadoras de los ingredientes “inactivos” para optimizar la capacidad de control contra las plagas o malezas que se buscan controlar, muchas veces incrementando la absorción del principio activo a través de la cutícula de insectos, la superficie de parásitos, la pared celular de vegetales, etc.

Sumado a esto, en el caso particular de algunos principios activos que son sintetizados en forma de sales para aumentar su solubilidad en agua, como es el caso del glifosato y del 2,4-D, hay evidencia de que las distintas sales de un mismo principio activo pueden diferir en su perfil toxicológico presentando niveles de solubilidad muy distintos, y que la parte sal en sí misma puede ser más tóxica para ciertas especies que el principio activo (Lipok et al. 2010). Un caso particularmente interesante es el de las distintas sales de 2,4-D, donde, si bien las distintas formas en las que se puede encontrar en los formulados (dimetilamina, ésteres, 2-etilhexil éster y ácido) parecen tener toxicidad similar (Charles et al. 1996), la alta volatilidad de las preparaciones de tipo éster de 2,4-D produce una mayor deriva ambiental (Groover et al. 1972). Esto último tuvo como implicancia la reciente

prohibición de la aplicación de los ésteres butílicos en algunas provincias de nuestro país¹.

Si bien los experimentos utilizando los principios activos son necesarios y brindan información muy útil sobre los mecanismos de toxicidad de los formulados comerciales, se debe continuar complementándolos con estudios donde se pongan a prueba los productos reales que son utilizados en el campo. Como se desarrolló arriba, la extrapolación de los resultados de los ensayos realizados con los principios activos ignora la toxicidad particular de los coadyuvantes y sales, así como la interacción de éstos con el principio activo, que puede modificar su toxicidad (Pereira et al. 2009, Cuhra et al. 2013, Mansano et al. 2016) y/o de sus propiedades físico-químicas que determinan su deriva ambiental.

El glifosato ha sido uno de los herbicidas más utilizados durante más de 20 años a nivel mundial y, en consecuencia, el crecimiento casi exponencial de las aplicaciones y del territorio tratado fue acompañado de la aparición y dispersión de numerosas especies de malezas resistentes (Bonny, 2016). Para superar los desafíos agronómicos que impone dicha resistencia, la alternativa de manejo que propuso la industria agroquímica fue, además de la intensificación en dosis de cada herbicida, su utilización combinada, especialmente mezclando aquellos que poseen distintos modos de acción (Shaw & Arnold, 2002). En este sentido actualmente hay promoción de paquetes tecnológicos que incluyen al glifosato mezclado con glufosinato de amonio, con dicamba o con 2,4-D, entre otros, existiendo diversos formulados comerciales de esta última combinación como Mestizo[®], Campaign[®] y EndList[®].

En esta tesis doctoral se propuso analizar el efecto conjunto de los dos herbicidas más utilizados en Argentina, el glifosato y el 2,4-D, y predecir su impacto sobre los cuerpos de agua insertos en el paisaje agrícola. Para esto se realizaron dos principales aproximaciones: microcosmos en condiciones controladas de laboratorio y mesocosmos al aire libre. Se examinaron, además, los

¹ <http://www.desab.com.ar/wp-content/uploads/2017/07/PROHIBICION-2.4D-ESTER-CBA-BSAS-LP-SF.pdf>

principios activos y los formulados comerciales, seleccionando esquemas de exposición a concentraciones únicas de relevancia ambiental y proporciones de los ingredientes activos comparables a las recomendadas a nivel agronómico.

Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue estudiar los impactos en el agua dulce, de los principios activos, algunos formulados comerciales y el efecto mezcla del glifosato y el 2,4-D, dos de los herbicidas más utilizados en la agricultura industrial en Argentina. Dichos impactos se estudiaron a través del análisis de los cambios en la estructura de las comunidades del bacterioplancton, fitoplancton y perifiton en relación al medio abiótico. Además, se analizaron cambios funcionales a través del estudio de la concentración de oxígeno disuelto en el agua y de la producción primaria fitoplanctónica.

Objetivos específicos

Dado que los estudios vinculados a los efectos del glifosato y algunos de sus formulados comerciales, sobre los ecosistemas acuáticos de agua dulce en Argentina son más abundantes que los referidos al 2,4-D, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

Estudios estructurales:

- a. *Mediante microcosmos en condiciones controladas de laboratorio:*
 - Evaluar el impacto de un rango amplio de concentraciones de 2,4-D (formulado comercial) sobre las comunidades del micro+nano fitoplancton, picoplancton autotrófico (picoeucariotas, picocianobacterias) y bacterioplancton de sistemas en estados contrastantes de turbidez (claro y turbio-orgánico) (Capítulo I).

Considerando que el fitoplancton y que la fracción algal del perifiton son los componentes microbianos productores más importantes en los sistemas de agua dulce lénticos y considerando que son organismos autótrofos susceptibles a la toxicidad de los herbicidas:

- Estudiar el impacto de la mezcla de los principios activos y formulados comerciales del glifosato y 2,4-D sobre la comunidad fitoplanctónica y la fracción algal del perifiton (Capítulo II).

b. *Mediante mesocosmos al aire libre:*

- Evaluar los impactos de la mezcla de formulados comerciales de glifosato y 2,4-D en variables estructurales (variables físicas y químicas, abundancias de las fracciones micro+nano y pico-planctónicas, variables de masa del perifiton y abundancias de la fracción algal perifítica) a partir de sistemas en estados claro y turbio-orgánico (Capítulo III).

Estudios funcionales:

- Estudiar la dinámica de las variables funcionales oxígeno disuelto y producción primaria del fitoplancton luego de la exposición a formulados comerciales de glifosato, 2,4-D y su mezcla en mesocosmos al aire libre (Capítulo IV).

Hipótesis generales

H1: El impacto del 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autotrófica en el agua dulce depende de la concentración de herbicida aplicada.

H2: El impacto del herbicida 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autotrófica depende de la condición inicial de turbidez del sistema.

H3: En escenarios de mezcla de glifosato y 2,4-D (en las proporciones recomendadas por las prácticas agronómicas vigentes en Argentina), el efecto del

glifosato es mayor que el del 2,4-D sobre la estructura y el funcionamiento de las comunidades microbianas de agua dulce.

H4: *La mezcla de los herbicidas 2,4-D y glifosato (en las proporciones recomendadas) se comporta siempre de manera aditiva (suma algebraica de efectos independientes) sobre las variables biológicas en el agua dulce.*

H5: *Los cambios estructurales sobre las comunidades microbianas de agua dulce producto del efecto de los herbicidas glifosato, 2,4-D y su mezcla, provocan cambios en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos.*

H6: *Los ensayos en microcosmos y mesocosmos al aire libre brindan información ecotoxicológica diferente.*

Capítulo I:
***Impacto del 2,4-D en aguas claras y
turbias: aproximación en
microcosmos***

Introducción

Los herbicidas de tipo auxínicos perturban los procesos de crecimiento celular de las plantas debido a que poseen estructuras moleculares y actividad biológica similar a la de las auxinas naturales. El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida de tipo auxínico que inhibe el desarrollo de la planta a través del sobre crecimiento de las células asociadas a los haces vasculares (Song, 2014). El 2,4-D puede tener un tipo de impacto hormético (i.e. presentan hormesis) sobre la fracción algal, caracterizado por una estimulación del crecimiento a bajas concentraciones y una inhibición a altas concentraciones (Wong, 2000). Las propiedades auxínicas del 2,4-D y la existencia de rutas metabólicas auxínicas primitivas en las algas es una posible razón de este interesante fenómeno (Žižková et al. 2016).

El objetivo general de este primer capítulo fue evaluar el impacto de un formulado comercial de 2,4-D (AsiMax 50[®]) sobre las comunidades microbianas de dos cuerpos de agua en estado contrastante de turbidez.

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar el efecto de un rango amplio de concentraciones del i.a. 2,4-D en AsiMax 50[®], sobre las abundancias de micro+nano fitoplancton, el picoplancton autotrófico y las bacterias heterotróficas.

2. Evaluar la importancia del estado de turbidez orgánica sobre los efectos del 2,4-D sobre las comunidades microbianas mencionadas.

Las hipótesis puestas a prueba correspondieron a las 2 primeras hipótesis generales de la tesis:

H1: *El impacto del herbicida 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autotrófica en el agua dulce depende de la concentración aplicada.*

H2: *El impacto del herbicida 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autotrófica depende de la condición inicial de turbidez del sistema.*

Para los objetivos planteados y la puesta a prueba de las hipótesis se desarrolló un experimento manipulativo en microcosmos de 500 mL en condiciones controladas de laboratorio.

Materiales y Métodos

Se llenaron Erlenmeyers de 500 mL con agua proveniente de dos sistemas en estado contrastante de turbidez orgánica (claro y turbio) sin previa exposición al herbicida (unidades experimentales). Se tomó agua de dos estanques, conteniendo cada uno sistemas acuáticos naturales, ubicados en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. El sistema seleccionado como “claro” poseía concentración de clorofila α de 7,6 $\mu\text{g/L}$ y turbidez de 1 NTU, mientras que en el sistema “turbio” dichas condiciones fueron de 25,0 $\mu\text{g/L}$ y 9 NTU respectivamente. La cámara de cultivo utilizada fue programada con un fotoperíodo de 12H:12H, temperatura constante de 25°C y agitación permanente. Las unidades experimentales se dispusieron aleatoriamente en la cámara de cultivo y luego de tres días de incubación para la adaptación y estabilización a las condiciones controladas de laboratorio, se asignaron y aplicaron los tratamientos al azar sobre las unidades experimentales turbio y claro: control (sin herbicidas), 0,02, 0,2, 2, 20, 200 y 2.000 mg/L de ingrediente activo de 2,4-D utilizando el formulado comercial AsiMax 50[®] (602 g de sal dimetilamina/L, 500 g de equivalente ácido de 2,4-D/L)². Los tratamientos fueron realizados por triplicado y el período de exposición tuvo una duración de 7 días (Fig. 1).

² <https://www.chemotecnica.com/asimax50>

del experimento (Tf, 7 días) la turbidez volvió a ser medida justo antes del procesamiento de las muestras.

Variables biológicas

La concentración de **clorofila α** , estimadora de biomasa autotrófica, se determinó a través del método espectrofotométrico: 200 mL de muestra fueron filtrados a través de filtros Whatman® GF/F en oscuridad y preservados a -20°C. La extracción de los pigmentos se realizó con acetona, dejando actuar el solvente toda la noche en oscuridad a 4°C. Finalmente, la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 3.000 rpm, midiéndose la absorbancia a 665 y 750 nm antes y luego de acidificar con HCl 1 N, la concentración fue estimada siguiendo Lilchenthaler & Wellburn (1983).

Para el recuento del **micro+nano fitoplancton**, se fijaron muestras de 200 mL utilizando Lugol acidificado al 1% con ácido acético glacial y preservándose en cámara fría (4°C). Luego se utilizó microscopio invertido siguiendo la técnica de Utermöhl (1958), distinguiendo el máximo nivel taxonómico posible. Además, se realizó la diferenciación entre organismos vivos y muertos, considerándose vivos los individuos que presentaban intactos los cloroplastos y la pared celular o los frústulos en el caso de diatomeas. El error del recuento fue estimado según Venrick (1978), aceptándose un máximo de 20% para la especie más abundante. Se calcularon la riqueza específica (S), como el número total de especies; el índice de diversidad de Simpson calculado como 1-D (Magurran, 2013):

$$D = \sum \left(\frac{ni[ni - 1]}{N[N - 1]} \right)$$

donde ni = número de individuos pertenecientes a la especie i y N es el número total de individuos.

Además, se calculó la equitatividad como:

$$E \left[\frac{1}{D} \right] = \frac{\left(\frac{1}{D} \right)}{S}$$

Para el estudio de las poblaciones de la **fracción del picoplancton autotrófico**, así como para la **fracción del bacterioplancton** se utilizó citometría

de flujo mediante citómetro FACS Aria II[®]. Por ser un método indirecto de recuento utilizando comunidades naturales, las poblaciones determinadas por esta técnica deben considerarse poblaciones citométricas (Olson et al. 1989). Las muestras extraídas fueron fijadas con glutaraldehído al 1% y preservadas a -80°C. Antes de ser analizadas por el citómetro, un volumen conocido de *beads* (1 µm de diámetro, Fluospheres[®]) fue añadido a las muestras descongeladas. En el caso de la muestra de bacterias, 5 minutos antes del pasaje por el citómetro una tinción adicional fue realizada con SYBR Green I[®] (Sigma Aldrich[®]) utilizando una concentración final de 1X. La fracción correspondiente al pico-fitoplancton fue determinada y estudiada a través de la autofluorescencia de sus pigmentos utilizando el canal FL3 (PERCP) en el caso de la clorofila, el canal FL2 (PE) en el caso de la ficoeritrina y el canal FL4 (APC) para la ficocianina. Para las bacterias se utilizó el canal FL1 correspondiente a la fluorescencia del SYBR Green I[®]. Para ambos tipos de citogramas se utilizó el eje correspondiente a SSC (*side scatter*) para la determinación de las nubes de eventos correspondientes a cada fracción. Luego de pruebas preliminares, una dilución previa con PBS (1:10) fue necesaria para realizar el recuento de bacterias de los microcosmos en estado turbio. Toda la metodología referente a la citometría se basó en Gasol et al. (1999) y Gasol & Del Giorgio (2000).

Análisis numérico y estadístico

Previa evaluación de los supuestos de homocedacea y normalidad mediante los test de Levene y Kolmogorov-Smirnov respectivamente, el análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA de un factor (tratamiento): concentración de herbicida, con 7 niveles (control, 0,02, 0,2, 2, 20, 200 y 2.000 mg/L) con comparaciones múltiples. Los resultados estadísticos descriptivos e inferenciales que se informan corresponden a las comparaciones entre las UEs tratadas con 2,4-D y el sistema de microcosmos control. En el caso que los supuestos no fueran cumplidos se realizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis). Se utilizó el software SigmaPlot[®] v.11. Con el objetivo de estudiar las relaciones entre los taxones expuestos a AsiMax 50[®] en condiciones claras y turbias, se construyeron redes de correlación utilizando el coeficiente de Pearson para las abundancias de los organismos vivos de las especies del micro+nano fitoplancton en todos los tiempos. Los coeficientes de correlación de Pearson se obtuvieron utilizando

InfoStat® y se graficaron como redes de correlación en Cytoscape® (Shannon et al. 2003).

Resultados

El estudio de la turbidez a tiempo inicial arrojó valores medios de $1,10 \pm 0,30$ NTU y $9,29 \pm 0,85$ NTU (media ± 1 DE) para los microcosmos claros y turbios respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre las unidades experimentales del sistema claro (KW, $p=0,511$), como así tampoco para el sistema turbio (KW, $p=0,199$).

A tiempo final, los microcosmos del sistema claro no presentaron diferencias respecto a la turbidez entre los tratamientos, estabilizándose todos en 1 NTU, mientras que en el sistema turbio se encontraron disminuciones significativas del 29, 41 and 45% respecto de los controles en los tratamientos 20, 200 y 2.000 mg/L respectivamente (ANOVA, $p<0,001$).

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	
	CLARO	TURBIO
Control	<LD	<LD
0,02	$0,02 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
0,2	$0,20 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,02$
2	$1,93 \pm 0,04$	$2,02 \pm 0,29$
20	$19,25 \pm 0,59$	$21,94 \pm 1,17$
200	193 ± 11	238 ± 79
2.000	1.911 ± 58	2.133 ± 351

Tabla 1. Concentraciones promedio (± 1 DE) reales de 2,4-D medidas al inicio del experimento (T1) para cada tratamiento y cada tipo de microcosmos. LD = límite de detección (0,3 $\mu\text{g/L}$).

A tiempo final, las máximas concentraciones de clorofila α fueron detectadas en el tratamiento de 2 mg/L para ambas condiciones, con 7,62 and 101,24 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, mientras que los valores más bajos se encontraron para el tratamiento de 2.000 mg/L con 1,09 y 38,10 $\mu\text{g/L}$ (Fig. 2). Las disminuciones en el tratamiento de mayor concentración correspondientes a 2.000 mg/L fueron estadísticamente significativas respecto del control, 36,7% menor en el sistema turbio (ANOVA; $p=0,006$) y 76,9% menor en el sistema claro (ANOVA, $p<0,001$).

Micro+nano fitoplancton (>2 µm)

La Tabla 2 muestra la lista de las especies de la fracción micro+nano fitoplanctónica para los sistemas claros y turbios. Chlorophyta fue siempre el grupo más importante, tanto en riqueza como en abundancia. En condiciones claras y considerando T0 y Tf, este grupo representó el 71% de la abundancia total de esta fracción, seguido de Dinophyceae (12,1%), Bacillariophyceae (8,86%), Crysophyceae (7,8%) y Cryptophyceae (0,2%).

En el sistema claro a T0, Chlorophyta representó el 38,8% de la abundancia total mientras que a Tf, este grupo mostró aumentos significativos en la abundancia entre los tratamientos AsiMax 50[®] y el control (ANOVA, $p < 0,001$), excepto para el tratamiento de 2.000 mg/L, donde los porcentajes de todos los grupos fueron similares a los de T0. En el sistema turbio, Chlorophyta dominó en riqueza y abundancia (97,5%), seguido por Crysophyceae (1,2%), Cyanobacteria (0,8%) y Dinophyceae (0,6%). En el sistema turbio a T0, Chlorophyta representó el 95,7% de la abundancia total y se observó un aumento significativo a Tf (ANOVA $p = 0,046$), con un valor promedio de 97,7% para todos los tratamientos.

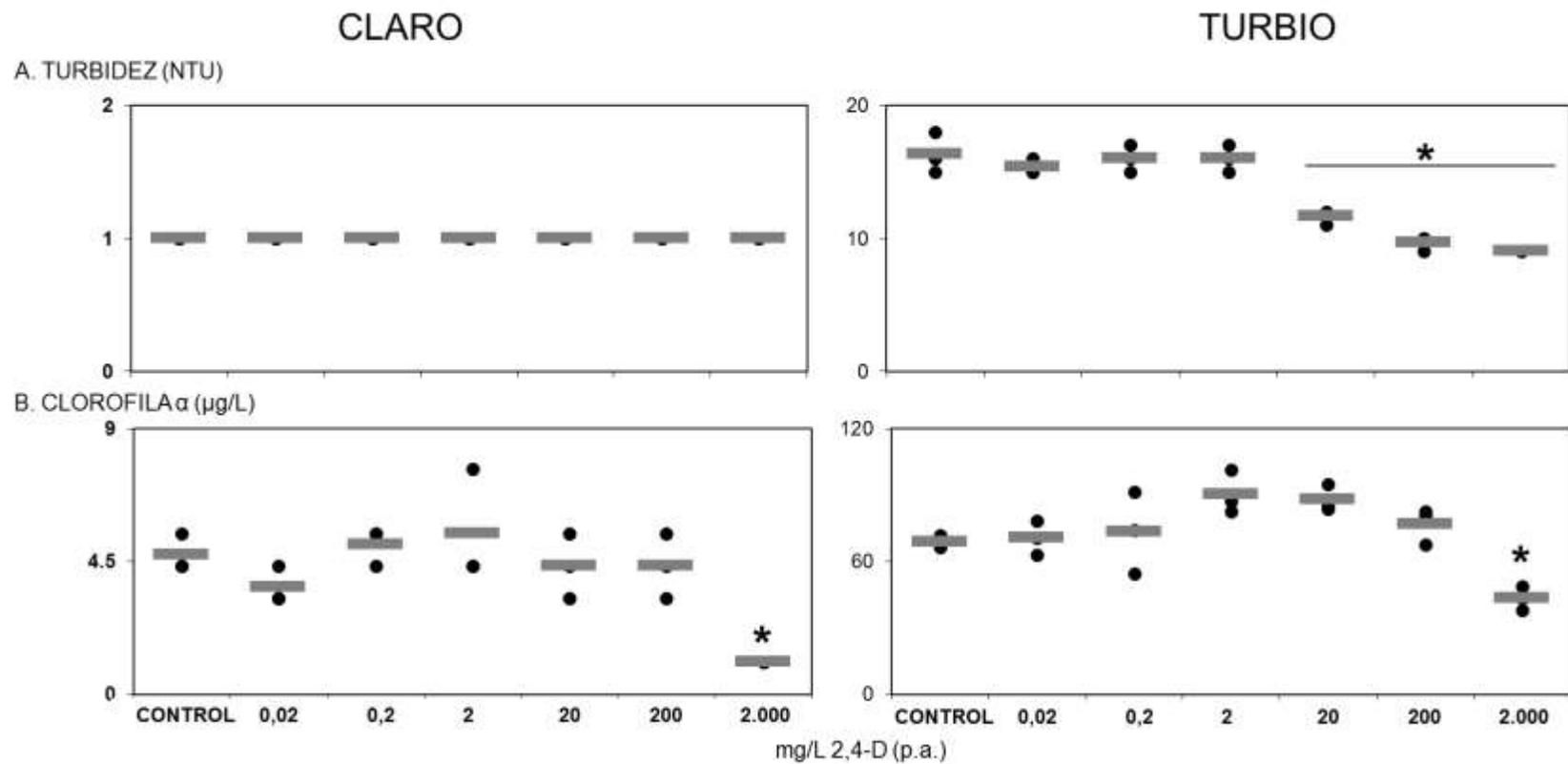


Fig. 2: Turbidez (A) y concentración de clorofila α (B) a tiempo final (7 días) en microcosmos en estado claro y turbio tratados con concentraciones crecientes del formulado comercial AsiMax 50[®]. Barra horizontal: media; cada punto corresponde al valor obtenido en una réplica. (*): diferencias significativas respecto al control (ANOVA, $p < 0,05$).

Grupo	CLARO	TURBIO
Cyanobacteria		<i>Leptolyngbya</i> sp.
Chlorophyta	<i>Choricystis</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Coelastrum microporum</i> <i>Lagerheimia ciliata</i> <i>Oedogonium</i> sp. <i>Oocystis solitaria</i> <i>Scenedesmus pulloides</i> <i>Tetraedron mínimum</i> <i>Staurastrum</i> sp.	<i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Tetraedron mínimum</i> <i>Staurastrum</i> sp.
Bacillariophyceae	<i>Achnanthes minutissimum</i> <i>Nitzschia palea</i>	
Dinophyceae	<i>Peridinium</i> sp.	<i>Peridinium</i> sp.
Cryptophyceae	<i>Cryptomonas erosa</i>	
Chrysophyceae	<i>Ochromonas</i> sp.	<i>Ochromonas</i> sp.

Tabla 2. Especies por grupo del micro+nano fitoplancton determinadas en las unidades experimentales de ambos sistemas.

En el sistema claro, la abundancia total promedio (± 1 DE) de micro+nano fitoplancton a T0 fue de 2.324 ± 352 ind/mL, con 61,5% de organismos vivos (Fig. 3A). A Tf, la abundancia total media para el control fue aproximadamente 5 veces mayor que a T0 (ANOVA, $p=0,003$); no se encontró efecto del AsiMax 50[®] en la abundancia total. En el sistema turbio, la abundancia total promedio (± 1 DE) de micro+ nano fitoplancton a T0 fue de 663.603 ± 40.174 ind/mL, con 90,2% de organismos vivos (Fig. 3B). A Tf, no se registró cambio significativo para el control entre T0 y Tf. Además, los tratamientos de 0,02; 0,2; 2 y 20 mg/mL llevaron a un aumento significativo en la abundancia total en comparación con el control (ANOVA, $p<0,001$, $p=0,003$, $p<0,001$ y $p<0,001$, respectivamente). Por otro lado, los tratamientos con 200 y 2.000 mg/L no difirieron significativamente en las abundancias totales de organismos vivos con respecto al control. Tanto para los sistemas claros como para los turbios, los datos de la abundancia de organismos vivos a Tf se ajustaron a curvas polinómicas de segundo orden de todos los tratamientos con herbicidas (Fig. 4). Su análisis muestra que existió un mejor ajuste a una curva en forma de joroba (*humped*) para el sistema turbio ($R^2=0,64$) en comparación con el sistema claro ($R^2 = 0,40$).

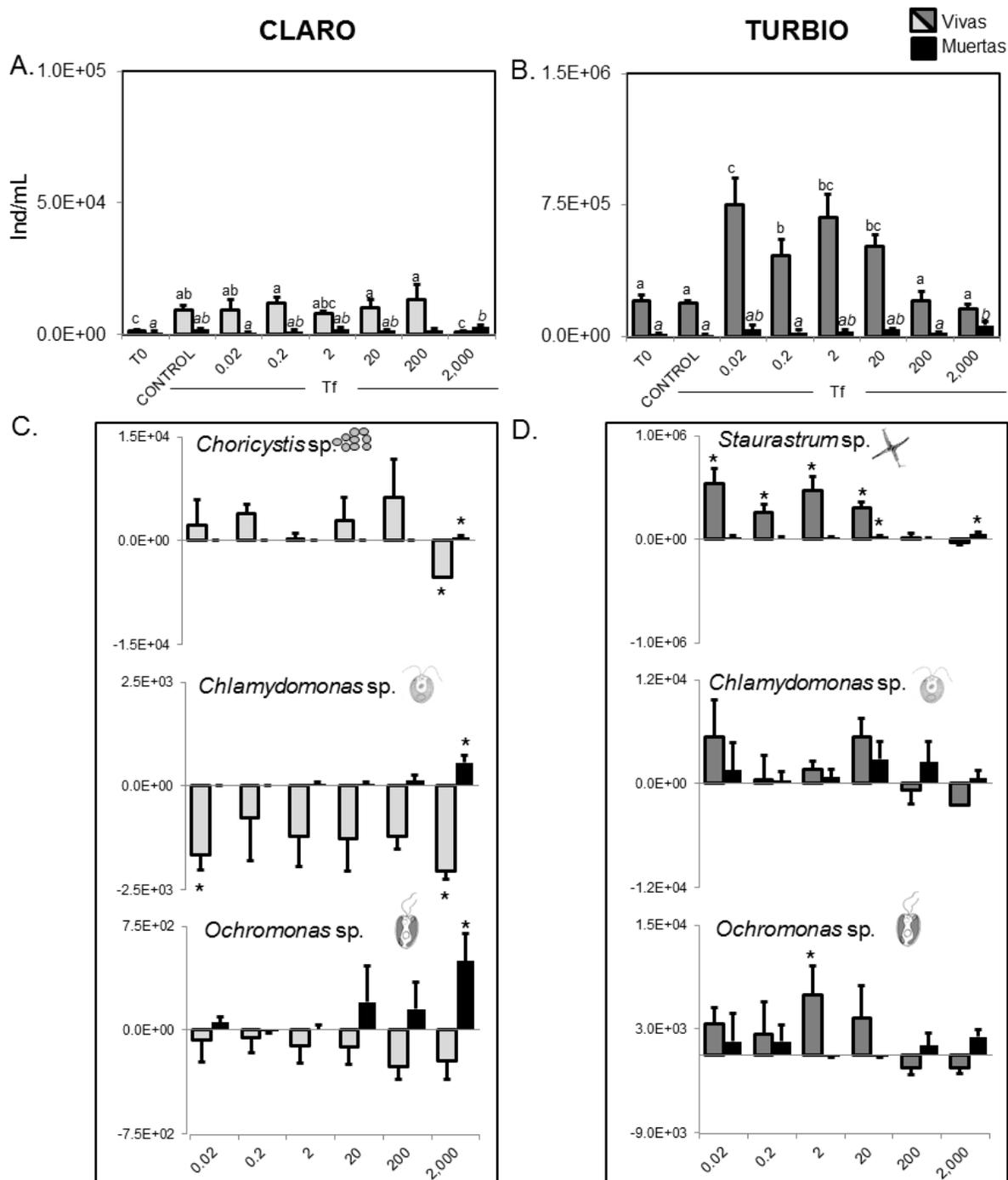


Fig. 3: Diferencia promedio (± 1 DE) en abundancias totales de organismos vivos y muertos a T0 y Tf con respecto al control del micro+nano fitoplancton en relación a las concentraciones de 2,4-D en forma de AsiMax 50[®] ensayadas ($p < 0,05$). A) sistema claro y B) sistema turbio. Los resultados de ANOVA de un factor en combinación con prueba de comparaciones múltiples de Tukey se muestran en letras para abundancias vivas (normal) y muertas (cursivas); letras diferentes indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

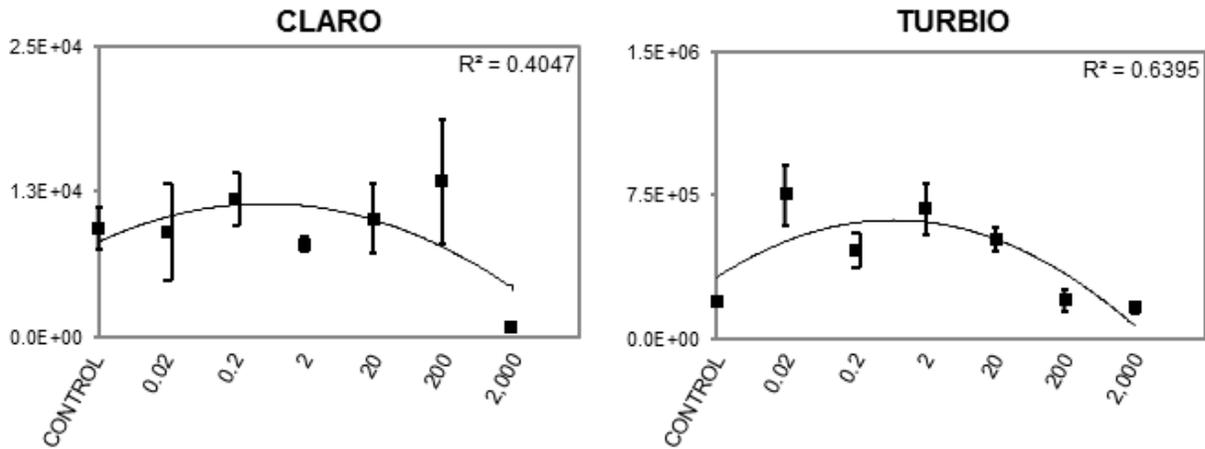


Fig. 4: Ajuste de las abundancias a curvas polinómicas de segundo orden para el sistema claro y turbio. En el eje y se muestran las abundancias totales (ind/mL) y en el eje x los tratamientos (mg/L de i.a. 2,4-D). En la parte superior derecha se presentan los valores de R^2 .

Los valores de la abundancia total de organismos vivos del micro+nano fitoplancton mencionados anteriormente parecen estar en concordancia con las variaciones en la abundancia de las especies más numerosas para cada tipo de sistema. En el sistema claro, *Choricystis* sp. fue dominante en todos los tratamientos, seguido de *Chlamydomonas* sp. y *Ochromonas* sp. A Tf, la abundancia de organismos vivos de *Choricystis* sp. mostró disminución significativa con respecto al control (ANOVA, $p=0,047$), con un aumento significativo en la abundancia de los organismos muertos (ANOVA, $p<0,001$) (Fig. 3C). Además, a Tf se encontró un aumento significativo en la abundancia de organismos muertos para *Chlamydomonas* sp. y *Ochromonas* sp. en el tratamiento de 2.000 mg/L (ANOVA, $p<0,001$ y $p<0,001$, respectivamente). En el sistema turbio, *Staurastrum* sp. mostró el valor más alto de abundancia de organismos vivos, con incrementos significativos en los tratamientos de 0,02; 0,2; 2 y 20 mg/L (Fig. 3D) encontrándose un aumento significativo en la abundancia de los organismos muertos en el tratamiento con 2.000 mg/L (ANOVA, $p<0,001$). Esta especie fue seguida en abundancia por *Chlamydomonas* sp. y *Ochromonas* sp., cuyas abundancias de organismos vivos y muertos no mostraron una tendencia clara en relación a la contaminación con el herbicida (Fig. 3D). En resumen, en el sistema claro, la fracción micro+nano fitoplanctónica mostró la mayor diferencia en la composición entre el control y el tratamiento de 2.000 mg/L, mientras

que en el sistema turbio su composición cualitativa y cuantitativa en los tratamientos de 200 y 2.000 mg/L fue similar a la del control.

Para estudiar las relaciones entre los taxones expuestos a AsiMax 50[®] en condiciones claras y turbias, se construyeron redes de correlación utilizando el coeficiente de Pearson para las abundancias de los organismos vivos de las especies, (Fig. 5). Las redes incluyeron 10 y 7 especies para los sistemas claros y turbios, respectivamente, eliminándose del análisis aquellas especies consideradas raras (aparición en menos de 5 UEs). Los taxones se interrelacionaron más con coeficientes positivos y con mayores valores de significancia en el sistema turbio (media r Pearson = 0,62) que en el sistema claro (media r = 0,56). Como ya fue mencionado, algunas especies estaban presentes en ambas comunidades (*Chlamydomonas* sp., *Staurastrum* sp., *Ochromonas* sp., *Tetraedron minimum* y *Peridinium* sp.). Sin embargo, se observó que respondieron de forma diferente al tratamiento con AsiMax 50[®] dependiendo de la turbidez original ensayada. *Chlamydomonas* sp. se vio afectada negativamente en el sistema claro pero no en el turbio (Fig. 3 C y D). Observando la red, la abundancia de *Chlamydomonas* sp. se correlacionó de manera positiva y significativa con la especie más abundante, *Staurastrum* sp. (r Pearson=0,60; p =0,002) (Fig. 5). En el sistema claro, no se observó una correlación significativa entre las abundancias de *Chlamydomonas* sp. con ninguna de las especies significativamente estimuladas por el herbicida. En el sistema turbio, *Staurastrum* sp. fue la especie más fuertemente estimulada por AsiMax 50[®] (Fig. 3C) y la que correlacionó más con los taxones subdominantes (Fig. 5). Esta tendencia no se observó en el sistema claro, donde la abundancia de *Staurastrum* sp. no tuvo correlación significativa con la de ninguna otra especie. La abundancia de *Ochromonas* sp. también varió según el tipo de sistema, es decir, su abundancia disminuyó en el sistema claro, mientras que aumentó a bajas concentraciones de 2,4-D y disminuyó a concentraciones más altas en la turbia (Fig. 3C y D). La abundancia de esta especie se correlacionó de manera significativa y positiva con la de *Staurastrum* sp. (r Pearson=0,72; p =0,0001), mientras que no se correlacionó significativamente con la de ninguna otra especie en el sistema claro (Fig. 5).

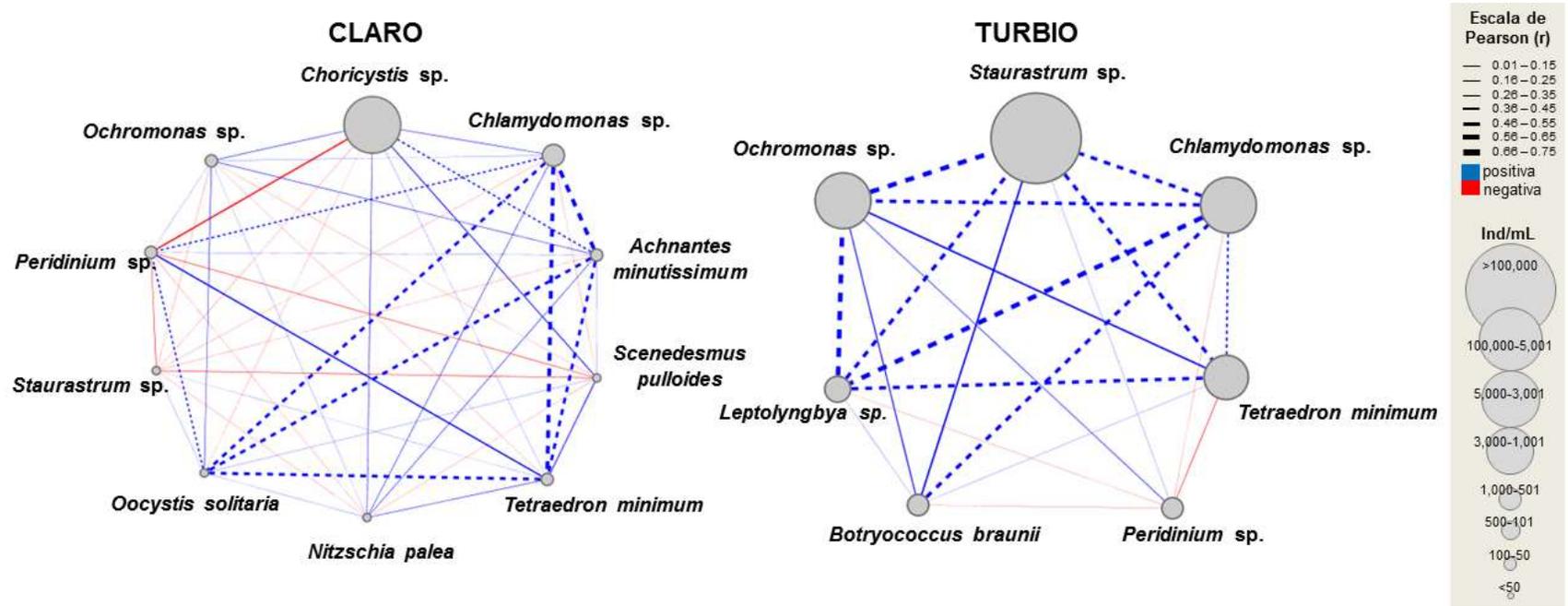


Fig. 5: Redes de correlación entre la abundancia de organismos vivos de las especies de micro+nano fitoplancton para los sistemas claro y turbio. Líneas sólidas: no significativo; líneas punteadas: $p < 0,05$. Las redes se construyeron con el software Cytoscape® v3.7.1.

A T0, los valores promedio de riqueza y diversidad específicas y equitatividad fueron mayores en el sistema claro ($S=7,00 \pm 1,00$, $D=0,74 \pm 0,03$ y $E=0,57 \pm 0,14$) que en el turbio ($S=6,67 \pm 0,58$, $D=0,14 \pm 0,03$ y $E=0,17 \pm 0,01$) (Tabla 3). En general, a Tf, los valores que tomaron estos parámetros fueron similares en las UEs independientemente del tratamiento para ambos tipos de sistemas, con las siguientes excepciones: (a) para el sistema claro, una disminución significativa en la diversidad (D) (ANOVA, $p=0,04$) se observó en el tratamiento de 200 mg/L con respecto al control, con $D=0,29 \pm 0,13$; (b) para el sistema turbio, riqueza (S) y equitatividad (E) disminuyeron significativamente en el tratamiento de 200 mg/L, con $S=3,67 \pm 0,58$ (ANOVA, $p=0,006$) y $E=0,29 \pm 0,05$ (ANOVA, $p=0,041$) y en el tratamiento de 2.000 mg/L, con $S=3,00 \pm 1,00$ (ANOVA, $p<0,001$) y $E=0,38 \pm 0,12$ (ANOVA, $p=0,001$).

	CLARO				TURBIO				
	S máx	S media	Simpson (1-D)	Equitatividad	S máx	S media	Simpson (1-D)	Equitatividad	
Tiempo Inicial	8	7,00	0,74	0,57	7	6,67	0,14	0,17	
Control	11	10,00	0,62	0,27	7	6,00	0,08	0,18	
Tiempo Final	0,02	10	9,00	0,33	0,17	7	6,00	0,08	0,18
	0,2	9	8,67	0,38	0,19	5	4,33	0,06	0,26
	2	10	9,00	0,49	0,23	6	5,67	0,07	0,19
	20	9	8,33	0,36	0,20	6	5,67	0,10	0,20
	200	8	7,33	0,29	0,20	4	3,67	0,05	0,29
	2.000	9	8,00	0,71	0,49	4	3,00	0,04	0,38

Tabla 3. Valores de riqueza (S), diversidad específica (Simpson) y equitatividad para el tiempo inicial (control) y el tiempo final (control + tratamientos) de los sistemas en microcosmos claro y turbio.

Poblaciones citométricas (0,2-2 μ m): picoplancton autotrófico y bacterioplancton.

Los citogramas obtenidos de las muestras del control y los tratamientos con herbicidas recogidos 15 minutos después de la aplicación de los tratamientos y a Tf revelaron cuatro poblaciones citométricas, de las cuales una correspondió a las bacterias y las otras tres a poblaciones autotróficas: pico-eucariotas (PEuk), picocianobacterias ricas en ficocianina (PC-Pcy) y picocianobacterias ricas en

ficoeritrina (PE-Pcy). En las Figs. 6 y 7 se muestran ejemplos de los citogramas obtenidos.

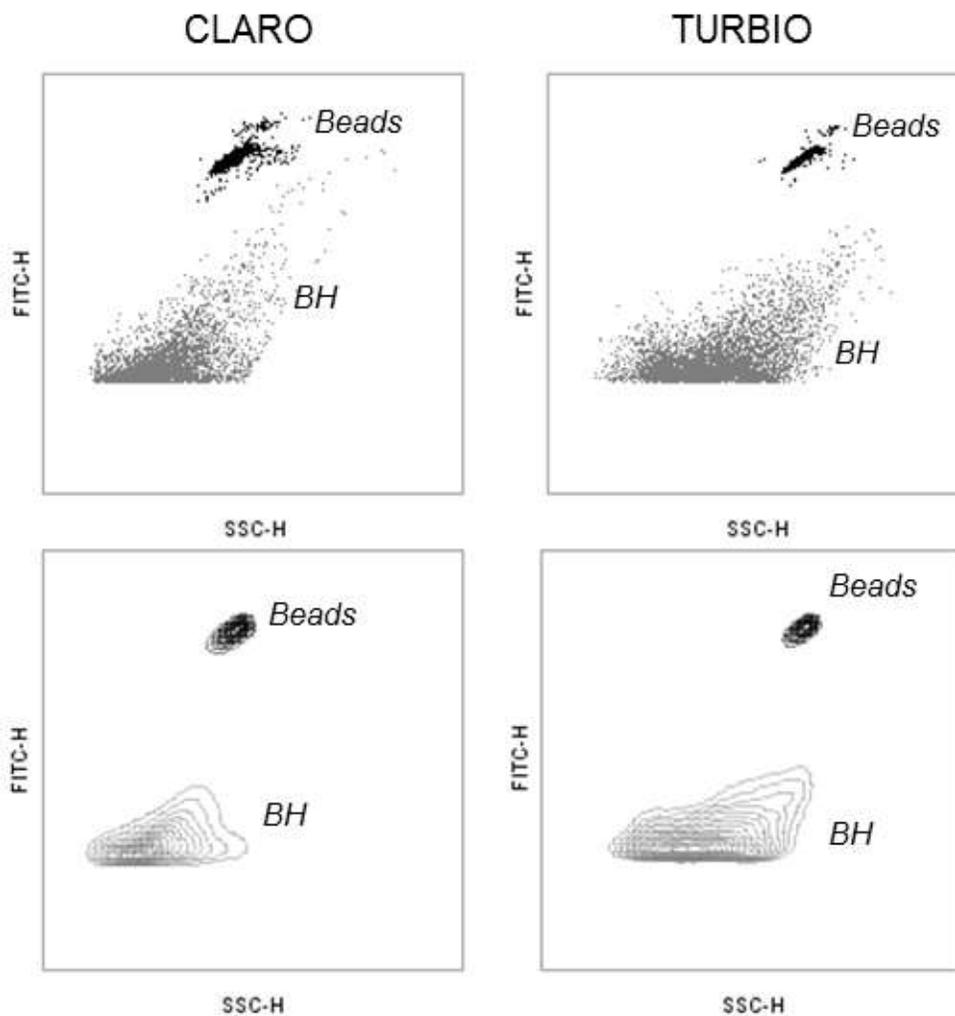


Fig. 6: Ejemplos de citogramas con tinción para determinación de la población citométrica correspondiente a las bacterias heterótrofas (BH). Dentro de cada citograma arriba se observan todos los eventos como puntos y abajo las nubes de densidad. Se observa la ubicación de las “beads” (añadidas a las muestras para referencia y control) en cada citograma. Los citogramas muestran el análisis gráfico de muestras de agua del tratamiento control a T1. FITC-H: emisión de Syber Green® SSH: tamaño.

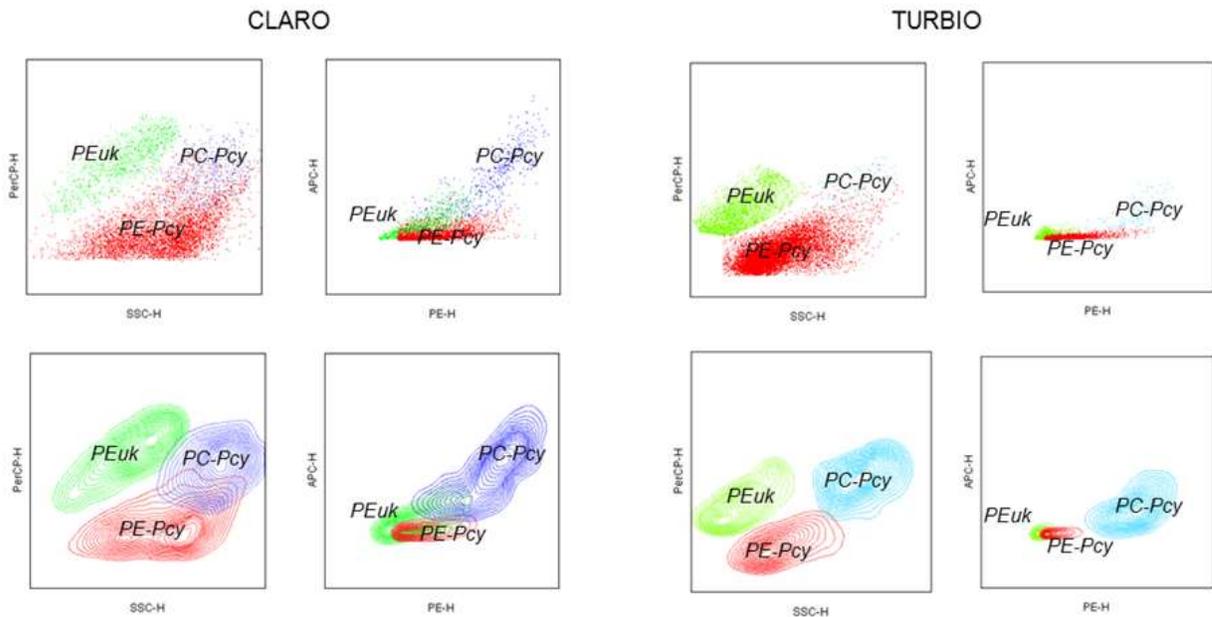


Fig. 7: Ejemplo de los citogramas de la fracción pico-fitoplanctónica y sus poblaciones citométricas. Dentro de cada citograma arriba se observan todos los eventos como puntos y abajo las nubes de densidad. PEuk: pico-eucariotas, PC-Pcy: picocianobacterias ricas en ficocianina, PE-Pcy: picocianobacterias ricas en ficoeritrina. PerCP-H: emisión de la clorofila, SSC-H: tamaño, APC-H: emisión de la ficocianina, PE-H: emisión de la ficoeritrina. Los citogramas corresponden a un control a T1 para cada sistema.

Las bacterias fueron más abundantes que el picoplancton autotrófico, tanto en el sistema claro como en el turbio, con un máximo de 99,7% (claro, Tf, 2.000 mg/L) y un mínimo de 80,9% (turbio, Tf, 2.000 mg/L). El análisis de medidas repetidas (MR-ANOVA) reveló diferencias significativas en la abundancia de las bacterias y el picoplancton autotrófico entre T1 y Tf para los sistemas claro y turbio (MR-ANOVA, $p=0,018$ y $p=0,001$ respectivamente). Con respecto a los efectos del tratamiento, la fracción autotrófica mostró variaciones significativas en la abundancia a 2.000 mg/L de 2,4-D con un incremento significativo de aproximadamente 5 veces a los 15 minutos en comparación con el control (MR-ANOVA, $p<0,001$ en ambos sistemas). Este aumento parece haberse mantenido hasta el tiempo final en el sistema turbio, mientras que no lo hizo en el claro (MR-ANOVA, $p<0,001$). Un aumento similar en la abundancia se observó en el tratamiento con 200 mg/L (RM-ANOVA, $p=0,003$) para el

sistema turbio a Tf. La abundancia de la fracción de bacterias aumentó significativamente aproximadamente 3 veces a Tf en el tratamiento de 2.000 mg/L solo para el sistema claro (ANOVA, $p < 0,001$).

La abundancia de las poblaciones citométricas correspondientes a la fracción picofitoplanctónica fue, en promedio, mayor en el sistema turbio que en el claro. Para el sistema claro a T1, la abundancia de PEuk varió entre un mínimo de 856 ± 202 ind/mL (200 mg/L) hasta un máximo de 1.284 ± 466 ind/L (2.000 mg/L), sin diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 8). A Tf, la abundancia de PEuk varió entre 509 ± 111 ind/mL (2.000 mg/L) y 9.118 ± 2.268 ind/mL (control). El análisis MR-ANOVA no mostró crecimiento significativo de las PEuk en los microcosmos tratados con 2.000 mg/L (RM-ANOVA, $p = 0,580$), mientras que esta población mostró respuesta de crecimiento significativa en el resto de los tratamientos, incluidos los controles. La inhibición del crecimiento a 2.000 mg/L condujo a una disminución significativa en la abundancia de PEuk de aproximadamente 18 veces a Tf, en comparación con el control (ANOVA, $p < 0,001$) (Fig. 8). En el sistema turbio a T1, la abundancia de PEuk varió desde 6.621 ± 368 ind/L (0,02 mg/L) hasta 39.887 ± 11.842 ind/mL (2.000 mg/L). Siendo un incremento significativo de aproximadamente 5 veces en comparación con el control en el tratamiento con 2.000 mg/L (ANOVA, $p < 0,001$) (Fig. 8B). A Tf, la abundancia de esta fracción varió desde 2.950 ± 223 (20 mg/L) hasta 10.979 ± 4.271 (2.000 mg/L), sin diferencias significativas entre los tratamientos y el control. La abundancia de esta población disminuyó significativamente entre T1 y Tf para los tratamientos de 200 y 2.000 mg/L (MR-ANOVA, $p = 0,026$ y $p < 0,001$ respectivamente), como resultado de un crecimiento temprano y una posterior disminución.

En el sistema claro, la abundancia de las PC-Pcy varió desde un valor medio mínimo de 166 ± 29 (200 mg/L) hasta un máximo de 282 ± 87 ind/mL (20 mg/L) a T1, mientras que fue desde 80 ± 75 (0,02 mg/L) a 286 ± 91 ind/mL (2.000 mg/L) en Tf (Fig. 8C). En el sistema turbio, su abundancia varió de 80 ± 77 (0,2 mg/L) hasta 206 ± 86 (200 mg/L) a T1, y de 187 ± 90 (0,2 mg/L) hasta 333 ± 207 ind/mL (0.02 mg/L) a Tf

(Fig. 8D). No se encontraron efectos significativos entre tratamientos en ningún caso para esta población.

PE-Pcy, la fracción del picoplancton autotrófico más abundante, a T1 varió de 22.969 ± 2.530 (200 mg/L) a 164.130 ± 48.443 ind/mL (2.000 mg/L) en el sistema claro. En ese momento, se observó un aumento significativo en la abundancia de PE-Pcy de aproximadamente 5 veces en relación con el control en el tratamiento con 2.000 mg/L (ANOVA, $p < 0,001$) (Fig. 8E). A Tf, no hubo variaciones significativas, observándose un mínimo de 15.527 ± 8.418 (0,02 mg/L) y un máximo de 23.553 ± 4.497 ind/mL (control). El análisis de MR-ANOVA reveló un aumento temprano (a T1) en la abundancia de esta fracción en el tratamiento de 2.000 mg/L, con una disminución posterior a Tf (MR-ANOVA, $p < 0,001$). En el sistema turbio, esta fracción tuvo un rango que fue desde 62.626 ± 44.171 (0,02 mg/L) hasta 651.631 ± 68.514 ind/L (2.000 mg/L) a T1 y de 115.508 ± 16.676 (2 mg/L) a 853.987 ± 230.227 ind/L (2.000 mg/L) a Tf (Fig. 8F). Esta población mostró un aumento significativo en la abundancia de aproximadamente 4 veces a T1, y de 5 veces a Tf en el tratamiento de 2.000 mg/L comparado con el control (ANOVA, $p < 0,001$ en ambos casos). Además, se registró un aumento en la abundancia cercano a las 3 veces en el tratamiento con 200 mg/L (ANOVA, $p < 0,001$) a Tf para el sistema turbio (Fig. 8F). Estos aumentos persistieron entre T1 y Tf para los tratamientos con 200 y 2.000 mg/L (MR-ANOVA, $p = 0,004$ y $p = 0,017$, respectivamente).

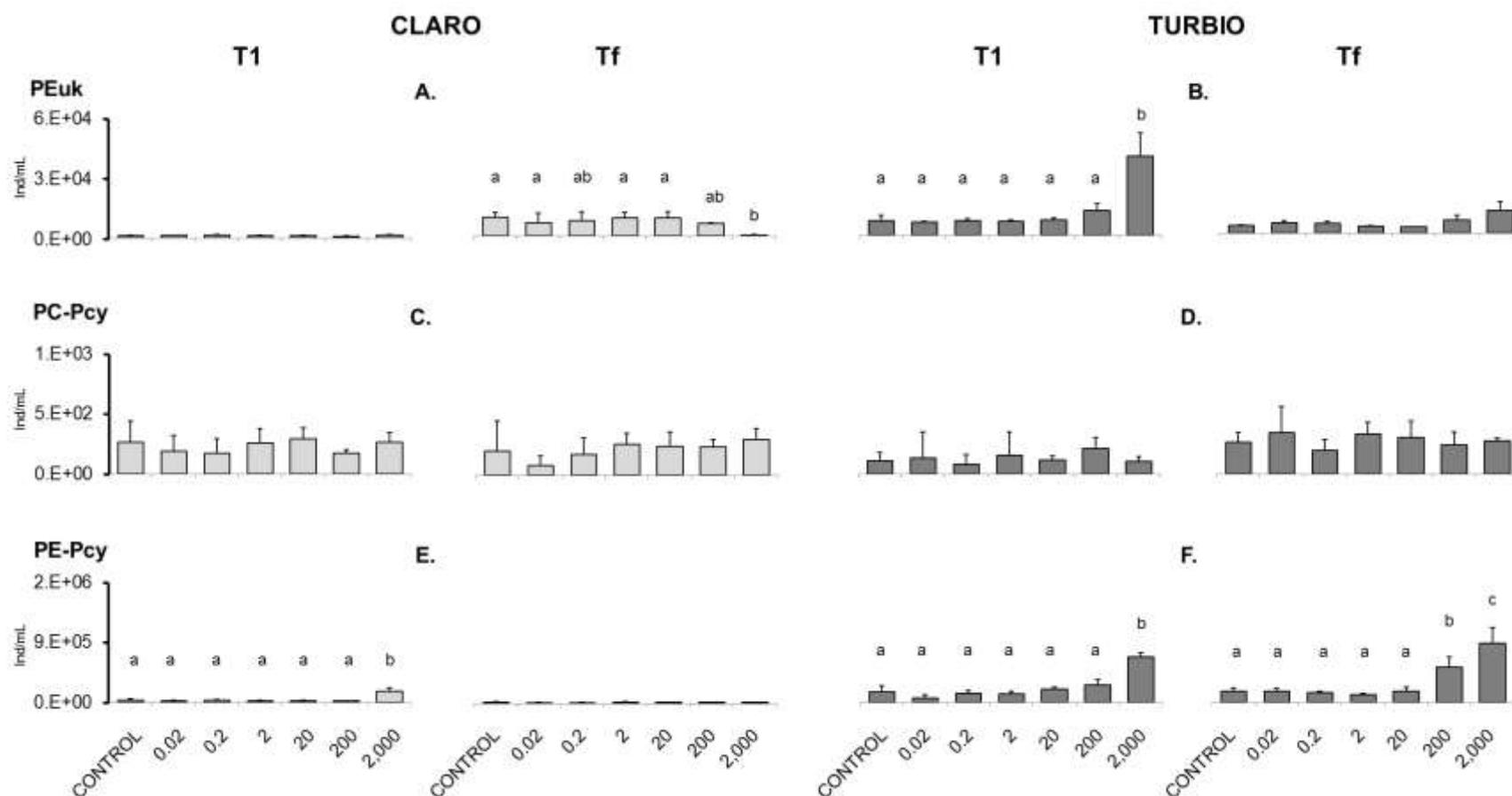


Fig. 8: Valores promedio (± 1 DE) de las abundancias de las poblaciones citométricas del picoplancton autotrófico (ind/mL) determinadas a los T1 y Tf. A. pico-eucariotas (PEuk); claro; B. pico-eucariotas (PEuk); turbio; C. picocianobacterias ricas en ficocianina (PC-Pcy), claro; D. picocianobacterias ricas en ficocianina (PC-Pcy), turbio; E. picocianobacterias ricas en ficoeritrina (PE-Pcy) claro; F. picocianobacterias ricas en ficoeritrina (PE-Pcy) turbio. En el eje x se muestran los niveles de los tratamientos (mg/L). Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA; comparaciones Tukey; $p < 0,05$).

A Tf, el porcentaje de contribución de las fracciones autótrofas de los diferentes tamaños a la biomasa autótrofa total fue diferente según la fracción y el tratamiento. Para el sistema turbio, el micro+nano fitoplancton mostró una contribución menor en los tratamientos a concentraciones más altas (200 y 2.000 mg/L) (ANOVA, $p=0,005$ y $p<0,001$, respectivamente). Esta disminución estuvo asociada al aumento en la contribución porcentual de la fracción de las PE-Pcy a 200 mg/L (ANOVA, $p=0,004$), así como con el aumento en la contribución porcentual de ambas PE-Pcy (ANOVA, $p<0,001$) y de las PEuk (ANOVA, $p=0,002$) a 2.000 mg/L.

En general, en el sistema turbio la concentración de clorofila α correlacionó con la contribución porcentual del micro+nano fitoplancton (r Pearson= $0,66$; $p=0,0012$), las PEuk (r Pearson= $-0,62$; $p=0,0029$) y las PE-Pcy (r Pearson= $-0,66$; $p=0,0011$). Por el contrario, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre estas variables en el sistema claro.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran que el tipo de sistema de agua dulce, con su particular estructura de la comunidad microbiana y su estado de turbidez condicionan la respuesta de las poblaciones estudiadas expuestas durante 7 días al herbicida basado en 2,4-D, Asimax 50[®]. Dependiendo de la turbidez del sistema, se encontraron diferentes cambios estructurales en las comunidades del fitoplancton y picoplancton expuestas a concentraciones bajas y altas del herbicida (Fig. 9). Las investigaciones donde se utilizan comunidades complejas de forma comparativa no son muy comunes en la literatura, por lo que este resultado se constituye como novedoso para la ciencia ya que no había sido previamente observado para el 2,4-D ni para ningún otro herbicida.



Fig. 9: Resumen gráfico de los resultados obtenidos en el Capítulo I. Las flechas indican aumentos o disminuciones de las abundancias específicas. En orden de aparición de izquierda a derecha: *Choricystis sp.*, *Chlamydomonas sp.*, *Ochromonas sp.*, PEuK, BH, *Staurastrum sp.*

El impacto de AsiMax 50[®] sobre el micro+nano fitoplancton fue mayor en el sistema turbio que en el claro, tanto en términos de riqueza como de abundancia. A Tt, no se observó disminución en la riqueza del fitoplancton para ningún tratamiento en el sistema claro, mientras que disminuyó significativamente a 200 y 2.000 mg/L de 2,4-D en el sistema turbio, lo que sugiere que algunas especies no pueden sobrevivir a altas concentraciones del herbicida, hecho que concuerda con lo reportado para el 2,4-D por Kobraei & White (1996).

Las comunidades con alta diversidad tienden a ser más resistentes a los cambios ambientales (Oliver et al. 2015), debido, entre otras varias razones, a la redundancia entre las diferentes especies que comparten funciones similares. La

resiliencia aumenta si estas especies también muestran resistencia diferencial a un contaminante. De hecho, Girvan et al. (2005) han demostrado que la diversidad bacteriana en los suelos promueve la estabilidad y la resistencia de la comunidad después de una perturbación con benceno. En el caso del fitoplancton, se espera que la sensibilidad diferencial de las especies a los herbicidas (Huertas et al. 2010), así como su presencia y abundancia relativa, determinen la respuesta de la comunidad en su conjunto. Además, a mayor riqueza específica mayor es la probabilidad de que haya una o más especies tolerantes a un determinado contaminante y, por lo tanto, es predecible que la respuesta de la comunidad entera dependa entonces de la equitatividad y/o de la sensibilidad de la especie dominante. Los resultados presentados en este capítulo mostraron que el sistema turbio, con menor riqueza específica y menor equitatividad fue más susceptible a los cambios provocados por el formulado comercial de 2,4-D, debido en este caso a que la especie dominante del sistema turbio, *Staurastrum* sp., fue promovida en su crecimiento.

En general, los agentes naturales o antropogénicos inducen una amplia gama de respuestas en entidades biológicas, según su complejidad que van desde respuestas a escala molecular hasta escala ecosistémica y biomas (Peck, 2011). A escala comunidad microscópica quedó demostrado en este experimento, que las especies fitoplanctónicas que sobrevivieron a 2,000 mg/L de 2,4-D en el sistema claro y a 200 y 2,000 mg/L de 2,4-D en el sistema turbio, mostraron valores bajos de abundancia, debido probablemente a cambios fisiológicos que generaron la disminución en su reproducción.

La abundancia de las especies de la comunidad de micro+nano fitoplancton disminuyó a concentraciones más altas y aumentó a concentraciones más bajas de 2,4-D (0,02; 0,2; 2 y 20 mg/L), con una respuesta, dependiente de la concentración, en forma de joroba (*humped*) correspondiente a un efecto de tipo hormesis. Este efecto se observó más claramente en el sistema turbio que en el claro. Si bien en este ensayo se utilizó una formulación comercial que contiene ingredientes no declarados con el objetivo de obtener una aproximación más realista de lo que sucede en el ambiente, los efectos observados corresponden a fenómenos de estimulación del

fitoplancton reportados previamente para el principio activo. La estimulación del fitoplancton a concentraciones bajas de 2,4-D ya se ha informado en estudios con ensayos de monocultivo de algas y también en mesocosmos utilizando comunidades naturales (Boyle, 1980, Kobraei & White, 1996, Wong, 2000). Las vías auxínicas y sus modos de acción son bien conocidas para las plantas vasculares, pero no para las algas (Žižková et al. 2016), sin embargo, después de muchos años de debate (Lau et al. 2009), la presencia de vías auxínicas en algas y cianobacterias finalmente fueron confirmadas por Sergeeva et al. (2002). Ciertamente, el hecho de que el 2,4-D induzca el crecimiento de algas a concentraciones bajas y cause su inhibición a altas proporciona evidencia de que puede imitar la función hormonal. En este caso, la presencia o ausencia de vías auxínicas en las diferentes especies, i.e. *Staurastrum* sp., dominante en el sistema turbio, podría ser determinante para la respuesta de toda la comunidad en su conjunto. En este trabajo, el hecho de que *Chlamydomonas* sp. y *Ochromonas* sp. fueran sensibles al 2,4-D sólo en el sistema claro, puede ser indicador de que otro fenómeno de tipo indirecto estuviera ocurriendo en el sistema turbio como consecuencia del impacto directo en el crecimiento de *Staurastrum* sp. Esto indicaría que el impacto del 2,4-D en la comunidad puede no ser sólo directo, según la sensibilidad de la especie, sino también indirecto, a través de las interacciones entre las diferentes poblaciones presentes en cada comunidad. La absorción y/o utilización diferencial del 2,4-D por ciertas especies podría afectar indirectamente la abundancia de otras. En este experimento, una posibilidad es que la absorción del 2,4-D por parte de *Staurastrum* sp. haya limitado la exposición de las otras especies al herbicida. Además, el 2,4-D pudo haber afectado indirectamente a la comunidad a través de interacciones ecológicas como la competencia, la facilitación y/o la predación. La revisión bibliográfica indica que este fenómeno es muy común, ya que el 60% de los 150 trabajos sobre distintos contaminantes acuáticos revisados por Flegger et al (2003), mostraron efectos de tipo indirectos por cascada trófica.

El análisis de las redes de correlación sugiere que el 2,4-D estimuló el crecimiento de *Staurastrum* sp. cuando fue dominante (sistema turbio) y que esto permitió el crecimiento de otras especies que en realidad podrían ser sensibles al 2,4-D ya que en el sistema turbio esas especies correlacionan positivamente con

Staurastrum sp. Dada la existencia comprobada de vías auxínicas en algunas algas, y en las desmiales en particular (Žižková et al. 2016), y observando la respuesta de *Staurastrum* sp. en este experimento, puede postularse la existencia de vías auxínicas en esta especie, lo que la haría sensible al 2,4-D. Además, la capacidad de *Staurastrum* sp. de absorber rápidamente el contaminante, disminuyendo el herbicida en el medio, pudo generar la disminución de la exposición de las otras especies en el sistema turbio, lo que explicaría la sensibilidad diferencial de *Chlamydomonas* sp. y *Ochromonas* sp. El hecho de que *Staurastrum* sp. estuviera presente también en el sistema claro, pero en una proporción muy baja, puede indicar que no sólo la composición de especies, sino también su abundancia relativa, son importantes para predecir el comportamiento del sistema en respuesta a un contaminante. Poblaciones más numerosas tienden a ser más resilientes ante el impacto de un agente de cambio (Oliver et al. 2015). La estructura inicial de la comunidad, dada por la composición taxonómica, la riqueza específica y las abundancias relativas, sería entonces determinante en el efecto del contaminante. Si bien ambos sistemas poseían riqueza específica similar del micro+nano fitoplancton, los índices de diversidad eran muy distintos. Los sistemas claro y turbio poseían a tiempo inicial índices de diversidad de 0,74 y 0,14 respectivamente, observándose que el sistema de mayor diversidad y mayor equitatividad presentó mayor resistencia al impacto del formulado AsiMax 50[®]. Si bien existen controversias acerca del rol de la diversidad en la estabilidad y/o en la resistencia de los sistemas naturales (Lampert & Sommer, 2007), encontramos que una comunidad menos diversa se vió más afectada por el formulado de 2,4-D AsiMax 50[®].

La comparación entre las redes de correlación indica que las especies estaban menos interrelacionadas en el sistema claro que en el turbio bajo el estrés producido por la contaminación con el herbicida, lo que puede interpretarse como una mayor independencia de cada especie dentro de la comunidad en el sistema claro. El sistema turbio partió de un estado de dominancia de una especie sensible que creció en abundancia en presencia de 2,4-D, mientras que en el claro la misma especie estaba en muy baja proporción. A partir de los resultados obtenidos podemos concluir

que la presencia de especies dominantes, reflejado en los valores de equitatividad de la comunidad, fue clave en la respuesta de los sistemas.

A tiempo inicial el sistema turbio tenía alrededor de 3 veces mayor cantidad de bacterias que el claro. El único efecto provocado por el 2,4-D sobre la abundancia de bacterias se observó en la concentración más alta de 2,4-D en el sistema claro, probablemente porque la mayor cantidad de herbicida presente, que pudo actuar como fuente de nutrientes, favoreció el crecimiento bacteriano (Lipthay et al. 2003, Aguayo et al. 2014). Por otro lado, las bacterias no mostraron crecimiento significativo en el sistema turbio, probablemente porque su abundancia inicial era más alta. El efecto del 2,4-D en las comunidades bacterianas ha sido estudiado por Aguayo et al. (2014), quienes observaron a partir de un experimento utilizando agua proveniente de un lago oligotrófico frío y prístino, que el phylum Actinobacteria predominaba a 20 mg/L de 2,4-D. Asimismo, De Lipthay et al. (2003) encontraron que una exposición a largo plazo de un acuífero subsuperficial a una mezcla de herbicidas auxínicos en bajas concentraciones (<40 µg/L) indujo el incremento de bacterias degradadoras de fenoxiácidos.

La fracción del picoplancton autotrófico también experimentó cambios más pronunciados en el sistema turbio que en el claro. Aunque se observaron variaciones rápidas (T1) a la concentración más alta del herbicida en ambos sistemas, hacia el final del experimento (Tf) sólo se observaron efectos en el sistema turbio. Debido al estudio de poblaciones citométricas, lo que no diferencia especies verdaderas, no fue posible en este caso realizar un análisis basado en índices de diversidad. Los efectos diferenciales observados dependiendo del sistema en esta fracción podrían o no estar asociados, a través de competencia entre las fracciones, a los distintos efectos constatados de la fracción micro+nano fitoplanctónica.

AsiMax 50[®] es una formulación comercial basada en 2,4-D como ingrediente activo, que presenta coadyuvantes y otras sustancias no declaradas. Es sabido que pueden existir diferentes impactos en organismos y/o comunidades de agua dulce de los ingredientes activos dependiendo de las formulados comerciales utilizadas (Tsui & Chu 2003, Annett et al. 2014, Lipok et al. 2010, De Stéfano et al. 2018). Es por ello que la diversidad de formas en las que un mismo principio activo puede ser ensayado

(distintas sales y distintos formulados comerciales) genera desafíos para la comparación de los trabajos presentes en la literatura. En este caso, la mayor parte de los efectos analizados fueron adjudicados al 2,4-D debido a su propiedad auxínica y al tipo de respuesta hormética observada, sin embargo no se pueden descartar efectos de los otros componentes presentes.

Este capítulo proporciona nuevas pruebas sobre el modo de acción en agua dulce del herbicida basado en 2,4-D, el Asimax 50[®], una de las formulados comerciales más utilizadas en los campos agrícolas de Argentina. Si bien los resultados no pueden extrapolarse a los ambientes naturales ya que se utilizaron microcosmos en condiciones controladas de laboratorio, se resalta la importancia de utilizar enfoques a escala comunitaria en estudios ecotoxicológicos para brindar información sobre el sentido, la magnitud y la dirección de los cambios que pueden producirse en los ecosistemas de agua dulce expuestos al 2,4-D.

Resumen del Capítulo I:

H1: *El impacto del herbicida 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autótrófica en el agua dulce depende de la concentración aplicada.*

✓ Aceptada: a bajas concentraciones de 2,4-D se verificó una estimulación en el crecimiento del fitoplancton, mientras que a altas hubo inhibición.

H2: *El impacto del herbicida 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autótrófica depende de la condición inicial de turbidez del sistema.*

✓ Aceptada: el impacto del 2,4-D depende del estado trófico del sistema, en estado turbio-orgánico el impacto fue mayor que en el estado claro.

***Capítulo II: Efecto de la mezcla de
glifosato y 2,4-D sobre el
fitoplancton y perifiton:
aproximación en microcosmos***

Introducción

El herbicida más usado en Argentina es el glifosato, que representa el 75% de todos los agroquímicos y más de 137 millones de kilogramos por año (Pórfido et al. 2014). Probablemente, el segundo herbicida más usado en Argentina es el 2,4-D que estuvo en 2013, 2014 y 2015 en la 3ª posición en importación de agroquímicos (SENASA, 2017). Hoy en día, una de las recomendaciones agrícolas más importantes es el uso de mezclas de herbicidas para el efectivo control de malezas. Como consecuencia de su modo de acción diferente, el 2,4-D se usa más frecuentemente en combinación con glifosato, como lo demostraron Pérez et al. (2017), quienes detectaron los dos herbicidas en un arroyo ubicado en campos agrícolas de Argentina. Ambos agroquímicos se aplican a través de formulados comerciales que contienen el ingrediente activo (e.g. glifosato o 2,4-D), coadyuvantes y agua. Además, existen formulados comerciales que contienen la mezcla de glifosato y 2,4-D en diferentes proporciones. Algunos ejemplos son Mestizo[®] (Albaugh Argentina) con proporción 1 glifosato : 0,45 2,4-D; EnList Duo[®] (Dow AgroSciences) con proporción 1 glifosato : 0,95 2,4-D y Landmaster II[®] (Bayer) con proporciones 1 glifosato : 0,83 2,4-D.

En el ambiente, las mezclas de contaminantes pueden actuar de forma aditiva, sinérgica o antagonista, sin embargo, existe escasa información disponible sobre el efecto de la mezcla entre glifosato y 2,4-D y hay controversias sobre la posibilidad de impactos sinérgicos entre ellos (EPA, 2016).

Utilizando distintos sistemas experimentales varios estudios han demostrado que los herbicidas a base de glifosato en los sistemas de agua dulce modifican las comunidades del fitoplancton, el zooplancton y otras comunidades microbianas (Pérez et al. 2007, Lipok et al. 2010, Vera et al. 2012, Geyer et al. 2016). Sin embargo, no existe información sobre los efectos del glifosato y las mezclas con 2,4-D sobre el fitoplancton, así como tampoco sobre el perifiton.

Considerando que ambos herbicidas poseen diferente modo de acción: ¿cómo impactará la mezcla de ambos herbicidas en el fitoplancton y el perifiton? Debido a

que ambas herbicidas poseen blancos moleculares diferentes y teniendo en cuenta que desde un punto de vista toxicológico su punto final es el mismo (muerte de la planta), se espera que los efectos individuales del glifosato y 2,4-D en la mezcla sean independientes (Faust et al. 2001) lo que no conllevaría en un efecto mezcla de tipo aditivo.

El objetivo general del presente capítulo fue estudiar el impacto de la mezcla de glifosato y 2,4-D, tanto en sus ingredientes activos como en sus formulados comerciales Glifosato Atanor[®] (formulación comercial de glifosato) y AsiMax 50[®] (formulación comercial de 2,4-D), sobre propiedades estructurales del fitoplancton y perifiton.

Los objetivos específicos fueron:

1. Analizar el impacto del glifosato, el 2,4-D y su mezcla en la composición del fitoplancton y la concentración de clorofila α de 3 niveles de concentración de los ingredientes activos.

2. Estudiar el efecto del glifosato, el 2,4-D y su mezcla sobre la estructura del perifiton usando tanto los ingredientes activos como los formulados comerciales.

Para dichos objetivos se realizaron dos experimentos independientes y sucesivos: en el primero se utilizó agua proveniente de un sistema de agua dulce en estado turbio-orgánico y se ensayaron los ingredientes activos (ácidos) en 3 concentraciones de glifosato, 3 de 2,4-D y 3 de la mezcla en proporción 1 glifosato : 0,45 2,4-D (experimento 1). A partir de los resultados obtenidos del experimento 1, se seleccionó la menor concentración de herbicidas a partir de la que se observaron efectos sobre el fitoplancton. Luego, se utilizó dicha concentración para la exposición de sustratos artificiales colonizados con perifiton, ensayando en este experimento tanto los principios activos como los formulados comerciales de cada herbicida y su mezcla (experimento 2).

Las hipótesis puestas a prueba fueron:

h1: La toxicidad del glifosato y 2,4-D en el fitoplancton depende de la concentración.

h2: *Teniendo en cuenta que los modos de acción del glifosato y 2,4-D son distintos, el impacto de cada herbicida es diferente, tanto en el fitoplancton como en el perifiton.*

h3: *En ambas comunidades el efecto de la mezcla de herbicidas es aditivo.*

h4: *Los herbicidas en formulados comerciales tienen impacto sobre estas comunidades diferente al de sus ingredientes activos.*

h5: *La comunidad perifítica es más resistente al impacto de los herbicidas que la comunidad fitoplanctónica.*

Experimento 1:

Materiales y Métodos

Las características iniciales del agua utilizada para completar los 34 microcosmos (Erlenmeyers de 250 mL) fueron: 71,5 µg/L de clorofila α, turbidez 9 NTU (unidades experimentales). Las unidades experimentales fueron incubadas en cámara de cultivo con agitación permanente bajo 12 h luz : 12 h oscuridad de fotoperíodo y 25°C de temperatura. Luego de llenados, se los dejó 4 días para su estabilización para luego procesar 3 microcosmos con el objeto de establecer las condiciones iniciales del sistema a estudiar para luego aplicar los tratamientos. Se ensayaron 3 concentraciones: baja (GB; 2,4-DB), media (GM; 2,4-DM) y alta (GA, 2,4-DA) de los principios activos, y sus correspondientes mezclas (MB, MM y MA) (Fig. 1). Se utilizó la sal de monoisopropilamina de glifosato (Sigma-Aldrich[®], cat.338,109) y la sal dimetilamina de 2,4-D (Supelco[®], N-10612). Las mezclas se realizaron utilizando la proporción 1 glifosato : 0,45 2,4-D, tomada de la que contiene el formulado comercial Mestizo[®].

La duración del experimento fue de 7 días a partir de la aplicación de los tratamientos.

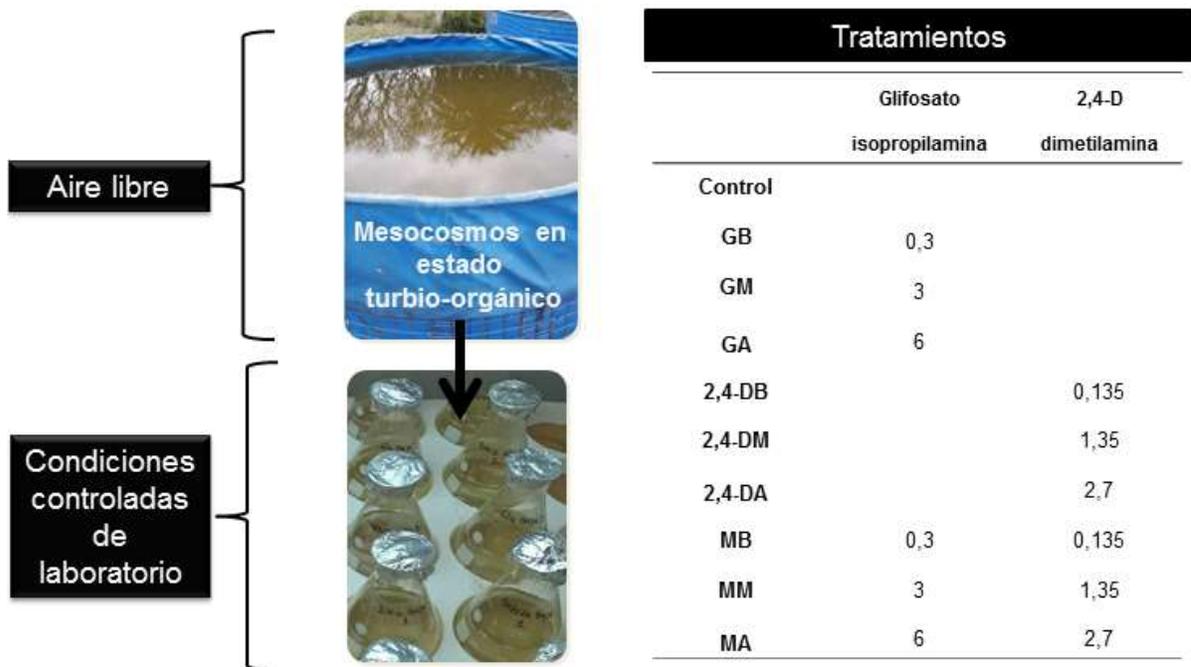


Fig. 1: Esquema del diseño experimental para el experimento 1: estudio del impacto de la mezcla de glifosato y 2,4-D en la comunidad fitoplanctónica utilizando los principios activos (ácidos); los valores están expresados en mg/L. GB, GM, GA: Glifosato baja, media y alta. 2,4-DB, 2,4-DM, 2,4-DA: 2,4-D baja, media y alta. MB, MM, MA: Mezcla baja, media y alta.

Variables físicas y químicas

Para el análisis de la concentración de los **herbicidas**, inmediatamente después de que fueran administrados a las unidades experimentales, se tomaron muestras de agua de todas las unidades experimentales, las que fueron almacenadas a -20°C. Para las mediciones, las muestras fueron descongeladas, homogeneizadas y se les aplicó un protocolo de extracción con clorometano fue realizado con 3-10 mL de agua. Luego, se trasvasaron 10 mL del agua extraída a tubos falcons de 15 mL los que se centrifugaron durante 10 minutos a 17.000 g con el objetivo de eliminar los residuos sólidos. Posteriormente, la fase líquida fue transferida a viales de polipropileno para cromatografía líquida de ultra performance. Las concentraciones de glifosato y 2,4-D se determinaron mediante UPLC Water Acquity con detector SQD (*single quadrupole mass detector*) usando ESI modo negativo. La separación cromatográfica fue realizada con 1% de ácido acético en agua y MeOH. Las columnas

que se utilizaron fueron Hypercarb 2,1 x 100 mm 5 µm para analizar el glifosato y ODS Hypersil 2,1 x 150 3 µm para 2,4-D. Para el análisis cuantitativo se utilizó el modo monitoreo de iones seleccionados. Las curvas de calibración fueron realizadas con agua para cubrir el rango que va de 5,00 µg/L a 15,00 mg/L, con un límite de detección de 1,00 µg/L.

La **turbidez** fue medida siguiendo el mismo protocolo que en el capítulo I.

Variables biológicas

La concentración de **clorofila α** y la abundancia del **micro+nano fitoplancton** fueron determinadas según lo detallado en el capítulo I. Habiéndose también diferenciado entre organismos vivos y muertos.

Análisis estadístico

Se estudió la homogeneidad de las unidades experimentales previa a los tratamientos a través de los valores de turbidez justo antes de la aplicación de los tratamientos. Para ello se aplicó ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, comparándose los distintos tratamientos respecto del control. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para analizar la relación entre turbidez, abundancia total de organismos vivos y muertos del fitoplancton y la concentración de clorofila α. El impacto de los herbicidas sobre la fracción algal y las cianobacterias fue estudiado sobre las especies más abundantes, mediante la comparación de las abundancias de los organismos vivos y muertos, entre los tratamientos y el grupo control. Las especies raras y descartadas del análisis fueron aquellas que estuvieron presentes en menos de 5 muestras del total del experimento o en 1 o 2 de las réplicas de un mismo tratamiento. Aquellas especies presentes en las 3 réplicas de un mismo tratamiento no fueron descartadas del análisis posterior. Para las comparaciones respecto del control se utilizó ANOVA no-paramétrico de Kruskal-Wallis utilizando InfoStat® versión 2015.

Con el objetivo de evaluar la hipótesis (aditividad de efectos independientes) para la acción combinada de la mezcla se calcularon los valores esperados en las

variables turbidez, clorofila α , abundancias totales de organismos vivos y muertos, y las abundancias de las especies dominantes. Para ello se construyó, a partir de los efectos de cada herbicida por separado, un grupo de valores “esperados” por aditividad. Los valores esperados fueron calculados como la suma algebraica de los efectos de los factores (F1 y F2) sobre cada variable de cada herbicida. Cuando los valores observados (O) eran mayores a los valores esperados (E), la interacción se consideró como sinérgica, cuando eran menores, como antagónica. Para la comparación entre los valores observados y los valores esperados se realizaron análisis *t-Student* tomando como significativo $p < 0,001$. La figura 2 muestra la zona de aditividad con un intervalo de confianza del 95% normalizado a -1,1 con el fin de observar todas las variables en la misma escala. Este intervalo de aditividad fue creado a partir de valores esperados calculados como la suma algebraica de los valores obtenidos en cada una de la UE y luego normalizados a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Intervalo Aditividad} = \frac{\text{IC 95\% Obtenido}}{\text{IC 95\% Esperado}}$$

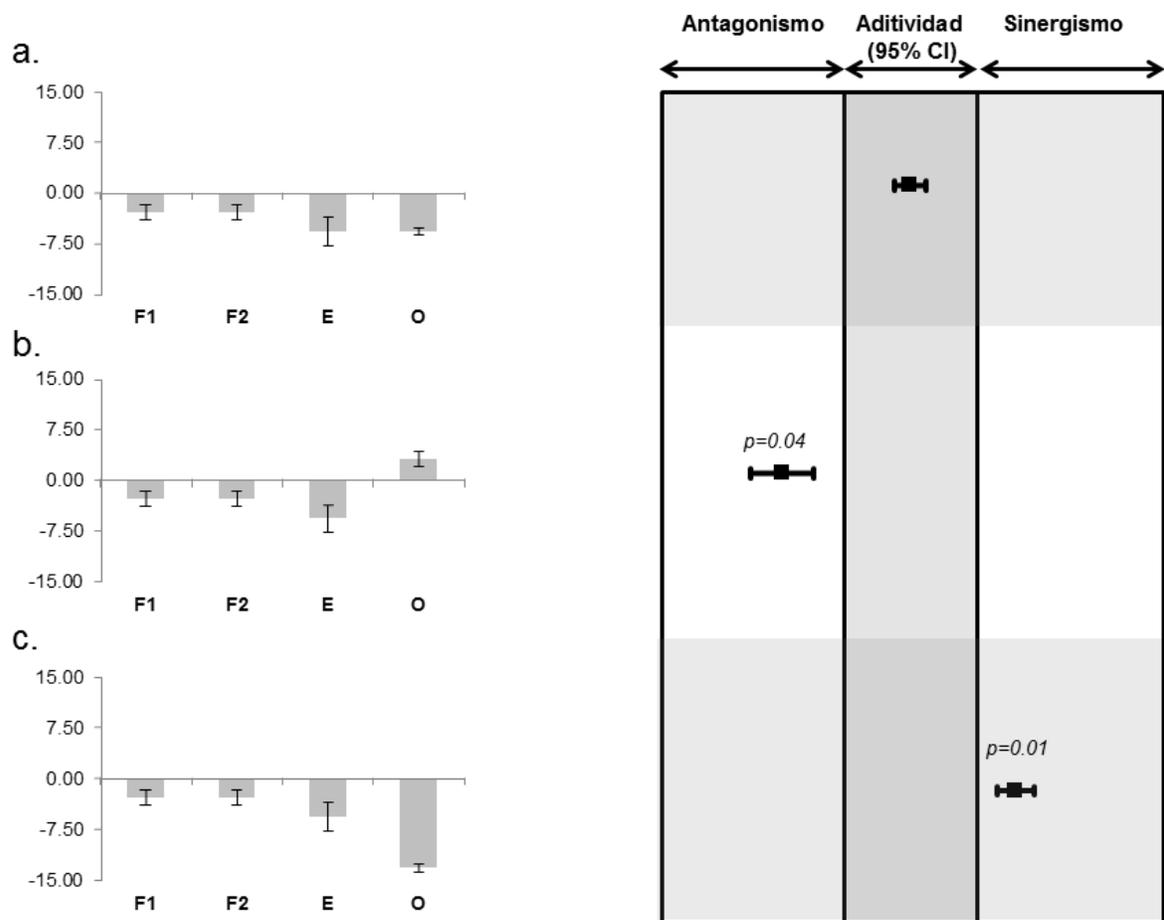


Fig. 2: Representación gráfica de los resultados para una evaluación visual, descriptiva y estadística de la hipótesis de aditividad de efectos en mezclas binarias. A la izquierda se muestran los histogramas correspondientes a las medias \pm DE de los efectos de cada factor (F1 y F2) y los valores esperados (E) y obtenidos (O) y a la derecha los intervalos de confianza 95% normalizados para la aditividad en la zona del centro y sus desviaciones así como los intervalos de confianza 95% de los valores obtenidos normalizados al intervalo esperado. (a) aditividad (b) antagonismo y (c) sinergismo. Los gráficos son ejemplos simulados y fueron realizados con la plantilla de Microsoft Excel® v.2010 desarrollada durante esta tesis doctoral.

Resultados

Las concentraciones reales de los herbicidas obtenidas a partir de las muestras tomadas inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos se presentan en la Tabla 1.

	Glifosato (mg/L)	2,4-D (mg/L)
Control	<LD	<LD
GB	0,34 ± 0,11	<LD
GM	3,21 ± 0,22	<LD
GA	5,45 ± 0,11	<LD
2,4-DB	<LD	0,20 ± 0,07
2,4-DM	<LD	1,76 ± 0,29
2,4-DA	<LD	2,35 ± 0,85
MB	0,36 ± 0,13	0,18 ± 0,03
MM	2,89 ± 0,30	1,57 ± 0,39
MA	4,51 ± 0,77	2,45 ± 1,31

Tabla 1. Concentraciones reales de los herbicidas (media ± DE) a tiempo inicial. G: glifosato; B: concentración baja; M: concentración media; A: concentración alta; M: mezcla. <LD: por debajo del límite de detección (1 µg/L para ambos).

A tiempo inicial, el valor promedio de turbidez del agua fue de $8,71 \pm 0,59$ NTU y no se encontraron diferencias significativas entre las unidades experimentales ($p=0,08$). A tiempo final, los valores de turbidez estuvieron comprendidos desde un mínimo de 9 NTU en GM hasta un máximo de 16 NTU para MB, con una disminución significativa en GM, GA y en las mezclas correspondientes (MM y MA) ($p=0,0042$) (Fig. 3A).

La misma tendencia se registró para las concentraciones de clorofila α en las que se registró una disminución significativa ($p=0,0061$) en los tratamientos de GM, GA, MM y MA, con un valor mínimo de 41 (MM) y un máximo de 107 µg/L (ML) (Fig. 3B). Los mismos tratamientos mostraron diferencias significativas en la abundancia total de fitoplancton con la disminución de los organismos vivos y el aumento de individuos muertos (Fig. 4A1). La máxima mortandad se registró para MA (60% de los individuos muertos) y GM (53%), mientras que se observó un mínimo de 10% de los organismos muertos para el tratamiento GB. Las siguientes correlaciones de Pearson fueron estadísticamente significativas: turbidez y organismos vivos totales ($r=0,58$, $p=0,0006$); turbidez y organismos muertos totales ($r=-0,61$, $p=0,0003$); clorofila α y organismos vivos totales ($r=0,50$, $p=0,0045$), clorofila α y organismos muertos totales ($r=-0,39$, $p=0,03$).

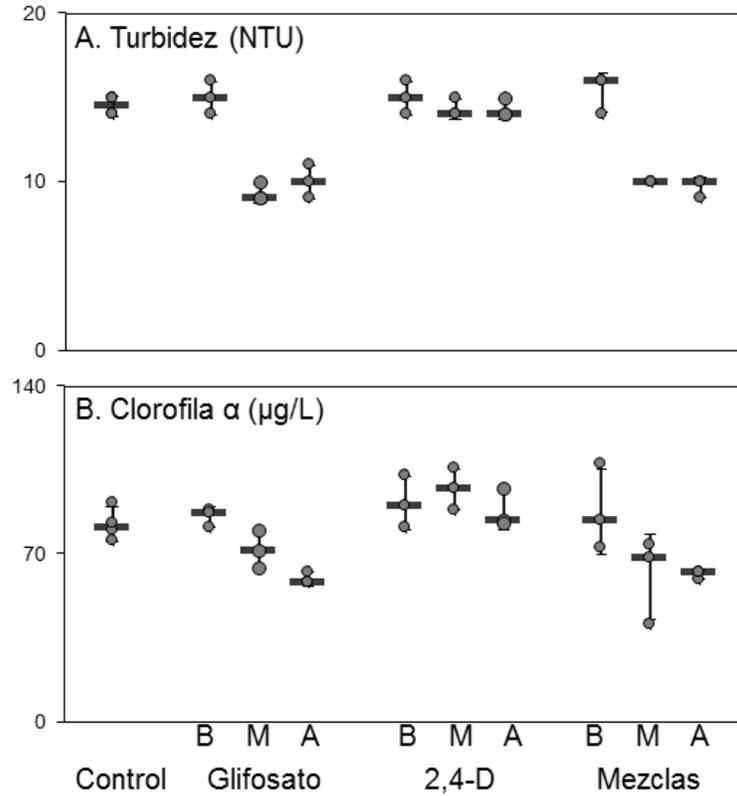


Fig. 3: Valores de turbidez (A) y clorofila a (B) a tiempo final (7 días) para los tratamientos con glifosato, 2,4-D y sus mezclas. B: concentración baja; M: concentración media; A: concentración alta. Los puntos muestran el valor de medición en cada réplica, mientras que las barras horizontales muestran la mediana para cada tratamiento.

Grupo	Especie
Cyanobacteria	<i>Leptolyngbya</i> sp.
	<i>Staurastrum</i> sp.
Chlorophyta	<i>Lagerheimia</i> sp.
	<i>Pandorina</i> sp.
	<i>Tetraedron minimum</i>
	<i>Chlamydomonas</i> sp.
Bacillariophyceae	<i>Botryococcus braunii</i>
	<i>Achnanthes</i> sp.
Dinophyceae	<i>Nitzschia</i> sp.
	<i>Peridinium</i> sp.
Chrysophyceae	<i>Ochromonas</i> sp.

Tabla 2. Lista de especies fitoplanctónicas determinadas en el experimento 1.

Se determinó un total de 11 especies, donde Chlorophyta fue el grupo más abundante (87,8%) seguido de Chrysophyceae (10,5%), Cyanobacteria (0,9%), Dinophyceae (0,78%) y Bacillariophyceae (0,02%) (Tabla 2). En todas las muestras la especie dominante fue *Staurastrum* sp. representando aproximadamente el 83% de la abundancia total en todos los tratamientos con una abundancia media de 280.839 ± 75.499 ind/mL y el 90,7% de la abundancia total de organismos vivos (309.711 ± 77.011 ind/mL). Esta especie mostró aumentos significativos de individuos muertos en tratamientos GM (74% del total de organismos) y GA, MM y MH (67%) (Fig. 4B1). Un aumento de 9,95 veces de *Ochromonas* sp. se encontró en GM con respecto al control y la misma tendencia se registró en el tratamiento con MM (5,1 veces) (Fig. 4B2). Para *Chlamydomonas* sp. se observó una alta mortalidad en GM mientras que la especie no se registró en el tratamiento GA (Fig. 4B3). *Tetraedron minimum* aumentó en los tratamientos con GB (5,7 veces) y en MA (8,1 veces) (Fig. 4B4), mientras que la abundancia de la cianobacteria filamentosa *Leptolyngbya* sp. disminuyó en los tratamientos de GA y en MA (Fig. 4B5). No se observó efecto del 2,4-D en ninguna de las variables analizadas del fitoplancton para ninguna de las concentraciones analizadas.

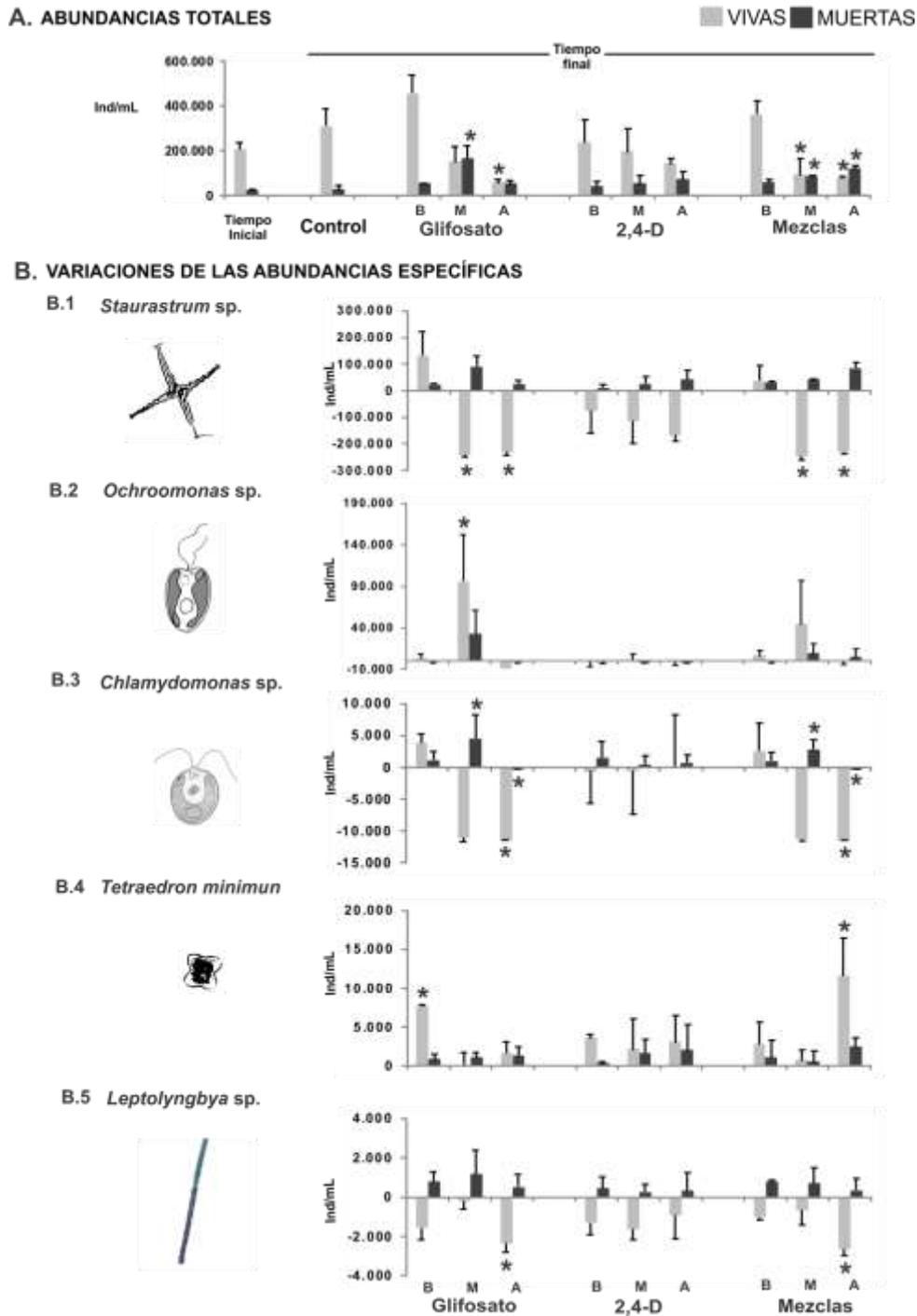


Fig. 4: Abundancias fitoplanctónicas para tratamientos con glifosato, 2,4-D y su mezcla. A. Abundancia media (ind/mL) de organismos vivos y muertos ($n=3$) a tiempo inicial y tiempo final. B. Diferencias medias de las abundancias vivas y muertas a Tf con respecto a Ti para las principales especies fitoplanctónicas por tratamiento ($n=3$, L: concentración baja; M: concentración media; H: concentración alta). Las imágenes de algas son representativas y no están a escala. Barras: 1 desviación estándar. (*) Diferencias significativas con respecto al control (test no paramétrico Kruskal-Wallis, $p<0,05$).

El tipo de efecto mezcla mayoritariamente encontrado para todas las variables fue la aditividad, sin embargo, la mezcla de herbicidas a alta concentración (MA) dio como resultado una menor abundancia de organismos vivos de *Staurastrum* sp. de lo esperado para un efecto aditivo, encontrándose el mismo fenómeno de antagonismo para la abundancia total de organismos vivos (Fig. 5).

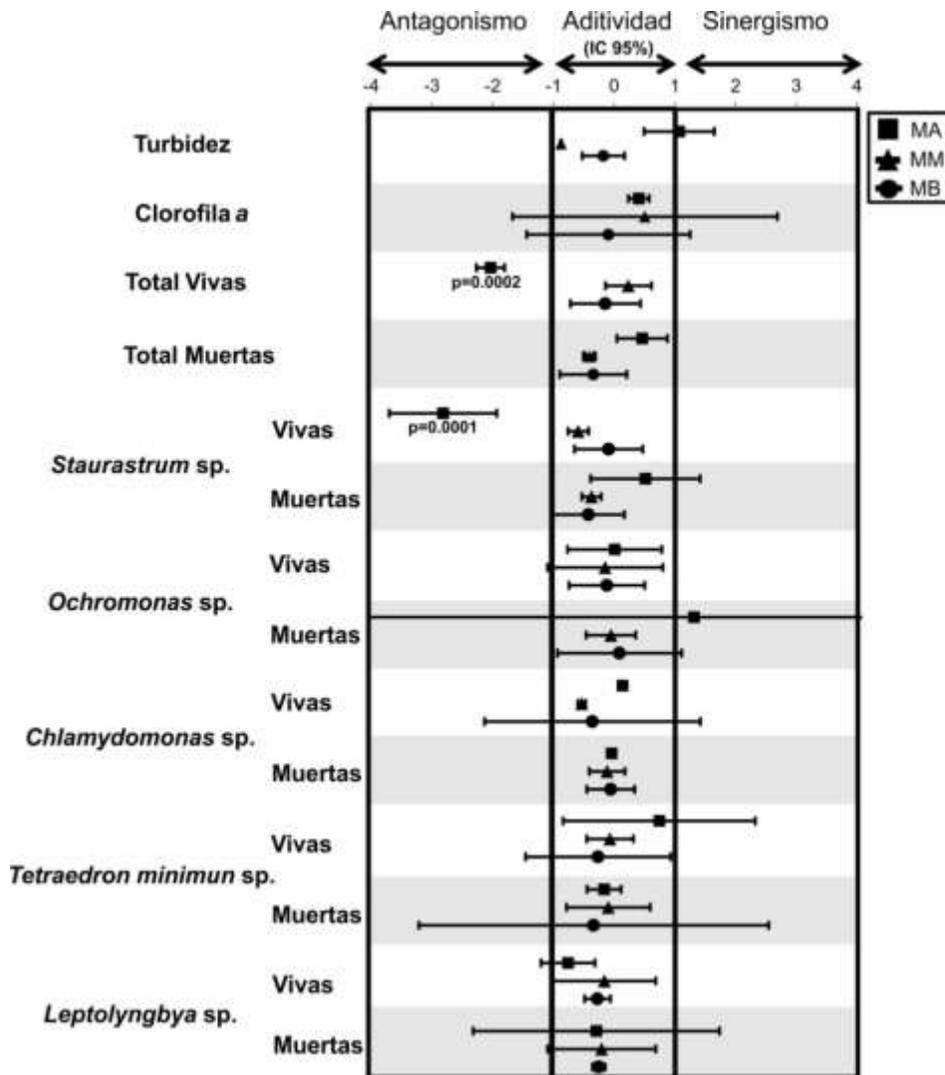


Fig. 5: Representación gráfica de los resultados de efectos mezcla. Se observan los valores promedio y los intervalos de confianza para cada variable en los tratamientos de mezcla a concentraciones baja (MB), media (MM) y alta (MA); los valores fueron relativizados para comparación entre variables; intervalos de confianza del 95% para la aditividad (centro), antagonismo (izquierda) y sinergismo (derecha). (T-Student $p < 0,05$; $n=3$).

Experimento 2:

Materiales y Métodos

Para el estudio de la comunidad perifítica, se utilizaron sustratos artificiales que consistieron en tiras de policarbonato (2 x 8 cm) las que fueron sumergidas en un tanque experimental ubicado al aire libre, mediante un dispositivo construido ad hoc, durante 60 días (Fig. 6A).

Al momento de la inmersión de los sustratos para su colonización por perifiton, las características del sistema eran típicamente las de un cuerpo de agua claro (Clorofila α = 4,35 $\mu\text{g/L}$, turbidez = 1 NTU). Durante la colonización, la temperatura media del agua fue, en promedio, de 19,5°C.

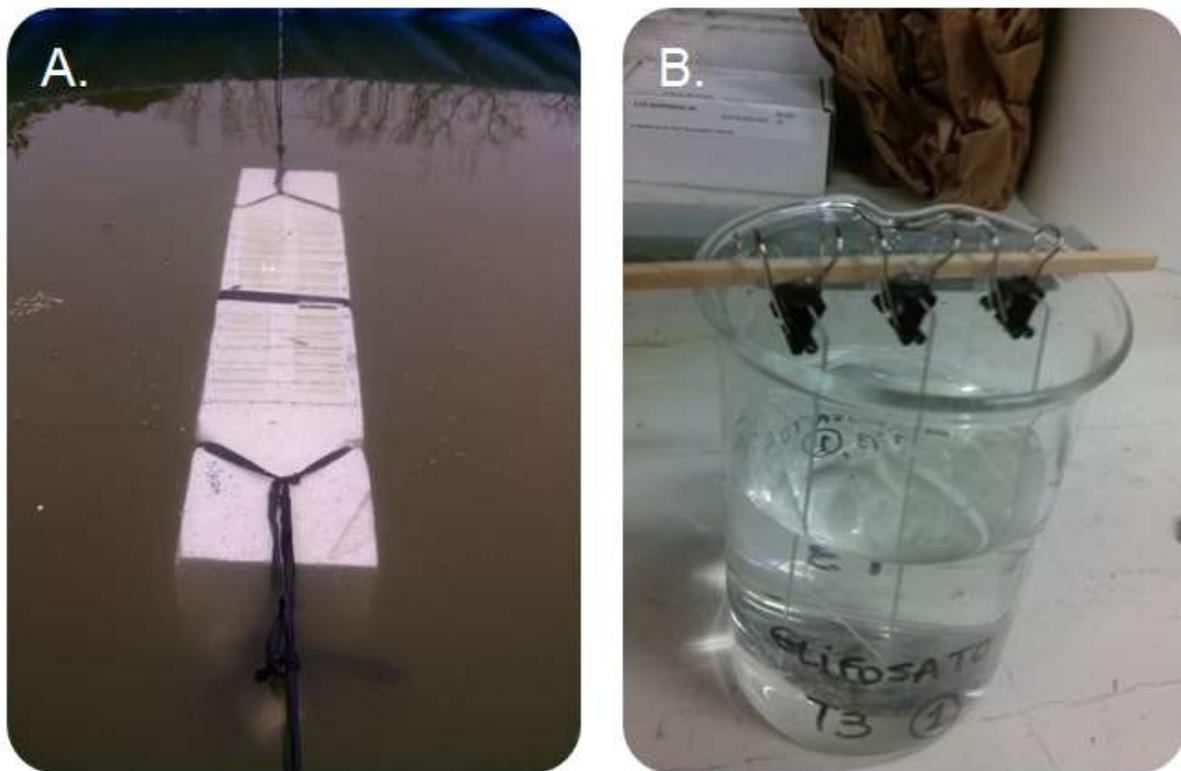


Fig. 6: *Dispositivo ad-hoc para el sostén de los sustratos artificiales para la colonización del perifiton (A) y unidad experimental (B).*

Para el experimento se utilizaron vasos de precipitados los que se llenaron con agua tomada del tanque experimental. Previamente, el agua fue filtrada través de una red de 18 μm de diámetro de poro y luego se la esterilizó con el objeto de eliminar organismos que pudieran potencialmente interactuar con el perifiton. Antes de la inclusión de los sustratos colonizados, se determinó que el agua tenía 0,13 mg/L PO_3 y 0,9 mg/L NO_2+NO_3 , condición que puede considerarse como no-limitante para el crecimiento algal. En cada vaso lleno se sumergieron 3 sustratos colonizados, los que se constituyeron en unidades experimentales (Fig. 6B). A tiempo inicial (T_i), 15 minutos antes de la aplicación de los tratamientos, 3 microcosmos fueron seleccionados al azar para ser procesados con el objetivo de determinar las condiciones previas al comienzo de los tratamientos. El resto de los microcosmos fueron asignados a los 7 tratamientos y procesados a tiempo final (T_f , 7 días). La concentración de herbicidas utilizada correspondió a la mínima concentración con efecto observado en el experimento 1 que fueron: GM (3 mg/L), 2,4-DM (1,35 mg/L) y MM (3 mg/L G + 1,35 mg/L 2,4-D) (Fig. 7).

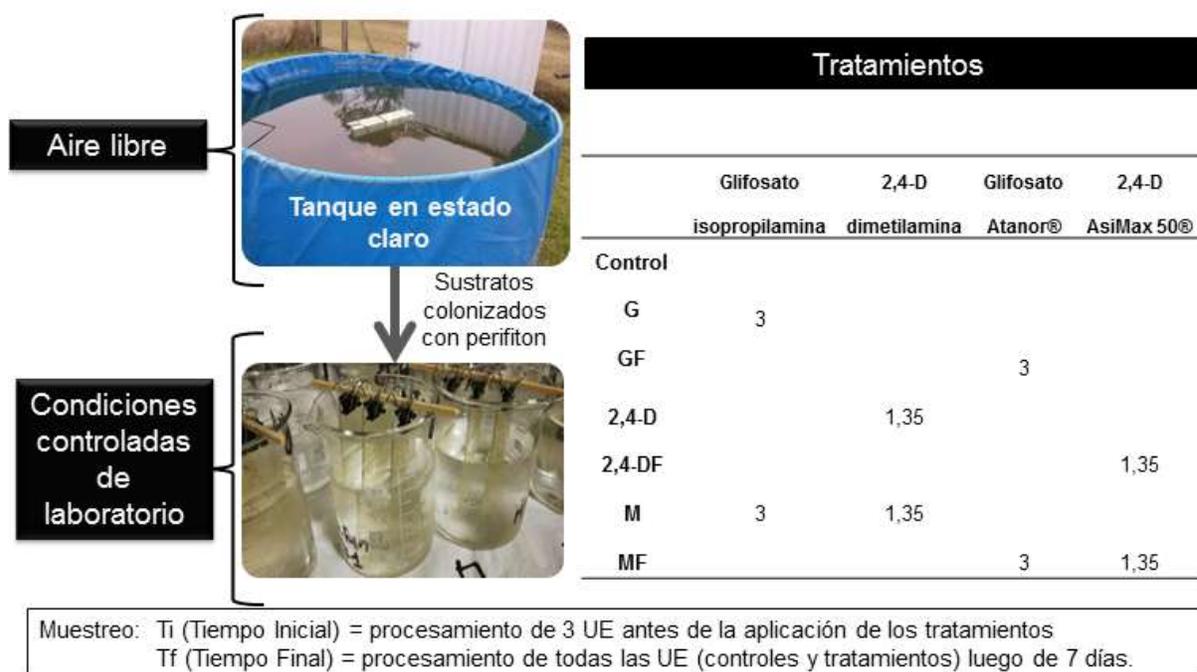


Fig. 7: Resumen del diseño experimental para el estudio del impacto de la mezcla de glifosato y 2,4-D en la comunidad perifítica utilizando los principios activos y dos formulados comerciales (Glifosato Atanor® y AsiMax 50®).

Variables físicas y químicas

La determinación de las concentraciones de **herbicidas**, a tiempo inicial, fue realizada siguiendo el protocolo que se detalla para el experimento 1.

Variables biológicas

A tiempo inicial como a tiempo final los tres sustratos fueron raspados de ambos lados utilizando un cepillo fino y el material obtenido fue diluído en agua destilada. Las muestras obtenidas de cada unidad experimental fueron divididas en tres alícuotas. Una alícuota se utilizó para calcular el peso seco (PS) y el peso seco libre de cenizas (PSLC). El **PSCL** se midió a partir de la diferencia entre el **PS** (estufa 60°C hasta peso constante) y el calcinado (550°C 3 hs) del filtrado de esta alícuota a través de un filtro tipo GF/C (GVS[®]), previamente calcinado y pesado (APHA, 2005). Una segunda alícuota del raspado fue filtrada a través de filtros GF/F (Whatman[®]) para el cálculo de la concentración de **clorofila α** que fue determinada siguiendo el mismo procedimiento detallado en el capítulo I pero estimada en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. El **índice autotrófico** fue calculado como PSLC/clorofila α . Este índice permite estimar la auto/heterotrofia de la comunidad y puede alcanzar valores de varios órdenes de magnitud. Se considera que un valor mayor a 200 indica una alta proporción de organismos heterotróficos, individuos sin clorofila o una alta presencia de detritos orgánicos (APHA, 2005; Lowe & Pan, 1996).

La tercera alícuota de cada muestra fue fijada en lugol al 1% acidificado para el posterior análisis cuali/cuantitativo del **micro+nano fitoperifiton** siguiendo la misma técnica de recuento que el capítulo I. En el caso particular de las cianobacterias filamentosas, éstas fueron confirmadas a través del uso de microscopía de epifluorescencia.

Análisis estadístico

La homogeneidad de las unidades experimentales previas al experimento fue estimada a partir del porcentaje de variación del valor promedio del peso seco de las 3 UE procesadas a Ti. Las tres UE presentaron una variación promedio de 6,85% de

PSLC, lo fue considerado razonablemente bajo en vista del hecho de que el perifiton es una comunidad de disposición espacial muy heterogénea (Azim & Asaeda, 2005). Este valor es menor al obtenido en otros casos donde el perifiton también fue desarrollado en sustratos artificiales (Pizarro et al. 2015). Los efectos fueron estudiados estadísticamente con ANOVA no-paramétrico al igual que en el experimento 1.

Resultados

En la Tabla 3 figuran los valores de concentraciones reales de los herbicidas, los que no difieren estadísticamente con los valores esperados.

	Glifosato (mg/L)	2,4-D (mg/L)
Control	<LD	<LD
G	2,39 ± 0,47	<LD
GF	3,65 ± 0,85	<LD
2,4-D	<LD	0,86 ± 0,14
2,4-DF	<LD	1,18 ± 0,56
M	3,16 ± 1,61	1,24 ± 0,47
MF	2,96 ± 0,64	1,03 ± 0,12

Tabla 3. Concentraciones reales de los herbicidas (media ± DE) a tiempo inicial para el experimento con perifiton. LD: Límite de detección.

El PS promedio a Ti fue de $65,90 \pm 4,51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A Tf, el PS tuvo un rango que fue desde un valor mínimo de 34,62 (MF) hasta un valor máximo de 54,43 (GF) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y los valores de PSLC oscilaron entre un mínimo de $18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (M) y un máximo de $55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Control) (Fig. 8A). La concentración de clorofila α varió de $0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (MF) hasta $0,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2,4-D) (Fig. 8B), mientras que el IA varió desde 218 (2,4-D) hasta 1,350 (G) (Fig. 8C). No se encontraron diferencias significativas en las variables de masa y el índice autotrófico entre los tratamientos.

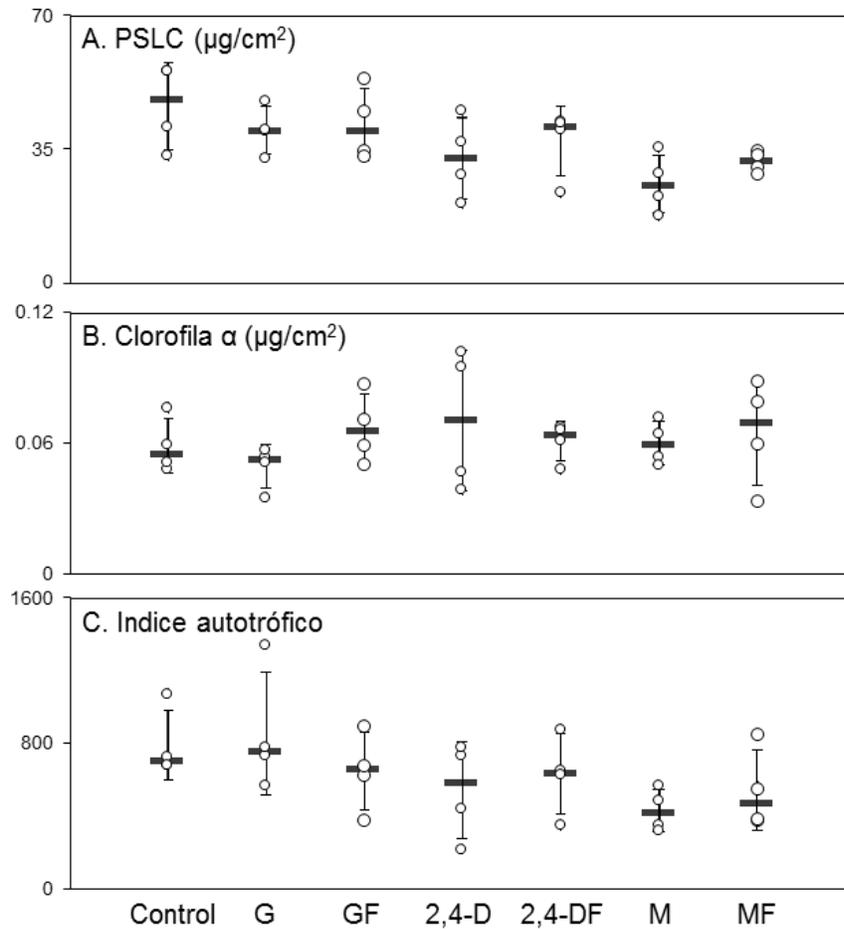


Fig. 8: Variables de masa del experimento con perifiton. Los círculos muestran el valor de cada réplica; las barras horizontales indican la mediana (figuras hechas de plantillas proporcionadas por Weissgerber et al. 2015).

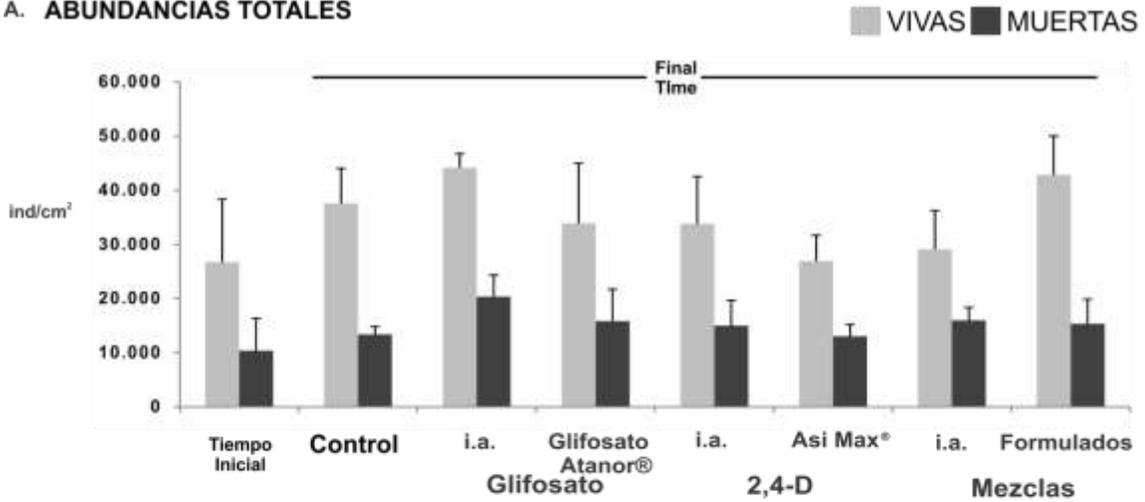
Se determinaron un total de 25 especies durante todo el experimento. A Tf Chlorophyta representó el 84,44%, seguidas por Bacillariophyceae (10,73%), Dinophyceae (7,53%), Cyanobacteria (0,30%). A Tf, Chlorophyta fue también el grupo más abundante (81,83%) seguido de Bacillariophyceae (14,02%), Dinophyceae (2,38%), Cyanobacteria (1,75%) y Chrysophyceae (0,02%) (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de los individuos vivos entre los tratamientos (Control 64,1%, G 54,1%, GF 53,5%, 2,4-D 55,9%, 2,4-DF 51,2%, M 43,2%, MF 64,6%). A Tf, dos especies mostraron variaciones en abundancia con respecto al Control: la diatomea *Achnanthisdium* sp. disminuyó más de 3 veces (-3,26) con respecto al control para el tratamiento G ($p=0,03$) y en el tratamiento M (Fig. 9B1). Por otro lado, la cianobacteria filamentosa *Leptolyngbya* sp. fue detectada sólo en el

tratamiento M ($p=0.02$) (Fig. 9B2.1 y 10). No se encontraron efectos significativos para ninguna de las variables medidas bajo el tratamiento con 2,4-D solo.

Grupo	Especie
Cyanobacteria	<i>Aphanothece nidulans</i> <i>Chroococcus</i> sp. <i>Leptolyngbya</i> sp.
Chlorophyta	<i>Ankistrodesmus spiralis</i> <i>Botryococcus braunii</i> <i>Fusola viridis</i> <i>Monoraphidium minutum</i> <i>Nephrocytium</i> sp. <i>Oocystis</i> sp. <i>Pediastrum</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Sphaerocystis</i> sp. <i>Tetraedron mínimum</i> Palmeloide (sin identificar) <i>Cosmarium</i> sp. <i>Staurastrum</i> sp. <i>Oedogonium</i> sp. 1 <i>Oedogonium</i> sp. 2 <i>Bulbochaete</i> sp. <i>Achnantheidium</i> sp. <i>Fragilaria ulna</i> <i>Gomphonema</i> sp. <i>Rophalodia gibba</i> <i>Peridinium</i> sp.
Bacillariophyceae	<i>Salpingoeca</i> sp.
Dinophyceae	
Chrysophyceae	

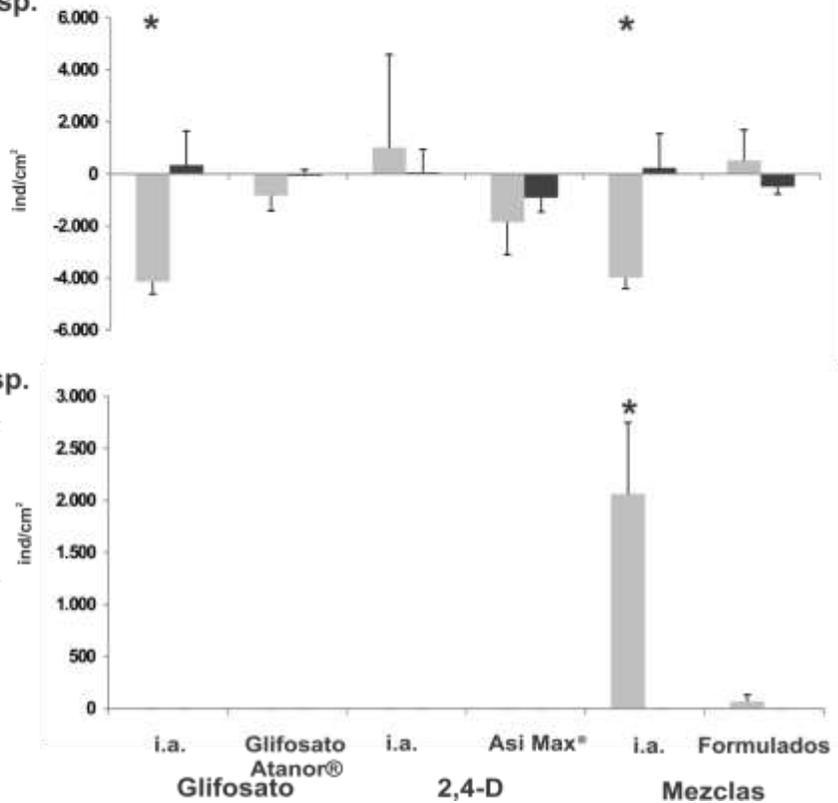
Tabla 4. Lista de especies determinadas en la comunidad perifítica en el experimento 2.

A. ABUNDANCIAS TOTALES



B. VARIACIONES DE LAS ABUNDANCIAS ESPECÍFICAS

B.1 *Achnanthydium* sp.



B.2.1 *Leptolyngbya* sp.

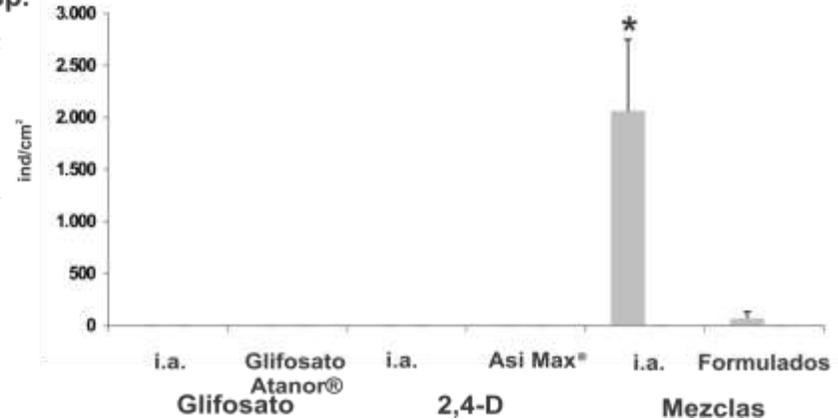


Fig. 9: Abundancia total y de las principales especies de algas y cianobacterias perifíticas. A. Abundancias totales (ind/cm²) a tiempo inicial (control) y tiempo final (todos los tratamientos). B. Valores promedio de las diferencias en las abundancias de organismos vivos y muertos con respecto al control (línea de base del control) en Tf para: 1. *Achnanthydium* sp. 2.1 *Leptolyngbya* sp. Las imágenes de algas son ilustrativas y no están a escala. Barras: ± 1 DE. (*) diferencias significativas con respecto al control (KW, p<0,05; n=3).

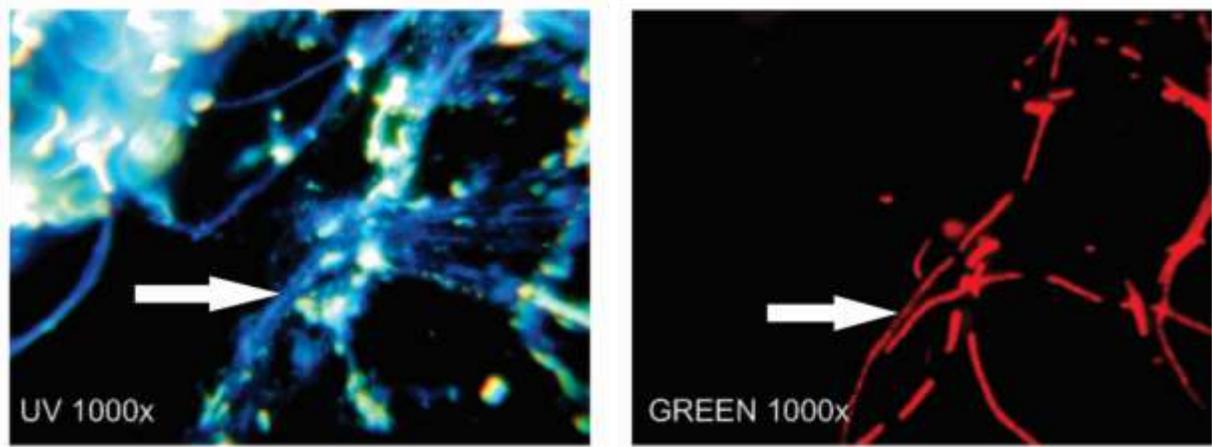


Fig. 10: Imágenes de epifluorescencia de *Leptolyngbya* sp. (flechas) de muestras provenientes del tratamiento mezcla (M).

Discusión

Los resultados de los dos experimentos de este capítulo muestran que tanto el fitoplancton como el perifiton poseen sensibilidad a la presencia de glifosato en una concentración del orden $\approx 10^0$ - 10^1 mg/L, mientras que no se detectaron efectos significativos del 2,4-D (~ 1 mg/L). A partir del análisis del efecto mezcla, se observó que el impacto producido en estas comunidades por la mezcla de los herbicidas fue principalmente aditivo y, aunque más evidente para el fitoplancton, el glifosato fue el principal factor impulsor en el efecto de la mezcla. El glifosato es un herbicida de amplio espectro que inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos de todas las plantas a través de la vía del ácido shikímico, ruta también presente en las algas (Richards et al. 2006, Tohge et al. 2013). En este sentido, se esperaba un impacto significativo en estos organismos, hecho que fuera registrado por Saxton et al. (2011) y Mensah et al. (2013). Por otro lado, el 2,4-D es un herbicida selectivo debido a su modo de acción de tipo auxínico, que afecta el cambium vascular en las plantas dicotiledóneas (Song, 2014). Si bien las algas y cianobacterias carecen de tejidos, algunas vías auxínicas han sido reportadas en algas.

La disminución en la abundancia total del fitoplancton registrada en concentraciones medias y altas de glifosato confirmó el comportamiento dependiente

de la concentración, consistente con los resultados registrados previamente por diferentes autores. Pizarro et al. (2015) encontraron una disminución en la abundancia de micro+nano fitoplancton en mesocosmos al aire libre como consecuencia de la acción de Glifosato Atanor[®] utilizando una concentración de 3 mg/L, mientras que Pérez et al. (2007) observaron un resultado similar con Roundup[®] a concentraciones de 6 y 12 mg/L del ingrediente activo. La disminución en la abundancia de fitoplancton en los tratamientos GM y GA se reflejó en la caída de la turbidez y la concentración de clorofila α , como lo señalara también Sura et al. (2012) en mesocosmos al aire libre. Se ha observado que incluso algunas algas y cianobacterias que tienen la vía del ácido shikímico, no se eliminan completamente en presencia de glifosato, reaccionando de manera diferente (Lipok et al. 2010; Saxton et al. 2011; Wang et al. 2016). Para las cianobacterias se conocen distintas estrategias por las cuales son capaces de tolerar el glifosato: 1. Por la sobreproducción de la EPSP sintasa a través de cambios en su tasa de expresión génica (Powell et al. 1991), 2. Por la síntesis de enzimas análogas a la EPSP (Forlani et al. 2008) y 3. Por la presencia del gen *phnD* que sintetiza la fosfonotasa (Hove-Jensen, 2014). En este sentido, las concentraciones de 3 y 6 mg/L de glifosato produjeron la disminución en la abundancia de *Staurastrum* sp., que resultó más sensible que otras especies como *Chlamydomonas* sp. y *Leptolyngbya* sp., ambas afectados por la concentración más alta ensayada. Por el contrario, el crecimiento de *Tetraedron minimum* fue estimulado por la concentración más baja de glifosato, sin observarse efecto a concentraciones más altas.

En relación con el impacto del 2,4-D sobre la fracción algal, se ha observado que el herbicida puede estimular el crecimiento del fitoplancton en concentraciones bajas (0.02-2 mg/L), mientras que lo puede inhibir a las más altas (entre 10 y más de 20 mg/L) (Kobraei & White, 1996; Boyle, 1980; Relyea, 2009). Ambos hechos fueron verificados en el capítulo I. Trabajos recientes reportaron también reducciones en la abundancia de *Scenedesmus* sp. en concentraciones de 1.1 mg/L (Singh & Shrivastava 2015) y de 0.5 mg/L para algunas especies de diatomeas (Wood et al. 2016). Otro estudio mostró que el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* no sufría estimulación en presencia de 2 mg/L de 2,4-D y sin embargo su defensa morfológica

antipredatoria, expresada por la presencia de espinas, se veía afectada a esa concentración (Zhu et al. 2016). En contraste con estos informes y con lo reportado en el Capítulo I, en los dos experimentos presentados en este capítulo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la abundancia del fitoplancton luego del tratamiento con 2,4-D. Es interesante observar que si bien en el experimento 1 la especie *Staurastrum* sp. era la dominante, similar a lo sucedido en los microcosmos turbios utilizados en el capítulo I, en este caso no se observó estimulación en su crecimiento. Cabe aclarar que en este experimento se utilizó la sal pura mientras que en el experimento del capítulo I se utilizó el formulado comercial AsiMax 50[®]. En función al efecto facilitador que tienen los coadyuvantes en los formulados, es probable que el 2,4-D en el AsiMax[®] penetre con mayor facilidad en las células, produciendo de ese modo su efecto estimulante o inhibitorio.

Los resultados obtenidos sugieren que el glifosato es el principal impulsor de los cambios en la estructura del fitoplancton en escenarios de mezcla cuando se utilizan las sales puras. En este sentido, Sura et al. (2012) también encontraron que el glifosato tiene mayor potencial para inhibir el crecimiento del fitoplancton y las algas perifíticas, cuando es utilizado en mezclas, respecto de otros herbicidas de tipo auxínicos. Si bien la aditividad fue el principal tipo de respuesta encontrada en todas las variables, la mezcla de herbicidas en altas concentraciones pareció mitigar el efecto de cada herbicida por separado sobre la abundancia de *Staurastrum* sp. (antagonismo).

Las concentraciones de glifosato y 2,4-D elegidas para el experimento utilizando perifiton (experimento 2) no tuvieron un impacto significativo en las variables medidas. Además, considerando las variables de masa donde se incluyen tanto la fracción autótrofa como la heterotrófica de la comunidad, no se detectaron diferencias significativas entre los ingredientes activos y los formulados comerciales. Este hecho fue contrario a lo que se esperaba, ya que se presume que los formulados comerciales presentan mayor toxicidad que los ingredientes activos para esta comunidad (Vera et al. 2014). A nivel específico, *Achnanthydium* sp. fue significativamente afectada por el glifosato en la forma de ingrediente activo, tanto solo como mezclado con 2,4-D, lo que muestra nuevamente diferentes respuestas a

diferentes niveles de análisis. Por otra parte, el desarrollo de la cianobacteria filamentosa *Leptolyngbya* sp. se observó solo en presencia de ambos herbicidas, lo que podría considerarse como un resultado sinérgico no esperado. El alto crecimiento de esta cianobacteria en el perifiton después de 7 días podría implicar el inicio del desarrollo de una comunidad más densa tendiente a evitar el impacto de los contaminantes. Los organismos filamentosos son muy importantes para la estructura tridimensional del perifiton, ya que mejoran la cohesión de toda la microbiota inmersa en la matriz mucilaginosa. Las cianobacterias filamentosas tales como *Leptolyngbya* sp. pueden formar matas de algas (Vincent et al. 1993).

Los resultados de ambos experimentos mostraron que el perifiton puede presentar mayor resistencia a los herbicidas que el fitoplancton. Se sabe que el perifiton puede ser más tolerante a los factores estresantes debido a su estructura compleja y a la presencia de una matriz de sustancias extracelulares poliméricas hidratadas (Flemming & Wingender, 2010) que podrían ser las causantes de proporcionar mayor resistencia. La matriz reduce la exposición a contaminantes al limitar su contacto con los organismos y a la vez permite el reciclaje de nutrientes dentro de ella, lo que le da más independencia a la comunidad perifítica respecto a la columna de agua. En este caso se utilizó una comunidad perifítica desarrollada durante 60 días, lo que probablemente produjo una matriz muy consolidada lo que puede haber proporcionado una fuerte resistencia a los herbicidas. En el mismo sentido, la alta resistencia del perifiton a otro herbicida como el paraquat fue reportada previamente por Bonilla et al. (1997).

Como hemos visto ya en el capítulo anterior, el análisis a nivel comunidad toma relevancia ya que los resultados obtenidos pueden ser muy diferentes en comparación con los bioensayos mono-específicos. En el contexto de comunidades como el fitoplancton o el perifiton, las diferentes especies pueden reaccionar de manera diferente a un mismo tóxico, ya que las interacciones biológicas juegan un papel importante en la respuesta final de toda la comunidad (Seguin et al. 2001). Además, como se demostró, es muy importante considerar muchas variables al evaluar los mecanismos por los cuales las comunidades microbianas responden a una mezcla de herbicidas u otro tipo de interacciones. En el mismo sentido,

Magbanua et al. (2013) registraron efectos sinérgicos y antagónicos para distintas variables en presencia de glifosato y sedimentos.

En este capítulo, se demostró que existe un impacto significativo del glifosato y del 2,4-D en las comunidades microbianas derivadas de sistemas en estados claro y turbio orgánico, mediante experimentos de laboratorio similares a los realizados por las agencias gubernamentales. Las respuestas de las comunidades a los herbicidas fueron diferentes y las consecuencias ecológicas de estas respuestas son difíciles de predecir en condiciones naturales. Extrapolando los resultados de estos ensayos a condiciones naturales, el glifosato en concentraciones de 3 mg/L o más, solo o mezclado con 2,4-D, reduciría la concentración de clorofila α y la turbidez como consecuencia de la disminución del fitoplancton. Este hecho podría mejorar la penetrancia de la luz en la columna de agua de lagos poco profundos turbios orgánicos como los que se encuentran en la llanura pampeana, lo que conduciría al crecimiento del perifiton, que luego de desarrollarse no sería afectado por los herbicidas gracias a su mayor resistencia. Estos sucesos, producto de una sola exposición al glifosato, podrían derivar en el consecuente cambio de toda la estructura y función del sistema a mediano plazo.

Resumen del Capítulo II:

h1: *La toxicidad del glifosato y 2,4-D en el fitoplancton depende de la concentración.*

✓ Aceptada: se observó un efecto concentración dependiente del glifosato sobre la fracción fitoplanctónica.

h2: *De acuerdo con los diferentes modos de acción, el impacto de cada herbicida en el fitoplancton y el perifiton es diferente.*

✓ Aceptada: el glifosato tiene un efecto negativo sobre la fracción fitoplanctónica, mientras que no se observó efectos del 2,4-D en ninguna de las dos comunidades.

h3: *En ambas comunidades el efecto de la mezcla de herbicidas es aditivo.*

✗ Rechazada: se observaron efectos antagónicos de la mezcla en la comunidad fitoplanctónica y efectos de tipo sinérgicos en el perifiton.

h4: *Los herbicidas en forma de formulados comerciales tienen un impacto sobre estas comunidades diferente al de los ingredientes activos.*

✓ Aceptada: se observó mayores efectos de los principios activos que de los formulados comerciales.

h5: *La comunidad perifítica es más resistente al impacto de los herbicidas que la comunidad fitoplanctónica.*

✓ Aceptada: se observaron efectos sobre la comunidad fitoplanctónica del glifosato y su mezcla con 2,4-D a la concentración media pero no se detectaron cambios a las mismas concentraciones sobre el perifiton.

***Capítulo III: Efecto de la mezcla de
glifosato y 2,4-D sobre la estructura
de comunidades microbianas de
aguas claras y turbias: aproximación
en mesocosmos al aire libre***

Introducción

En los últimos años, los análisis realizados con el objetivo de estudiar el impacto de los formulados comerciales de glifosato sobre los sistemas de agua dulce han demostrado la importancia de utilizar aproximaciones ecosistémicas para predecir su efecto como el de otros herbicidas en el ambiente (Pérez et al. 2007; Vera et al. 2010; Vera et al. 2012) así como su interacción en presencia de otros agentes de cambio antropogénicos (Gattás et al. 2016; Pizarro et al. 2016). En este sentido, existen pocos trabajos a escala ecosistémica que estudien los efectos de mezclas de los plaguicidas más utilizados sobre los sistemas de agua dulce (Fairchild et al. 1994; Knauert et al. 2008; Knauert et al. 2009). Si bien existen algunos trabajos donde se estudia la mezcla de glifosato y el 2,4-D, la extrapolación de las conclusiones a escenarios realistas de contaminación ambiental (ecosistemas acuáticos cercanos a agrosistemas) es limitada por el hecho que en esos estudios previos se utilizaron ensayos monoespecíficos (Wong, 2000) o comunidades mantenidas bajo condiciones controladas de laboratorio (Lozano et al. 2018). Los experimentos donde se estudian los efectos de la contaminación con plaguicidas sobre las diferentes comunidades en condiciones controladas de laboratorio, en volúmenes pequeños durante un tiempo relativamente corto, como los realizados en los capítulos I y II, son una escala previa a aproximaciones más realistas (Caquet et al. 2000). Los ensayos al aire libre permiten incorporar las fluctuaciones climáticas reales, ya que en la naturaleza existen diferencias de temperatura entre el día y la noche y procesos continuos de aumento y disminución de la radiación lumínica. La utilización combinada de estudios realizados en condiciones controladas de laboratorio y al aire libre es especialmente importante ya que las especies pueden presentar susceptibilidades diferentes de acuerdo a las condiciones generales ambientales en las que se encuentran (Crossland & Wolff, 1988).

Habiendo observado el impacto diferencial del 2,4-D sobre sistemas en estado claro y turbio-orgánico (Capítulo I) y diferentes respuestas al glifosato y su mezcla con 2,4-D de las comunidades fitoplanctónica y perifítica (Capítulo II), se realizaron dos experimentos independientes y sucesivos de mayor duración (21 y 23 días) utilizando mesocosmos al aire libre. El trabajar a escala ecosistémica habilita a estudiar

numerosas variables respuesta, lo que aumenta la posibilidad de detección de potenciales efectos directos e indirectos de interacción de una mezcla de plaguicidas, las que pueden ser del tipo aditivo, antagónico o sinérgico. Finalmente, realizar ensayos en sistemas de turbidez orgánica contrastante permite evaluar el efecto de mezcla de herbicidas partiendo de escenarios de agua dulce de estructura y funcionamiento diferentes, semejantes a los encontrados en las lagunas poco profundas, como las de la pampa argentina que presentan los típicos estados de equilibrio alternativo descritos por Scheffer et al. (1993) (Allende et al. 2009).

El objetivo general de este capítulo fue estudiar los efectos del glifosato, 2,4-D (Roundup Max[®] y AsiMax 50[®]) y su mezcla, en alta y baja concentración, sobre variables físicas y químicas, así como sobre la estructura de las comunidades microbianas de agua dulce pertenecientes a dos tipos de sistemas: uno claro y otro turbio-orgánico, a través de experimentos en mesocosmos al aire libre. Los experimentos consistieron en estudios de 23 (claro) y 21 (turbio) días a partir de una única aplicación a tiempo inicial de dos concentraciones de herbicidas:

Objetivos específicos:

A partir de la mezcla de herbicidas:

1. Estudiar los efectos sobre las variables físicas y químicas: turbidez, conductividad, pH, temperatura del agua y el nitrógeno y fósforo totales.
2. Analizar la variación en las abundancias y composición de la comunidad fitoplanctónica (micro+nano fitoplancton), picoplancton autotrófico compuesto por las picocianobacterias y las pico-eucariotas y bacterias heterotróficas.
3. Evaluar la colonización de la comunidad perifítica en sustratos artificiales analizando la composición taxonómica de la fracción algal (incluyendo cianobacterias), el peso seco, las cenizas, el peso seco libre de cenizas y la concentración de clorofila α .

En función de los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, proponemos las siguientes hipótesis de trabajo:

h1: Los efectos de los herbicidas Roundup Max[®] (glifosato), AsiMax 50[®] (2,4-D) y su mezcla sobre la estructura (abundancia y composición taxonómica) de las comunidades planctónicas en mesocosmos al aire libre son iguales en dos sistemas de turbidez contrastantes.

h2: Los efectos de los herbicidas estudiados y su mezcla sobre la estructura (abundancia y composición taxonómica) de las comunidades planctónicas en mesocosmos al aire libre son iguales a los efectos sobre las comunidades en condiciones controladas de laboratorio (Capítulos I y II).

h3: Los efectos del AsiMax 50[®] (2,4-D) sobre la estructura de las comunidades planctónicas (abundancia y composición taxonómica) son mayores a menor concentración.

h4: La colonización de la comunidad perifítica, medida a partir de las variables de masa y la composición taxonómica de la fracción autotrófica, es diferente según escenarios, con o sin los herbicidas.

h5: El comportamiento de la mezcla sobre las variables físicas, químicas y biológicas es aditivo.

Materiales y Métodos

Se realizaron dos experimentos en mesocosmos al aire libre utilizando comunidades microbianas consolidadas: (a) sistema en estado turbio-orgánico (denominado en adelante turbio) con una concentración de clorofila $\alpha = 31,7 \mu\text{g/L}$ y turbidez = 12 NTU; y (b) sistema en estado claro (denominado en adelante claro) con una concentración de clorofila $\alpha = 8,7 \mu\text{g/L}$ y turbidez = 2 NTU. El experimento turbio tuvo una duración de 21 días y fue realizado a fines de la primavera (03/10/2016-24/10/2016), mientras que el claro tuvo una duración de 23 días y fue realizado a fines del verano (20/03/2017-12/04/2017), en ambos casos se utilizó un diseño experimental similar. Las unidades experimentales (UE) fueron bolsas de plástico de 40-45 L llenas con agua incubadas en tres tanques de 3.000 L al aire libre ubicados

en el campo experimental de la ciudad universitaria de la Universidad de Buenos Aires (Fig. 1).



Fig. 1: Imágenes del dispositivo experimental, dispositivo de incubación (A) y mesocosmos al aire libre (B).

El agua del primer experimento provenía de un sistema turbio y las del segundo experimento de un sistema claro. Los tanques de donde provino el agua utilizada de ambos experimentos se encuentran al aire libre y fueron llenados con agua de red, a los que posteriormente se le colocaron inóculos de plancton tomados de sistemas naturales de la región pampeana, dejando que ambos sistemas evolucionen de forma natural durante 2 años. Al momento de los experimentos uno de ellos se encontraba en estado turbio-orgánico mientras que el otro en estado claro. Antes de los ensayos, las UE se sometieron a un período de estabilización de 3 días y en cada tanque (3 tanques) se asignaron al azar los siguientes tratamientos: control (C); una aplicación única de Roundup Max[®] (formulado a base de glifosato, sal de amonio) en

concentraciones bajas (0,3 mg/L) y altas (3 mg/L); una aplicación única de AsiMax 50[®] (formulado basado en 2,4-D, sal dimetilamina) en concentraciones bajas (0,135 mg/L) y altas (1,35 mg/L) y mezcla de herbicidas en dos concentraciones con la misma relación de ingredientes activos (es decir, 1 G: 0,45 2,4-D). Las concentraciones utilizadas y la proporción de la mezcla fueron elegidas a fin de poder comparar con los resultados obtenidos del Capítulo II. Las concentraciones de la mezcla baja fueron entonces de 0,3 mg/L G + 0,135 mg/L 2,4-D y de la mezcla alta fueron de 3 mg/L G + 1,35 mg/L 2,4-D. En lo sucesivo, estos tratamientos se denominarán control, GB, GA, 2,4-DB, 2,4-DA, MB y MA, respectivamente. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, excepto el control, que se realizó con seis réplicas (dos por tanque). La toma de muestras y mediciones para las variables físicas, químicas y biológicas se realizaron 15 minutos luego de la adición de los tratamientos (T0), 1 día después (T1), a los 7 días (T2) y a los 21 y 23 días según el experimento (T3). Además, a tiempo final (T3) se procesaron los sustratos utilizados para el estudio de la colonización perifítica.

Variables físicas y químicas

Los valores de **temperatura** máximos y mínimos diarios del aire se obtuvieron de la base de datos del Servicio Meteorológico Nacional de Argentina (SMN, Argentina). Para ello se utilizaron datos de una estación del SMN ubicada a menos de 2 km del campo experimental, y se calcularon las temperaturas medias diarias del aire (T°C) de la siguiente manera: $(T_{\text{máxima}} + T_{\text{mínima}})/2$. En cada UE se midió la **temperatura del agua** a través de medidores continuos (TermoButtons de Akribis[®]). Un dispositivo *ad-hoc* de la misma forma y dimensiones que una UE se ubicó en el campo experimental durante ambos experimentos con el objetivo de medir el **volumen de lluvia** ingresado en cada UE (mL). Además se llevó un control diario de la concentración de **oxígeno disuelto** de los controles que se midió con un oxímetro óptico (YSI[®] ProODO[™]; error = 0,01 mg/L) sumergiendo la sonda a una profundidad de 10 cm en el centro de cada UE. La **turbidez** fue medida de mismo modo que en el capítulo I. La **conductividad** y el **pH** fueron medidos utilizando un sensor multiparamétrico portable Hach[®] (Fig.3a). La concentración de **fósforo y nitrógeno**

totales fueron determinadas con por el método molibdato-ácido ascórbico y de reducción de cadmio utilizando los kits de Hatch[®] (Phosver[®]3 y Nitraver[®]5 respectivamente) luego de digestión con persulfato de potasio (APHA, 2005).

La medición de concentración de herbicidas se realizó a través de la toma de muestras en los 4 tiempos de muestreo (T0, T1, T2 y T3) y luego fueron mantenidas a -20°C hasta su procesamiento. El **2,4-D** fue cuantificado a través del método de HPLC-UV. Las muestras de agua descongeladas y homegeneizadas fueron pasadas a través de la columna seteada a 232 nm. La fase móvil fue de acetonitrilo: agua miliQ (60:50) acidificada con ácido fosfórico hasta obtener un pH=4, y se realizaron dos curvas de calibración, una de bajas concentraciones y otra de altas, utilizando ácido 2,4-D de Sigma Aldrich[®] (APHA, 2005; EPA, 1980). El **glifosato** fue determinado a través del ensayo de tipo inmuno-enzimático con el kit Elisa Microtiter Plate de Abraxis[®]. Siguiendo este método, con el objetivo de trabajar en el rango del kit, las muestras correspondientes a las concentraciones más bajas fueron diluídas previamente con agua MiliQ 1:1.000 y las altas 1:10.000. El protocolo incluyó un paso de derivación utilizando dimetilsulfóxido y la placa fue revelada en una fotómetro de microplaca ELISA seteado en 450 nm (Byer et al. 2005). La vida media de ambos herbicidas en los dos experimentos fue calculada realizando la regresión exponencial de los valores obtenidos a los 4 tiempos para los tratamientos GA y 2,4-DA, con los valores de la regresión se calculó la vida media utilizando las siguientes fórmulas:

Regresión exponencial :

$$\text{Concentración} = ae^{-k.tiempo}$$

Valor de vida media:

$$\text{Vida media} = \text{Ln } 2/k$$

Para la discusión comparativa entre ambos experimentos, se realizó la simulación de partición ambiental del glifosato y del 2,4-D utilizando el programa EPI Suite[™] desarrollado por la agencia ambiental de Estados Unidos (EPA, 2010).

Variables biológicas

La concentración de **clorofila α fitoplanctónica**, las abundancias del micro (>20 μm) y nano (2–20 μm) **fitoplancton** y del **picoplancton** (<2 μm) fueron calculadas a través de los métodos detallados en el capítulo I, analizando separadamente los organismos vivos y muertos en el caso del micro+nano fitoplancton. Se consideraron organismos muertos a aquellos que no tenían preservada la estructura celular o la cubierta de sílice para el caso de las diatomeas. Se calcularon los valores riqueza específica, la diversidad (índice de Simpson) y la equitatividad del micro+nano fitoplancton siguiendo las ecuaciones y métodos del capítulo I.

El efecto del glifosato, el 2,4-D y su mezcla sobre la colonización de la **comunidad perifítica** se estudió mediante la sumersión de dos tiras rectangulares de policarbonato de 200 cm^2 (4 x 25 cm) (Fig. 2a) cada una sostenida por un gancho de metal y orientada de forma similar en todas las UE. Los sustratos fueron sujetos en cada bolsa, conservando la misma orientación espacial, a T0 justo después de la aplicación de los tratamientos (Fig. 2b). A tiempo final, las tiras de policarbonato fueron retiradas, limpiándose la cara interior (cara en contacto con la bolsa). Se seleccionó el fragmento a partir de los primeros 5 cm de la línea de superficie, para abajo. Los 2 sustratos por mesocosmos, fueron colocados en bolsas herméticas individuales y procesadas inmediatamente, siendo raspados y llevados a un volumen final de 60 mL con agua destilada (Fig. 3b y c). La superficie total de raspado para cada UE fue calculada midiendo cada sustrato.

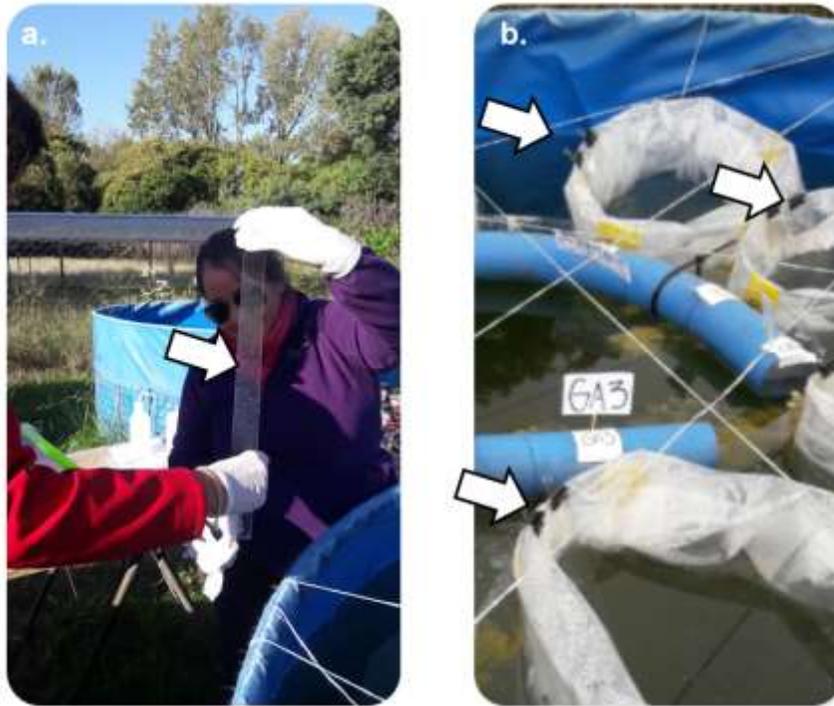


Fig. 2: Imágenes de los sustratos utilizados para la evaluación del desarrollo del perifiton (a) y su ubicación en las UE (b).

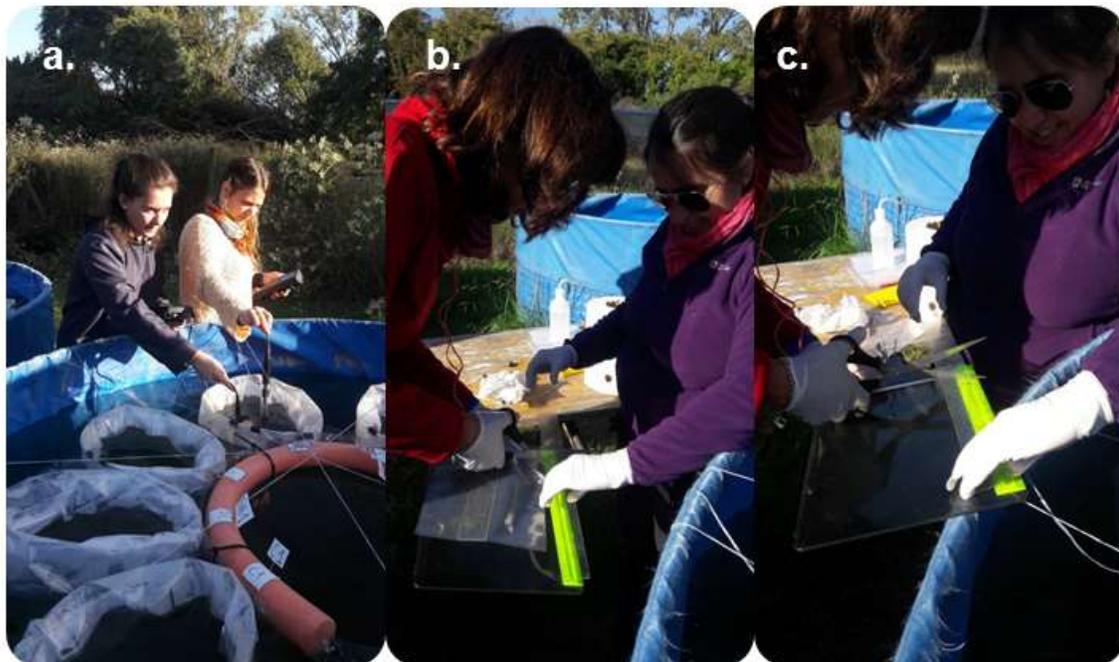


Fig. 3: Imágenes de la medición de propiedades físicas y químicas in situ (a) y del retiro y corte de sustratos a tiempo final, con preservación de sólo aquellas superficies colonizadas para el posterior procesamiento del perifiton (b y c).

Las variables medidas sobre la comunidad perifítica, evaluadas a tiempo final, fueron peso seco libre de cenizas, concentración de clorofila α e índice autotrófico y las abundancias del micro+nano fito-perifiton y fueron realizadas al igual que en el capítulo II. Para la determinación de la concentración de clorofila α , 20 mL del volumen que contiene todo lo raspado, fueron filtrados a través de filtros Whatman® GF/F y procesados al igual que en el capítulo I. Otros 20 mL fueron utilizados para la determinación del peso seco y cenizas a través de su filtración por filtros Whatman® GF/C mediante la misma técnica desarrollada en el capítulo II. Utilizando las distintas variables de masa calculadas se caracterizó el perifiton según la clasificación detallada en la Tabla 1 (Lakatos, 1989).

% Cenizas	I.	Inorgánico	>75	Cenizas/PS*100
	II.	Inorgánico-orgánico	50-75	
	III.	Orgánico-inorgánico	25-50	
	IV.	Orgánico	< 25	
% Clorofila α	I.	Autotrófico	> 0,60	Clorofila α /PSLC *100
	II.	Auto-heterotrófico	0,25-0,60	
	III.	Hetero-autotrófico	0,10-0,25	
	IV.	Heterotrófico	< 0,10	

Tabla 1. Clasificación del perifiton según porcentaje de cenizas y clorofila α , adaptado de Lakatos (1989).

Análisis estadístico

Con el objetivo de verificar que ambos experimentos fueran comparables, se realizó una prueba de t comparando las concentraciones reales de G y 2,4-D de cada para cada tratamiento a T0. Para el análisis de las variables físicas y químicas y de las abundancias de las diferentes fracciones se aplicó ANOVA de medidas repetidas, siendo el tiempo el factor 1 con 4 niveles y el tratamiento el factor 2 con 7 niveles con comparaciones múltiples de Holm-Sidak. Para el análisis del perifiton y de

los índices de diversidad se utilizó ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los programas utilizados fueron SigmaPlot® v11 e InfoStat®.

El modelo de aditividad de las mezclas se evaluó del mismo modo que el capítulo II, construyéndose un gráfico multiparamétrico con las zonas de aditividad, sinergismo y antagonismo.

Experimento utilizando sistema en estado claro

Resultados

Variables físicas y químicas

Las concentraciones reales de herbicidas analizadas a T0 fueron similares a las concentraciones nominales esperadas en tanto que las vidas medias fueron de 16 días para el glifosato y de 99 días para el 2,4-D (Tabla 2 y Fig. 4).

	Nominal (mg/L)		Real (mg/L)	
	G	2,4-D	G	2,4-D
Control	0	0	< LD	< LD
GB	0,30	0	0,28 ± 0,06	< LD
2,4-DB	0	0,135	< LD	0,11 ± 0,01
MB	0,30	0,135	0,25 ± 0,05	0,12 ± 0,01
GA	3	0	3,09 ± 0,08	< LD
2,4-DA	0	1,35	< LD	1,02 ± 0,07
MA	3	1,35	2,93 ± 0,33	1,05 ± 0,13
Vida media (días)				
	Glifosato		16	
	2,4-D		99	

Tabla 2. Concentraciones nominales y concentraciones reales promedio (± 1 DE) de la concentración de herbicidas medidas a T0 en el experimento claro y vidas medias. LD: límite de detección.

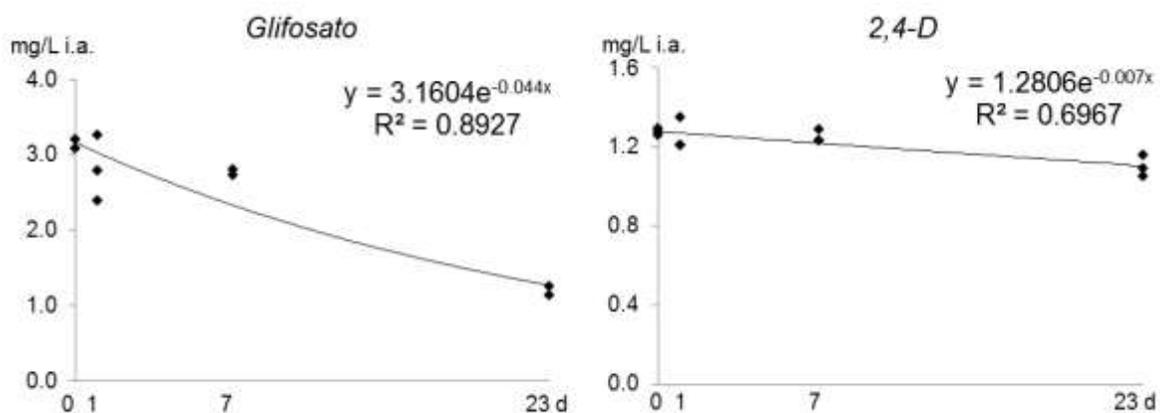


Fig. 4: Curvas de concentraciones y regresiones exponenciales obtenidas para glifosato y 2,4-D.

La temperatura media diaria del aire fue de 21,9°C (valores mínimo y máximo de 15,0 y 24,1°C) mientras que el volumen de lluvia total ingresado en cada UE fue de 7,840 mL divididos en 6 episodios durante todo el experimento (Fig. 5).

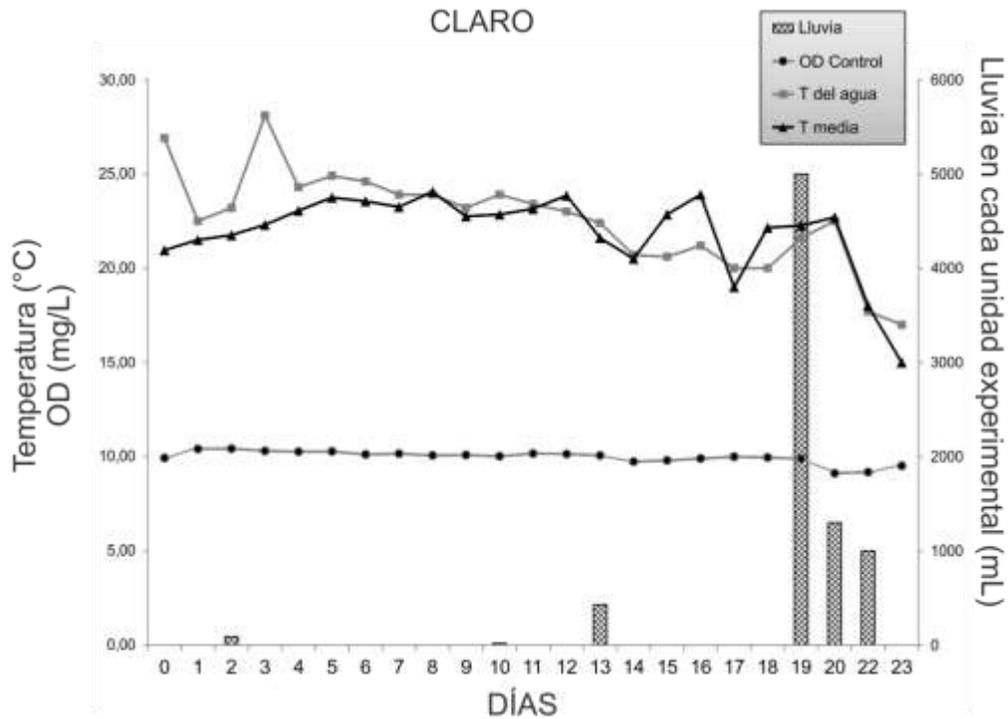


Fig. 5: Temperatura promedio del aire y del agua (°C); volumen de lluvia caída (mL) acumuladas en cada UE (barras) y concentración de oxígeno disuelto promedio medida en los controles para el experimento claro.

La Tabla 3 resume los resultados de las variables físicas y químicas estudiadas durante el experimento. De todas, la única que mostró diferencias sostenidas en el tiempo respecto de los controles fue el fósforo total que se vio incrementado en los tratamientos GA y MA desde el tiempo inicial hasta el tiempo final (ANOVA, $p < 0,001$ ambos). También se detectó un aumento significativo de la conductividad a T0 en los tratamientos GA y MA. Finalmente, en los tratamientos GA y MA, el pH disminuyó a T0 y aumentó a T2 y T3 (ANOVA, $p < 0,001$ para los tres casos). La turbidez de la MA a T3 fue significativamente 1,83 veces mayor al de los controles (ANOVA, $p < 0,001$).

Por otro lado, se observó que la conductividad, la turbidez y la concentración de clorofila α en los controles sufrieron una disminución significativa hacia el tiempo final del experimento.

	Control	GB	GA	2,4-DB	2,4-DA	MB	MA
Conductividad (mS/cm)							
T0	262,3 ± 2,2	264,3 ± 0,6	265,7 ± 0,6	263,7 ± 0,6	263,7 ± 0,6	264,7 ± 2,1	266,7 ± 0,6
T1	263,6 ± 3,8	265,3 ± 0,6	267,0 ± 1,0	265,3 ± 1,0	265,0 ± 1,0	265,7 ± 3,1	267,7 ± 0,6
T2	269,5 ± 1,1	270,0 ± 1,0	270,0 ± 1,0	270,3 ± 0,6	269,7 ± 0,6	270,7 ± 3,5	270,3 ± 0,6
TF	223,0 ± 1,7	223,0 ± 3,0	225,0 ± 1,73	225,3 ± 1,2	224,3 ± 2,1	223,0 ± 3,6	223,3 ± 2,5
Turbidez (NTU)							
T0	2,12 ± 0,16	2,09 ± 0,33	1,55 ± 0,10	1,99 ± 0,14	2,13 ± 0,22	2,13 ± 0,14	2,05 ± 0,48
T1	2,21 ± 0,32	2,32 ± 0,30	2,73 ± 0,71	3,54 ± 0,43	2,56 ± 0,61	2,57 ± 0,38	1,74 ± 0,35
T2	1,65 ± 0,34	1,04 ± 0,14	1,55 ± 0,06	2,43 ± 1,03	2,18 ± 0,47	1,03 ± 0,09	1,29 ± 0,47
TF	1,77 ± 0,39	2,17 ± 0,33	2,32 ± 0,24	1,83 ± 0,16	2,26 ± 0,17	1,81 ± 0,42	3,28 ± 0,62
pH							
T0	8,47 ± 0,04	8,50 ± 0,09	8,30 ± 0,10	8,50 ± 0,12	8,50 ± 0,04	8,43 ± 0,04	8,29 ± 0,08
T1	8,46 ± 0,05	8,50 ± 0,10	8,23 ± 0,11	8,61 ± 0,10	8,59 ± 0,04	8,56 ± 0,04	8,26 ± 0,06
T2	8,69 ± 0,06	8,74 ± 0,07	9,11 ± 0,03	8,74 ± 0,04	8,73 ± 0,12	8,84 ± 0,03	8,97 ± 0,08
TF	8,25 ± 0,20	8,24 ± 0,11	9,11 ± 0,13	8,22 ± 0,15	8,49 ± 0,28	8,23 ± 0,16	9,15 ± 0,25
Nitrógeno Total (mg/L)							
T0	0,88 ± 0,12	1,00 ± 0,10	0,83 ± 0,06	1,07 ± 0,06	0,63 ± 0,15	0,70 ± 0,02	1,23 ± 0,15
TF	0,93 ± 0,10	0,70 ± 0,10	1,00 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,07 ± 0,06	1,2 ± 0,10	1,13 ± 0,12
Fósforo Total (mg/L)							
T0	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,61 ± 0,02
TF	0,14 ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,61 ± 0,07
Clorofila α (µg/L)							
T0	6,62 ± 1,07	6,79 ± 1,18	5,77 ± 3,11	5,77 ± 3,27	10,19 ± 4,44	3,40 ± 0,59	5,09 ± 1,02
T1	2,21 ± 1,19	4,41 ± 2,12	2,38 ± 1,56	3,74 ± 2,35	2,38 ± 1,18	3,74 ± 1,18	2,72 ± 0,59
T2	4,92 ± 2,36	4,07 ± 2,70	8,83 ± 0,59	6,45 ± 0,59	4,41 ± 2,12	4,07 ± 2,04	5,43 ± 0,59
TF	2,72 ± 0,53	2,04 ± 1,76	4,07 ± 1,02	1,02 ± 1,02	2,04 ± 1,02	1,70 ± 0,59	3,40 ± 0,59

Tabla 3. Variables físicas y químicas de los 4 tiempos en el experimento claro. T0=15 minutos luego de la adición de los herbicidas, T1: 1 día, T2: 7 días y T3=23 días. Los valores corresponden a los promedios ± DE de las réplicas (n=6 control, n=3 tratamientos). En negrita se muestran las diferencias significativas respecto del control (ANOVA, p<0,05).

Micro+nano fitoplancton

Durante el experimento y teniendo en cuenta todos los tratamientos, se identificaron 18 especies pertenecientes a 6 grupos (Tabla 4). Considerando los controles en cada tiempo y calculando los porcentajes de las abundancias de cada grupo respecto al total, predominaron los organismos pertenecientes al grupo Chlorophyta en todos los tiempos con excepción de T2, con un máximo de 68,42% (T0) y un mínimo de 29,88% (T2), seguidas por Dinophyceae con un máximo de 30,15% (T2) y un mínimo de 5,46% (T3). En tercer lugar, se encontró el grupo Bacillariophyceae con un máximo de 22,11% (T2) y un mínimo de 2,99% (T1). Chrysophyceae se encontró sólo a T1 con un 36,24% y a T2 con un 17,76%, mientras que el grupo Cyanobacteria tuvo un máximo de 1,07% (T3), finalmente los organismos pertenecientes a Cryptophyceae sólo fueron encontrados a T0 (Fig. 6).

Grupo	Especie
Cyanobacteria	<i>Leptolyngbya sp.</i>
Chlorophyta	<i>Choricystis sp.</i>
	<i>Cosmarium sp.</i>
	<i>Chlorella sp.</i>
	<i>Oocystis solitaria</i>
	<i>Scenedesmus pulloides</i>
	<i>Scenedesmus acuminatus</i>
	<i>Scenedesmus ecornis</i>
	<i>Tetraedron minimum</i>
	<i>Staurastrum sp.</i>
	<i>Phacotus sp.</i>
Bacillariophyceae	<i>Monoraphidium circinale</i>
	<i>Monoraphidium concertum</i>
	<i>Fragilaria sp.</i>
	<i>Navicula sp</i>
Dinophyceae	<i>Peridinium sp.</i>
Chrysophyceae	<i>Ochromonas sp.</i>
Cryptophyceae	<i>Cryptomona erosa</i>

Tabla 4. Listado de especies durante todo el experimento claro considerando controles y tratamientos.

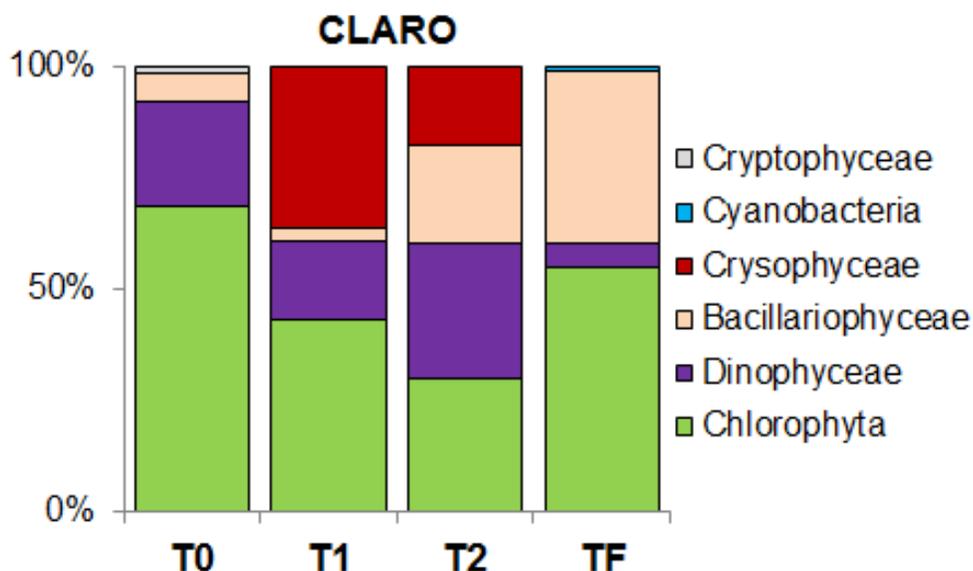


Fig. 6: Abundancia relativa de grupos algales del micro+nano fitoplancton en los controles de los 4 tiempos (T0, T1, T2 y T3) del experimento claro.

En el sistema claro la abundancia de los organismos del micro+nano fitoplancton vivo presentó un máximo de 20.289 ± 4.611 ind/mL a T0 (2,4-DB) y un mínimo a T3 con 765 ± 517 ind/mL (GB). La abundancia de los organismos muertos varió entre un mínimo de 282 ± 138 ind/mL a T2 (GA) y un máximo de 3.202 ± 1.585 ind/mL a T0 (MB). Se observaron efectos de los tratamientos para esta fracción, a T0 el micro+nano vivo aumentó significativamente 1,3 veces en el tratamiento 2,4-DB (ANOVA, $p=0,007$), disminuyendo 0,68 veces para el tratamiento MB (ANOVA, $p=0,004$) (Fig. 7A). Al mismo tiempo los organismos muertos aumentaron en abundancia en los tratamientos MB y MA (ANOVA, $p<0,001$ y $p=0,008$ respectivamente) (Fig. 8A). Estas dos últimas variaciones no fueron persistentes en el tiempo, ya que a T1 en ambos tratamientos la abundancia de organismos del micro+nano fitoplancton muertos fue significativamente menor que en los controles. La mayor variación de los organismos vivos respecto de los controles producto de los tratamientos fue observada a T2, donde las abundancias mostraron aumentos de 5,5 y 2,5 veces del micro+nano vivo para los tratamientos GA y MA (ANOVA, $p<0,001$ y $p=0,003$ respectivamente). Finalmente, a T3 no se observaron diferencias

significativas respecto de los controles para ningún tratamiento en los organismos vivos y muertos (Fig. 7A y 8A).

En las figuras 7B y 8B se presentan las diferencias respecto a los controles de las abundancias de los organismos vivos (Fig. 7) y muertos (Fig. 8) de las principales 4 especies que cubren el 80,05% del total de las abundancias de los organismos vivos. Si bien se graficaron estas 4 especies, el análisis estadístico fue realizado para todas las especies presentes. Las variaciones de las abundancias por especie muestran una correspondencia entre el aumento de las abundancias totales a T2 para los tratamientos GA y MA y las abundancias de la especie más abundante *Choricystis* sp. (Fig. 7B.1) mientras que los aumentos a T0 en el tratamiento 2,4-DA parecen ser explicados por el aumento de *Peridinium* sp. (Fig. 7B.2). Finalmente, disminuciones significativas de los individuos muertos de *Ochromonas* sp. se observaron a T1 en los tratamientos GB, GA, 2,4-DB, MB y MH (Fig. 8B.3).

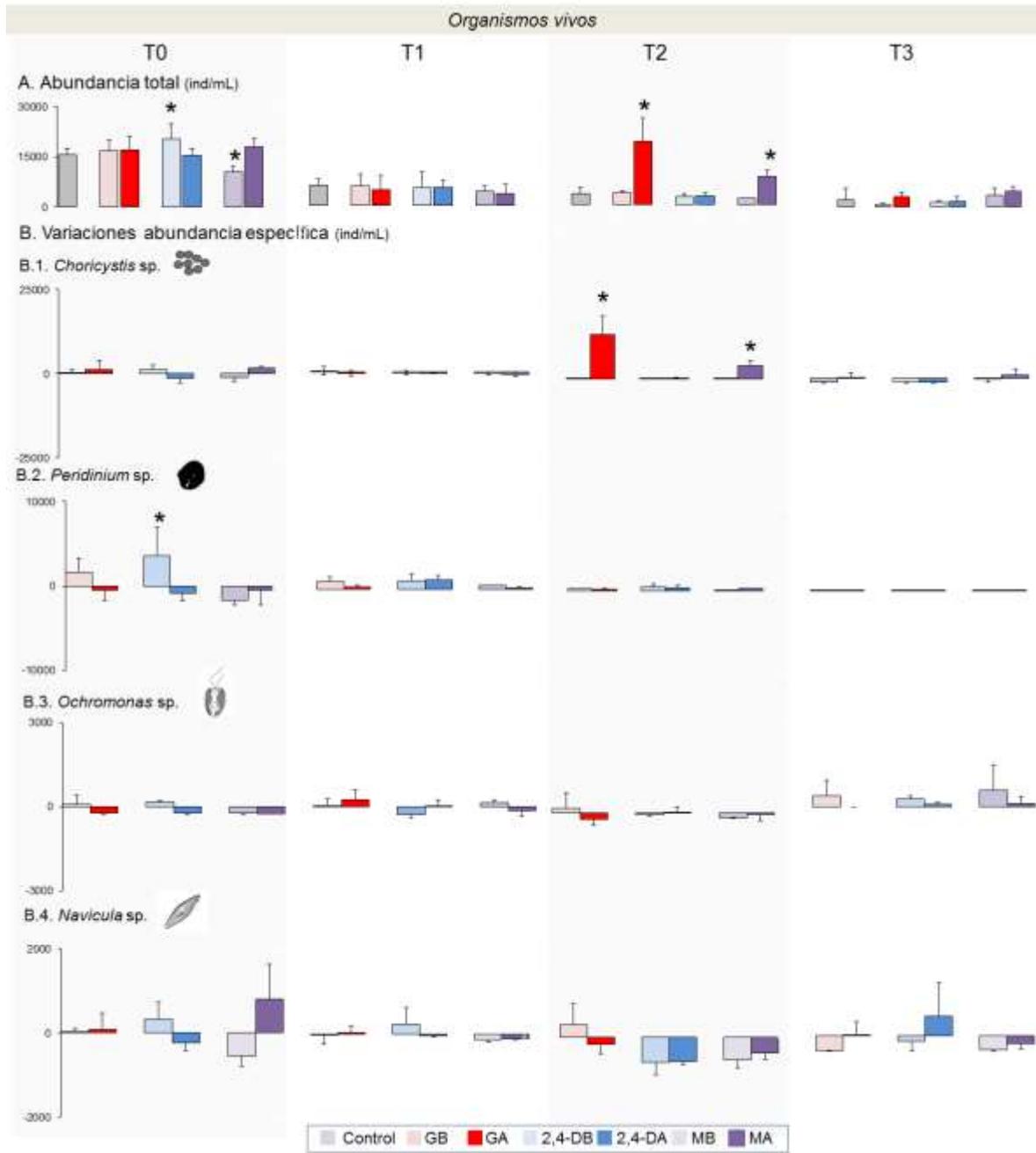


Fig. 7: Abundancia de organismos vivos del micro+nano fitoplancton (A) y variaciones de las abundancias específicas para las 4 especies más abundantes (B 1, 2 3 y 4) para los 4 tiempos (T0, T1, T2 y T3). Barra: +/- 1DE. (*) diferencia significativa respecto de los controles (ANOVA $p < 0,05$, comparaciones múltiples de Holm-Sidak). Las ilustraciones no están a escala.

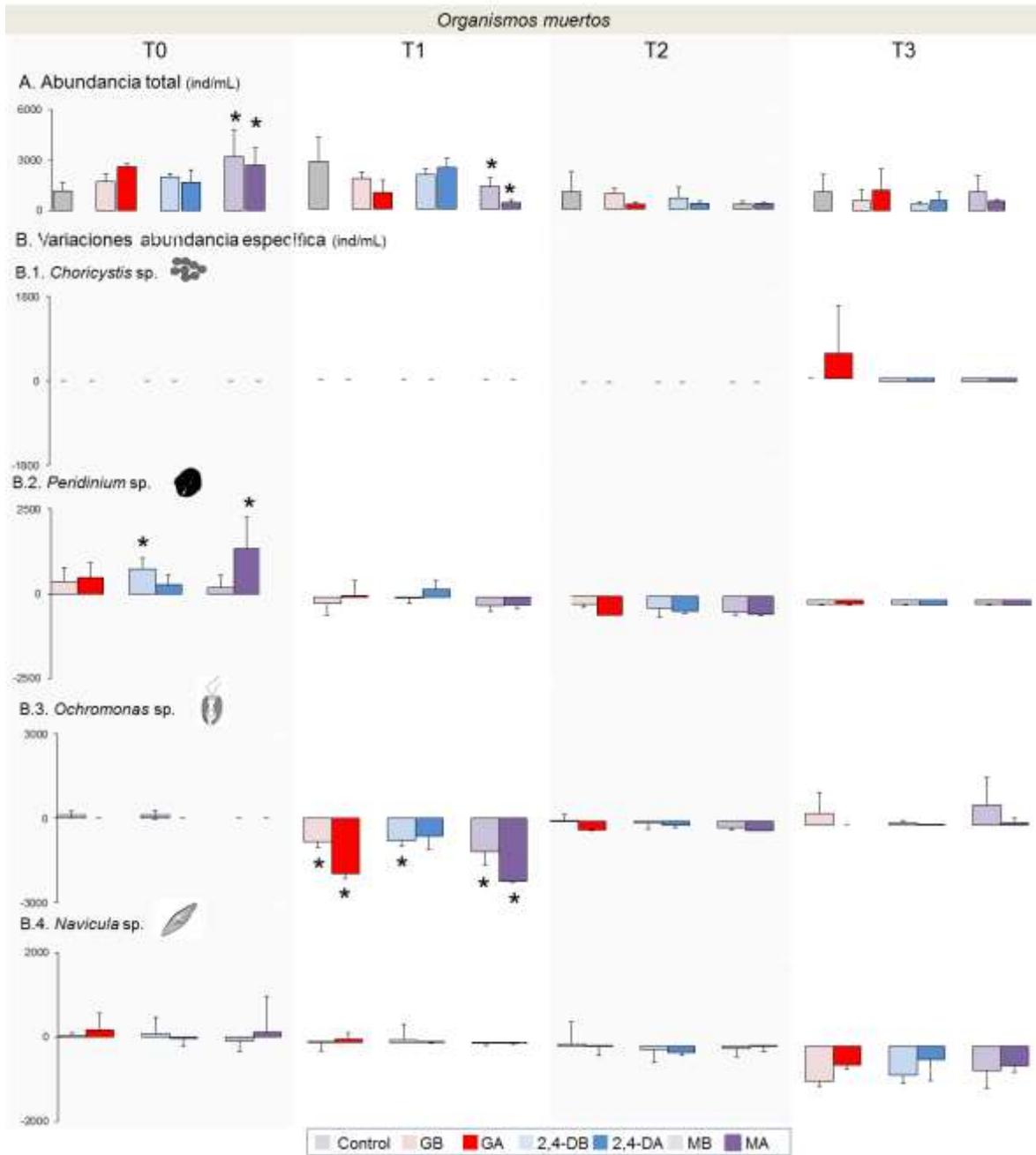


Fig. 8: Abundancia de organismos muertos del micro+nano fitoplancton (A) y variaciones de las abundancias específicas para las 4 especies más abundantes (B 1, 2 3 y 4) para los 4 tiempos (T0, T1, T2 y T3). Barra: +/- 1DE (*) diferencia significativa respecto de los controles (ANOVA $p < 0,05$, comparaciones múltiples de Holm-Sidak). Las ilustraciones no están a escala.

		Riqueza (S)	Simpson (1-D)	Equitatividad
T0	Control	10,50	0,62	0,27
	GB	10,67	0,67	0,30
	GA	9,00	0,61	0,29
	2,4-DB	9,67	0,67	0,31
	2,4-DA	8,67	0,65	0,33
	MB	6,00	0,54	0,37
	MA	8,00	0,62	0,34
T1	Control	8,67	0,61	0,31
	GB	9,00	0,59	0,28
	GA	8,33	0,59	0,30
	2,4-DB	8,00	0,63	0,35
	2,4-DA	7,33	0,63	0,37
	MB	7,33	0,53	0,30
	MA	6,67	0,50	0,30
T2	Control	7,83	0,70	0,47
	GB	8,33	0,71	0,43
	GA	9,33	0,23	0,14
	2,4-DB	6,00	0,61	0,47
	2,4-DA	7,00	0,65	0,45
	MB	5,33	0,56	0,48
	MA	10,33	0,50	0,20
T3	Control	5,83	0,60	0,46
	GB	4,67	0,37	0,40
	GA	8,00	0,62	0,37
	2,4-DB	7,67	0,74	0,51
	2,4-DA	6,33	0,66	0,48
	MB	5,67	0,57	0,43
	MA	8,67	0,48	0,25

Tabla 5. Valores promedio de riqueza específica (S), diversidad (Simpson) y equitatividad del micro+nano fitoplancton para cada tiempo y tratamiento. Negrita: valores estadísticamente significativos respecto del control (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

En la Tabla 5 se presentan los valores promedio obtenidos de riqueza específica, diversidad específica y equitatividad del micro+nano fitoplancton para cada uno de los tratamientos y tiempos. Se observa una disminución de la diversidad en los tratamientos GA y MA a T2 (KW, $p=0,0013$ y $p=0,04$ respectivamente) así también como de la equitatividad (KW, $p=0,01$ y $p=0,04$ respectivamente). Finalmente, a T3 la riqueza aumentó 49% en la MA (KW, $p=0,02$).

Picoplancton

Las PEuk oscilaron entre un máximo de 2.826 (\pm 1.360) ind/mL a T2 y un mínimo 826 (\pm 696) ind/mL a T3, mostrando aumentos significativos a T2 para GA y MA con valores medios de 414% (ANOVA, $p < 0,001$) y 204% (ANOVA, $p = 0,006$) respectivamente (Fig. 9A). Las Pcy mostraron un valor máximo a T2 con 104,313 (\pm 72,043) ind/mL y el mínimo a T1 con 79,910 (\pm 9,832) ind/mL. No se observaron efectos de los tratamientos para esta fracción (Fig. 9B). Finalmente, las BH variaron desde $5,08E^6$ (\pm $2,73E^6$) a T1 hasta $2,59E^7$ (\pm $3,6E^6$) a T2, esta fracción tuvo variaciones significativas en varios tiempos en los diferentes tratamientos: a T0 con un aumento promedio de 52% en GA ($p < 0,001$), a T1 2,4-DA, GA y MA mostraron incrementos de 60%, 49% y 136% ($p < 0,001$ todos). De manera opuesta, a T2 algunos tratamientos mostraron una abundancia menor en comparación con los controles con -26% ($p = 0,011$), -27% ($p = 0,008$) y -27% ($p = 0,009$) para GA, 2-4-DA y MA (Fig. 9C).

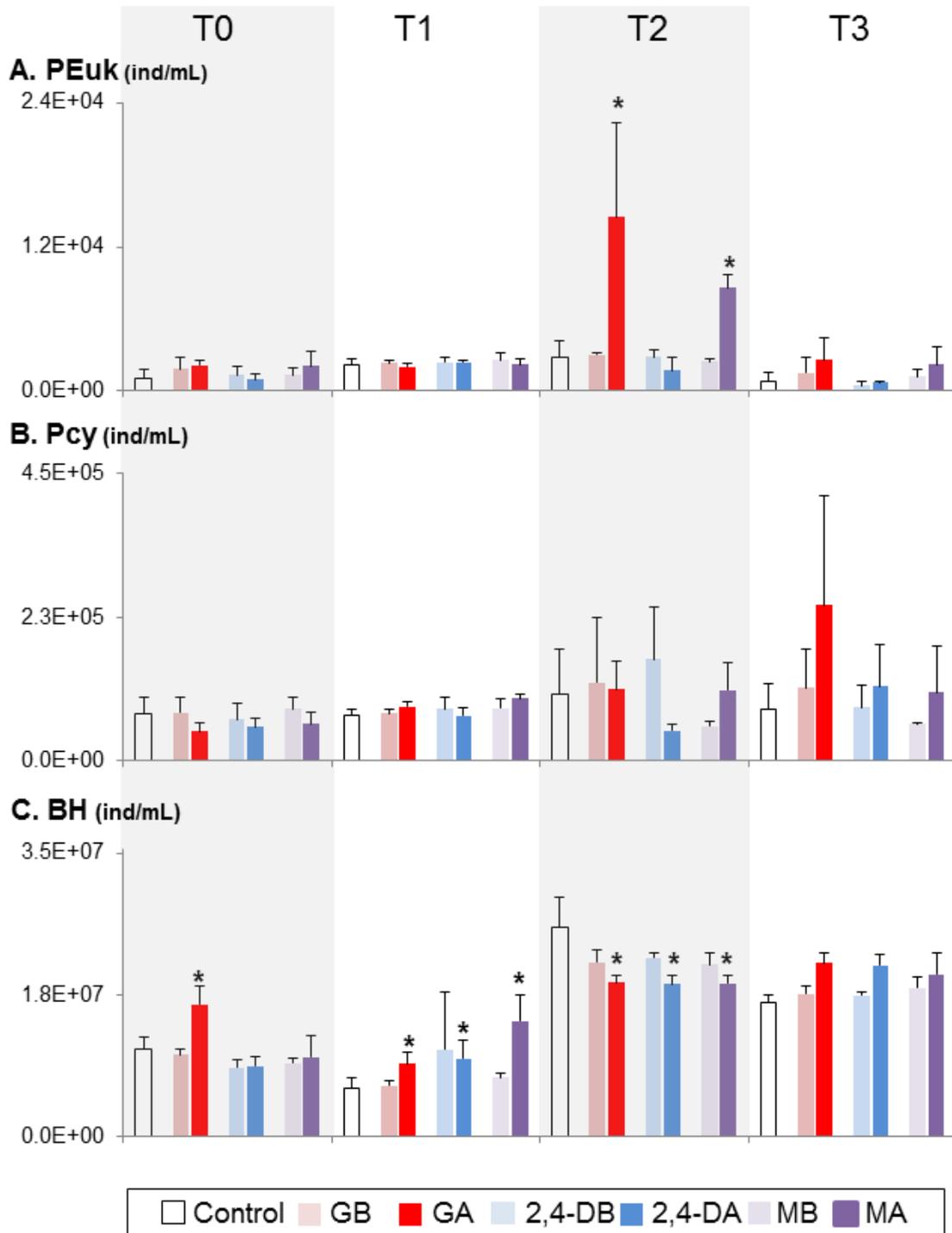


Fig. 9: Valores medios (+ 1DE) de las abundancias del picoplancton en el experimento claro. a) Picoeucariotas (PEuk), b) Picocianobacterias (Pcy) y c) Bacterias heterótrofas (BH). (*) diferencia significativa respecto de los controles (ANOVA $p < 0,05$, comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Perifiton

Respecto a la fracción algal del perifiton, se determinaron 13 especies pertenecientes a 5 grupos (Tabla 6). Las Bacillariophyceae representaron el 87,7% de la abundancia total en el grupo control, seguida por Crysophyceae con un 9,7%. Finalmente, Dinophyceae, Chlorophyta y Cyanobacteria, las que registraron bajas proporciones con 1,6%, 0,9% y 0,1% respectivamente (Fig. 10). El análisis de las abundancias totales de los componentes autótrofos de la comunidad no arrojó diferencias significativas de los tratamientos respecto de los controles. Sin embargo, el estudio de las abundancias por especie mostró un aumento de la cianobacteria filamentosa *Leptolyngbya* sp. con un desarrollo de 16,8 veces mayor con respecto a los controles en GA (KW, $p=0,01$) y de 36,5 veces en MA (KW, $p=0,0027$). Por otro lado, en el tratamiento MA también se observó un incremento de aproximadamente 20 veces de la abundancia de *Staurastrum* sp. (KW, $p=0,01$) con respecto al control.

Grupo	Especie
Cyanobacteria	<i>Leptolyngbya</i> sp.
	<i>Aphanocapsa</i> sp.
	<i>Aphanothece</i> sp.
Chlorophyta	<i>Cosmarium</i> 1 sp.
	<i>Cosmarium</i> 2 sp.
	<i>Staurastrum</i> sp.
	<i>Oocystis solitaria</i>
	<i>Scenedesmus</i> sp.
	<i>Tetraedron mínimum</i>
Bacillariophyceae	<i>Fragilaria</i> sp.
	<i>Navicula</i> sp.
Dinophyceae	<i>Peridinium</i> sp.
Chrysophyceae	<i>Ochromonas</i> sp.

Tabla 6. Listado de especies de la fracción algal del perifiton del experimento claro considerando controles y tratamientos.

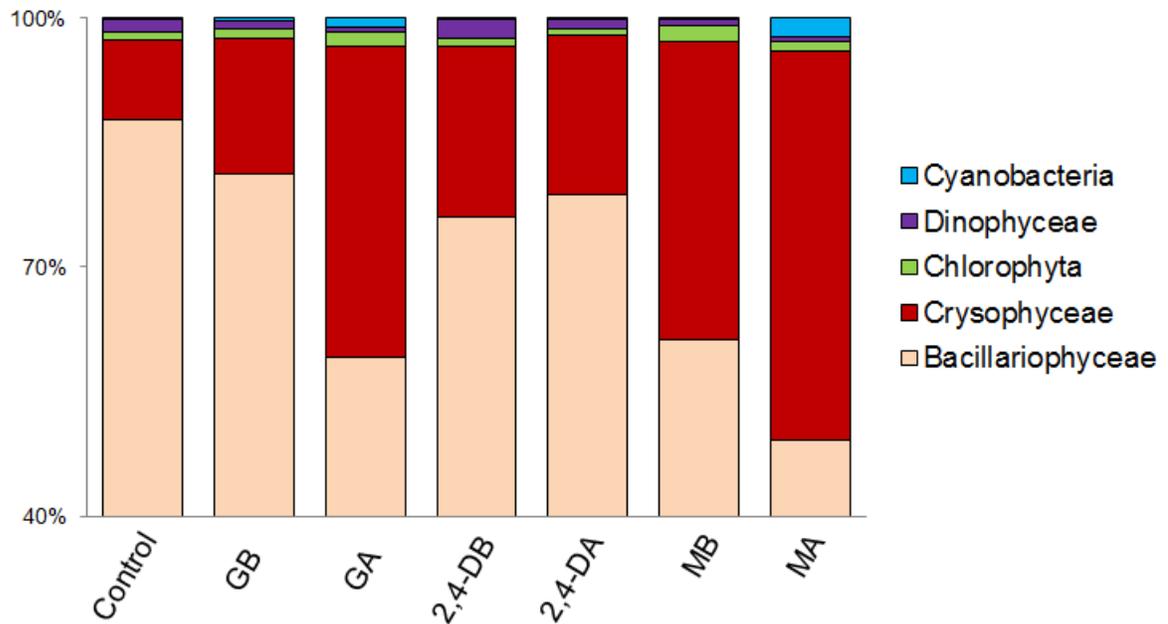


Fig. 10: Abundancia relativa de grupos algales en el perifiton en todos los tratamientos.

El análisis de la riqueza específica y de los índices de diversidad de las especies algales y de cianobacterias presentes no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Durante el experimento, la comunidad perifítica en los controles, alcanzó un valor promedio de PS de $67,11 (\pm 11,67) \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los efectos de los tratamientos sobre el desarrollo de la comunidad mostraron que en los tratamientos GA y MA se obtuvieron concentraciones de clorofila α con respecto a los controles 3 y 4 veces mayores, respectivamente. El mismo patrón de aumento se observó para el PS y el PSLC, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas para estos casos (Fig. 11).

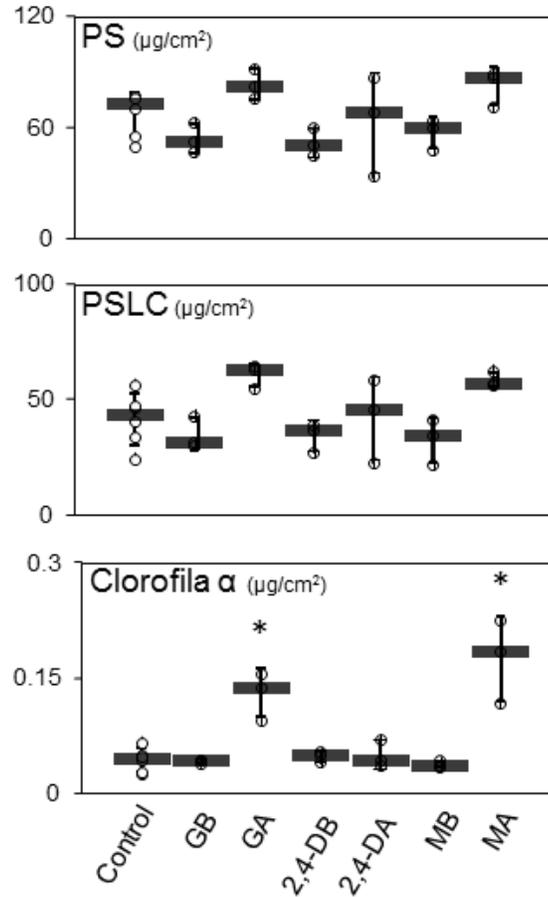


Fig. 11: Variables de masa del desarrollo del perifiton en el experimento claro: PS (Peso Seco), PSLC (Peso Seco Libre de Cenizas) y clorofila α . En la figura se observan los valores obtenidos para cada UE (puntos) y la mediana (barra). (* KW, $p < 0,05$).

La clasificación del perifiton a partir de los porcentajes de cenizas y la concentración de clorofila α siguiendo lo propuesto por Lakatos (1989), muestra que la comunidad tiende hacia una estructura de naturaleza más orgánica y autotrófica en escenarios con presencia de glifosato (GA y MA) (Fig. 12).

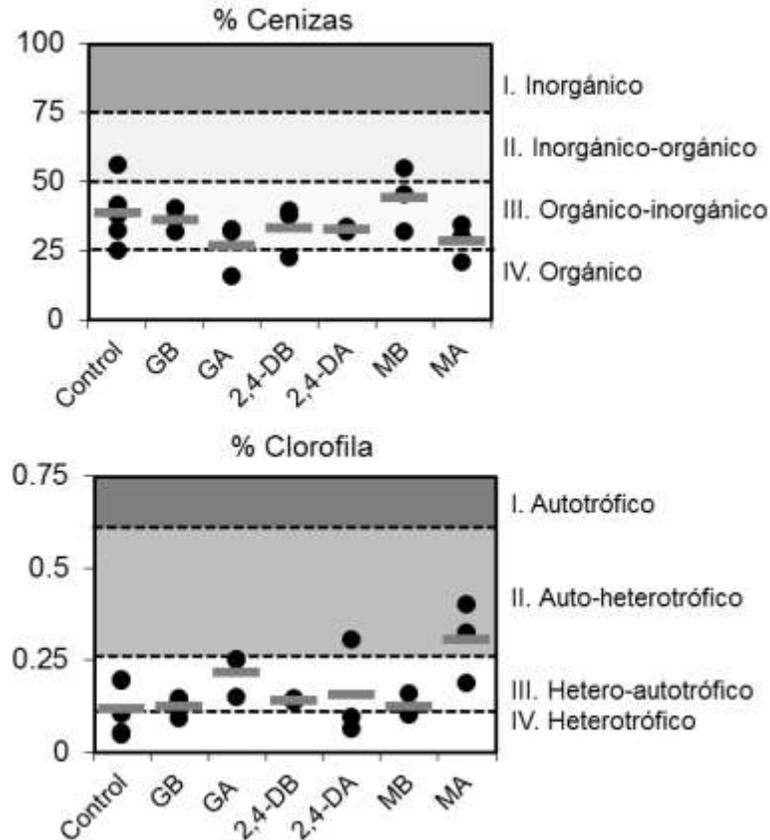


Fig. 12: Clasificación según Lakatos (1989) del perifiton por tratamiento desarrollado durante el experimento en el sistema claro. Se visualiza cada réplica (punto) y el promedio de los tratamientos (barra).

Estudio del efecto mezcla sobre las principales variables estructurales

En la Fig. 13 se muestra el análisis integrado del tipo de efecto que tuvo la mezcla de herbicidas sobre las principales variables físicas, químicas y biológicas. Para cada variable se estudiaron por separado los efectos mezcla de las concentraciones bajas (MB) y concentraciones altas (MA) a cada tiempo. Cuando los valores obtenidos en los tratamientos mezcla se desviaron del modelo aditivo los intervalos de confianza obtenidos son visualizados dentro de las zonas de antagonismo (izq) o sinergismo (der) según corresponda.

Se observaron cuatro desviaciones a la aditividad. La concentración de clorofila α (T0) en MA y las abundancias de organismos vivos del micro+nano fitoplancton en MA (T3) y de organismos muertos en MA (T2), mostraron antagonismo (t-student

$p < 0,05$). Por otro lado, la abundancia de organismos vivos del micro+nano fitoplancton en MB (T2) mostró sinergismo.

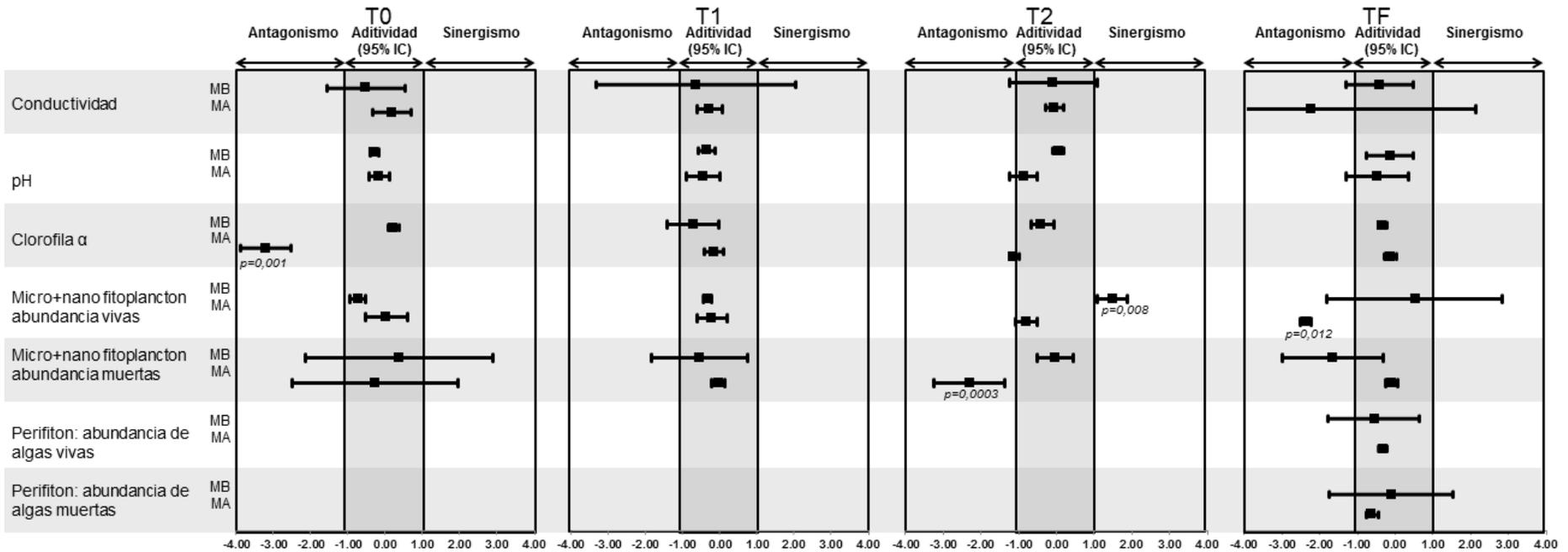


Fig. 13: Estudio del efecto mezcla sobre las variables físicas, químicas y biológicas en el experimento claro. Para cada variable se graficó el efecto mezcla a concentración baja (MB) y a concentración alta (MA) en los 4 tiempos de muestreo (T0, T1, T2 y T3) y en T3 para el perifiton. Los recuadros verticales en gris oscuro del -1 al 1 corresponden a las zonas de los efectos esperados por aditividad con un intervalo de confianza del 95%. Todos los intervalos están normalizados a (-1,1) para una visualización comparativa entre las variables. (*) t-Student, $p < 0,05$.

Discusión

Este experimento fue realizado en mesocosmos al aire libre utilizando comunidades establecidas con un sistema que puede ser caracterizado, por sus valores de abundancias, turbidez, concentración de clorofila α y el fósforo total, como claro y mesotrófico (Wetzel, 2001; Scheffer et al. 1993). Los resultados mostraron el efecto sostenido en el tiempo en los sistemas tratados con 3 mg/L de glifosato en su formulado comercial Roundup Max[®], sea solo o mezclado con 2,4-D (GA y MA), a través del aumento del fósforo total. Este tipo de aumento luego de la adición de formulados comerciales de glifosato, que en este caso fue de 0,465 y 0,485 mg/L para GA y MA respectivamente fue previamente reportado en otros trabajos, según la concentración utilizada en cada caso (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2012, Pizarro et al. 2016, Gattás et al. 2016). La molécula de glifosato es un compuesto fosforado ($C_3H_8NO_5P$). El fósforo representa 18,32% de su peso molecular. Al contaminar el sistema experimental con G (solo o en combinación con 2,4-D) ese fósforo pasa a ser parte de los procesos físicos, químicos y biológicos que afectan la integridad estructural y funcional de los sistemas. La concentración más alta del formulado comercial (3 mg/L) que se utilizó en este experimento aportó, en teoría, 0,55 mg/L de fósforo al sistema, lo que explicaría el aumento observado. En los casos donde la concentración agregada fue 10 veces menor (GB y MB) no se observaron diferencias significativas en el fósforo total del sistema, lo que podría ser consecuencia de la no detección por el método o por la variabilidad entre las UE al encontrarse al aire libre y la probabilidad de tomar muestras heterogéneas entre UE. En consecuencia, el efecto de agregado de fósforo a menores concentraciones podría no ser detectado por esta variabilidad. Por otro lado, la conductividad aumentó inmediatamente de aplicados los tratamientos GA y MA (T0), debido probablemente al aporte de sales por parte del formulado comercial Roundup Max[®], ya sea la sal de amonio del glifosato u otras sales correspondientes a los aditivos que no se encuentran declarados en la etiqueta del envase comercial.

Se detectó una disminución general (controles y tratamientos) de las abundancias del micro+nano fitoplancton y de la concentración de clorofila α , entre el T0 y T1 (24 hs de diferencia), que podría asociarse a la baja abrupta de $\sim 5^\circ C$ en la temperatura del agua (Fig. 5). Esta disminución de temperatura se observa como local, ya que no fue registrada por la estación meteorológica. Por otro lado, a

T2 la concentración de clorofila α volvió a niveles similares a los de T0 pero sin detectarse que el micro+nano fitoplancton recuperara los valores de abundancia inicial, por lo que el aumento de la concentración de clorofila α planctónica podría estar asociada al aumento de la PEuk que se hizo claramente significativo, principalmente en los tratamientos en presencia de glifosato. También se observó que las precipitaciones, concentradas hacia el final del experimento, produjeron una baja en la conductividad y la concentración de clorofila α fitoplanctónica. Este tipo de dinámica y su posible importancia sobre el comportamiento de las distintas fracciones microbianas autotróficas es observable únicamente en sistemas complejos al aire libre. Las implicancias que puedan tener, o no, este tipo de dinámicas en el impacto de los contaminantes no pueden predecirse a partir de modelos más sencillos en condiciones controladas de laboratorio.

Respecto a las comunidades estudiadas y los tratamientos, se observó que el Roundup Max[®] provocó efectos mayores que el AsiMax 50[®] sobre la estructura de las mismas. En este sentido, en los tratamientos GA y MA se observa un aumento de las abundancias del micro+nano fitoplancton y de las PEuk y una baja en las BH en T2. No se observaron disminuciones de ninguna fracción ni de ninguna especie en estos tratamientos con Roundup Max[®] a concentraciones altas, lo que podría entenderse como un tipo de efecto directo en la promoción del crecimiento algal como producto del aumento del fósforo disponible (Vera et al. 2010, Qiu et al. 2013, Pizarro et al. 2016). Respecto al pH, se observó una disminución a T0 y un aumento a T2 y T3 de los tratamientos GA y MA lo que podría ser consecuencia de la variación en la actividad fotosintética por el aumento y la disminución respectivamente del ácido carbónico en el sistema (Tucker & D'Abramo, 2008). A T0 no se observó en ninguno de esos tratamientos ni la baja de los organismos vivos ni la suba de los muertos, por lo que la reducción inicial del pH pudo haber sido provocada por la reducción de la tasa fotosintética como producto de la inhibición de la actividad enzimática de la EPSP. Mientras que el aumento a T2 pudo ser consecuencia del del aumento observado en las abundancias de la fracción del micro+nano fitoplancton y de las PEuk, conservándose el efecto hasta T3.

En la tabla 7 se presentan los resultados de la revisión bibliográfica de experimentos realizados sobre la fracción planctónica de cuerpos de agua dulce, donde se utilizaron productos a base de glifosato, 2,4-D o su mezcla. Los trabajos

realizados utilizando glifosato muestran estimulación de alguna fracción autotrófica planctónica, ya sea del micro+nano fitoplancton (Gattás et al. 2016 y 2018), de las PEuk (Gattás et al. 2016) o de las Pcy (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2012), habiendo casos donde aumentaron las PEuk y las Pcy en el mismo sistema (Pizarro et al. 2016). Es particularmente interesante que en Vera et al. (2012) se ha observado el aumento del micro+nano fitoplancton y las Pcy en el mismo experimento, lo que descartaría la posibilidad de realizar una generalización sobre la competencia entre el micro+nano fitoplancton y las Pcy. El aprovechamiento del glifosato como fuente de fósforo depende probablemente más de la composición específica y proporciones relativas de ambas fracciones y de la existencia, o no, de especies capaces de utilizarlo.

Por otro lado, y en el mismo sentido de estimulación en el crecimiento, a T3 se observó un mayor grado de desarrollo del perifiton en los tratamientos GA y MA, con el aumento de la clorofila α y de las abundancias específicas de la cianobacteria filamentosa *Leptolyngbya* sp. y de *Staurastrum* sp. observándose, en este caso, una tendencia hacia una comunidad más orgánica y autotrófica. Las especies del género *Staurastrum* son desmideáceas planctónicas con capacidad de síntesis de mucilago, que se cree puede funcionar como sistema de defensa ante predadores, con agregación de los organismos en ciertas circunstancias (Wiltshire et al. 2003). En este caso la especie *Staurastrum* sp. que fue poco abundante en el micro+nano fitoplancton, es probable que dada su forma, con cuatro brazos largos en forma de equis y su capacidad de síntesis de mucílago, haya permitido un aumento de su adhesión- a la comunidad perifítica. Este proceso pudo haber sido potenciado por la formación de una trama más tupida producto el aumento de la filamentosa *Leptolyngbya* sp. en esta comunidad (Souza & Ferragut, 2012). La proporción del grupo Bacillariophyceae en estos dos tratamientos disminuyó, este grupo algal posee frústulos de sílice, lo que podría explicar el cambio observado entre el peso seco libre de cenizas y el contenido de clorofila α (Nalewajko, 1966). Además, la disminución de la proporción de Bacillariophyceae en conjunto con el aumento de las cianobacterias filamentosas y de *Staurastrum* sp. podrían explicar la tendencia observada hacia una comunidad más orgánica y autotrófica.

Si bien el aumento en la abundancia del micro+nano fitoplancton, PEuk y la fracción algal del perifiton pueden ser explicados por el aumento del fósforo del sistema aportado por la molécula de glifosato. Es pertinente mencionar que ese fósforo no está inmediatamente biodisponible para los organismos autótrofos eucariotas; su disponibilidad se presenta recién luego de su metabolización bacteriana (Shushkova et al. 2010, Sun et al. 2019). Algunas bacterias y cianobacterias pueden romper los enlaces fosfonatos como el del glifosato a través de una enzima específica (carbono-fósforo liasa) (Hove-Jensen et al. 2014). Por este motivo, algún tipo de degradación bacteriana de la molécula de glifosato tuvo que haber ocurrido para que a los 7 días del experimento se observara el crecimiento de la fracción autótrofica eucariota (*Choricystis* sp. y las PEuk) y de la biomasa autótrofica del perifiton a tiempo final como producto del enriquecimiento en fósforo. Dos hechos sustentan el efecto directo en el crecimiento de las fracciones algales y cianobacterias por enriquecimiento con fósforo en este experimento: 1. Las abundancias de las BH sufrieron aumentos a T0 y T1, lo que pudo haberse debido a un aumento de las abundancias de las bacterias degradadoras al igual que en lo observado en otros trabajos (Vera et al. 2012, Pizarro et al. 2016); 2. La vida media del glifosato fue de 16 días, más allá de que una parte pudo haber sido absorbida, a los 7 días ya podría haber habido una cantidad significativa de fósforo biodisponible y, a tiempo final, la mayor parte del glifosato se encontraría degradado.

Los valores de vida media del glifosato registrados a partir de experimentos utilizando sistemas de agua dulce y metodologías similares es muy diverso, yendo de 7 (Pérez et al. 2007) a 79 días (Gattás et al. 2016). El valor de vida media del glifosato en este experimento (16 días) fue igual al valor encontrado por Vera et al. (2012), pero bastante menor a lo encontrado por Pizarro et al. (2015) quienes registraron una vida media de 31,5 días a partir de un experimento realizado en agua con muy bajo contenido de clorofila α planctónica (sistema claro). Este rango amplio de los valores de vida media encontrados en los distintos trabajos es probablemente debido a diferentes factores que pueden modificar la tasa de degradación del glifosato como la temperatura, la cantidad de sedimentos y las comunidades biológicas presentes (Heinonen-Tanski, 1989; Tsui & Chu, 2008; Annett et al. 2014).

Finalmente, el análisis de las variables de diversidad del micro+nano fitoplancton mostró una baja de la diversidad y equitatividad al mismo tiempo (T2) y tratamientos (GA y MA) de forma consecuente con el aumento observado de la especie dominante *Chorycistis* sp. Si bien la relación entre la diversidad de un ecosistema y su estabilidad es un debate que lleva muchos años, se asume que depende del tipo de sistema estudiado y de cada situación en particular (McCann, 2000) y que, además, la diversidad tiene un valor intrínseco (Ghilarov, 2000). Debe alertarse entonces, que una sola aplicación del herbicida más utilizado en nuestro país puede provocar la disminución de diversidad de la fracción fitoplanctónica.

	Referencia	Producto	Condiciones experimentales	Estado del agua	Tratamientos (mg/L)	Tiempo (días)	Micro+nano fitoplancton	Picoplancton autotrófico	Bacterias heterótrofas
Glifosato	Pérez et al. (2007)	Roundup®	Mescosmos en tierra	Meso-eutrófico	6 and 12	1,6 and 11	Disminución	Aumento (~40 veces Pcy)	Sin efecto
	Vera et al. (2012)	Glifosato Atanor®	Mesocosmos 90L	Mesotrófico	3,5	0,1,7,14 and 21	Aumento	Aumento (Pcy)	Aumento
	Pizarro et al. (2016)	Ácido	Mesocosmos 70L	Oligotrófico Eutrófico	2,5	1,8,19 y 33	Sin efectos Sin efectos	Aumento (PEuk y Pcy) Aumento (Pcy)	Aumento Disminución
	Gattás et al. (2016)	Ácido y Roundup Max®	Mesocosmos 70L	Mesotrófico	6	0,13 y 34	Aumento con el ácido y con Roundup®	Aumento con Roundup®	Disminución a los 13 días
	Gattás et al. (2018)	Roundup Max®	Mesocosmos 400L	Eutrófico	5	0,1 y 7	Aumento		
2,4-D	Boyle (1980)	Sal DMA	Mesocosmos en tierra	Hiper-eutrófico	~0,6 y ~1,2 (estimado)	3,7, 14, 28, 56	Aumento en la clorofila α		
			Microcosmos en Laboratorio	Hiper-eutrófico	1 y 2	1,2,4 y 7			
	Kobraei & White (1996)	Sal DMA	Campo	Eutrófico	2		Aumentado a 2 mg/L		
			Microcosmos 950 mL	Eutrófico	2,10,40,100 and 1000	0,1,2,4,5,7 and 8			
	Aguayo et al. (2014)	Ácido	Microcosmos 500 mL	Oligotrófico	20	20			Actinobacterias aumentadas
Lozano et al. (2019) (Capítulo I)	AsiMax 50®	Microcosmos 450 mL	Mesotrófico		0,0,02, 0,2, 2,20,200 y 2.000	0 y 7	Disminuído a 2.000 mg/L	PEuk disminuídas a 2.000 mg/L (T0), Pcy aumentadas a 2.000 mg/L (7 días)	
			Eutrófico		0,0,02, 0,2, 2,20,200 y 2.000	0 y 7	Aumentado desde 0,02 hasta 20 mg/L, disminuído a 2.000 mg/L	PEuk y Pcy aumentadas a 2.000 mg/L (T0), Pcy aumentadas a 200 y 2.000 mg/L (7 días)	Aumento a 2.000 mg/L (7 días)
Mezcla	Lozano et al. (2018) (Capítulo II)	Glifosato Atanor® y AsiMax 50®	Microcosmos 450 mL	Eutrófico	0,3, 3 y 6 (G), 0,135 and 1,35 y 2,7 (2,4-D)	7	Disminución en 3 y 6 mg/L (G)		

Tabla 7. Revisión bibliográfica sobre efectos del glifosato, 2,4-D y su mezcla en ecosistemas de agua dulce.

Los efectos del 2,4-D sobre las variables estructurales estudiadas como las abundancias y la estructura taxonómica de las distintas fracciones planctónicas fueron menores, sin presentar ninguna tendencia clara. No se detectaron tampoco efectos del 2,4-D sobre el desarrollo del perifiton. Algunos trabajos han reportado la estimulación del crecimiento algal por parte del 2,4-D ya sea en ensayos utilizando comunidades (Boyle 1980, Kobraei & White, 1996) o cultivos monoalgales (Wong, 2000). En el Capítulo I se concluyó que el mismo formulado comercial de 2,4-D utilizado en este experimento (AsiMax 50[®]) a concentraciones bajas estimula el crecimiento fitoplanctónico dependiendo de las características en composición y abundancia de la comunidad a partir de la cual se realizaron los ensayos, siendo en ese caso el sistema turbio el más afectado. En este experimento se utilizó una comunidad bastante similar a la utilizada en el experimento descrito en el primer capítulo, la cual fue denominada como clara, siendo en ese caso y en el aquí reportado *Choricystis* sp. la especie más abundante del micro+nano fitoplancton. Por lo tanto, los resultados obtenidos en mesocosmos al aire libre a las concentraciones ensayadas (1,35 y 0,135 mg/L) coinciden con lo observado previamente en los microcosmos en condiciones controladas de laboratorio (Lozano et al. 2019). La vida media estimada del 2,4-D fue de 99 días, más de 6 veces superior a la encontrada para el glifosato en el mismo experimento y 3 veces mayor al máximo reportado ya que los datos existentes presentan un rango de 3,2 a 27,8 días (EPA, 2005). Si bien se han descrito bacterias capaces de degradar el 2,4-D (Islam et al. 2018) y habiéndose observado a T1 un aumento en las BH en los tratamientos con 2,4-D, estos cambios no fueron permanentes en el tiempo, lo que podría explicar una baja tasa de degradación.

Respecto a los efectos de la mezcla, tanto en concentración alta como en baja, en general se verificó aditividad, aunque se detectaron algunos casos de antagonismo y sinergismo. En general las variables se comportaron de forma aditiva, probablemente porque el efecto de estimulación auxínica del 2,4-D no fue constatado, posiblemente por no haber especies sensibles al igual que lo observado en el experimento claro del Capítulo I. En el caso particular del sinergismo encontrado para las abundancias del micro+nano fitoplancton vivo a T2 para las concentraciones más bajas de glifosato podría deberse a las propiedades de aporte de fósforo al sistema que posee el glifosato y a las propiedades

auxínicas del 2,4-D (Boyle, 1980, Kobraei & White, 1996, Wong, 2000). En presencia del fósforo aportado por el glifosato y ante un estímulo auxínico hacia el crecimiento o reproducción, que fuera verificado en el capítulo I en un sistema turbio en condiciones controladas de laboratorio, las abundancias de las especies sensibles al 2,4-D como hormona del crecimiento podrían verse estimuladas de forma sinérgica. Sin embargo, este sinergismo se encontró muy cerca del intervalo de confianza (95%) de la aditividad y debe tomarse con recaudos.

Experimento utilizando sistema en estado turbio

Resultados

Variables físicas y químicas

Las concentraciones reales de herbicidas analizadas a T0 fueron similares a la concentración nominal aplicada, en tanto que las vidas medias estimadas fueron de 41 días para el glifosato y de 69 días para el 2,4-D (Tabla 8, Fig. 14).

	Nominal (mg/L)		Real (mg/L)	
	G	2,4-D	G	2,4-D
Control	0	0	< LD	< LD
GB	0,30	0	0,36 ± 0,08	< LD
2,4-DB	0	0,135	< LD	0,14 ± 0,01
MB	0,30	0,135	0,33 ± 0,05	0,11 ± 0,01
GA	3	0	3,14 ± 0,09	< LD
2,4-DA	0	1,35	< LD	1,28 ± 0,02
MA	3	1,35	2,82 ± 0,43	1,26 ± 0,08

Vidas medias (días)	
Glifosato	41
2,4-D	69

Tabla 8. Concentraciones nominales y concentraciones reales promedio (± 1 DE) de la concentración de herbicidas medidas a T0 en el experimento turbio y vidas medias. LD: límite de detección G=0,05 μ g/L y 2,4-D=0,3 μ g/L.

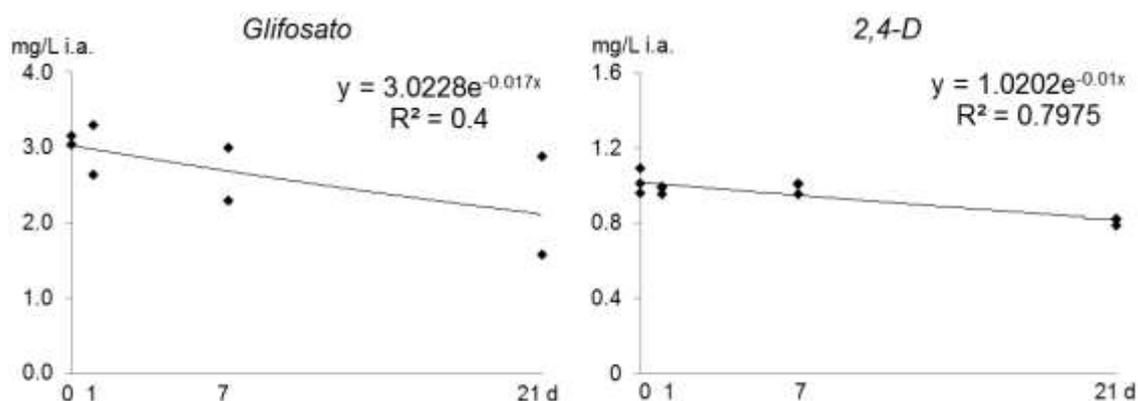


Fig. 14: Concentración de glifosato (izq.) y de 2,4-D versus tiempo, curvas y ecuaciones de ajuste.

La temperatura media diaria del aire durante todo el experimento fue de 17,9°C, variando entre un mínimo de 13,8 y un máximo de 23,2°C. El volumen de lluvia total ingresado en cada UE fue de 7.275 mL (6 episodios de lluvia) (Fig. 15).

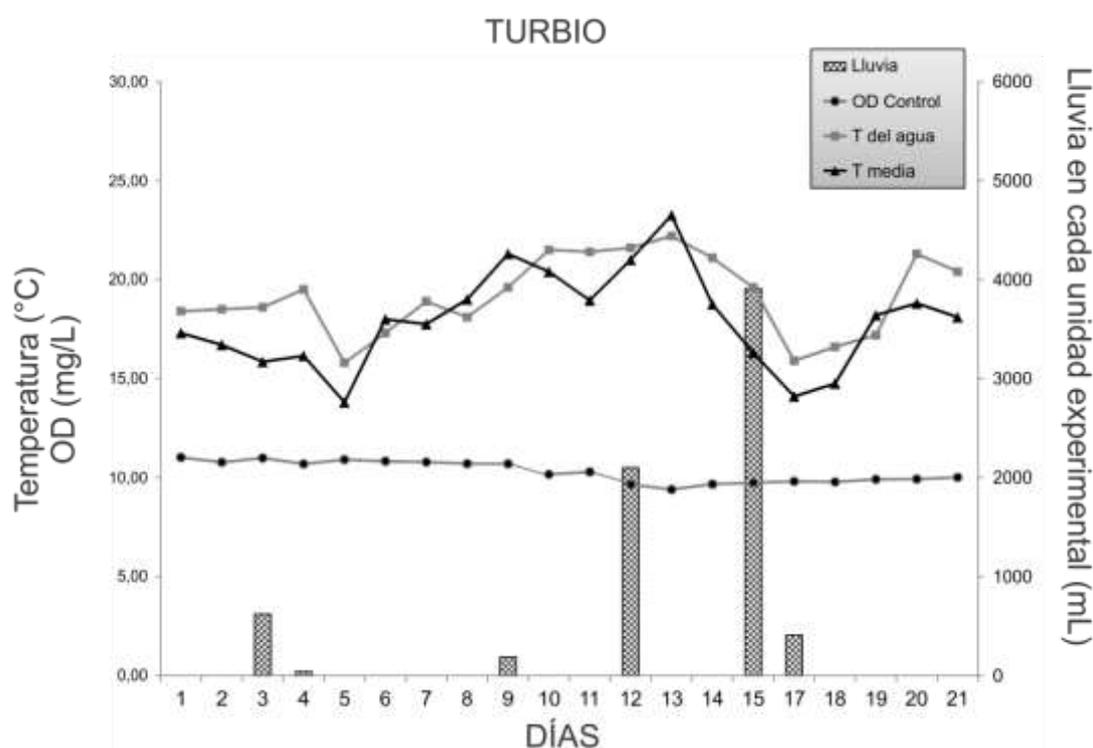


Fig. 15: Temperatura promedio del aire y del agua (°C); volumen de lluvia caída (mL) acumuladas en cada UE (barras) y concentración de oxígeno disuelto promedio media en los controles para el experimento turbio.

En la Tabla 9 se resumen los resultados de las principales variables físicas y químicas estudiadas. De todas las variables físicas y químicas, la única que mostró diferencias sostenidas en el tiempo respecto de los controles fue el fósforo total que se vio incrementado en los tratamientos GA y MA desde el tiempo inicial hasta el tiempo final ($p < 0,001$ ambos). La conductividad también aumentó en los tratamientos GA y MA a T0, el pH se redujo a T0 para los tratamientos GA y MA mientras que en los tratamientos con 2,4-D, tanto a baja como a alta concentración, en mezcla o individualmente, se observó una disminución del pH desde T2 que perduró hasta T3. Se detectaron varios aumentos de la clorofila α planctónica en los distintos tratamientos. Los dos tratamientos en los que se observó mayores cambios en clorofila α fueron GA y MA a T1 y T2. Por otro lado, se observó que los valores de conductividad, turbidez y concentración de clorofila α en los controles disminuyeron hacia el final del experimento.

	Control	GB	GA	2,4-DB	2,4-DA	MB	MA
Conductividad (mS/cm)							
T0	73,47 ± 0,15	73,73 ± 0,12	75,10 ± 0,44	73,70 ± 0,00	74,13 ± 0,12	73,73 ± 0,06	75,23 ± 0,15
T1	74,02 ± 0,12	73,83 ± 0,15	73,60 ± 0,26	74,07 ± 0,06	74,13 ± 0,15	73,83 ± 0,06	74,00 ± 0,10
T2	74,55 ± 0,31	74,80 ± 0,10	75,63 ± 0,32	75,50 ± 1,06	74,47 ± 0,21	74,93 ± 0,35	74,40 ± 0,30
TF	65,88 ± 0,57	66,17 ± 0,81	66,20 ± 0,35	68,30 ± 0,72	66,37 ± 0,15	65,90 ± 0,30	66,73 ± 0,55
Turbidez (NTU)							
T0	12,03 ± 1,27	12,90 ± 0,10	12,70 ± 0,10	13,00 ± 0,36	13,13 ± 0,12	13,43 ± 0,23	12,40 ± 0,61
T1	13,70 ± 0,82	14,40 ± 1,31	14,63 ± 1,57	15,30 ± 0,30	15,67 ± 1,26	14,63 ± 0,96	15,27 ± 2,74
T2	13,18 ± 1,71	13,57 ± 2,61	11,33 ± 0,38	13,97 ± 2,30	13,83 ± 1,21	12,70 ± 1,84	11,87 ± 1,07
TF	7,67 ± 1,03	9,00 ± 0,00	7,33 ± 0,58	9,33 ± 0,58	7,67 ± 1,53	10,00 ± 1,73	6,00 ± 1,00
pH							
T0	8,90 ± 0,11	8,76 ± 0,05	8,27 ± 0,03	8,99 ± 0,02	9,04 ± 0,03	8,95 ± 0,02	8,40 ± 0,12
T1	7,94 ± 0,14	7,90 ± 0,08	7,82 ± 0,07	7,88 ± 0,04	7,90 ± 0,02	7,93 ± 0,02	7,92 ± 0,02
T2	8,45 ± 0,11	8,35 ± 0,03	8,37 ± 0,07	8,28 ± 0,02	8,14 ± 0,05	8,18 ± 0,01	8,20 ± 0,04
TF	7,90 ± 0,12	7,67 ± 0,07	7,66 ± 0,06	7,58 ± 0,05	7,55 ± 0,01	7,56 ± 0,02	7,57 ± 0,03
Nitrógeno Total (mg/L)							
T0	0,97 ± 0,05	1,03 ± 0,15	1,70 ± 0,10	1,20 ± 0,10	0,93 ± 0,06	1,20 ± 0,00	1,20 ± 0,10
T1	1,08 ± 0,11	1,07 ± 0,31	1,17 ± 0,15	1,23 ± 0,23	1,00 ± 0,00	0,83 ± 0,21	1,43 ± 0,15
T2	1,08 ± 0,12	1,13 ± 0,12	1,17 ± 0,15	1,10 ± 0,10	0,97 ± 0,12	1,10 ± 0,17	1,30 ± 0,26
TF	0,92 ± 0,16	0,93 ± 0,12	1,03 ± 0,06	0,97 ± 0,06	1,07 ± 0,12	0,80 ± 0,10	1,03 ± 0,12
Fósforo Total (mg/L)							
T0	0,11 ± 0,03	0,20 ± 0,06	0,83 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,74 ± 0,01
T1	0,15 ± 0,06	0,18 ± 0,06	0,84 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,34 ± 0,09	0,77 ± 0,06
T2	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,68 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,66 ± 0,01
TF	0,11 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,63 ± 0,05	0,08 ± 0,03	0,14 ± 0,08	0,21 ± 0,06	0,59 ± 0,02
Clorofila α (µg/L)							
T0	31,75 ± 2,36	29,88 ± 1,56	32,94 ± 2,56	31,58 ± 1,02	30,56 ± 3,06	33,96 ± 1,56	24,79 ± 9,19
T1	25,81 ± 3,20	28,86 ± 8,66	34,97 ± 6,47	30,22 ± 2,12	33,96 ± 2,12	34,97 ± 4,81	29,54 ± 7,96
T2	19,69 ± 3,74	29,54 ± 2,70	31,92 ± 1,56	24,45 ± 1,76	20,71 ± 1,18	27,84 ± 4,12	26,82 ± 3,86
TF	12,73 ± 5,79	15,28 ± 2,70	19,01 ± 5,61	13,24 ± 6,36	17,32 ± 2,70	13,24 ± 2,04	10,19 ± 4,44

Tabla 9. Variables físicas y químicas de los 4 tiempos en el experimento turbio. T0=15 minutos luego de la adición de los herbicidas, T1: 1 día, T2: 7 días y T3=21 días. Los valores corresponden a las medias ± DE de las réplicas (n=6 control, n=3 tratamientos). En negrita se muestran las diferencias significativas respecto del control (ANOVA, p<0,05).

Micro+nano fitoplancton

Durante todo el experimento, teniendo en cuenta todos los tratamientos, se identificaron 10 especies pertenecientes a 5 grupos (Tabla 10). El grupo Chlorophyta predominó en abundancia en todos los tiempos en los controles, con un máximo de 83,82% (T1) y un mínimo de 57,56% (T3), seguido por Chrysophyceae que presentó un máximo de 40,28% (T3) y un mínimo de 14,85% (T1). En tercer lugar, se encontró Dinophyceae con un máximo porcentaje de 2,09% (T3) y un mínimo a T1 con 1,03%. Los grupos con menor porcentaje fueron Bacillariophyceae, con un máximo de 0,31% (T0) y un mínimo de 0,00% (T3) y Cyanobacteria, con un máximo de 0,25% (T0) y un mínimo de 0,05% (T1) (Fig. 15).

Grupo	Especie
Cyanobacteria	<i>Leptolyngbya sp.</i>
Chlorophyta	<i>Staurastrum sp.</i>
	<i>Tetraedron minimum</i>
	<i>Chlamydomonas sp.</i>
	<i>Pandorina sp.</i>
	<i>Botryococcus braunii</i>
Bacillariophyceae	<i>Lagerhermia sp.</i>
Dinophyceae	<i>Achnantes sp.</i>
Chrysophyceae	<i>Peridinium sp.</i>
	<i>Ochromonas sp.</i>

Tabla 10. Listado de especies determinadas durante todo el experimento turbio considerando controles y tratamientos.

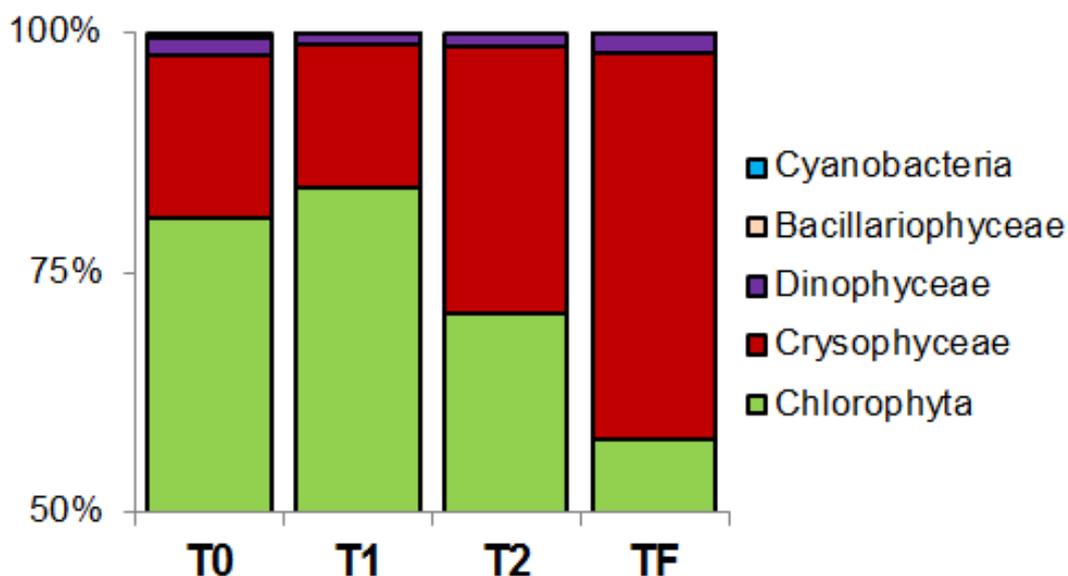


Fig. 15: Distribución de grupos algales del micro+nano fitoplancton en los controles de los 4 tiempos (T0, T1, T2 y T3) del experimento turbio.

Las abundancias del micro+nano fitoplancton vivo tuvieron un mínimo de 15.735 ± 10.735 ind/mL a T3 (MA) y un máximo a T0 de 211.723 ± 87.937 ind/mL (2,4-DA). Los máximos y mínimos de los organismos muertos de esta fracción se encontraron en los mismos dos tratamientos, con un mínimo de 14.076 ± 3.690 ind/mL (T3, MA) y un máximo de 125.984 ± 4.098 ind/mL (T0, 2,4-DA).

Los efectos de los tratamientos sobre las abundancias totales se observaron a T0 donde los organismos muertos aumentaron significativamente en los tratamientos GB (+1,5 veces), 2,4-DB (+1,62 veces) y 2,4-DA (+1,93 veces) y a T2 donde se observaron disminución de las vivas en los tratamientos 2,4-DA (-0,7 veces) y MA (-0,50 veces) y aumento de las muertas en 2,4-DA (+1,78 veces) (Fig. 16A). En la figura 16B se graficaron las variaciones de las abundancias respecto a los controles de las 4 especies más abundantes, que representaron el 98,24% de las abundancias de los organismos vivos. Si bien se muestran las principales 4 especies, se analizaron estadísticamente todas las presentes. Las variaciones en las abundancias totales se correspondieron con las variaciones de la especie más abundante *Staurastrum* sp. a T0 y a T2, observándose disminuciones significativas en las abundancias de *Ochromonas* sp. a T2 para los tratamientos GA, 2,4-DB, 2,4-DA, MB y MA.

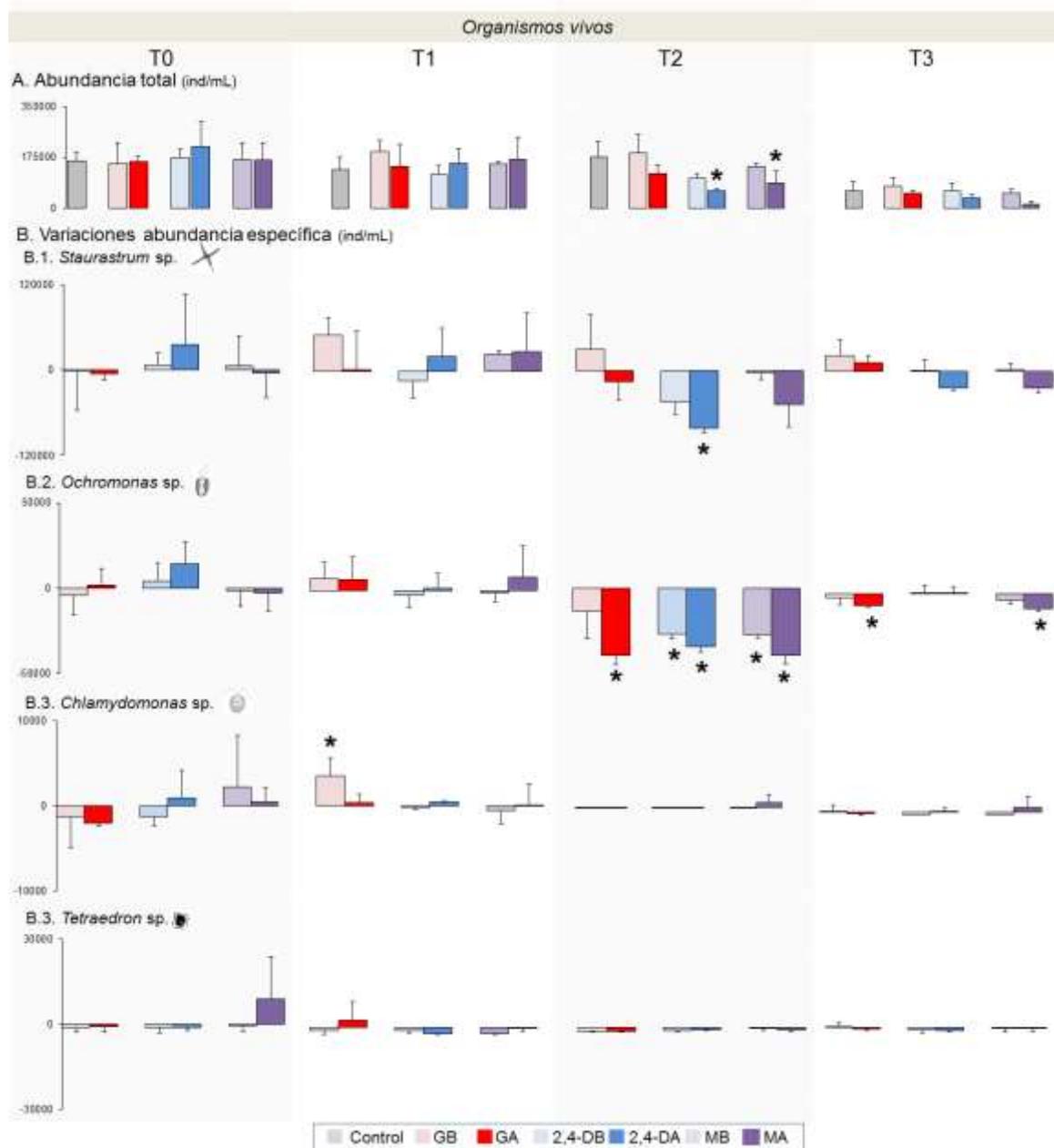


Fig. 16: Abundancia de organismos vivos del micro+nano fitoplancton (A) y variaciones de las abundancias específicas para las 4 especies más abundantes (B 1, 2 3 y 4) para los 4 tiempos (T0, T1, T2 y T3). Barra: +/- 1DE. (*) diferencia significativa respecto de los controles (ANOVA $p < 0,05$, comparaciones múltiples de Holm-Sidak). Las ilustraciones no están a escala.

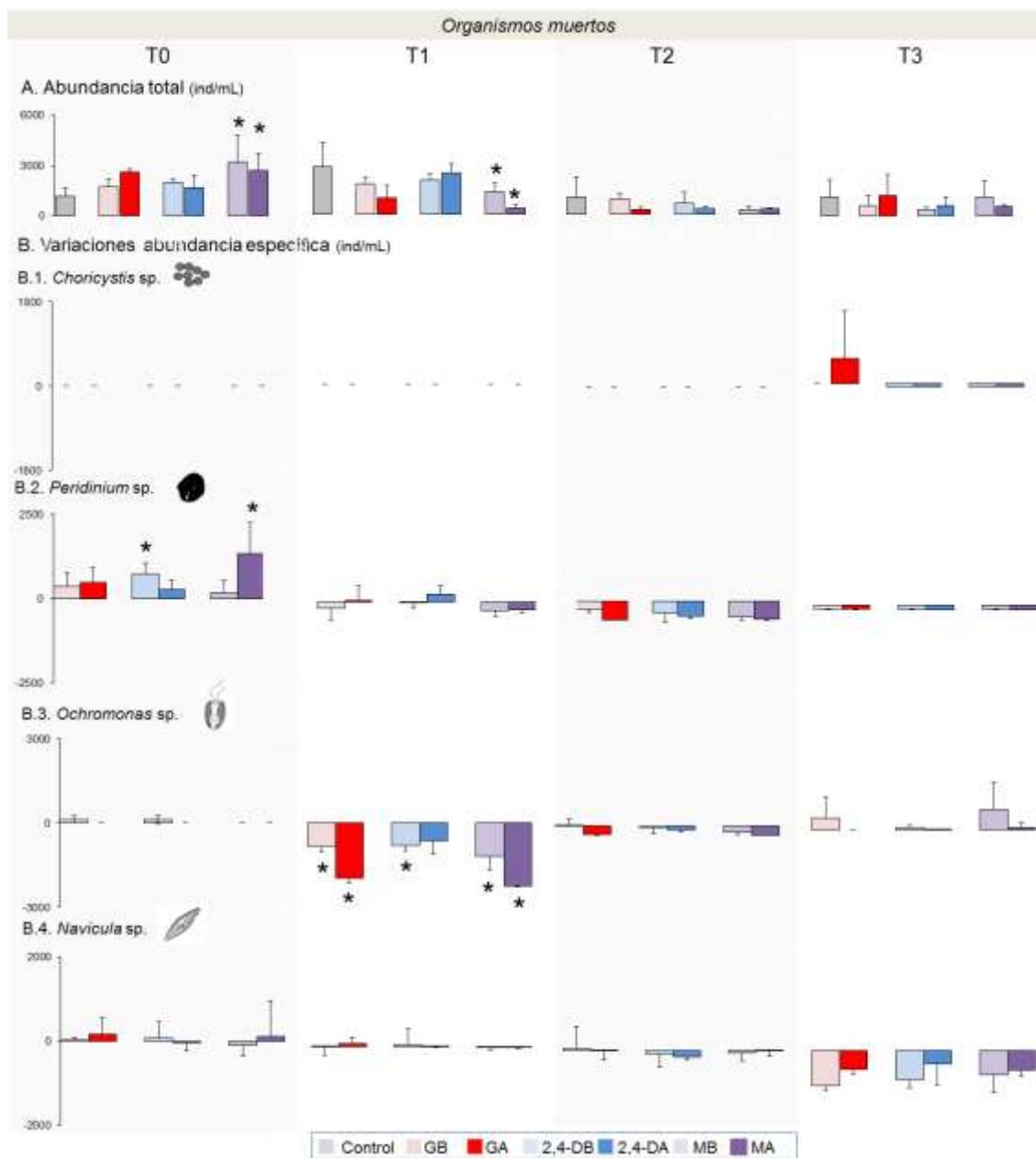


Fig. 17: Abundancia de organismos muertos del micro+nano fitoplancton (A) y variaciones de las abundancias específicas para las 4 especies más abundantes (B 1, 2 3 y 4) para los 4 tiempos (T0, T1, T2 y T3). Barra: +/- 1DE. (*) diferencia significativa respecto de los controles (ANOVA $p < 0,05$, comparaciones múltiples de Holm-Sidak). Las ilustraciones no están a escala.

En la Tabla 11 se presentan los valores promedio obtenidos del índice de diversidad de Simpson, la riqueza específica (S) y equitatividad del micro+nano fitoplancton para cada uno de los tratamientos y tiempos. Se observó disminución de la diversidad en el tratamiento MB a T1 (KW, $p = 0,02$), mientras que a T2 los

tratamientos que tuvieron bajas significativas en la diversidad fueron GA y MA (KW, $p=0,0015$ y $p=0,03$ respectivamente). Los tres tratamientos parecen haber sufrido una baja en la diversidad como producto de la disminución de la riqueza específica. Finalmente, a T3 GA continuó con disminución de la diversidad respecto del control (KW, $p=0,00047$) y los tratamientos GB, 2,4-DA y MB también fueron significativamente menores (KW, $p=0,01$, $p=0,03$ y $p=0,03$ respectivamente).

		S media	Simpson (1-D)	Equitatividad
T0	Control	7	0,46	0,26
	GB	6	0,42	0,29
	GA	6,33	0,47	0,31
	2,4-DB	7	0,44	0,27
	2,4-DA	6,67	0,44	0,27
	MB	6,33	0,43	0,28
	MA	7	0,49	0,29
T1	Control	6	0,39	0,28
	GB	6,33	0,36	0,25
	GA	6,33	0,44	0,29
	2,4-DB	6	0,39	0,28
	2,4-DA	6,33	0,35	0,25
	MB	4,67	0,30	0,33
	MA	5	0,38	0,32
T2	Control	4,67	0,45	0,40
	GB	3,33	0,34	0,46
	GA	3,33	0,23	0,45
	2,4-DB	5	0,43	0,38
	2,4-DA	5	0,48	0,40
	MB	4,67	0,33	0,32
	MA	4,33	0,32	0,47
T3	Control	4,50	0,54	0,50
	GB	4,33	0,44	0,43
	GA	4	0,29	0,36
	2,4-DB	3,67	0,51	0,64
	2,4-DA	5,33	0,47	0,38
	MB	4	0,47	0,48
	MA	4	0,52	0,54

Tabla 11. Valores de riqueza específica (S), diversidad (Simpson) y equitatividad del micro+nano fitoplancton para cada tiempo y tratamiento. En negrita los valores estadísticamente significativos respecto del control (Kruskal-Wallis, $p<0,05$).

Picoplancton

La abundancia de las PEuk osciló entre 117.882 (\pm 8.451) a T1 hasta 187.617 (\pm 30.881) ind/mL a T2. Los efectos relacionados a los tratamientos se observaron a T1 para el tratamiento GA con una variación media respecto de los valores de los controles de -42% (ANOVA, $p=0,007$) y a T3 para GB, 2,4-DA y MA con -60% (ANOVA, $p<0,001$), +58% (ANOVA, $p=0,004$) y +53% (ANOVA, $p=0,004$) respectivamente (Fig.18A). La abundancia de las Pcy en los controles tuvo un máximo a T2 con 430.309 (\pm 37.736) y un mínimo a T3 con 215.329 (\pm 64.905) ind/mL. A T1, ML y GA mostraron aumentos menores, pero estadísticamente significativos de +7 y +13% (ANOVA, $p=0,005$ y $0,007$) respectivamente. Los tratamientos GA y MA tuvieron aumentos significativos desde T2 hasta T3 con un promedio de +58 y +112% para GA y de +88 y +116% para MA (ANOVA, $p<0,001$ para los cuatro). A T3 MB también presentó abundancias de las Pcy aumentadas con un valor promedio de +59% (ANOVA, $p<0,001$). Solo el tratamiento MA mostró una disminución persistente hasta T3 con -81% (ANOVA, $p=0,006$) (Fig.18B). Finalmente, las BH mostraron un mínimo a T0 con $2,55E6$ (\pm $6,37E5$) y un máximo en T1 con $1,01E07$ (\pm $2,1E6$) ind/mL. Se encontraron aumentos en la abundancia de las BH a T0 en todos los tratamientos, salvo GB: 2,4-DB +67%, MB +90%, GA +157%, 2,4-DA +94% y MA 250% (ANOVA, $p<0,001$ todos). Mientras que en el tratamiento MA el incremento significativo respecto a los controles también se observó a T2 con +40% (Fig.18C).

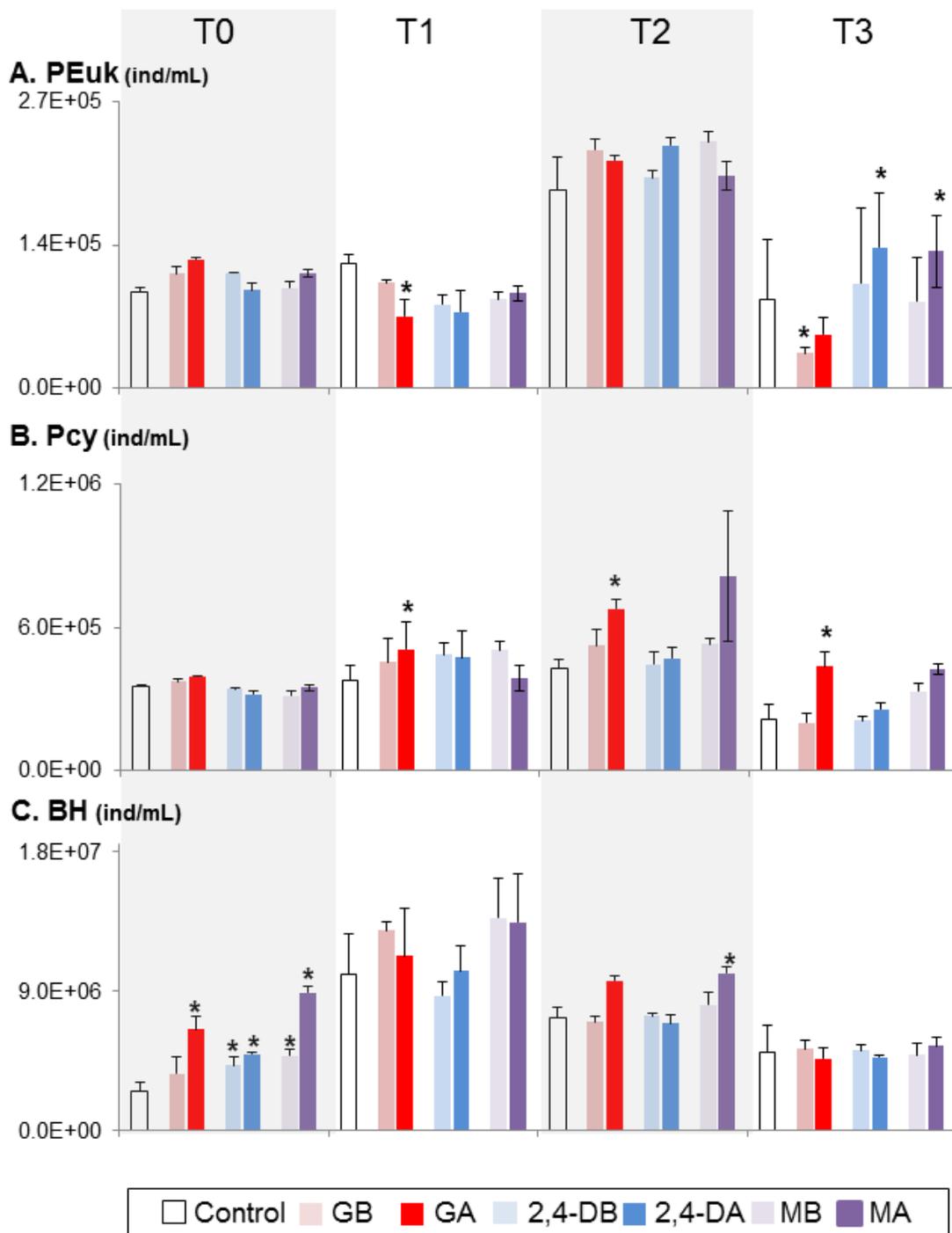


Fig. 18: Valores medios (+ 1DE) de las abundancias del picoplancton en el experimento turbio. a) Pico-eucariotas (PEuk), b) Picocianobacterias (Pcy) y c) Bacterias heterótrofas (BH). (*) diferencia significativa respecto de los controles (ANOVA $p < 0,05$, comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Perifiton

Se determinaron 10 especies algales pertenecientes a 5 grupos (Tabla 12). La composición de grupos algales muestra una preponderancia del grupo Chlorophyta con un máximo en promedio de 71,29% en el tratamiento GA y un mínimo de 39,70% correspondiente al tratamiento MB. El grupo Chrysophyceae es el segundo más abundante, con un máximo 48,66% en el tratamiento MB y un mínimo de 26,33% en GA. Los siguientes tres grupos fueron Bacillariophyceae con un máximo de 5,07% en GB, Dinophyceae con un máximo de 7,33% en MB y por último Cyanobacteria con un máximo de 0,30% en el tratamiento 2,4-DB (Fig. 19).

Grupo	Especie
Cyanobacteria	<i>Leptolyngbya</i> sp.
Chlorophyta	<i>Staurastrum</i> sp.
	<i>Tetraedron minimum</i>
	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	<i>Pandorina</i> sp.
	<i>Botryococcus braunii</i>
Bacillariophyceae	<i>Lagerhermia</i> sp.
Dinophyceae	<i>Achnantes</i> sp.
	<i>Peridinium</i> sp.
Chrysophyceae	<i>Ochromonas</i> sp.

Tabla 12. Listado de especies de algas y cianobacterias del perifiton del experimento turbio considerando controles y tratamientos.

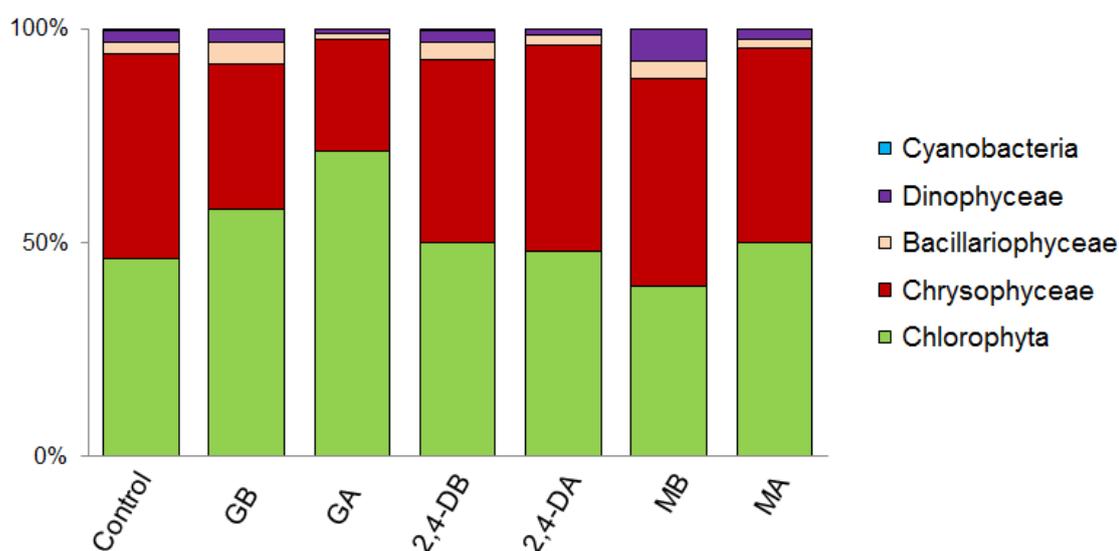


Fig. 19: Abundancia relativa de clases algales en el perifiton en todos los tratamientos.

El análisis de las abundancias totales de la fracción autotrófica del perifiton mostró aumentos significativos en los tratamientos GA y MA con valores de +123% (KW $p=0,01$) y +64% (KW $p=0,02$), en las vivas y de 119% (KW $p=0,01$) y +81% (KW $p=0,03$) en las muertas. El estudio de las abundancias específicas mostró un aumento de aproximadamente 20 veces de *Chlamydomonas* sp. (KW, $p=0,0022$) para el tratamiento GA y de 19 veces para MA (KW, $p=0,0011$) mientras que en el tratamiento MB aumentaron unas 12 veces (KW, $p=0,01$). El análisis de los datos de riqueza específica, diversidad y equitatividad no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control.

Respecto a las variables de masa, el perifiton se desarrolló durante los 21 días obteniéndose un PS de $29,38 (\pm 8,79) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a T3 en los controles. Los efectos de los tratamientos sobre las variables de masa se observaron a través del aumento del PS, respecto de los controles, en los tratamientos GB (+65% KW, $p=0,04$), GA (+57% KW, $p=0,0014$), MB (+81% KW, $p=0,04$) y MA (+183% KW, $p=0,0007$). Mientras que para el PSLC se observaron aumentos para los tratamientos GB (+84% KW, $p=0,04$), GA (+164% KW, $p=0,0012$) y MA (+126% KW, $p=0,0037$). Aumentos estadísticamente no significativos se observaron para el contenido de clorofila α en los tratamientos GA y MA (Fig. 20).

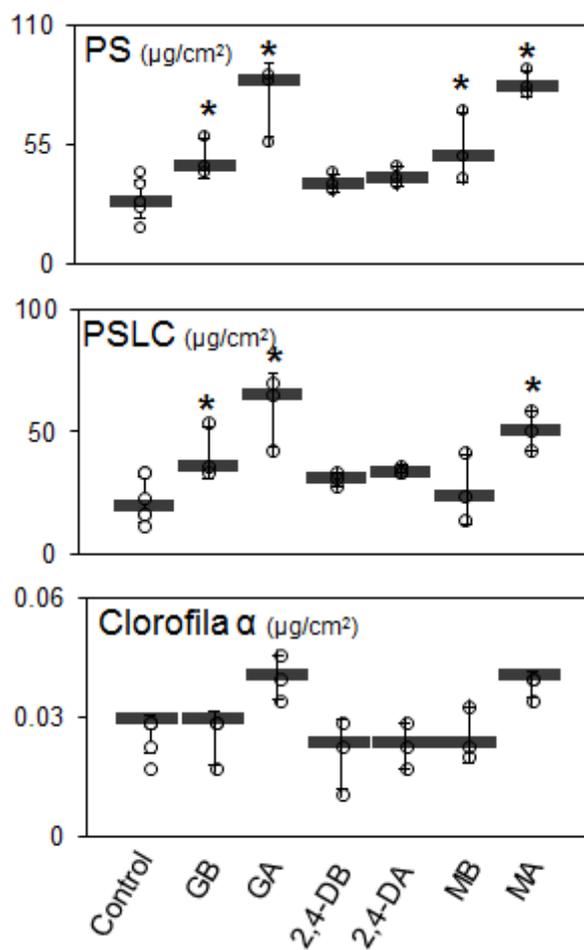


Fig. 20: Variables de masa del desarrollo del perifiton en el experimento turbio: PS (Peso Seco), PSLC (Peso Seco Libre de Cenizas) y clorofila α . En la figura se observan los valores obtenidos para cada réplica (puntos) y la mediana (barra). (* KW, $p < 0,05$).

La clasificación del perifiton según el % de cenizas y el % de clorofila α (Fig. 21) mostró una tendencia hacia una comunidad inorgánica en los tratamientos mezcla (MB y MA).

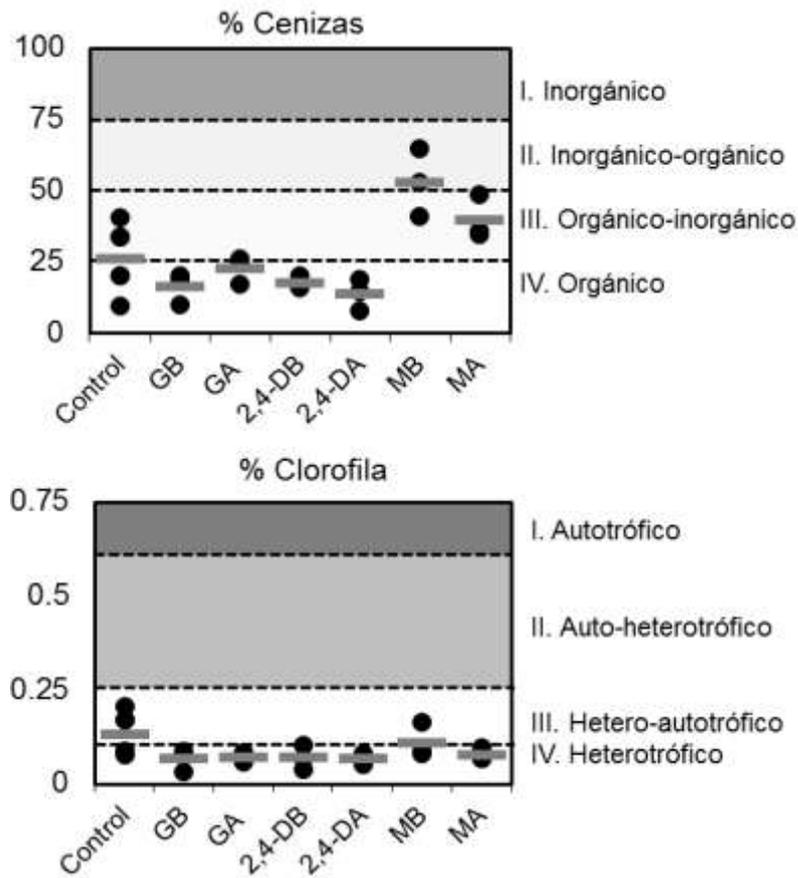


Fig. 21: Clasificación del perifiton por tratamiento desarrollado durante el experimento en el sistema turbio. Se visualiza cada réplica (punto) y la media de los tratamientos (barra). Tomado de Lakatos, (1989).

Estudio del efecto mezcla sobre las principales variables estructurales

En el sistema turbio, se observaron cuatro desviaciones a la aditividad, siendo todas ellas del mismo tipo. Las variables pH en el tratamiento MB (T0) y en MA (T2 y T3) así como la abundancia del micro+nano fitoplancton vivo en MA (T0) mostraron antagonismo, mientras que ninguna variable mostró sinergismo (Fig. 22).

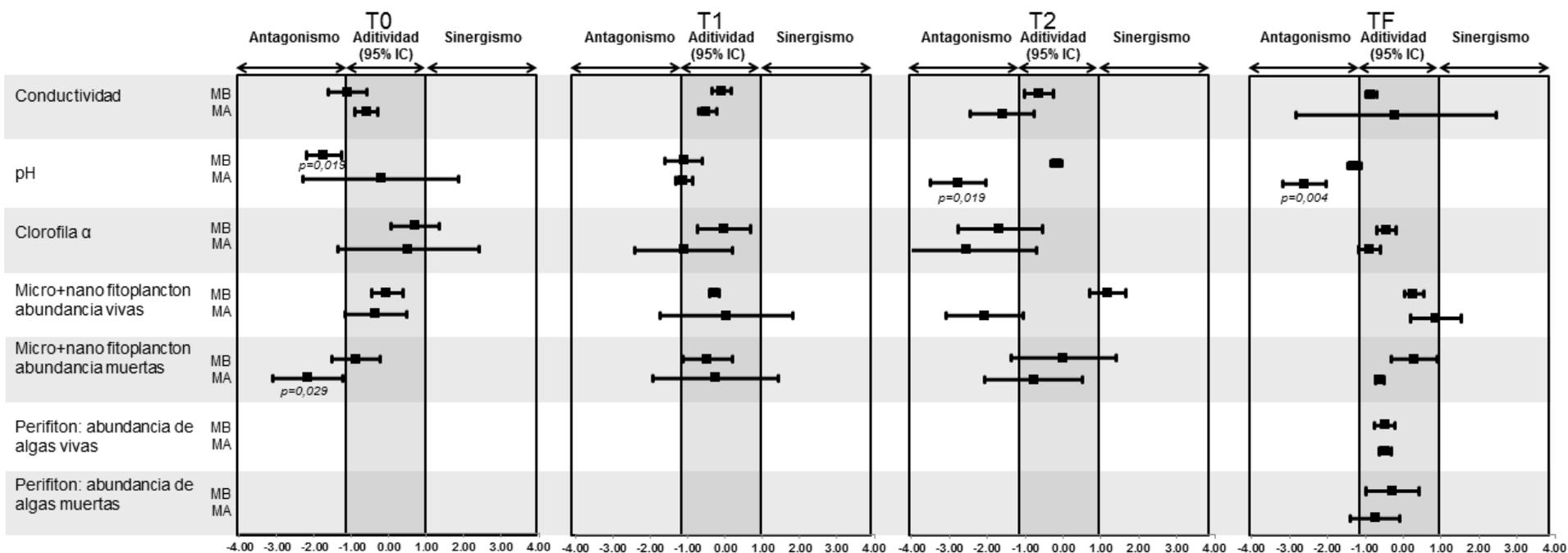


Fig. 22: Estudio del efecto mezcla sobre las variables físicas, químicas y biológicas en el experimento turbio. Para cada variable se graficó el efecto mezcla a concentración baja (MB) y a concentración alta (MA) en los 4 tiempos de muestreo (T0, T1, T2 y T3) y en T3 para el perifiton. Los recuadros verticales en gris oscuro del -1 al 1 corresponden a las zonas de los efectos esperados por aditividad con un intervalo de confianza del 95%. Todos los intervalos están normalizados a (-1,1) para una visualización comparativa entre las variables. (*) t-Student, $p < 0,05$.

Discusión

El sistema utilizado en este experimento puede ser caracterizado como turbio y eutrófico. Al igual que en el experimento realizado en el sistema claro, se observó un efecto sostenido en el tiempo en los sistemas tratados con 3 mg/L de glifosato en su formulado comercial Roundup Max[®] (GA y MA) a través del aumento del fósforo total. Este aumento de 0,63 y 0,57 mg/L para GA y MA respectivamente, también podría explicarse a partir del aporte de fósforo que se encuentra en la molécula del glifosato, ya que en teoría la concentración utilizada aportaría 0,55 mg/L de fósforo al sistema. En los casos de los tratamientos GB y MB los aumentos estadísticamente significativos en el fósforo total no fueron verificados en todos los tiempos de muestreo, aunque en promedio se registraron aumentos de 0,048 y 0,102 mg/L de fósforo respectivamente. El aumento de la conductividad en los tratamientos GA y MA apenas fueron tratadas las UE, al igual que en lo discutido en el experimento claro, podría explicarse por el ingreso al sistema de la sal amónica de glifosato o de otros componentes no declarados del Roundup Max[®].

Sobre las comunidades estudiadas y los tratamientos ensayados, se observó que el AsiMax 50[®] provocó efectos mayores que el Roundup Max[®] sobre la estructura del micro+nano fitoplancton, siendo el T2 (7 días luego de la aplicación) donde se observaron las mayores desviaciones respecto a los controles. En este sentido, en los tratamientos 2,4-DA y MA se registró disminución de la abundancia de los organismos vivos y aumento de los muertos. Este fenómeno observado en las abundancias totales, fue provocado por la variación de las abundancias específicas de la especie dominante *Staurastrum* sp. Estos cambios en las abundancias, con su consecuente reducción de la tasa fotosintética, podrían explicar la disminución de los valores de pH en dichos tratamientos que fueron observadas al mismo tiempo. Este fue el único experimento realizado durante esta tesis doctoral donde se observó una toxicidad del formulado comercial de 2,4-D, entendida como una baja en las abundancias del micro+nano fitoplancton. En este caso, el agua utilizada provenía del mismo sistema (tanque con colonización natural) que la utilizada unos meses antes para el experimento turbio del Capítulo I y del experimento de fitoplancton del Capítulo II.

Con el objeto de realizar una comparación metodológica entre los experimentos abordados en esta tesis, en la tabla 13 se resume la metodología, las concentraciones a las cuales se vio efecto y de qué tipo, algunas condiciones iniciales y finales y, finalmente, el listado de especies del micro+nano fitoplancton determinadas. Con fines comparativos, se colocaron los valores iniciales (T0) y finales (T3) de los experimentos que duraron 7 días, y los valores a T2 (7d) del experimento correspondiente a este capítulo que tuvo una mayor duración. En el experimento turbio del Capítulo I se observó estimulación del crecimiento del micro+nano fitoplancton dado por el crecimiento específico de la especie dominante *Staurastrum* sp., en un rango de concentraciones amplio (0,02, 0,2, 2 y 20 mg/L). Este fenómeno, observado a partir de la realización de un experimento en condiciones controladas de laboratorio utilizando microcosmos, fue explicado por la posible existencia de vías auxínicas en ésta y otras especies de algas ya que otros trabajos habían encontrado estimulación fitoplanctónica provocada por el herbicida 2,4-D (Boyle, 1980, Kobraei & White, 1996, Wong, 2000). Durante el experimento del Capítulo II, también realizado en condiciones controladas de laboratorio y utilizando microcosmos, no se observaron efectos estadísticamente significativos provocados por presencia de la sal pura de 2,4-D sobre las abundancias del micro+nano fitoplancton. El hecho de que en ese experimento, se haya utilizado la sal pura y no un formulado comercial, podría explicar la falta de efecto debido a una limitada penetrancia celular de la sal pura (Mesnage & Antoniou, 2018). Es importante recalcar que otras fracciones no han sido estudiadas detalladamente en todos los experimentos como para poder hacer una comparación exhaustiva de los sistemas utilizados. El sistema artificial utilizado como fuente del agua ensayada en los tres experimentos de esta tesis se encontraba al aire libre lo que pudo modificar la estructura del sistema entre un experimento y el otro, especialmente de aquellas comunidades que no fueron estudiadas como el zooplancton. Sin embargo, frente a una composición de la fracción del micro+nano fitoplancton muy similar se observaron efectos sobre esa fracción completamente diferentes utilizando concentraciones de 2,4-D cercanas. El efecto estimulante del 2,4-D sobre algunas especies algales ya había sido observado en reiteradas oportunidades (Boyle, 1980, Kobraei & White, 1996, Wong, 2000), sin embargo en

esta tesis vemos que una misma especie, *Staurastrum* sp., estando en microcosmos en condiciones controladas de laboratorio es estimulada, mientras que en mesocosmos al aire libre su abundancia se reduce. ¿Es posible que las condiciones de luz y temperatura afecten la posibilidad que tiene esta especie de “responder” al estímulo auxínico? ¿Un mensaje químico de promoción del crecimiento en condiciones desfavorables, por ejemplo, por una menor radiación lumínica podría provocar un crecimiento irregular y llevar a la muerte celular? Los resultados contrastantes, dependiendo de la aproximación experimental utilizada, muestra la importancia de la perspectiva ecosistémica y la necesidad de complementar los trabajos realizados en condiciones controladas de laboratorio con estudios de mayores dimensiones en condiciones no controladas.

Respecto de las otras comunidades estudiadas, las PEuk sí mostraron un aumento en presencia de la concentración más alta de 2,4-D (2,4-DA y MA) a tiempo final, lo que podría explicarse por una estimulación del crecimiento de esa fracción por mecanismos auxínicos ya discutidos.

La vida media estimada del 2,4-D fue de 69 días, un poco menor a la encontrada en el experimento claro. Las BH sólo sufrieron un aumento en su abundancia a T0 pero no se mantuvo en el tiempo. Es posible que la concentración de 2,4-D en la columna de agua durante este experimento haya sido un poco menor que en el experimento claro considerando que hubo un efecto mayor sobre la fracción del micro+nano fitoplancton, lo que muestra cierta absorción por parte de estos organismos. Además podrían existir diferencias entre ambos experimentos como producto de fenómenos físicos, químicos o biológicos dependientes del sistema, por ejemplo por una diferencia potencial en la capacidad de absorción del 2,4-D de los sedimentos de la columna de agua.

El pH se redujo a T0 para los tratamientos GA y MA lo que pudo ser una consecuencia de una reducción en la tasa fotosintética de los organismos autótrofos en presencia de glifosato como fue discutido en el experimento claro.

	Experimento Turbio Capítulo I	Experimento Fitoplancton Capítulo II	Experimento Turbio Capítulo III
Condiciones	Erlenmeyer 450 mL, cámara 12H:12H con 24°C	Erlenmeyer 450 mL, cámara 12H:12H con 24°C	Bolsas 40 L, incubadas en tanques al aire libre
Producto	AsiMax50®	2,4-D sal pura	AsiMax50®
Concentraciones con efecto	rango 0,02-20 mg/L aumento de las abundancias del micro+nano fitoplancton	Sin efecto	1,35 mg/L disminución de las abundancias del micro+nano fitoplancton
Turbidez (controles)	T0 = 9,29 ± 0,85 T3(7d) = 16,33 ± 1,53	T0 = 8,75 ± 0,50 T3(7d) = 14,5 ± 0,58	T0 = 12,03 ± 1,27 T2(7d) = 13,18 ± 1,71
Clorofila α (controles)	T0 = 25,04 ± 10,38 T3(7d) = 68,95 ± 2,74	T0 = 71,49 ± 2,74 T3(7d) = 82,37 ± 6,74	T0 = 31,75 ± 2,36 T3(7d) = 19,69 ± 3,74
Abundancias totales m+n (controles)	T0 = 221.102 ± 40.174 T3(7d) = 202.712 ± 12.837	T0 = 229.483 ± 30.806 ind/mL T3 (7d) = 337.335 ± 80.420 ind/mL	T0 = 114.793 ± 20.896 T2 (7d) = 225.632 ± 67.145
Spp. Micro + nano presentes	<i>Leptolyngbya sp.</i> <i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlamydomonas sp.</i> <i>Tetraedron minimum</i> <i>Staurastrum sp. (dominante)</i> <i>Peridinium sp.</i> <i>Ochromonas sp.</i>	<i>Leptolyngbya sp.</i> <i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlamydomonas sp.</i> <i>Tetraedron minimum</i> <i>Staurastrum sp. (dominante)</i> <i>Peridinium sp.</i> <i>Ochromonas sp.</i> <i>Lagerhermia sp.</i> <i>Pandorina sp.</i> <i>Achnantes sp.</i> <i>Nitzschia sp.</i>	<i>Leptolyngbya sp.</i> <i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlamydomonas sp.</i> <i>Tetraedron minimum</i> <i>Staurastrum sp. (dominante)</i> <i>Peridinium sp.</i> <i>Ochromonas sp.</i> <i>Lagerhermia sp.</i> <i>Pandorina sp.</i> <i>Achnantes sp.</i>

Tabla 13. Comparación de tres experimentos de esta tesis doctoral donde se utilizó agua proveniente de un sistema similar y se ensayaron formulados o principios activos de 2,4-D.

En relación al glifosato, este experimento no mostró efectos sobre el micro+nano fitoplancton pero se observó un crecimiento de las Pcy sostenido en el tiempo (T1, T2 y T3) en su concentración más alta (GA) que no ocurrió cuando éste se encontraba mezclado con 2,4-D (MA). La estimulación del crecimiento de esta fracción ha sido observada previamente (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2012, Pizarro et al. 2016) y se estima que es producto de la capacidad de algunas picocianobacterias de utilización del fósforo de la molécula de glifosato a través de la función de un operon que degrada fosfonatos (*phn*) (Ilikchyan et al. 2009, Hove-Jensen et al. 2014, Castro Berman et al. 2020). El aumento de la abundancia de las Pcy podría explicar el aumento observado en la clorofila α fitoplanctónica. Por otro lado, se constató un aumento en la colonización perifítica, observable a través del aumento del PS y del PSLC, en presencia de ambas concentraciones de glifosato en su forma comercial Roundup Max[®] (GB, GA, MB y MA). Como fue discutido en el experimento claro, los aumentos en estas fracciones podrían ser asociadas a una estimulación del crecimiento por el aporte de fósforo al sistema que realiza el glifosato. Respecto a la vida media estimada del glifosato de 41 días, los valores son similares a los encontrados por Pizarro et al. (2015) para el sistema turbio estudiado que había sido calculado en 33,5 días donde también se había observado un aumento de las Pcy.

Finalmente, las mezclas mostraron en la mayoría de los casos un comportamiento de tipo aditivo, con algunos antagonismos y ningún sinergismo. La existencia de efectos antagónicos podría explicarse a través de cierta resistencia al impacto del sistema en presencia de más estresores, esto puede verse en la variable pH, donde se encontraron la mayoría de los antagonismos. Siendo que ambos plaguicidas redujeron el pH a T2 y T3, la MA mostró antagonismo explicado como un descenso menor al esperado del pH en presencia de ambos plaguicidas, lo que podría entenderse a través de la existencia de cierta capacidad amortiguadora del sistema a los cambios de pH.

Influencia del tipo de sistema (claro; turbio) sobre los resultados

Los dos experimentos desarrollados en este capítulo se realizaron en condiciones no controladas o “al aire libre”, siendo ambos diseños experimentales similares respecto a los tratamientos, la duración y el esquema de muestreo. Además, si bien ambos experimentos no fueron realizados simultáneamente, se llevaron a cabo en épocas del año con temperaturas y radiación lumínicas semejantes. Para el llenado de las unidades experimentales se utilizó agua colonizada naturalmente en tanques experimentales ubicados en la ciudad de Buenos Aires, cuyo objetivo fue garantizar la no exposición previa a ningún herbicida ya que la comunidad fitoplanctónica con exposición previa pueden presentar mayor resistencia ante un nuevo evento de contaminación (Fugère et al. 2020). Las comunidades utilizadas, por tanto, pueden ser consideradas representativas de dos sistemas naturales como los pampeanos en estado contrastante de turbidez orgánica no expuestos previamente a plaguicidas.

En ambos experimentos el 2,4-D presentó mayores valores de vida media en el agua y ambos plaguicidas mostraron comportamientos diferentes en las dos condiciones de agua contrastantes utilizadas. Existen métodos de cálculo para estimar dónde y en qué proporción se encontrará un contaminante en el ambiente. La partición ambiental de los contaminantes se define como los porcentajes (en masa) de un compuesto, encontrados en los diferentes compartimentos ambientales (aire, agua, suelo y sedimentos) (Card et al. 2017). En general para los contaminantes orgánicos, como para los plaguicidas en general, la partición y la persistencia en el ambiente dependen de las propiedades físicas y químicas de los compuestos, así como de la capacidad de los organismos vivos de biodegradarlos (Kerle et al. 1994). A fines comparativos, se realizó una simulación de partición ambiental con el programa EPI Suite™ (EPA) a partir de datos de referencia para los principios activos glifosato y 2,4-D, que se encontraban ya disponibles en el programa. Los resultados mostraron que, considerando el ambiente de forma global, ambos compuestos se encuentran preferentemente en el suelo, siendo la partición en agua bastante alta con porcentajes de 37,8 y 27,2% para glifosato y 2,4-D respectivamente. Sin embargo, en los

experimentos realizados en esta tesis se simularon procesos de contaminación directa de cuerpos de agua insertos en el paisaje agrícola, por ejemplo en situaciones de vertido directo por lavado de recipientes o por fumigación aérea. Considerando esto, se calcularon a partir de los valores bibliográficos presentes en el programa, los porcentajes en masa correspondientes al sistema acuático (columna de agua vs sedimentos) y se observó que la mayor parte de ambos compuestos se encuentra en la columna de agua, con valores de 97,35 y 97,54% para glifosato y 2,4-D respectivamente. Los dos sistemas ensayados presentaron valores muy diferentes de vida media en el agua, con casi el doble en el sistema turbio para el glifosato y casi la mitad en el sistema claro para el 2,4-D. Según los datos de la simulación realizada, la mayor parte de ambos compuestos se encuentra en el agua, por lo que las diferencias en los porcentajes de partículas inorgánicas y sedimentos entre ambos sistemas no podrían explicar la magnitud de las diferencias encontradas. Además, los sistemas utilizados no poseían sedimentos en el fondo, por lo que una absorción importante en esa sección no pudo haber ocurrido. Por lo tanto, éstas deben estar asociadas a procesos biológicos diferenciales.

Se ha demostrado que gran parte de la degradación del glifosato la realizan las bacterias heterótrofas vía los intermediarios sarcosina y AMPA, mientras que para el 2,4-D es realizada a través por la vía de los ácidos tricarbóxicos (Singh & Singh, 2014). La velocidad de degradación microbiana está asociada a la composición bacteriana y la existencia, en menor o mayor medida, de las vías enzimáticas específicas en las poblaciones de bacterias presentes. En ambos experimentos los recuentos de bacterias heterótrofas fueron realizados a través de citometría de flujo, con obtención del número total de BH y sin poder identificar poblaciones citométricas ni, como consecuencia del método, ningún tipo de taxonomía. Por tanto, no es posible concluir si las velocidades de degradación fueron consecuencia de una estructura de la comunidad de bacterias heterótrofas diferencial u otras razones vinculadas a otras fracciones como las Pcy que también tienen mecanismos de degradación. Además, el destino de las sustancias en el medio acuático depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos, que pueden aumentar la velocidad de volatilización, de

degradación biológica, fotolítica o química, provocar la absorción o la neutralización de las sustancias por otras presentes en el agua o aumentar su bioasimilación.

En ambos experimentos, tanto el 2,4-D como el glifosato, presentaron sus mayores efectos a las concentraciones altas en todas las variables estudiadas. Teniendo en cuenta esto, y con fines comparativos, se hizo hincapié en los resultados obtenidos para ambos herbicidas a sus concentraciones más altas (3 mg/L G, 1,35 mg/L 2,4-D). En el caso de los tratamientos con glifosato (Fig. 23), en ambos experimentos se observó el efecto del aumento del fósforo total en los tratamientos GA y MA, que puede ser atribuido al fósforo aportado por la molécula del principio activo (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2012, Pizarro et al. 2016, Gattás et al. 2016). Siendo que la vida media del glifosato en ambos experimentos fue de 16 y 41 días para claro y turbio respectivamente, es esperable que una parte del fósforo estuviera biodisponible durante el transcurso de ambos experimentos y que estimulara el desarrollo del perifiton constatado en ambos experimentos y la estimulación del crecimiento de fracciones específicas del plancton como el micro+nano fitoplancton en el experimento claro y de las Pcy en el experimento turbio. En relación a la estimulación del crecimiento del perifiton por el glifosato, un resultado similar fue observado por Vera et al. (2012) donde se utilizó una concentración cercana (3,5 mg/L) del formulado comercial Glifosato Atanor® y dispositivos experimentales similares. Además, se había reportado previamente que el enriquecimiento con fósforo aumenta el crecimiento del perifiton (McCormik & O'Dell, 1996; Havens et al. 1999). En oposición a este posible efecto directo estimulante, en su trabajo en mesocosmos de 25 m³ al aire libre Pérez et al. (2007) vieron una disminución de la colonización perifítica utilizando concentraciones de 6 y 12 mg/L. En este sentido, es probable que hasta cierta concentración la comunidad perifítica se vea estimulada y a mayores exista un umbral donde comiencen a observarse efectos de tipo negativos. Sin embargo, en estos trabajos el aumento, o no, del desarrollo del perifiton en escenarios con glifosato no se estudió a partir del uso de sustratos de forma separada de otras comunidades presentes en la columna de agua, por lo que no pueden descartarse otros efectos indirectos como producto de la interacción con otras fracciones del plancton. Por ejemplo, el aumento de fracciones heterotróficas

planctónicas podría reducir la colonización del perifiton por efecto de la predación, e inversamente una reducción de algunas de estas fracciones estimularlo. Saxton et al. (2011) mostraron que el glifosato puede provocar distintos efectos sobre los organismos de los sistemas acuáticos, pudiendo estimular el crecimiento de aquellas especies tolerantes por el efecto del aporte de fósforo y disminuyendo las abundancias de las especies menos tolerantes, las que a su vez pueden producir indirectamente efectos sobre otras especies/fracciones como producto de las interacciones ecológicas. Es interesante destacar que, a diferencia del sistema claro, en el experimento turbio también se constató un mayor desarrollo del perifiton en los tratamientos GB y MB. Con una concentración 10 veces menor de glifosato (0,3 mg/L) en el sistema turbio también aumentó el desarrollo del perifiton. Esta diferencia pudo haber sido consecuencia del tipo de organismos presentes en cada una de las comunidades perifíticas ya que, por ejemplo, en el sistema claro hubo una preponderancia del grupo Chlorophyta mientras que en el turbio del grupo Bacillariophyceae o de otros efectos de tipo indirectos en relación a los impactos sobre las fracciones planctónicas. No hay que descartar también que las diferencias registradas entre experimentos propios con los realizados por otros autores sean producto de diseños experimentales diferentes (tamaño de mesocosmos, características físico-químicas del agua, etc.)

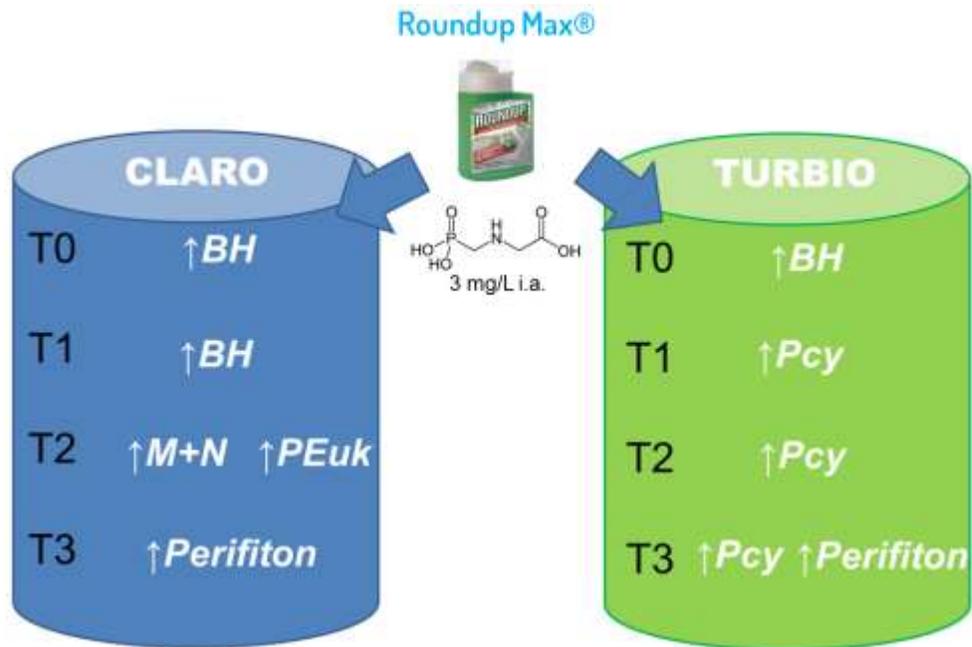


Fig. 23: Efectos de la concentración más alta estudiada de Roundup Max® (GA) sobre las comunidades estudiadas en el experimento claro (izq) y turbio (der). BH: bacterias heterótrofas, M+N: micro+nano fitoplancton, PEuk: picoplancton autotrófico eucariota, Pcy: picocianobacterias.

Respecto a la fracción del micro+nano fitoplancton, el glifosato aumentó su abundancia en el experimento claro a los 7 días (T2) desde la aplicación de los tratamientos, pero no provocó ningún efecto en el experimento turbio. Algunas especies de cianobacterias son capaces de utilizar el glifosato como fuente de fósforo a través de la ruptura del enlace fosfonato (Forlani et al. 2008) sin embargo, en el grupo Chlorophyta al cual pertenece *Choricystis* sp., la especie afectada, este mecanismo no se conoce. El aumento de su abundancia en presencia de glifosato podría deberse a un efecto del aumento del fósforo biodisponible como producto de su degradación bacteriana anterior, o a un efecto indirecto por ejemplo por la reducción de alguna especie herbívora del zooplancton que prede sobre *Choricystis* sp. Dado que también se observó un aumento de las PEuk en el sistema claro, la explicación del aumento en las abundancias por enriquecimiento de forma directa con fósforo toma fuerza, aunque no pueden descartarse formas indirectas como producto de las interacciones entre las fracciones biológicas presentes. En el sistema turbio no se observaron variaciones en las abundancias del micro+nano fitoplancton ni de las

PEuk sino de las Pcy, que aumentaron su abundancia en el tratamiento GA desde T1 hasta el T3. Como fue discutido previamente, el aumento de las Pcy puede ser explicado por la capacidad que tienen algunas de éstas de utilizar el glifosato directamente como fuente de fósforo (Ilikchyan et al. 2009). En su trabajo experimental Pizarro et al. (2016) observaron tanto en un sistema turbio como en uno claro, el crecimiento de esta fracción en presencia de glifosato, lo que podría indicar que no es el estado de turbidez en sí mismo, sino la presencia o no de especies de Pcy con capacidad de degradación lo que podría provocar un efecto diferencial sobre esta misma fracción en sistemas diferentes.

Dado que en ambos experimentos se produjo un aumento de las BH a T0, podría asociarse al crecimiento rápido de bacterias degradadoras (Wang et al. 2016). En el caso del experimento claro, este aumento se observó al menos hasta un día después (T1) de la aplicación, lo que puede explicar la disponibilidad del fósforo en los primeros días y en consecuencia, el crecimiento del micro+nano fitoplancton observado 7 días después (T2). En cambio, en el experimento turbio las Pcy aumentaron al día siguiente (T1), hecho que puede ser analizado por un mayor protagonismo en la función degradadora de esta fracción en detrimento de las BH. Recientemente ha sido constatado a campo lo que se había observado en ensayos de mesocosmos al aire libre (Pérez et al. 2007; Vera et al. 2010): la estimulación en el crecimiento de las Pcy en las lagunas pampeanas como producto de la contaminación con glifosato (Castro Berman et al. 2020). En este sentido, los resultados obtenidos en el experimento turbio de este capítulo son acordes a este proceso, ya que se observó el aumento de esta fracción. Sin embargo, dado que en el sistema claro la fracciones que aumentaron fueron el micro+nano fitoplancton y las PEuk, mientras que en el turbio fueron las Pcy, se podría predecir que podría existir un efecto diferente en aquellas lagunas pampeanas de tipo claras, con estimulación del micro+nano fitoplancton y de las pico-eucariotas que podría acarrear procesos de eutrofización.

La eutrofización representa uno de los mayores peligros en el mantenimiento de la salud de los ecosistemas acuáticos (Smith, 2003) y, por tanto, reducir los riesgos de

dichos procesos es esencial. Las respuestas diferenciales de las comunidades presentes en los sistemas acuáticos de agua dulce frente a la contaminación con glifosato ya habían sido reportadas por Pesce et al. (2009) en sistemas acuáticos lóticos donde diferentes respuestas se observaron según la estación y corroborado por Pizarro et al. (2016) en sistemas lénticos donde se detectaron impactos diferentes sobre la estructura de las comunidades microbianas según los estados claro y turbio-orgánico.

En los dos experimentos de este capítulo no se estudiaron otros componentes microbianos presentes (flagelados heterótrofos, ciliados, micro y macro zooplancton), por lo que no puede descartarse la existencia de efectos indirectos a través de procesos de cascada trófica.



Fig. 24: Efectos de la concentración más alta de AsiMax 50® (2,4-DA) sobre las comunidades estudiadas en el experimento claro (izq) y turbio (der). BH: bacterias heterótrofas, M+N: micro+nano fitoplancton, PEuk: picoplancton autotrófico eucariota, Pcy: picocianobacterias.

Respecto a los efectos del 2,4-D (Fig. 24), no se observaron impactos estructurales importantes en el experimento claro, donde sólo se constató un aumento de las BH a T1 y un posterior descenso a T2. En cambio, en el sistema turbio se

observó un descenso del micro+nano fitoplancton a T2 y un aumento de las PEuk a T3. Como fue abordado en la discusión del experimento turbio, la existencia de algunas especies sensibles al 2,4-D y su preponderancia, ej. la especie dominante *Staurastrum* sp., estaría afectando las abundancias totales de toda la fracción. No se encontró ningún efecto del 2,4-D sobre la colonización perifítica, estos resultados son únicos en este sentido ya que no hay trabajos previos publicados sobre el posible efecto del 2,4-D sobre el desarrollo de esta comunidad. En el caso particular del 2,4-D, los resultados diferenciales entre ambos experimentos tienen su correlato con lo observado en el Capítulo I de esta tesis. El 2,4-D muestra efectos diferenciales muy marcados, dependiendo de los sistemas estudiados pero también de la aproximación experimental utilizada. Mientras que en sistemas similares de tipo turbio-orgánico en microcosmos al aire libre se observó una estimulación de la abundancia del micro+nano fitoplancton (Capítulo I), en mesocosmos al aire libre se vio el efecto contrario, una reducción de esta fracción planctónica (Capítulo III).

Los resultados de ambos experimentos muestran la importancia de ensayar comunidades provenientes de distintos sistemas, ya que cada contaminante puede tener efectos diferentes dependiendo de la estructura del sistema. Esto puede deberse a la diferente composición de especies y sus diferentes sensibilidades al contaminante, así como a sus abundancias relativas. El análisis de las diferentes comunidades y sus respuestas ante los contaminantes indica que la columna de agua mostró mayor contraste entre los dos sistemas, mientras que el perifiton tuvo un comportamiento similar en ambos sistemas. Si bien en este capítulo se focalizó sobre las diferencias en cuanto a las comunidades biológicas microbianas presentes en cada sistema, es importante destacar que otros factores físicos, químicos, biológicos y climáticos pueden haber sido causantes de los impactos diferenciales observados de los herbicidas.

En la evaluación de la acción combinada en general se verificó un comportamiento aditivo (suma algebraica de efectos individuales), siendo el factor impulsor de cambio en cada experimento dependiente del tipo de sistema: el glifosato en el caso del mesocosmos claro, y el 2,4-D en el sistema turbio. Esto se condice con

lo predicho por el modelo de adición de efectos de compuestos con distinto modo de acción (Rodea-Palomares et al. 2015), el glifosato y el 2,4-D tienen modos de acción diferentes en las plantas, y es posible que sobre otros organismos no-blanco, como las algas y cianobacterias, suceda lo mismo. Por tanto, es un resultado esperado que la mayoría de los efectos mezclas hayan mostrado comportamiento aditivo. Los resultados mayormente aditivos se condicen con lo observado en microcosmos en condiciones controladas (Capítulo II, Lozano et al. 2018).

Si bien Pizarro et al. (2016) habían ya reportado algunos efectos diferenciales del glifosato de acuerdo al tipo de sistema ensayado, este trabajo es el primero en evaluar el 2,4-D y la mezcla de ambos herbicidas en mesocosmos al aire libre. Los resultados muestran que tanto el glifosato como el 2,4-D pueden modificar diferencialmente la estructura de los sistemas de agua dulce de acuerdo a las comunidades presentes y el grado de turbidez orgánica.

Resumen del Capítulo III:

h1: Los efectos de los herbicidas Roundup Max[®] (glifosato), AsiMax 50[®] (2,4-D) y su mezcla sobre la estructura (abundancias y composición taxonómica) de las comunidades planctónicas en mesocosmos al aire libre son iguales en dos sistemas de turbidez contrastantes.



Rechazada: con ambos herbicidas se encontraron efectos diferentes sobre las comunidades microbianas, especialmente sobre la fracción autotrófica, dependiendo del sistema ensayado.

h2: Los efectos de los herbicidas estudiados y su mezcla sobre la estructura (abundancias y composición taxonómica) de las comunidades planctónicas en mesocosmos al aire libre son iguales a los resultados obtenidos en condiciones controladas de laboratorio (Capítulos I y II).



Rechazada: se encontraron resultados muy diferentes en las distintas aproximaciones, especialmente en el caso del 2,4-D donde se observaron efectos contrarios en microcosmos en condiciones controladas vs mesocosmos al aire libre.

h3: Los efectos del AsiMax 50[®] (2,4-D) sobre la estructura de las comunidades planctónicas (abundancia y composición taxonómica) presenta efectos mayores a menor concentración.



Rechazada: los mayores efectos sobre las abundancias de las comunidades planctónicas fueron detectados a la concentración más alta.

h4: La colonización de la comunidad perifítica, medida a partir de las variables de masa y la composición taxonómica de la fracción autotrófica, es diferente según escenarios, con o sin los herbicidas.



Aceptada: ya que en ambos experimentos se observó un aumento del perifiton en los tratamientos en presencia de glifosato en su concentración más alta (GA y MA) mientras que en ninguno de los dos casos se observaron efectos del 2,4-D a ninguna concentración.

h5: *Los efectos de la mezcla sobre las variables físicas, químicas y biológicas son aditivos.*

X Rechazada: si bien la mayoría de las variables estructurales estudiadas en los 4 tiempos correspondieron al modelo aditivo, 3 antagonismos y 1 sinergismo fueron encontrados en el experimento claro y 4 antagonismos en el sistema turbio.

***Capítulo IV: Efecto de la mezcla de
glifosato y 2,4-D sobre variables
funcionales de comunidades
microbianas de aguas claras y
turbias: aproximación en
mesocosmos al aire libre***

Introducción

La llegada de contaminantes a los cuerpos de agua dulce puede producir efectos estructurales y/o funcionales (Havens, 1994). En el capítulo III fueron analizados efectos estructurales de los herbicidas glifosato y 2,4-D en dos experimentos realizados en mesocosmos al aire libre. Los efectos estructurales pueden ser descritos como cambios en la diversidad específica, la composición de las comunidades y aquellos indicadores relacionados a las especies sensibles en un sistema, entre otros. Estos efectos pueden derivar en impactos sobre las variables funcionales (Sandin & Solimini, 2009). Las variables funcionales son aquellas actividades, procesos o propiedades de un sistema que son influenciadas por la biota (Naeem, Loreau & Inchausti, 2002). Durante mucho tiempo se ha discutido la relación entre la estructura de un sistema y su funcionamiento, especialmente en lo referido a las posibilidades de restauración de los sistemas naturales luego de algún evento de contaminación u otro impacto. Tres hipótesis han sido propuestas (Naeem, Loreau & Inchausti, 2002): 1. Las especies son redundantes, por tanto la afectación de algunas de ellas no derivan necesariamente en cambios funcionales del sistema, 2. Las especies son singulares, todo cambio en la estructura impacta de forma detectable en las funciones del sistema, en particular existen especies clave cuya afectación produce cambios importantes, y 3. Los impactos sobre las especies son dependientes del contexto y por eso son particulares e impredecibles.

Por otro lado, también es posible la modificación de las funciones de un ecosistema acuático sin la presencia de cambios estructurales, por ejemplo a través del impacto sobre la fisiología y/o metabolismo de los organismos presentes. En ese sentido, Sandin & Solimini (2009), quienes trabajaron sobre cuerpos de agua lóticos, se han preguntado: ¿bajo qué circunstancias las variables funcionales son mejores que las estructurales para evaluar el estado de un sistema?. Los autores concluyeron que el estudio de las variables funcionales toma relevancia cuando las funciones están asociadas a aquellas comunidades que suelen ser menos estudiadas, como las comunidades microbianas.

En este capítulo se estudian los efectos del glifosato, el 2,4-D y su mezcla sobre dos variables de tipo funcional: la concentración de oxígeno disuelto (OD)

(Sección 1) y la producción primaria y la respiración de la columna de agua (Sección 2). Se analizará en primer lugar los patrones de modificación diaria del oxígeno disuelto para los experimentos desarrollados en el capítulo III , así como su relación con las abundancias totales del micro+nano fitoplancton, el picoplancton autotrófico y las bacterias heterótrofas en ambos experimentos. En segundo lugar se analizarán los resultados obtenidos para las variables de producción obtenidas durante el segundo experimento.

El objetivo general de este capítulo fue estudiar el impacto de los herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla, sobre variables funcionales del sistema.

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar el impacto de ambos herbicidas y su mezcla sobre la dinámica diaria de saturación del OD (Sección 1).
2. Evaluar el efecto de ambos herbicidas y su mezcla sobre la producción primaria y la respiración (Sección 2).
3. Estudiar la relación entre los impactos funcionales y estructurales observados (Sección 1 y 2).

Las hipótesis a contrastar fueron:

h1: Las herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla modifican la dinámica diaria de saturación del OD de los sistemas acuáticos.

h2: Las herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla impactan sobre la producción primaria.

h3: Los efectos de la mezcla de ambos herbicidas sobre las variables funcionales se comportan de forma aditiva.

h4: Los herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla producen efectos sobre las variables funcionales (OD y producción primaria) que pueden ser explicados por los impactos sobre las variables estructurales estudiadas (abundancias del micro+nano fitoplancton, pico-plancton autotrófico y bacterias heterótrofas).

Sección 1: oxígeno disuelto

Introducción

En los sistemas acuáticos, el oxígeno disuelto (OD) integra aspectos físicos, químicos y biológicos y su concentración resulta del balance de varios procesos que ocurren en todo el sistema. Respecto de los procesos físicos involucrados, el oxígeno está en permanente proceso de equilibrio entre la atmósfera y el agua, así como también puede ser aportado al sistema acuático a través de las entradas de agua subterránea o de la escorrentía de la superficie y puede eliminarse por salidas de aguas superficiales o subterráneas. Los flujos de intercambio de oxígeno a través de las interfaces aire-agua y sedimento-agua son dependientes de la temperatura del agua, la turbulencia y la salinidad, así como de la profundidad de la columna de agua y la agregación de partículas suspendidas (Peña et al. 2010). Con respecto a los procesos biológicos, el OD resulta de un equilibrio entre los procesos de fotosíntesis y de respiración. La fotosíntesis es realizada por el fitoplancton, los microorganismos autótrofos asociados a comunidades adheridas como el perifiton, las macrófitas y otras comunidades fotosintéticas de agua dulce. Por otro lado, todos los organismos aeróbicos presentes en el cuerpo de agua consumen oxígeno a través de la respiración (Fig. 1). Además de los procesos físicos y biológicos, los procesos biogeoquímicos como la mineralización de la materia orgánica alóctona y la nitrificación pueden afectar la concentración de OD en los sistemas de agua dulce. En general, todos estos procesos pueden presentar variaciones a lo largo del día así como estacionalmente, como producto de las modificaciones en la velocidad del viento, la temperatura y densidad del aire, la presión atmosférica y la radiación solar.

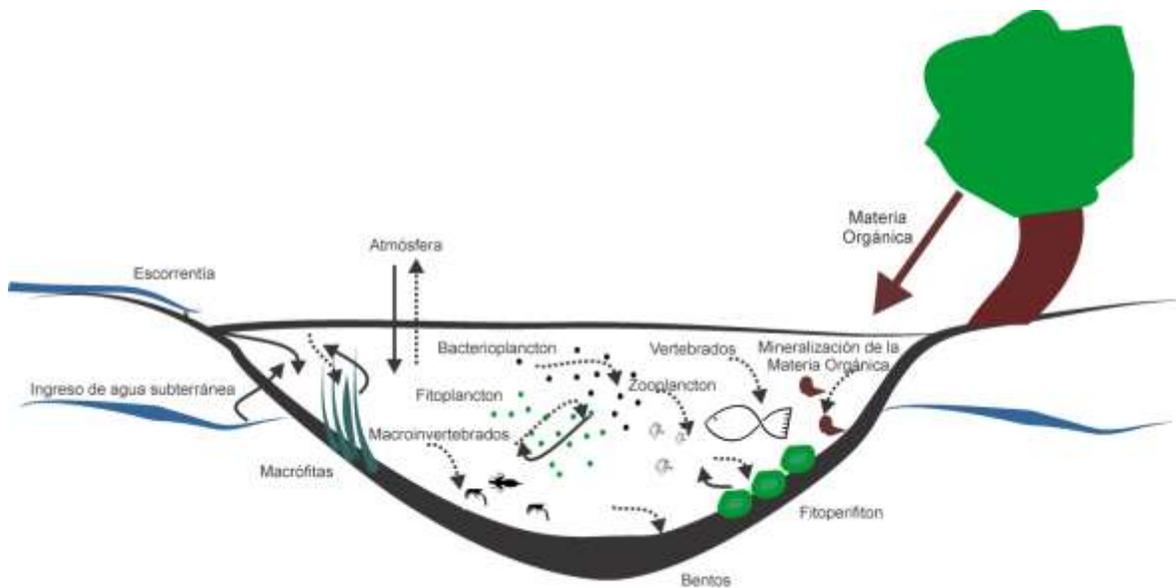


Fig. 1: Dinámica del oxígeno disuelto en los sistemas acuáticos. Las flechas negras son emisiones y las flechas punteadas representan consumos.

La deficiencia de OD puede afectar los procesos aeróbicos de las comunidades presentes en el ecosistema acuático, lo que puede ocasionar, en función de su magnitud y frecuencia, diferentes grados de alteración del ecosistema. Asimismo, se sabe que los cambios en la OD tienen un impacto negativo en muchos procesos bioquímicos esenciales; por ejemplo, la fijación de nitrógeno a través de la enzima nitrogenasa se inhibe en presencia de concentraciones excesivas de OD (Sigge, 2005) y la biodisponibilidad de los micro y macronutrientes (por ejemplo, fósforo) puede modificarse directa o indirectamente a diferentes concentraciones de OD (Wang et al. 2008). Por estos motivos, el monitoreo de OD en sistemas naturales de agua dulce se realiza a menudo como indicador de la salud del ecosistema acuático.

Las técnicas para la medición de OD han evolucionado desde reacciones químicas (por ejemplo, el método de Winkler) hasta el uso de microelectrodos y sensores ópticos. Los sensores ópticos tienen la ventaja de ser pequeños, baratos y poseer estabilidad a largo plazo (Klimant et al. 1995). Actualmente, el monitoreo del OD en sistemas acuáticos, tanto *in-situ* como en condiciones de laboratorio, es fácil de realizar y proporciona resultados instantáneos (Warkentin et al. 2007).

Las evidencias científicas muestran que los agroquímicos contaminan los cuerpos de agua dulce insertos en el paisaje agrícola causando efectos directos e indirectos en los organismos presentes (Fleeger et al. 2003). En este sentido, King et al. (2016) señalaron que el OD es un indicador particularmente sensible a la contaminación del agua con herbicidas.

El objetivo de esta sección fue estudiar los cambios en la dinámica del porcentaje de saturación del OD como resultado del impacto de la contaminación con dos formulados comerciales de herbicidas, uno basado en glifosato y el otro basado en 2,4-D, y sus mezclas en dos sistemas de agua dulce que contrastan en su estado de turbidez. Con este propósito se realizó la medición diaria del porcentaje (%) de saturación del OD de las UE durante los dos experimentos realizados en mesocosmos al aire libre (claro y turbio) (Capítulo III).

Materiales y métodos

Variables físicas y químicas

Se midió diariamente el % de saturación del OD a las 8:30 AM con un oxímetro óptico (YSI® ProODO™; error = 0,01 mg/L) sumergiendo la sonda a una profundidad de -10 cm en el centro de cada UE. La temperatura del agua se registró de forma continua utilizando botones térmicos (Akribis®) así como se registró la temperatura instantánea con el mismo oxímetro.

Variables biológicas

Con el objetivo de estudiar la asociación de la variable funcional %OD y la estructura de las comunidades microbianas, se utilizaron los valores de abundancias del micro+nano fitoplancton, el picoplancton autotrófico y las bacterias heterotróficas del Capítulo III. En el caso particular del micro+nano fitoplancton se dividió entre especies estrictamente autotróficas (M+N) y aquellas mixotróficas (Mixo) con el objetivo de mejorar el análisis desde una perspectiva funcional. Las especies que fueron consideradas mixotróficas fueron *Peridinium* sp. y *Ochromonas* sp. (Andersson et al. 1989, Palsson & Granéli, 2004).

Por otro lado, y con fines comparativos, se calcularon y graficaron las variaciones de las abundancias en porcentajes (%) de variación respecto de los controles.

TRATAMIENTOS				MESOCOSMOS AL AIRE LIBRE	VARIABLES		
	n	Roundup Max® (glifosato mg/L)	AsiMax 50® (2,4-D mg/L)		 OD medido diariamente		
Control	6	-	-		Autotrófico	Mixotrófico	Heterotrófico
GB	3	0.3	-		M+N	Mixo	BH
GA	3	3.0	-		PF (PEuk + Pcy)		
2,4-DB	3	-	0.135		T0, T1 (1 día), T2 (7 días) y TF		
2,4-DA	3	-	1.35				
MB	3	0.3	0.135				
MA	3	3.0	1.35				
Dos experimentos: CLARO y TURBIO							

Fig. 2: Diseño experimental de los dos experimentos en mesocosmos al aire libre. Los tratamientos se enumeran a la izquierda y las variables de muestreo a la derecha. GB: glifosato baja, GA: glifosato alta, 2,4-DB: 2,4-D baja, 2,4-DA: 2,4-D alta, MB: mezcla baja, MA: mezcla alta, M+N: Micro+nano fitoplancton, PF: picoplancton fotosintético, PEuk: fotótrofos eucariotas, Pcy: picocianobacterias, Mixo: micro+nano fitoplancton mixotrófico, BH: bacterias heterótrofas. Círculo: unidad experimental.

Análisis estadístico

El efecto de los herbicidas se evaluó a través de la la variación diaria del porcentaje de saturación de OD, calculada como $\%OD (mg/L) = \%ODx - \%OD_{control}$, donde $\%ODx$ es el valor de % de saturación de OD obtenido para cada UE. Las diferencias en $\%OD$ entre los siete tratamientos a lo largo del tiempo se analizaron con MR-ANOVA de dos vías (factor tiempo con 4 niveles y factor tratamiento con 7 niveles) seguido de comparaciones múltiples (método de Holm-Sidak) estableciéndose la significancia estadística en $p < 0,05$. Todos los datos se analizaron previamente para determinar la normalidad y la homocedasticidad (pruebas de Shapiro-Wilks y Levene) y se transformaron posteriormente en el caso de ser necesario.

Con el objetivo de evaluar el efecto mezcla y poner a prueba la aditividad de efectos sobre el $\%OD$, se realizó MR-ANOVA de dos factores en ambos experimentos, en los que los factores fueron la mezcla (dos niveles: observado y esperado por

aditividad) y la concentración (dos niveles: alto y bajo). Los valores esperados por aditividad se obtuvieron por la suma algebraica de los valores medidos para cada herbicida por separado. Cuando la diferencia entre las concentraciones observadas y las esperadas fue significativa, la interacción se consideró sinérgica si la concentración media observada del %OD fue mayor que la concentración esperada media de %OD; de lo contrario, la interacción fue considerada antagónica.

Con el fin de estudiar la relación entre función (%OD) y estructura (abundancias de las fracciones microbianas estudiadas), se construyó una matriz con los valores de coeficientes de correlación de Pearson entre las variaciones de abundancia de las diferentes fracciones y el %OD, luego se graficaron en redes de correlación con Cytoscape[®] v3.7.1 (Shannon et al. 2007).

Para todos los análisis estadísticos se utilizaron los programas SigmaPlot[®] 11.0 e InfoStat[®] versión 2015.

Resultados

La concentración media diaria de OD en los controles osciló entre 8,97 (día 20) y 10,54 mg/L (día 3) para el sistema claro, y entre 8,9 (día 13) y 11,56 mg/L (día 1) para el turbio. Mientras que las concentraciones diarias de OD considerando los tratamientos oscilaron entre 8,15 mg/L (MA, día 20) y 11,00 mg/L (GA, día 8) para el sistema claro, y entre 8,52 mg/L (MA, día 13) y 12,09 mg/L (GA, día 6) para el turbio. El porcentaje de saturación de oxígeno siempre superó el 94% en ambos experimentos. El máximo de %OD se observó para el sistema claro, con un incremento medio respecto del control del 8,46% bajo el tratamiento GA, mientras que el mínimo se detectó en el sistema turbio bajo el tratamiento 2,4-DH, con un 6,63% de disminución.

Para los tratamientos con Roundup Max[®], el sistema claro mostró una ligera disminución del %OD con respecto al control (-3,1%, $p=0,002$) entre los días 13 y 17 bajo el tratamiento GB, mientras que no se observó disminución en el sistema turbio (Fig. 3A y 4A). En el tratamiento GA, hubo un aumento en el %OD con respecto al control (+5,7%, $p<0,001$) entre los días 3 y 9 en condiciones turbias, mientras que se registró un aumento similar (+5,9%, $p=0,003$) unos días más tarde, entre los días 7 y

11, en el sistema claro (Fig. 3B y 4B). El porcentaje máximo de variación de OD correspondió al tratamiento GA en ambos experimentos, con un aumento promedio con respecto al control de +7,74% en el día 3 ($p < 0,001$) y +8,46% en el día 8 ($p < 0,001$), para el experimento claro y turbio respectivamente. Si bien en el tratamiento GA los sistemas claro y turbio mostraron un aumento similar en la concentración de OD, el impacto comenzó antes y duró más tiempo en la condición turbia.

El tratamiento con 2,4-D no modificó sustancialmente la concentración de OD en general, excepto en el experimento en sistema en condición turbia, donde se observó una disminución (-4,6%, $p < 0,001$) entre los días 1 y 10 bajo el tratamiento 2,4-DA (Fig. 4D).

Las mezclas de los herbicidas impactaron en el %OD a las concentraciones bajas y altas ensayadas, tanto en la condición clara como en la turbia. En el sistema claro, MB causó una disminución en el %OD entre los días 15 y 18 (-2,9%, $p = 0,003$), mientras que en el sistema turbio resultó en un aumento entre los días 9 y 15 (+2,8%, $p = 0,003$) (Fig. 3E y 4E). En el sistema claro, MA llevó a un aumento del %OD entre los días 7 y 11 (+ 5,5%, $p < 0,001$), mientras que en el experimento turbio provocó una disminución desde el día 9 hasta el día 14 (-4,9%, $p < 0,001$) seguido de un aumento entre los días 17 y 20 (+ 3,5%, $p < 0,001$) (Fig. 3F y 4F).

Si consideramos que el sistema se recupera del impacto cuando el %OD vuelve a los niveles de los controles, el tratamiento MA en el sistema turbio mostró un escenario de no recuperación, con un aumento neto que perduró hasta el final del experimento (Fig. 4F).

En general, la exposición a la mezcla de los formulados de los herbicidas estudiados provocó efectos aditivos en las variables examinadas, a excepción del tratamiento MA en el sistema turbio, donde se detectó sinergismo ($p < 0,05$) entre los días 9 y 15 (Fig. 4F).

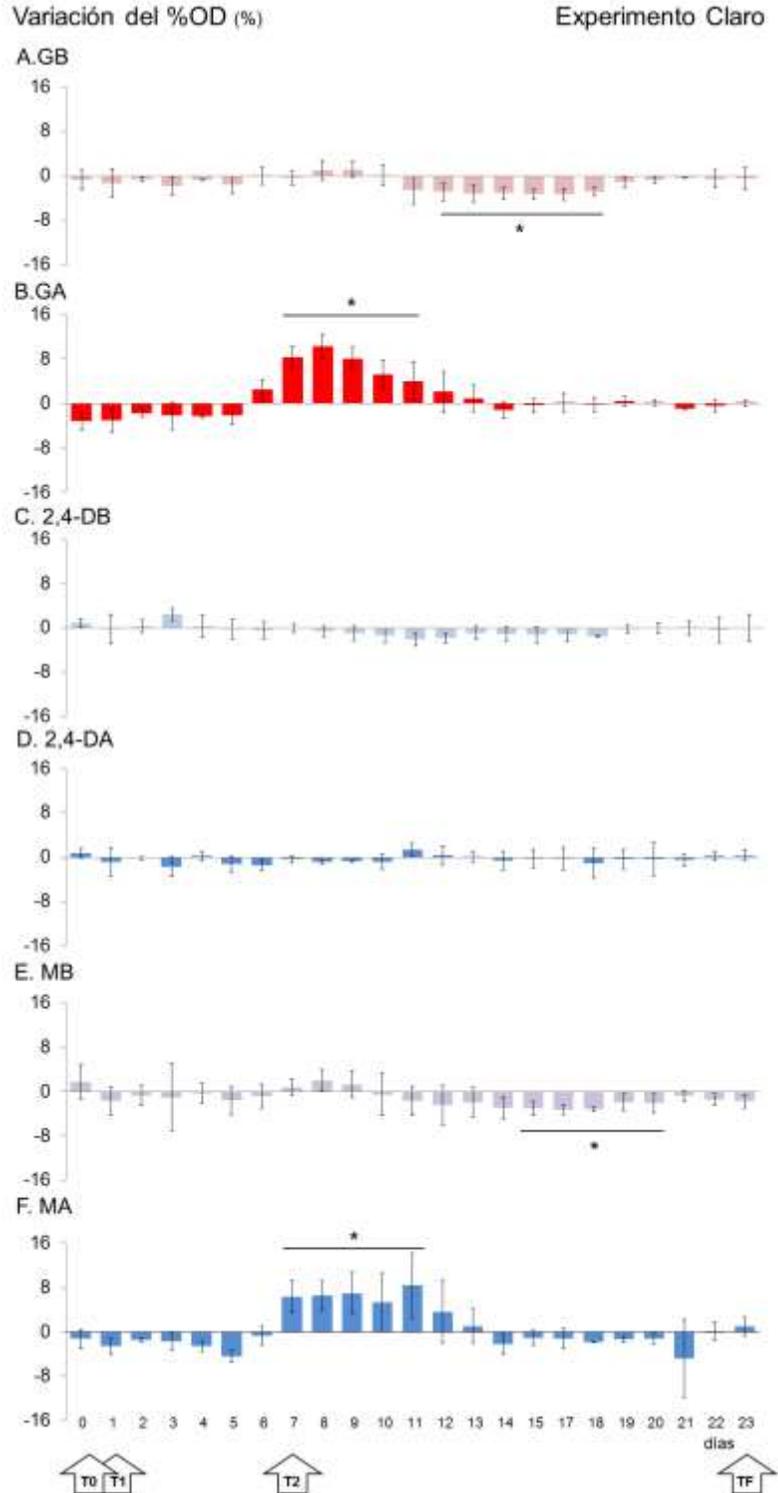


Fig. 3: Variaciones del porcentaje de saturación de OD (%OD) diario durante el experimento claro. Todas las variaciones son respecto a los controles. Barra de error = ± 1 DE; (*) diferencias significativas con respecto al control (RM-ANOVA; $p < 0,05$).

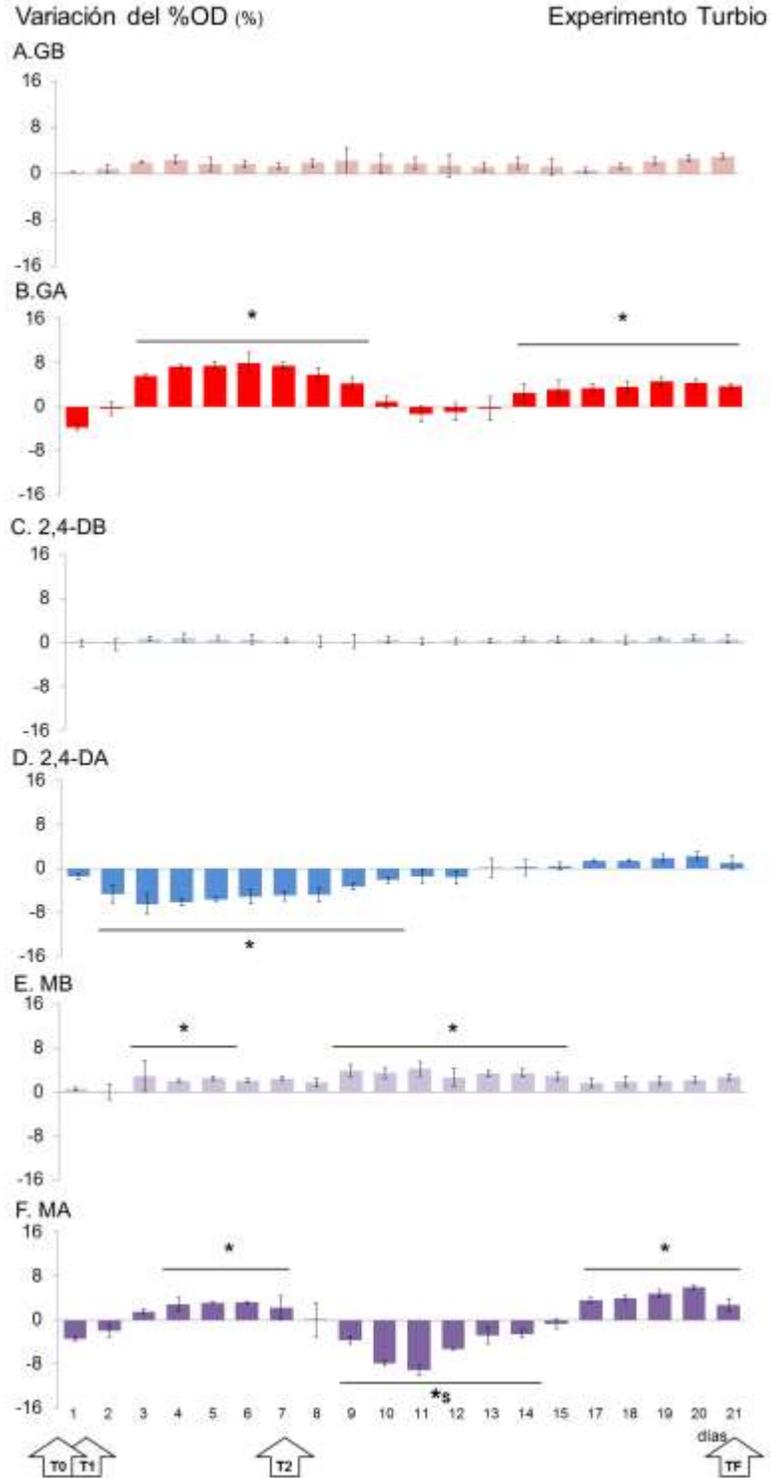


Fig. 4: Variaciones del porcentaje de saturación de OD (%OD) diario durante el experimento turbio. Todas las variaciones son respecto a los controles. Barra de error = ± 1 DE; (*) diferencias significativas con respecto al control (RM-ANOVA; $p < 0,05$). La S denota zona de sinergismo estadísticamente significativo.

Los porcentajes de variación de las abundancias de las fracciones microbianas estudiadas respecto de los controles en el sistema claro se muestran en la Fig. 5 y fueron desarrollados en el capítulo III. Se observaron efectos significativos relacionados con el tratamiento en el micro+nano fitoplancton a T2 en el tratamiento GA con una media de +709% (ANOVA, $p < 0,001$) y para MA con una media de +291% (ANOVA, $p = 0,01$) (Fig. 5A). Estos aumentos persistieron hasta T3, con +125% para MA (ANOVA, $p < 0,001$) y +55% para GA (ANOVA; $p = 0,004$). A T3, GB mostró una disminución de -83% en relación con los controles (ANOVA, $p = 0,001$). Los porcentajes de variación de las Mixo mostraron altos valores de desviación, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 5B). Respecto de las PEuk, se observaron aumentos a T2 para GA y MA, con valores medios de +414% (ANOVA, $p < 0,001$) y +204% (ANOVA, $p = 0,006$), respectivamente (Fig. 5C). No se observaron efectos relacionados con los tratamientos para las Pcy (Fig. 5D). Finalmente, las BH tuvieron variaciones significativas en diferentes tratamientos y tiempos de muestreo: con variaciones de +52% a T0, +49 a T1 y -26% a T2 en GA ($p < 0,001$ en todos los casos), +60%, +136% a T1 para 2,4-DA y MA respectivamente y de -27% para 2,4-DA y MA a T2 ($p = 0,008$ y $0,009$ respectivamente).

		GB		GA		2,4-DB		2,4-DA		MB		MA				
		Media (%)	DE	Media (%)	DE	Media (%)	DE	Media (%)	DE	Media (%)	DE	Media (%)	DE			
A. M+N	T0	-4	12	18	26	8	13	7	25	-25	25	26	7			
	T1	1	42	-16	29	-4	26	-18	9	-23	9	-32	19			
	T2	20	33	769	*	322	-24	18	-21	19	-27	19	267	*	93	
	T3	-83 *	15	55	*	60	-44	27	-23	64	47	64	125	*	72	
B. Mixo	T0	52	60	-21	38	116	104	-33	27	-58	27	-24	51			
	T1	-6	30	-28	26	-17	43	2	25	-41	25	-54	4			
	T2	-24	43	-63	25	-29	31	-30	34	-73	34	-46	16			
	T3	586	1000	-76	41	468	309	111	228	993	228	206	451			
C. PEuk	T0	66	89	94	44	20	65	-17	50	20	50	89	118			
	T1	8	12	-6	11	11	16	11	9	20	9	2	20			
	T2	6	7	414	*	277	0	21	-40	36	-13	36	204	*	37	
	T3	82	149	211	227	-49	41	-19	13	45	13	165	178			
D. Pcy	T0	2	32	-37	18	-11	33	-27	17	10	17	-22	26			
	T1	6	8	21	10	16	25	0	17	17	17	39	7			
	T2	17	98	7	43	53	77	-55	11	-48	11	6	41			
	T3	43	76	204	213	5	45	45	82	-28	82	34	91			
E. HB	T0	-6	6	52	*	21	-21	9	-19	10	-15	10	-9	24		
	T1	4	9	49	*	24	77	117	60	*	38	21	38	136	*	52
	T2	-17	6	-26 *	3	-15	2	-27*	4	-18	4	-27 *	4	-27 *	4	
	T3	6	6	29	7	5	3	28	7	11	7	21	15			

Fig. 5: Variaciones en las abundancias del micro+nano fitoplancton (M+N) (a), pico-eucariotas fotosintéticos (PEuk) (b), picocianobacterias (Pcy), algas mixotróficas (Mixo) y bacterias heterotróficas (BH) en el experimento claro. Todas las variaciones son % respecto a los controles y se encuentran en escala respecto a cada fracción. DE: Desvío Estándar; el asterisco denota diferencias significativas con respecto al control (ANOVA; $p < 0,05$).

		GB		GA		2,4-DB		2,4-DA		MB		MA		
		Media (%)	DE											
A. M+N	T0	-3	48	-7	9	4	16	28	59	5	39	4	40	
	T1	51	26	5	57	-14	23	8	38	21	3	26	54	
	T2	23	40	-13	21	-36	14	-67*	6	-3	6	-40	27	
	T3	64	61	31	29	1	47	-67*	10	7	22	-64	25	
B. Mixo	T0	-13	29	15	33	13	25	33	35	-7	20	-6	25	
	T1	29	41	21	51	-10	29	-3	35	-10	18	26	-30	
	T2	-25	30	-73*	9	-49*	6	-64*	6	-50*	4	-72*	11	
	T3	-25	37	-70	10	1	47	1	41	-36	24	-88*	13	
C. PEuk	T0	19	7	33	3	19	1	1	8	4	6	19	4	
	T1	-15	2	-42*	14	-33	7	-39	17	-28	5	-24	6	
	T2	20	6	15	2	6	4	22	4	24	5	7	7	
	T3	-60*	6	-39	19	17	84	58	61	-3	50	53	*	40
D. Pcy	T0	7	3	13	1	-2	2	-9	3	-10	6	0	4	
	T1	20	26	34	30	28	12	25	30	33	10	2	14	
	T2	22	16	58	10	4	12	10	11	23	5	89	*	64
	T3	-6	18	104	28	-2	7	20	13	55	14	98	*	10
E. HB	T0	44	42	157	34	67	21	94	5	90	18	250	*	16
	T1	28	5	12	31	-14	9	2	16	36	25	34	70	
	T2	-3	5	34	4	2	2	-4	7	12	11	40	*	6
	T3	5	10	-8	15	3	6	-6	3	-3	15	9	10	

Fig. 5: Variaciones en las abundancias del micro+nano fitoplancton (M+N) (a), pico-eucariotas fotosintéticos (PEuk) (b), picocianobacterias (Pcy), algas mixotróficas (Mixo) y bacterias heterotróficas (BH) en el experimento turbio. Todas las variaciones son % respecto a los controles y se encuentran en escala respecto a cada fracción. DE: Desvío Estándar; el asterisco denota diferencias significativas con respecto al control (ANOVA; $p < 0,05$).

Con el objetivo de analizar la relación entre el %OD y las variaciones en las abundancias, se construyó una red de correlaciones de estas variables considerando los valores de todos los tiempos. Para ello se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson (r) (Fig. 6). En el experimento claro, el %OD correlacionó con las abundancias de la fracción del micro+nano fitoplancton ($r=0,50$, $p<0,0001$) que, al mismo tiempo correlacionó con las PEuk ($r=0,54$, $p=0,0001$). Por otro lado, las abundancias de las BH y las algas mixotróficas se correlacionaron negativamente con el %OD ($r=-0,26$, $p=0,0271$ y $r=-0,29$, $p=0,0152$ respectivamente). Para el experimento turbio, el %OD correlacionó positivamente con las abundancias de las Pcy ($r=0,37$, $p=0,0067$) y negativamente con la de las algas mixotróficas ($r=-0,31$, $p=0,0215$). Entre las abundancias, las Pcy correlacionaron positivamente con las BH ($r=0,32$, $p=0,0182$) y estas últimas negativamente con el micro+nano fitoplancton ($r=-0,5$, $p=0,0001$). Finalmente, las algas mixotróficas correlacionaron positivamente con el micro+nano fitoplancton ($r=0,45$, $p=0,0006$) y negativamente con las Pcy ($r=-0,5$, $p=0,0001$) y las BH ($r=-0,35$, $p=0,0087$).

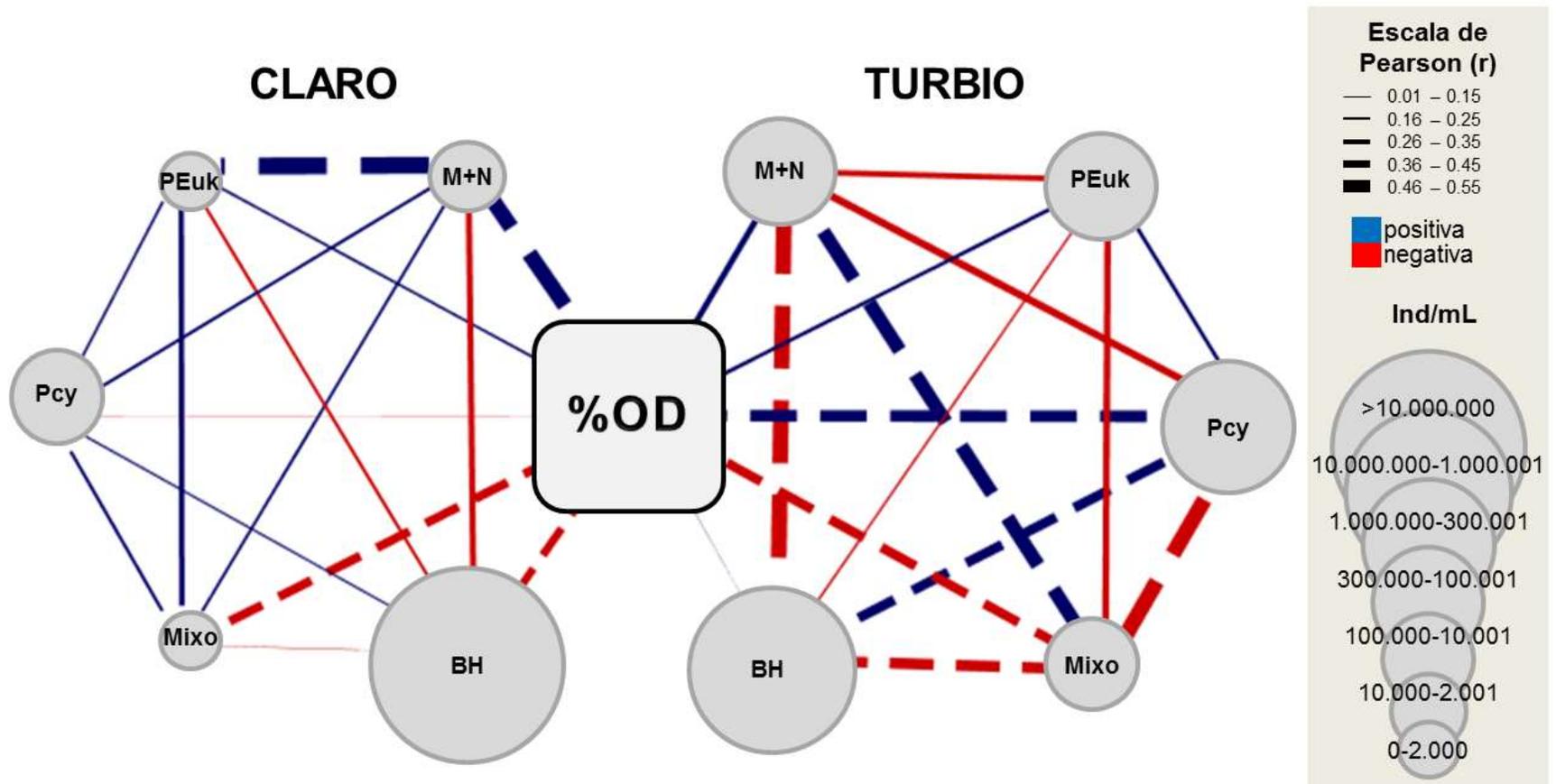


Fig. 6: Red de correlaciones entre los valores de %OD y las abundancias del micro+nano fitoplancton (M+N), pico-eucariotas (PEuk), picocianobacterias (Pcy), algas mixotróficas (Mixo) y bacterias heterotróficas (HB) en los experimentos claro y turbio. Línea de puntos: $p < 0.05$. $n=72$. Las redes se construyeron con el software Cytoscape® v3.7.1.

Discusión

Los resultados obtenidos en esta sección sugieren que el %OD es una variable funcional suficientemente sensible que permite el monitoreo de cambios estructurales impulsados por formulados de herbicidas y su mezcla en sistemas de agua dulce. A pesar de que los herbicidas ensayados, las fracciones de algas y cianobacterias parecen ser los blancos principales de ambos, posiblemente porque éstas comparten vías metabólicas comunes con las plantas (Couderchet & Vernet, 2003). Ambos herbicidas, solos o en mezcla, modificaron la estructura de la fracción microbiana autotrófica planctónica (Capítulo III). Esto último *per se* puede proponerse como uno de los factores responsables de la modificación en la dinámica de la variable funcional %OD.

En general, los cambios observados en los niveles del %OD de un ecosistema acuático podrían deberse a los siguientes efectos de los herbicidas sobre las comunidades presentes: 1) Cambios estructurales dados por el impacto sobre las tasas de reproducción y/o supervivencia, que puede tener como consecuencia una disminución de la riqueza debido a la muerte de especies intolerantes o a un aumento de ella debido a la estimulación de especies tolerantes; 2) Cambios funcionales que modifican la frecuencia fotosintética o respiratoria asociados a estrés o fisiológicas. Estas respuestas estructurales y funcionales a los herbicidas pueden ocurrir simultáneamente, pudiendo ambos tipos de efectos producir un aumento o disminución en el %OD o actuar de forma opuesta. En este sentido, se espera que el %OD disminuya como consecuencia un aumento en la fracción de descomponedores heterótrofos y/o a una tasa fotosintética reducida debido a la eliminación de algunas especies autotróficas. En contraste, la estimulación fisiológica de algunas especies fotosintéticas aumentaría su abundancia y su tasa fotosintética, provocando así un aumento en el %OD.

En el caso del glifosato, el aumento del %OD en el tratamiento GA observado durante el experimento claro podría explicarse como una consecuencia del aumento del micro+nano fitoplancton y de las PEuk que fueron discutidos en el Capítulo III. Así mismo, en el experimento turbio, un patrón similar de aumento del %OD podría relacionarse con el aumento de la abundancia de las Pcy detectado desde T1 y mantenido hasta T3, coherente con la dinámica del %OD donde a esos tiempos se observaron incrementos significativos.

El impacto que tiene el 2,4-D en el agua dulce en general, y en la fracción de algas en particular, es actualmente controvertido ya que algunos autores informaron sobre estimulación (Kobraei & White, 1996; Boyle, 1980; Relyea, 2009) y otros sobre inhibición (Singh & Shrivastava, 2016; Wood et al. 2016; Zhu et al. 2016) de la producción primaria en algas. En este trabajo, la disminución del %OD en el sistema turbio a la concentración alta (2,4-DA) indicaría un impacto negativo en una o más especies de la fracción autótrofa. Al igual que con la dinámica del %OD en los tratamientos con glifosato, el período de disminución del %OD (T2) por parte del 2,4-D mostró coincidencia con la disminución significativa de la abundancia de micro+nano fitoplancton, lo que podría explicar este fenómeno. En el mismo sentido, en el sistema claro, donde no se observó disminución del %OD, ninguna de las fracciones planctónicas autotróficas varió significativamente en presencia de 2,4-D.

Además, es importante destacar que otras comunidades microbianas están involucradas en este esquema, y pueden impulsar cambios en la concentración de %OD en el agua. En este sentido, en ambos experimentos se observó un incremento en el desarrollo del perifiton en presencia de la concentración más alta de Roundup Max® ensayada (GA y MA), lo que pudo haber incrementado el %OD de la columna de agua.

Con respecto a las diferentes correlaciones entre el %OD y las abundancias de las distintas fracciones estudiadas, en el sistema claro el %OD correlacionó con la dinámica de abundancias del micro+nano fitoplancton, mientras que en el turbio lo hizo con la de las Pcy, lo que fue coherente con el tipo de efecto estructural observado en cada sistema (capítulo III).

Respecto del efecto mezcla, el impacto en el %OD pareció ser más fuerte en presencia de Roundup Max® que para AsiMax 50®, particularmente en el experimento claro, donde no se observaron efectos del 2,4-D. Por otro lado, el 2,4-D tuvo un impacto en el sistema turbio pero no en el claro; la mezcla alta condujo a variaciones persistentes en el %OD, detectándose un efecto sinérgico durante el transcurso del experimento. En este caso, el tratamiento MA pareciera tener un patrón desplazado, donde la aditividad de los efectos predomina antes del octavo día y después de eso, la disminución del %OD aparece asociada a un efecto predominante de la disminución del micro+nano fitoplancton respecto al aumento

de las Pcy. Si bien predominó el efecto mezcla de tipo aditivo, se encontró un caso que sugiere una leve tendencia al sinergismo.

Teniendo en cuenta que llevamos a cabo experimentos al aire libre en los que todas las UE se sometieron a las mismas condiciones climáticas (en términos de temperatura, presión atmosférica, lluvia y viento), las variaciones del %OD observadas deben explicarse por el impacto de los formulados de herbicidas.

Las fluctuaciones del %OD en los ecosistemas acuáticos pueden tener varias consecuencias ecológicas, incluidas alteraciones en la estructura de la trama trófica. Davis (1975) sugirió que una diferencia de OD de 1 mg/L podría afectar el comportamiento de los peces y Yu et al. (2014) indicaron que los cambios en el OD alteran la estratificación microbiana. Sobre esta base, se espera que la magnitud de las fluctuaciones del OD medidas en nuestro estudio, con valores máximos de 2,55 mg/L y 3,57 mg/L para el experimento claro y turbio, respectivamente, tenga consecuencias relevantes para los ecosistemas de agua dulce. A los cambios en la dinámica del OD provocada por los plaguicidas se sumarán los efectos producidos por otros cambios antropogénicos como lo son el calentamiento global y los cambios de uso de suelo. El aumento de la temperatura promedio del agua en escenario de calentamiento global tendrá como consecuencia el descenso de la concentración de OD al disminuir su solubilidad en agua. Asimismo, el aumento de la llegada de materia orgánica a los cuerpos de agua dulce como producto del mayor lavado de los suelos en creciente cambio de uso, provocará el aumento en la tasa de descomposición oxigénica que podría agravar el escenario. El cambio climático además promueve la aparición de eventos como inundaciones o sequías extremas. Si a esta conjunción de eventos que pueden darse simultáneamente, se le suma la llegada de agroquímicos al agua, las consecuencias en el ambiente pueden ser extremas. Ya se han reportado casos en nuestro país de mortandad masiva de peces, los que podrían ser producto de este escenario complejo en el que la disminución del OD en cuerpos de agua dulce³ juega un papel preponderante.

³ <https://misionesonline.net/2019/11/01/formosa-impactantes-imagenes-de-mortandad-masiva-de-peces-por-efectos-climaticos-en-el-banado-la-estrella/>

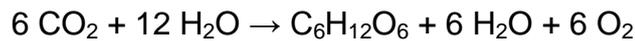
Nuestros resultados sugieren que una métrica simple del %OD puede ser lo suficientemente sensible para monitorear los efectos de las mezclas de herbicidas en los ecosistemas acuáticos, independientemente de su estado trófico, especialmente para estudios de mesocosmos al aire libre donde todas las UE presentan propiedades físicas casi idénticas. Es importante subrayar que un seguimiento continuo del %OD (por ejemplo, por medio de registradores sumergibles) proporcionará información adicional útil sobre la dinámica diaria.

En esta sección, las variaciones en las abundancias fitoplanctónicas pudieron explicar las fluctuaciones del %OD en los escenarios de agua dulce contaminados con herbicidas. Las medidas de OD pueden ser muy informativas en los sistemas de agua dulce perturbados y podrían alertar rápidamente sobre los cambios en la estructura y la abundancia de las comunidades de agua dulce. Sin embargo, el OD es una variable integradora y algunos procesos que funcionan en direcciones opuestas podrían compensarse, lo que puede llevar a sub-estimar ciertos impactos.

Sección 2: Producción primaria

Introducción

La producción primaria fitoplanctónica es una de las fuentes autóctonas de materia orgánica en los sistemas acuáticos que puede representarse por la siguiente ecuación, en presencia de luz y de un pigmento receptor (Wetzel, 2001):



Para realizar estimaciones de la producción primaria, existen métodos basados en el análisis del oxígeno gaseoso que se genera como producto o mediante la medición del carbono, a partir de la fijación de carbono marcado (^{14}C ó ^{13}C) en la fracción de reactivos de la ecuación (APHA, 2005). En el agua dulce, estos seguimientos se realizan mediante la incubación de botellas claras y oscuras, siendo una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de la producción primaria fitoplanctónica (Peterson, 1980).

El método de detección de oxígeno disuelto como producto de la fotosíntesis realizado en botellas claras y oscuras se realiza mediante la medición del oxígeno disuelto dentro de las botellas que son llenadas con agua del sistema e incubadas en el mismo. En líneas generales, la concentración inicial de oxígeno (Co_1) se verá reducida (Co_2) por efecto de la respiración luego del período de incubación en la botella oscura, mientras que en la clara la concentración final (Co_3) será el producto de la disminución por la respiración y del aumento por fotosíntesis (Fig. 7). Con los valores obtenidos es posible calcular la producción primaria bruta y neta siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\text{Respiración (R)} = \text{Co}_1 - \text{Co}_2$$

$$\text{Producción primaria bruta (PPB)} = (\text{Co}_3 - \text{Co}_1) + (\text{Co}_1 - \text{Co}_2)$$

$$\text{Producción primaria neta (PPN)} = \text{Co}_3 - \text{Co}_1$$

Este método de medición de la producción tiene sus limitaciones, ya que presupone que la tasa de respiración es igual en oscuridad que en presencia de luz, lo que es difícil de generalizar ya que las algas pueden fotorrespirar (utilización de O_2 en vez de CO_2 por parte de enzima RuBisCO en presencia de luz) y

además, que puede haber foto-oxidación o fotosíntesis sin fotólisis de agua realizada por algunos tipos de bacterias (Wetzel, 2001). Pese a estas limitaciones, la medición por este método es considerada una buena aproximación y puede realizarse de manera sencilla mediante el uso de un oxímetro.

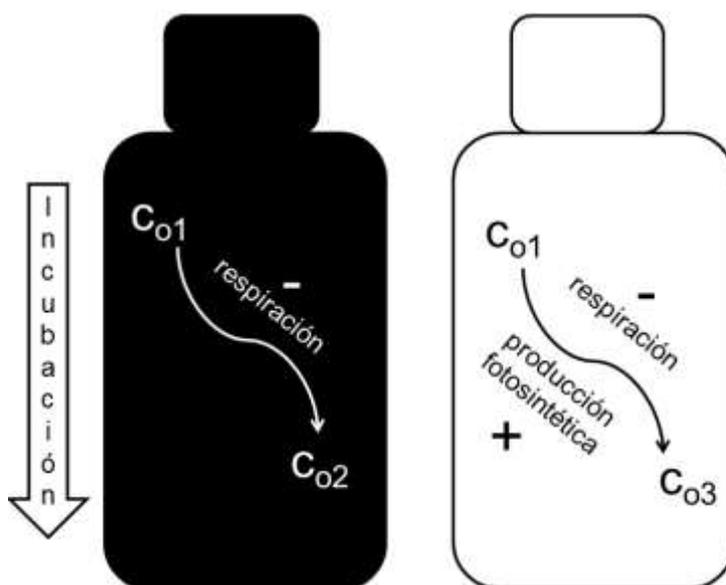


Fig. 7: Método de botellas claras y oscuras mediante la medición del oxígeno disuelto para la cuantificación de la producción primaria fitoplanctónica.

Luego de haber observado los cambios en la dinámica del oxígeno disuelto en el experimento turbio, el objetivo de esta sección fue estudiar el impacto del glifosato, el 2,4-D y su mezcla en la producción primaria fitoplanctónica durante el experimento claro. Pérez et al. (2007) habían informado de la duplicación de la producción primaria en mesocosmos tratados con Roundup[®], mientras que Boyle (1980) y Kobraei & White (1996) habían reportado su aumento en presencia de 2 mg/L de 2,4-D. Sin embargo, no hay información disponible acerca del efecto mezcla de estos dos plaguicidas sobre la producción primaria.

Materiales y métodos

Se diseñó un dispositivo de incubación de botellas claras y oscuras y se realizaron a los cuatro tiempos correspondientes a la toma de muestras biológicas (T0, T1, T2 y T3). Esta parte del trabajo fue llevada a cabo junto a la Lic. Sharon Allen durante su tesina de grado. La duración de las incubaciones fue de 4 hs. realizadas entre las 11:00 y 15:00 hs. donde la intensidad lumínica era alta (Fig. 8).



Fig. 8: Imágenes de preparación de dispositivos de incubación de botellas claras y oscuras dentro de cada UE.

Variables físicas y químicas

Las concentraciones de oxígeno disuelto fueron medidas antes y luego de la incubación con un oxímetro lumínico (YSI® modelo ProODO™). La sonda se insertó en el centro de la botella inmediatamente luego de su apertura. Las variables R, PPB y PPN en cada unidad experimental y en cada tiempo fueron calculadas utilizando las ecuaciones citadas anteriormente.

Variables biológicas

Las abundancias de las fracciones biológicas estudiadas fueron las mismas del Capítulo III, experimento claro. Se realizó además el cálculo del biovolumen aportado por las BH respecto del resto de las fracciones (micro+nano, mixo, Pcy y PEuk) a partir de datos de tablas siguiendo la metodología de Hillebrand et al. (1999). Para ello se utilizaron los valores medios de los controles a T0.

Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de las variables PPB, PPN y R se realizó modelando un modelo lineal generalizado mixto (MLGM) con dos factores de efectos fijos: tratamiento (4 niveles) y tiempo (4 niveles), y UE (réplicas) como factor aleatorio. Se utilizó la función CorCAR1 (Pinheiro & Bates, 2000) para

modelar la estructura de correlación de las unidades experimentales a lo largo del tiempo. Cuando fue necesario, se usó Varldent como la función de modelado dado que la homocedasticidad se cumplía y tenía el valor de AIC (Criterio de Información de Akaike) más bajo. Finalmente, la prueba LSD-Fisher ($\alpha = 0,05$) se utilizó para las comparaciones múltiples.

Para el estudio del efecto mezcla se analizó la aditividad a partir de valores esperados y obtenidos mediante la utilización del test t-student, graficándose los intervalos de confianza al igual que en el Capítulo II.

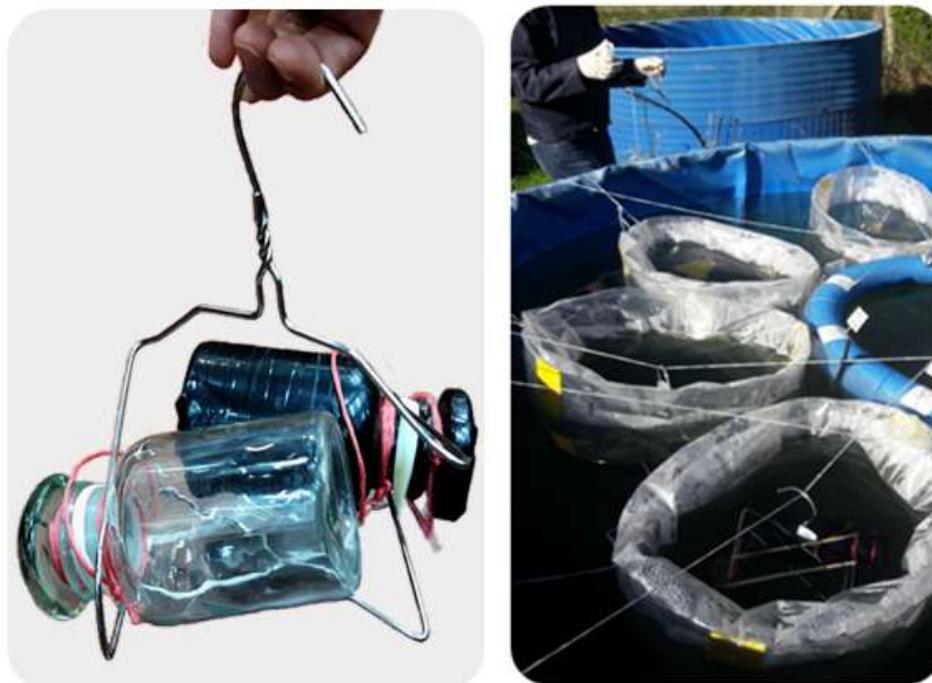


Fig. 9: Dispositivo ad hoc para sostener la botella clara y oscura (izq.) el que se observa sumergido en los mesocosmos (der.).

Resultados

Durante el experimento, la PPB registró un valor promedio de $55,00 \pm 43,69 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ con un mínimo de $-6,72 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (T3) y un máximo de $167,50 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (T0). El análisis MLGM mostró que los mesocosmos tratados con AsiMax 50[®] a baja concentración sufrieron una clara disminución de la PPB con respecto al control en el momento de la aplicación ($-67,31 \pm 15,20 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$, $p < 0,05$). También se observó una disminución significativa con respecto a lo que se registró

en el control en el día 0 en aquellos mesocosmos en los que se aplicó Roundup Max[®] y la mezcla de formulados a alta concentración ($-92,55 \pm 30,39 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ y $-63,94 \pm 37,09 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$, $p < 0,05$, respectivamente). Sin embargo, a T2 se observó un aumento en la PPB en el tratamiento con GA ($+47,04 \pm 24,03 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$, $p < 0,05$) (Fig. 10A).

La media de la PPN de los controles varió desde $-7,57 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (T3) hasta $35,01 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (T2). Todos los tratamientos registraron los valores promedio máximos de PPN en el T2, entre $27,4 \pm 11,76 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (GB) y $92,25 \pm 20,71 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (GA). El análisis MLGM reveló un aumento de la PPN con respecto al control en el T2 para el tratamiento con GA ($+57,25 \pm 34,38 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$, $p < 0,05$) (Fig. 10B).

El consumo de O_2 debido a la respiración, en los controles tuvo un valor medio de $37,74 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ con un mínimo de $6,59 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ y un máximo de $145 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$. El tratamiento de AsiMax 50[®] a baja concentración (2,4-DB) produjo una disminución de la respiración con respecto a los controles a T0 ($-61,42 \pm 14,31 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$, $p < 0,05$). Mientras que al mismo tiempo los tratamientos GA y MA mostraron disminuciones ($-85,02 \pm 32,41$ y $-57,84 \pm 34,78 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ respectivamente, $p < 0,05$ ambos) (Fig. 10C).

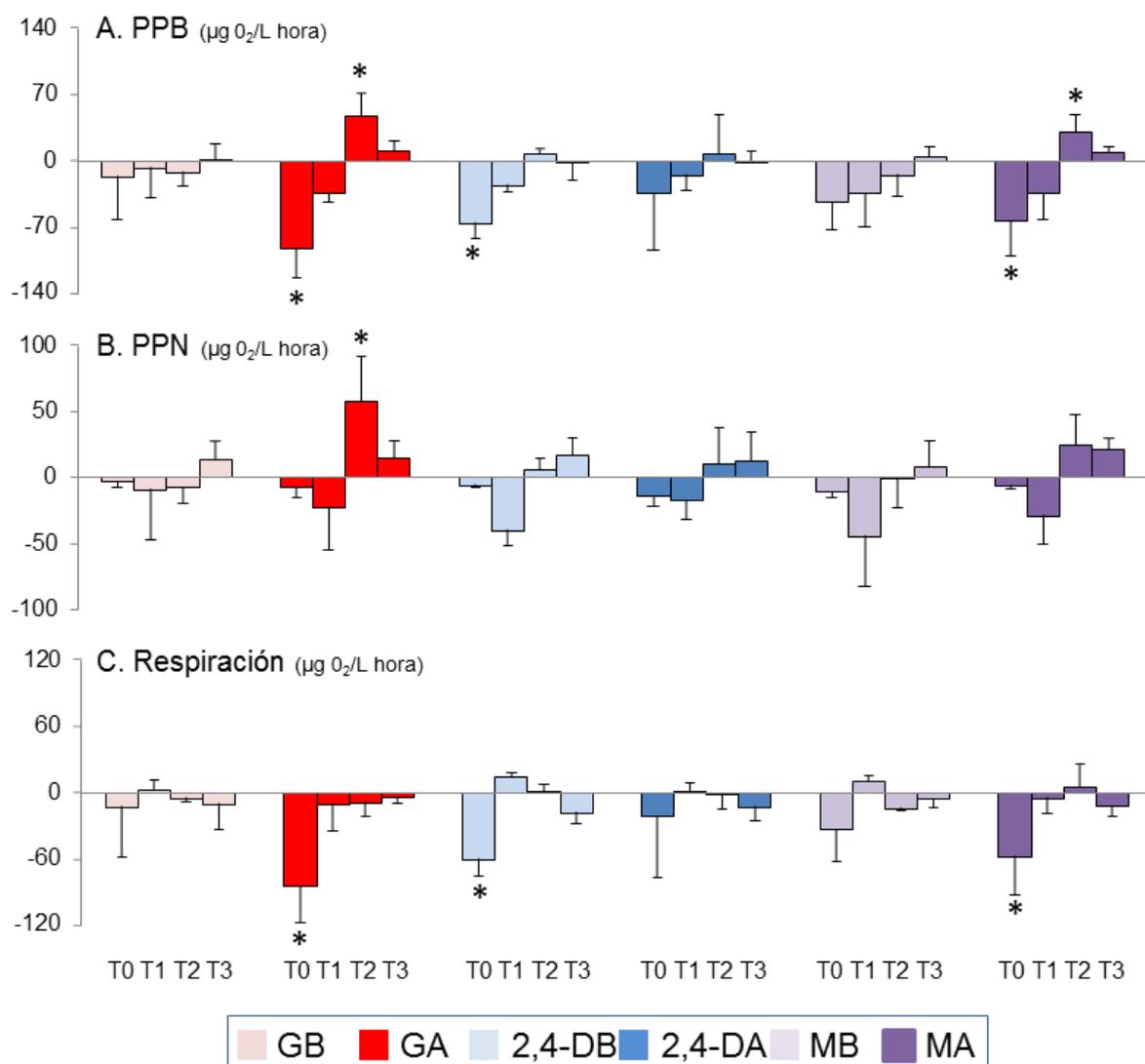


Fig. 10: Variaciones respecto a los controles de la producción primaria bruta (PPB), producción primaria neta (PPN) y respiración (R) en los 4 tiempos (T0, T1, T2 y T3) de los tratamientos de los herbicidas Roundup Max[®] (GB, GA) y AsiMax 50[®] (2,4-DB, 2,4-DA) y sus mezclas (MB, MA). (*= $p < 0,05$).

Al comparar los resultados esperados por aditividad con los resultados observados en los tratamientos de mezcla sobre las variables PPB, PPN y R, se observa que prevaleció la aditividad, con la excepción de PPB a T2 en MA donde se observó antagonismo (*t-student*, $p=0,009$) (Fig. 11)

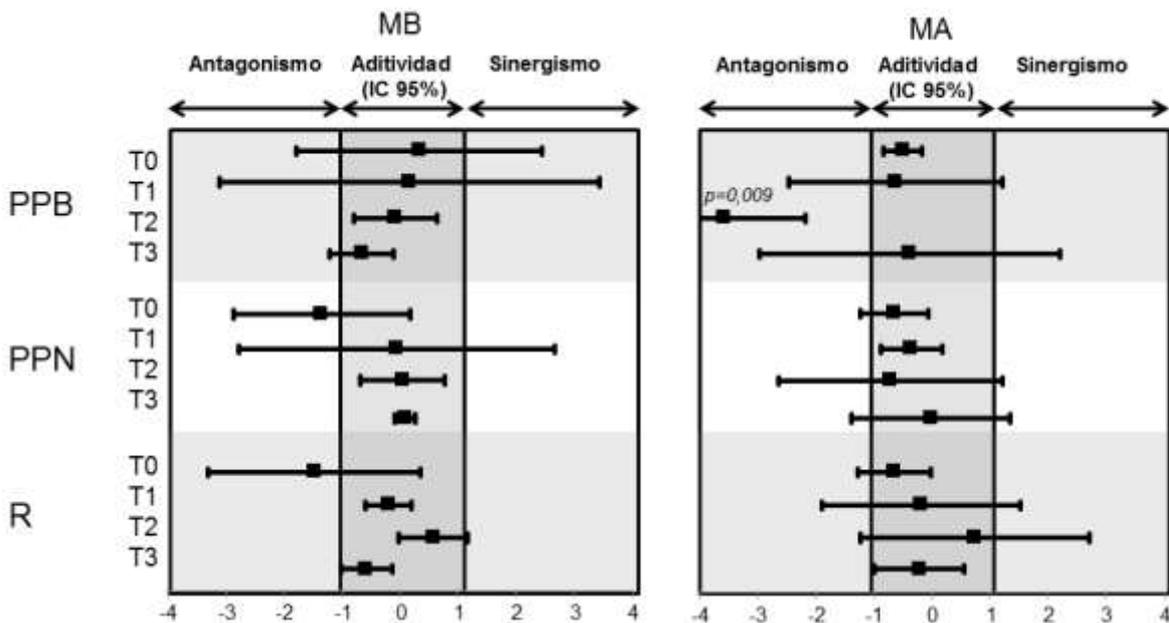


Fig. 11: Estudio del efecto de la mezcla sobre las variables funcionales PPB, PPN y R en los 4 tiempos. En el centro se presentan normalizados los intervalos de confianza (IC 95%) para los valores esperados por aditividad y los intervalos obtenidos, a la izquierda se presenta la zona con efectos de tipo antagónicos y a la derecha los sinérgicos. Los valores de p corresponden al test t -student.

Con el objetivo de estudiar el aporte de las distintas fracciones, se calculó el aporte de la fracción estrictamente heterotrófica analizada (BH) al biovolumen total. El resultado mostró que esta fracción representó el 9,37% del biovolumen, mientras que el resto de las fracciones estudiadas (micro+nano, mixo, Pcy y PEuk) representaron, en conjunto, el 90,63%.

Discusión

Los resultados obtenidos en esta sección mostraron que la adición de los herbicidas provoca impactos funcionales inmediatos (T0, 15 min) que no pueden ser explicados por cambios estructurales. Contrariamente, a los 7 días (T2) los cambios funcionales observados pueden ser el resultado de la modificación observada en la estructura del sistema.

Los efectos observados del Roundup Max[®] en la estructura y función microbiana a T0 solo se detectaron a altas concentraciones (GA, MA), con la PPB y la R reducidas y las abundancias de las BH aumentadas. Goldsborough & Brown

(1988) informaron una disminución en la producción primaria después de 4 horas de exposición del perifiton a 8,9 mg/L (i.a.) de Roundup®. Por otro lado, Shaw (2013) también reportó la disminución simultánea de la PPB y de la R en la comunidad perifítica en presencia de glifosato. Por lo observado en nuestro experimento, estamos reportando por primera vez, una respuesta funcional rápida de los sistemas de agua dulce a un herbicida a base de glifosato en la columna de agua. Dado que no se observaron cambios en las abundancias de las fracciones microbianas estudiadas a ese tiempo, las disminuciones de la PPB y la R a T0 se podrían asociar con respuestas de tipo fisiológicas de los organismos. En este sentido, Lu et al. (2020) mostraron que una sola aplicación de 2,5 mg/L de glifosato en microcosmos en condiciones controladas de laboratorio utilizando agua dulce, no provocó ningún efecto sobre la composición microbiana, pero afectó los niveles de transcripción de la comunidad. El glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos, lo que interfiere con la síntesis normal de proteínas y finalmente conduce a la muerte de los organismos blanco. El impacto a corto plazo sobre la PPB y la R que se observó podría deberse a una reducción en la actividad de las enzimas involucradas en la fotosíntesis y la respiración y/o a una respuesta general producida por estrés de los organismos. El estrés inducido por el glifosato en algas de agua dulce ya fue reportado por Lummatto et al. (2019), que informaron que la adición de 4 mg/L de glifosato (i.a.) de la formulación Glifosato Atanor®, aumenta las especies reactivas de oxígeno así como reduce las actividades de la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión-s-transferasa en *Scenedesmus vacuolatus*. Por lo tanto, las disminuciones de la PPB y de la R podrían atribuirse a un impacto fisiológico general de la fracción autotrófica que condujo a una modificación a corto plazo en el funcionamiento de todo el sistema. Inesperadamente, a T0 se observó un aumento en las abundancias de las BH, lo que podría haber derivado en un aumento de la tasa respiratoria del sistema, lo que no llegó a detectarse. El cálculo del biovolumen aportado por las BH respecto al resto de las fracciones analizadas fue de un 9,37%, por lo que podría esperarse que el aumento de las abundancias de las BH no haya sido suficiente para contrapesar la disminución en la actividad autotrófica y la respiración del resto de las fracciones.

A mediano plazo (T2, 7 días), la presencia del formulado de glifosato aumentó la PPB y la PPN. Esta respuesta podría deberse al hecho de que el glifosato, cuando es metabolizado por los microorganismos presentes en el agua, genera una contribución importante de fósforo, que promueve el crecimiento de las algas. Pérez et al. (2007) observaron el aumento en la producción primaria del fitoplancton a través de la técnica ^{14}C a los 11 días de la adición de Roundup® en mesocosmos al aire libre, fenómeno que se atribuyó al aumento significativo en la abundancia de las picocianobacterias. En este experimento, tanto la abundancia del micro+nano fitoplancton como las PEuk y la concentración de clorofila α aumentaron a T2 acompañando el aumento en la PPB, lo que sugiere un efecto similar al encontrado por Pérez et al. (2007). En el mismo sentido, Pizarro et al. (2016) describieron que las picocianobacterias aumentan su abundancia, tanto en un sistema mesotrófico como en uno eutrófico, luego de la adición de glifosato.

Por otro lado, inmediatamente después de la aplicación del herbicida a base de 2,4-D en su concentración más baja (2,4-DB), se encontró una disminución significativa en la PPB y la R. El aumento simultáneo en la abundancia del micro+nano fitoplancton sugiere que este resultado también se debió a impactos fisiológicos negativos en algunas poblaciones, como lo observado para el glifosato. Además, el tratamiento con la concentración más alta (2,4-DA) provocó el aumento de las BH a T1 y TF y una disminución a T2, sin observarse efecto sobre la respiración. Estos hechos apoyan la idea de que las BH representan una proporción baja de la biomasa microbiana total y, por lo tanto, un aumento en su abundancia produciría cambios no detectables globalmente sobre la respiración del sistema. Algunos estudios han documentado el impacto del 2,4-D en la producción primaria fitoplanctónica, por ejemplo, la producción primaria aumentó en presencia de 2 mg/L de 2,4-D (Kobraei & White, 1996; Boyle, 1980), mientras que disminuyó en presencia de 1,2 mg/L en estanques hipereutróficos (Boyle, 1980). En el Capítulo I de esta tesis se informó de los diferentes impactos estructurales del AsiMax 50® dependiendo de la estructura microbiana inicial, así como de un efecto en hormesis con mayores impactos a bajas concentraciones. Sobre esta base, los efectos funcionales a corto plazo causados por el 2,4-D a baja concentración fueron más pronunciados que los obtenidos a alta

concentración, lo que puede atribuirse al efecto hormonal del herbicida, como se señaló anteriormente (Kobraei & White, 1996).

Respecto al efecto de la mezcla de ambos herbicidas sobre la producción primaria y la respiración de la columna de agua, se observó que actuaron principalmente de manera aditiva. Estos resultados son esperables de acuerdo al modelo de adición de efectos ya que el modo de acción de cada herbicida es completamente diferente (Rodea-Palomares et al. 2015, Groten, 2001). Además, son coincidentes con el resto de resultados encontrados en esta tesis y similar a lo encontrado por Pesce et al. (2010), quienes estudiando el efecto mezcla de herbicidas en el agua dulce y observaron que, ya sea utilizando herbicidas con el mismo o diferentes modos de acción, la aditividad de efectos predominó.

Discusión general del capítulo: la importancia del uso de variables funcionales y estructurales

La evaluación del impacto de los residuos de plaguicidas en los cuerpos de agua es fundamental para la protección del ambiente así como para preservar la capacidad de los ecosistemas de agua dulce de proporcionar bienes y servicios que satisfagan las necesidades humanas. Sandin & Solimini (2009) concluyeron sobre la importancia del estudio de variables estructurales y funcionales en sistemas acuáticos de agua dulce de tipo lótico. En particular, Knauer & Hommen (2012) han discutido la importancia de las variables funcionales, frente a las estructurales, en la evaluación del impacto de los herbicidas en estudios de mesocosmos. En su trabajo afirmaron que las variables funcionales generalmente muestran menos variabilidad experimental entre réplicas que las estructurales, y proporcionan una mejor integración de la función del ecosistema. Diversos trabajos han reportado impactos de herbicidas sobre variables funcionales de los sistemas acuáticos, como la atrazina (DeLorenzo et al. 1999), el glifosato (Pérez et al. 2007), el metazacloro (Mohr et al. 2007), el acetocloro (Foley et al. 2008), etc.

En este capítulo se trabajó sobre el impacto de los formulados comerciales Roundup Max[®] (glifosato), AsiMax 50[®] (2,4-D) y su mezcla, sobre variables funcionales de dos sistemas de agua dulce en estado contrastante. En el caso del

oxígeno disuelto, la mayor parte de las modificaciones a su dinámica han podido ser explicadas como resultado de los cambios en variables asociadas a la estructura, especialmente a las variaciones en las abundancias de la fracción fitoplanctónica. Sin embargo, en el caso de la producción primaria y la respiración, se han observado también variaciones a corto plazo producidas por los herbicidas que podrían estar asociadas a modificaciones fisiológicas de los organismos presentes. Así como se han observado efectos sobre la funcionalidad de los sistemas sin modificación en la estructura en el caso del tiempo inicial, también se han corroborado efectos estructurales que no derivaron en efectos sobre la función, especialmente en relación a las abundancias de las BH. Las modificaciones de la estructura de los sistemas pueden o no implicar cambios de las funciones del ecosistema acuático (Sandin & Solimini, 2009) (Fig. 10), posiblemente como producto de la comunidad afectada, su rol y preponderancia en la función estudiada, en concordancia con lo encontrado con otros herbicidas por Knauer & Hommen (2012). En este caso, es posible que la representación en biomasa de las BH (<10%) no sea lo suficientemente importante como para revertir los impactos producidos por los herbicidas en el sentido inverso sobre la fracción fitoplanctónica, particularmente en el caso de la producción primaria.

Cabe destacar que en los experimentos realizados en esta tesis no se estudiaron otras funciones del ecosistema acuático. Es posible que la modificación de la estructura de las BH observada cause alteraciones en la velocidad de degradación de los herbicidas que fueron ya desarrollados en el Capítulo III, otro tipo de efectos en el reciclado de nutrientes en el sistema acuático (Alongi, 1994). Respecto a las implicancias del efecto inmediato de los herbicidas sobre la producción primaria, si bien los impactos con efectos de tipo fisiológicos pueden o no derivar en modificaciones estructurales persistentes, como por ejemplo modificaciones en las abundancias específicas, en la realidad los cuerpos de agua dulce se encuentran sujetos a pulsos de contaminación por plaguicidas de forma recurrente (Daam et al. 2008). Por tanto, los impactos inmediatos con respuestas de tipo fisiológica no deberían subestimarse, ya que es posible que los efectos negativos de los herbicidas sobre la producción primaria puedan mantenerse en el tiempo debido a la repetición de eventos de contaminación. Cabe destacar también que los cambios estructurales, aún sin modificación en la función, por ejemplo en

la composición taxonómica y/o de las abundancias de las especies presentes en cualquier comunidad pueden acarrear efectos a largo plazo. En este sentido, Castro Berman et al. (2020) han demostrado los efectos producidos por la contaminación con glifosato, a escala regional y a largo plazo, como producto del favorecimiento de algunas especies por sobre otras. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que las variables estructurales solas no pueden predecir de forma completa los efectos funcionales detectados, posiblemente como consecuencia de efectos de tipo fisiológicos o de *stress* de los organismos. Por lo tanto, se concluye que es importante la incorporación de ambos tipos de variables para la predicción de los efectos ambientales que la contaminación con plaguicidas puede provocar en los sistemas acuáticos.



Fig. 10: Esquema de las implicancias del estudio de los efectos de los herbicidas en los sistemas acuáticos trabajados en los dos experimentos en mesocosmos al aire libre sobre variables estructurales (Capítulo III) y funcionales (Capítulo IV). Las líneas punteadas indican incertidumbre en la existencia de la relación entre ambos tipos de impactos.

Resumen del Capítulo IV:

h1: Las herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla modifican la dinámica de saturación del OD de los sistemas.

✓ Aceptada: se observaron modificaciones en la dinámica del oxígeno disuelto para ambos herbicidas y sus mezclas en los dos sistemas estudiados.

h2: Las herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla impactan sobre la producción primaria.

✓ Aceptada: se constató un aumento de la producción primaria provocado por el formulado a base de glifosato en su concentración más alta (T2) ya sea en forma particular o en la mezcla (GA y MA) y efectos negativos para la concentración más baja del formulado a base de 2,4-D (T0).

h3: Los efectos de la mezcla de ambos herbicidas sobre las variables funcionales se comportan de forma aditiva.

✗ Rechazada: si bien la mayor parte de las variables funcionales se comportaron de manera aditiva, un antagonismo fue observado en la PPB a T2 para la MA.

h4: Los efectos estructurales provocados por los herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla se traducen en efectos funcionales de los sistemas.

✓ Aceptada: se observaron efectos en la funcionalidad de los sistemas a través de la modificación de la dinámica del OD y de la producción primaria relacionados a los impactos estructurales observados en el Capítulo III.

h5: Los herbicidas Roundup Max[®], AsiMax 50[®] y su mezcla producen efectos funcionales que no pueden ser explicados por las variables estructurales estudiadas (micro+nano fitoplancton, pico-plancton autotrófico y bacterias heterótrofas).

✓ Aceptada: se detectaron impactos en la producción primaria y la respiración a tiempo inicial del experimento claro que no pudieron ser asociadas a variaciones de las abundancias de las variables estructurales estudiadas.

Conclusiones generales

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue estudiar los impactos en el agua dulce de los principios activos glifosato y 2,4-D, sus productos formulados comerciales, y el efecto combinado de los mismos. Glifosato y 2,4-D son dos de los herbicidas más utilizados en la agricultura industrial en Argentina. Dichos impactos se estudiaron a través del análisis de los cambios en la estructura de las comunidades del bacterioplancton, fitoplancton y perifiton en relación al medio abiótico. Además se analizaron cambios funcionales a través del estudio de la concentración de oxígeno disuelto en el agua y de la producción primaria fitoplanctónica.

Las hipótesis generales contrastadas y los resultados obtenidos fueron:

H1: *El impacto del 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autotrófica en el agua dulce depende de la concentración de herbicida aplicada.*

✓ Aceptada: el formulado comercial de 2,4-D tiene efectos diferentes dependiendo de la concentración testada en microcosmos en condiciones controladas de laboratorio, estimulando a bajas concentraciones el crecimiento fitoplanctónico en el sistema turbio e inhibiendo su crecimiento en el sistema claro y turbio a altas (Capítulo I).

H2: *El impacto del herbicida 2,4-D sobre la estructura de la comunidad microbiana autotrófica depende de la condición inicial de turbidez del sistema.*

✓ Aceptada: el impacto observado en microcosmos en condiciones controladas fue dependiente de la condición inicial del agua utilizada (Capítulo I).

H3: *En escenarios de mezcla de glifosato y 2,4-D (en las proporciones recomendadas por las prácticas agronómicas vigentes en Argentina), el efecto del glifosato es mayor que el del 2,4-D sobre la estructura y el funcionamiento de las comunidades microbianas de agua dulce.*

✗ Rechazada: si bien en el experimento en microcosmos en condiciones controladas utilizando fitoplancton (Capítulo II) y durante el experimento en condición clara en mesocosmos al aire libre (Capítulo III) el mayor efecto en la mezcla correspondió al glifosato, en el experimento utilizando agua en condición

turbio-orgánica el mayor efecto sobre la fracción fitoplanctónica fue causado por el formulado de 2,4-D.

H4: *La mezcla de los herbicidas 2,4-D y glifosato (en las proporciones recomendadas) se comporta siempre de manera aditiva (suma algebraica de efectos independientes) sobre las variables biológicas en el agua dulce.*

 Rechazada: si bien en la mayoría de los casos estudiados se observó aditividad, se detectaron algunos sinergismos y antagonismos en todos los experimentos donde la mezcla fue ensayada

H5: *Los cambios estructurales sobre las comunidades microbianas de agua dulce producto del efecto de los herbicidas glifosato, 2,4-D y su mezcla, provocan cambios en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos.*

 Aceptada: gran parte de los cambios funcionales observados respecto al oxígeno disuelto y la producción primaria son factibles de ser explicados a través de los impactos observados en las variables estructurales.

H6: *Los ensayos en microcosmos y mesocosmos al aire libre brindan información ecotoxicológica diferente.*

Aceptada: se observaron distintos tipos de efectos tanto de los herbicidas por  separado, como en la mezcla, dependiendo del sistema y de la aproximación metodológica utilizada.

La fig. 1 resume los distintos resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

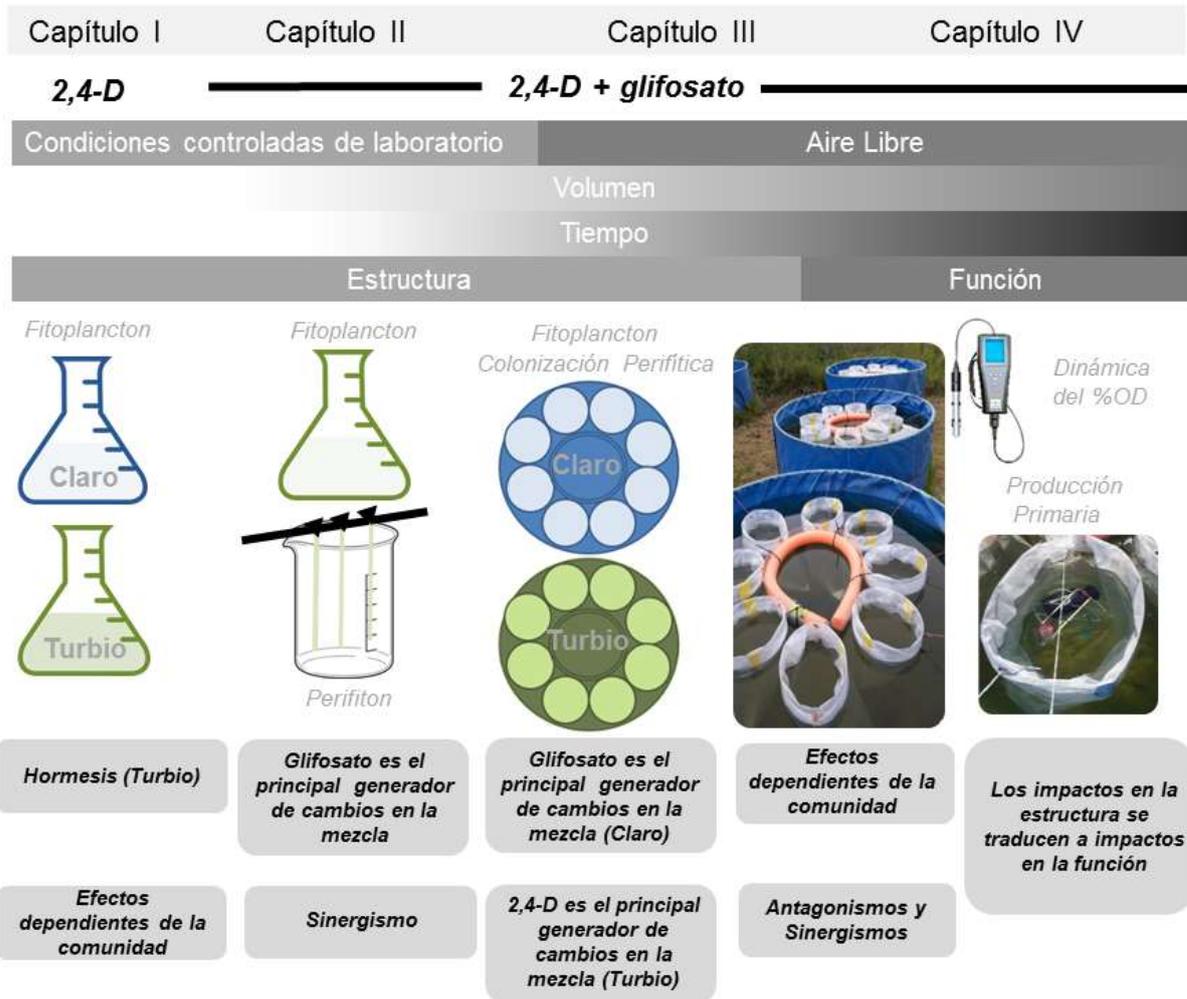


Fig. 1: Resumen de las comunidades, efectos y perspectivas utilizadas a lo largo de esta tesis doctoral y resultados principales (abajo).

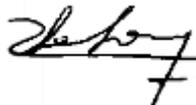
El avance y desarrollo de la agricultura industrial, basada en una fuerte utilización de plaguicidas y fertilizantes, pone en riesgo los sistemas naturales en nuestro país. Los cuerpos de agua insertos en el paisaje agrícola de Argentina poseen funciones clave a la vez que ofrecen servicios ecosistémicos importantes a las sociedades humanas. Las investigaciones sobre los posibles impactos sobre estos sistemas son fundamentales para brindar información que permita lanzar alertas tempranas y para la construcción de políticas de manejo preventivas y/o de mitigación. Esta tesis brinda información específica sobre el glifosato, el 2,4-D y su mezcla, así como brinda herramientas metodológicas haciendo hincapié en una mirada ecosistémica. Los resultados obtenidos deben tomarse como un alerta específico sobre la utilización de mezclas de plaguicidas que pueden tener efectos negativos sinérgicos en los ecosistemas acuáticos.

Conocer las posibles consecuencias ambientales del modelo de producción de alimento vigente, así como el de sus alternativas, permite realizar balances basándose en evidencia científica con el objetivo de mejorar la toma de decisiones en lo que respecta al desarrollo sostenible. Si bien existe un creciente interés en las posibles consecuencias de los plaguicidas sobre la salud, el interés social sobre las implicancias respecto a la salud ambiental y a la protección de los bienes naturales se encuentra en sus primeras etapas. Brindar información basada en evidencia científica respecto al modelo de producción dominante, así como avanzar en la generación de conocimiento respecto de sus alternativas, como la agroecología, es fundamental para el desarrollo de la economía nacional y para la construcción de la seguridad y la soberanía alimentaria. Existen indicios que indican que los sistemas de agua dulce pueden estar siendo afectados como consecuencia de los cambios en el uso del suelo y la expansión del modelo industrial en los sistemas agrícolas (Tilman et al. 2001; Quirós et al. 2006; Scanlon et al. 2007; Pérez et al. 2017). En particular para Argentina, la llanura pampeana ha experimentado un fuerte proceso de intensificación en el uso de la tierra en las últimas décadas (Sánchez et al. 2015). Esta área representa una región agrícola que alberga miles de lagos polimíticos poco profundos, que se elevan a más de 20.000 entre los permanentes y esporádicos (Dangavs et al. 2005). Mientras que el estado prístino de los lagos poco profundos de la región pampeana fue probablemente el de tipo claro vegetado (Quirós et al. 2006), hoy en día la mayoría de los lagos de esta región son eutróficos / hiper-eutróficos (Quirós & Drago, 1999), presentando un estado turbio, estando en áreas con alto impacto antropogénico (Quirós et al. 2002). Se estima que la gran cantidad de lagos poco profundos en estado turbio-algal está relacionada con el impacto de muchas décadas de la agricultura, basada en el uso de agroquímicos en la región (Quirós et al. 2006, Castro Berman et al. 2020). Por lo tanto, el hecho de que los agroquímicos como los fertilizantes y herbicidas que arriben al agua dulce por diferentes medios (accidentalmente, debido a la deriva del viento, o escorrentía superficial) y puedan afectar las propiedades estructurales y funcionales de los sistemas de agua dulce, no debería ser ignorado.

Todos los ecosistemas del planeta se encuentran ante una realidad compleja dada por la multiplicidad de estresores ambientales y de sus posibles interacciones. Si bien el estudio de las mezclas binarias es sólo un ejemplo de

todas las combinaciones posibles, su análisis aporta herramientas básicas para los desafíos en materia ambiental que urge abordar. La ecología es la ciencia que aborda la complejidad dada por las interacciones, así como por la posibilidad de eventos azarosos en el mundo natural. Algunos trabajos, enmarcados dentro de la “ecotoxicología” presentan ciertos esquemas de estudio, como el de las concentraciones letales 50, que si bien aportan valiosa información, no pueden abordar la complejidad de los sistemas naturales compuestos por cientos de especies con distintas sensibilidades y relaciones interespecíficas. Del encuentro de la teoría ecológica con la toxicología nace la ecotoxicología que busca estudiar la problemática desde una perspectiva sistémica. Esta tesis buscó cruzar la frontera entre ambas, con fuerte basamento en la limnología, para aportar conocimiento específico y herramientas que permitan una mejor protección de nuestros ecosistemas acuáticos.

A nivel mundial existen enormes desafíos respecto a las medidas urgentes que se necesitan tomar para preservar los ambientes para las generaciones futuras y garantizar el desarrollo. Dentro de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible de Naciones Unidas se promueve garantizar la disponibilidad y gestión sostenible del agua, así como la transformación del modelo de producción de alimentos hacia otro modelo de agricultura. Garantizar la seguridad y la soberanía alimentaria preservando los bienes naturales es sin dudas el mayor desafío que tenemos en el contexto de cambio climático irreversible en el que nos encontramos. Esta tesis brinda información fundamental que nos permite conocer las consecuencias que la agricultura industrial y la utilización masiva de plaguicidas producen. Brindar estas herramientas es fundamental para la toma de decisiones y el abordaje integral de los desafíos que en materia ambiental, social y económica afrontamos como humanidad.



Lic. Verónica Laura Lozano



Dra. Haydée N. Pizarro



Dr. Marcelo J. Wolansky

Referencias

- Aapresid (2018). Evolución de siembra directa en Argentina Campaña 2016-2017.
- Aguayo, P., González, C., Barra, R., Becerra, J., & Martínez, M. (2014). Herbicides induce change in metabolic and genetic diversity of bacterial community from a cold oligotrophic lake. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 1101-1110.
- Alapin, H. (2008). Rastrojos y algo más: Historia de la siembra directa en Argentina. Teseo.
- Allende, L., Tell, G., Zagarese, H., Torremorell, A., Pérez, G., Bustingorry, J., Escaray, R., Izaguirre, I. (2009). Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia*. 624(1), 45-60.
- Alongi, D. M. (1994). The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. In *Ecology and conservation of southeast Asian marine and freshwater environments including wetlands* (pp. 19-32). Springer, Dordrecht.
- Andersson, A., Falk, S., Samuelsson, G., & Hagström, Å. 1989. Nutritional characteristics of a mixotrophic nanoflagellate, *Ochromonas* sp. *Microbial Ecology*, 17(3), 251-262.
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34: 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(9), 1866-1873.
- Apha, A. W. W. A. (2005). *Standard Methods For Examination of Water And Wastewater*, 21th. Ed. New York: APHA, AWWA, WPCR, 1.
- Azim, M. E., Asaeda, T. (2005). Periphyton structure, diversity and colonization. In: Azim, M.E. et al (Eds.): *Periphyton: ecology, exploitation and management*. CABI Publ. Oxfordshire, Cambridge. 15-34.
- Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., ... & Hallas, L. (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. *Current topics in plant physiology (USA)*.
- Bishopp, F. C. (1945). Insect problems in world war II with special references to the insecticide ddt. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 35(4), 373-378.
- Bonilla, S., Conde, D., Blanck, H., (1998). The photosynthetic responses of marine phytoplankton, periphyton and epipsammon to the herbicides paraquat and simazine. *Ecotoxicology*, 7(2), 99-105.
- Bonny, S. (2016). Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact. *Environmental management*, 57(1), 31-48.
- Boyle, T.P. (1980). Effects of the aquatic herbicide 2,4-D DMA on the ecology of experimental ponds. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 21-1 (35-49).
- Caquet, T., Lagadic, L., & Sheffield, S. R. (2000). Mesocosms in ecotoxicology (1): Outdoor aquatic systems. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 1-38). Springer, New York, NY.
- Card, M. L., Gomez-Alvarez, V., Lee, W. H., Lynch, D. G., Orentas, N. S., Lee, M. T., ... & Boethling, R. S. (2017). History of EPI Suite™ and future perspectives on chemical property estimation in US Toxic Substances Control Act new chemical risk assessments. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 19(3), 203-212.
- Carson, R. (1963). *Silent Spring*. Silent Spring.

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

Charles, J. M., Cunny, H. C., Wilson, R. D., & Bus, J. S. (1996). Comparative subchronic studies on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, amine, and ester in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 33(2), 161-165.

Cohen, S., & Morgan, G. (2008). Monsanto Technology LLC v. Cargill: a matter of construction. *Nature biotechnology*, 26(3), 289.

Couderchet, M., & Vernet, G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 55(3), 271-277.

Crane, M. (1997). Research needs for predictive multispecies tests in aquatic toxicology. *Hydrobiologia*, 346(1-3), 149-154.

Crossland, N. O., & Wolff, C. J. M. (1988). Outdoor ponds: Their construction, management, and use in experimental ecotoxicology. In *Reactions and Processes* (pp. 51-69). Springer, Berlin, Heidelberg.

Cuhra, M., Traavik, T., & Bøhn, T. (2013). Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(2), 251-262.

Daam, M. A., Van den Brink, P. J., & Nogueira, A. J. (2008). Impact of single and repeated applications of the insecticide chlorpyrifos on tropical freshwater plankton communities. *Ecotoxicology*, 17(8), 756-771.

Dangavs, N. V. (2005). Los ambientes acuáticos de la provincia de Buenos Aires. *Relatorio del XVI Congreso Geológico Argentino*.

Davis, J. C. (1975). Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32(12), 2295-2332.

de Framond, A. J., Barton, K. A., & Chilton, M. D. (1983). Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. *Bio/technology*, 1(3), 262.

Defarge, N., Takács, E., Lozano, V. L., Mesnage, R., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G. E., & Székács, A. (2016). Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International journal of environmental research and public health*, 13(3), 264.

DeLorenzo, M. E., Lauth, J., Pennington, P. L., Scott, G. I., & Ross, P. E. (1999). Atrazine effects on the microbial food web in tidal creek mesocosms. *Aquatic Toxicology*, 46(3-4), 241-251.

Dill, G. M., Sammons, R. D., Feng, P. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., ... & Hauptfear, E. A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*, 1-33.

Donadío de Gandolfi, M. C., García, S. I., Ghera, C. M., Haas, A. I., Larripa, I., Marra, C. A., & Ricca, A. (2016). Evaluación de la Información Científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Consejo Nacional De Investigaciones Científicas Y Técnicas.. Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos. Julio, 2009. Eds. Buenos Aires. Autor.

Dukatz, F., Ferrari, R., & Canziani, G. (2006). Evaluación de sistemas lacunares bonaerenses mediante imágenes Landsat TM. *Biol Acuát*, 22, 95-101.

EPA (2005). Reregistration Eligibility Decision (RED) 2,4-D; EPA 738-R-05-002; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC.

EPA (2017). Registration of Enlist Duo | US EPA. [online] Available at: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/registration-enlist-duo>.

EPA, (1980). Onsite Wastewater Treatment and Disposal Systems. USEPA, Oct.

EPA, U. (2010). Estimation Program Interface (EPI) Suite.

Fairchild, J. F., La Point, T. W., & Schwartz, T. R. (1994). Effects of an herbicide and insecticide mixture in aquatic mesocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(4), 527-533.

FAOSTAT, F. A. O. (2019). Statistical databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L. H. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*. 56(1), 13-32.

Fleeger, J. W., Carman, K. R., & Nisbet, R. M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the total environment*, 317(1-3), 207-233.

Flemming, H. C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.

Foley, M. E., Sigler, V., & Gruden, C. L. (2008). A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *The ISME journal*, 2(1), 56-66.

Forlani, G., Pavan, M., Gramek, M., Kafarski, P., & Lipok, J. (2008). Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant and cell physiology*, 49(3), 443-456.

Foster, J. B., & Magdoff, F. (1998). Liebig, Marx, and the depletion of soil fertility: Relevance for today's agriculture. *Monthly Review*, 50(3), 32.

Gasol, J. M., & Del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64(2), 197-224.

Gasol, J. M., Zweifel, U. L., Peters, F., Fuhrman, J. A., & Hagström, Å. (1999). Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10), 4475-4483.

Gattás, F., Vinocur, A., Graziano, M., Dos Santos Afonso, M., Pizarro, H., & Cataldo, D. (2016). Differential impact of *Limnoperna fortunei*-herbicide interaction between Roundup Max® and glyphosate on freshwater microscopic communities. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18869-18882.

Gattás, F., De Stefano, L. G., Vinocur, A., Bordet, F., Espinosa, M. S., Pizarro, H., & Cataldo, D. (2018). Impact of interaction between *Limnoperna fortunei* and Roundup Max® on freshwater phytoplankton: An in situ approach in Salto Grande reservoir (Argentina). *Chemosphere*, 209, 748-757.

Geyer, R.L., Smith, G.R., Retting, J.E. (2016). Effects of Roundup formulations, nutrient addition, and Western mosquitofish (*Gambusia affinis*) on aquatic communities. *Environ Sci Pollut Res Int*.

Ghilarov, A. M. (2000). Ecosystem functioning and intrinsic value of biodiversity. *Oikos*, 90(2), 408-412.

Goldsborough, L. G., & Brown, D. J. (1988). Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 41(2), 253-260.

Groten, J. P., Feron, V. J., & Sühnel, J. (2001). Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in pharmacological sciences*, 22(6), 316-322.

Grover, R., Maybank, J., & Yoshida, K. (1972). Droplet and vapor drift from butyl ester and dimethylamine salt of 2, 4-D. *Weed Science*, 20(4), 320-324.

Harris, T. D., & Smith, V. H. (2016). Do persistent organic pollutants stimulate cyanobacterial blooms?. *Inland Waters*, 6(2), 124-130.

Havens, K. E. (1994). Structural and functional responses of a freshwater plankton community to acute copper stress. *Environmental pollution*, 86(3), 259-266.

Havens, K. E. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs* (pp. 733-747). Springer, New York, NY.

Havens, K. E., East, T. L., Rodusky, A. J., & Sharfstein, B. (1999). Littoral periphyton responses to nitrogen and phosphorus: an experimental study in a subtropical lake. *Aquatic Botany*, 63(3-4), 267-290.

Heinonen-Tanski, H. (1989). The effect of temperature and liming on the degradation of glyphosate in two arctic forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(2), 313-317.

Hernández, A. F., Gil, F., & Lacasaña, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Archives of toxicology*, 91(10), 3211-3223.

Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, 35(2), 403-424.

Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., & Jochimsen, B. (2014). Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 78(1), 176-197.

Huaraca, L. F., Chamorro, S. A., Hernández, V., Bay-Schmith, E., & Villamar, C. A. (2020). Comparative acute toxicity of glyphosate-based herbicide (GBH) to *Daphnia magna*, *Tisbe longicornis*, and *Emerita analoga*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 1-9.

Ilikchyan, I. N., McKay, R. M. L., Zehr, J. P., Dyhrman, S. T., & Bullerjahn, G. S. (2009). Detection and expression of the phosphonate transporter gene *phnD* in marine and freshwater picocyanobacteria. *Environmental microbiology*, 11(5), 1314-1324.

Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S., Xu, L., Zhu, J., ... & Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment international*, 111, 332-351.

Iummato, M. M., Fassiano, A., Graziano, M., dos Santos Afonso, M., de Molina, M. D. C. R., & Juárez, Á. B. (2019). Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 172, 471-479.

Kennedy, J. H., Ammann, L. P., Waller, W. T., Warren, J. E., Hosmer, A. J., Cairns, S. H., ... & Graney, R. L. (1999). Using statistical power to optimize sensitivity of analysis of variance designs for microcosms and mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(2), 113-117.

Kerle, E. A., Jenkins, J. J., & Vogue, P. A. (1994). Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection.

- Khush, G. S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature reviews genetics*, 2(10), 815.
- King, R. S., Brain, R. A., Back, J. A., Becker, C., Wright, M. V., Toteu Djomte, V., ... & Chambliss, C. K. (2016). Effects of pulsed atrazine exposures on autotrophic community structure, biomass, and production in field-based stream mesocosms. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(3), 660-675.
- Klimant, I., Meyer, V., & Köhl, M. (1995). Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology. *Limnology and Oceanography*, 40(6), 1159-1165.
- Knauer, S., Dawo, U., Hollender, J., Hommen, U., & Knauer, K. (2009). Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(4), 836-845.
- Knauer, S., Escher, B., Singer, H., Hollender, J., & Knauer, K. (2008). Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environmental science & technology*, 42(17), 6424-6430.
- Kobraei, M.E., White, D.S. (1996). Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on Kentucky algae: simultaneous laboratory and field toxicity testings. *Arch Environ Contam Toxicol*. 31(4):571-80.
- Lakatos, G. (1989). Composition of reed periphyton (biotecton) in the Hungarian part of lake Fertő. *BFB-Bericht*, 71, 125-134.
- Lalli C.M. (1990). *Enclosed Experimental Marine Ecosystems: A Review and Recommendations*.
- Lampert, W., & Sommer, U. (2007). *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*. Oxford university press.
- Lau, S., Shao, N., Bock, R., Jürgens, G., & De Smet, I. (2009). Auxin signaling in algal lineages: fact or myth?. *Trends in plant science*, 14(4), 182-188.
- Liboriussen, L., & Jeppesen, E. (2003). Temporal dynamics in epipelagic, pelagic and epiphytic algal production in a clear and a turbid shallow lake. *Freshwater Biology*, 48(3), 418-431.
- Lilchtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11 (5),591–592.
- Lipok J., Studnik H., Guyaert S. (2010). The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 1681-1688.
- Lowe, R. L., & Pan, Y. (1996). *Algal ecology. Benthic algal communities as biological monitors*. Academic Press, 705-739.
- Lozano, V. L., Miranda, C. E., Vinocur, A. L., González, C., Unrein, F., Wolansky, M. J., & Pizarro, H. N. (2019). Turbidity matters: differential effect of a 2, 4-D formulation on the structure of microbial communities from clear and turbid freshwater systems. *Heliyon*, 5(8), e02221.
- Lozano, V. L., Vinocur, A., Sabio y García, C.A., Allende, L., Cristos, D. S., Rojas, D., Wolansky, M. J. & Pizarro, H. N. (2018). Effects of glyphosate and 2, 4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1010-1019.

Lu, T., Xu, N., Zhang, Q., Zhang, Z., Debognies, A., Zhou, Z., ... & Qian, H. (2020). Understanding the influence of glyphosate on the structure and function of freshwater microbial community in a microcosm. *Environmental Pollution*, 260, 114012.

Magbanua, F. S., Townsend, C. R., Hageman, K. J., Lange, K., Lear, G., Lewis, G. D., Matthaei, C. D. (2013). Understanding the combined influence of fine sediment and glyphosate herbicide on stream periphyton communities. *Water research*, 47(14), 5110-5120.

Magurran, A. E. (2013). *Measuring biological diversity*. John Wiley & Sons.

Mansano, A. S., Moreira, R. A., Pierozzi, M., Oliveira, T. M., Vieira, E. M., Rocha, O., & Regali-Selegim, M. H. (2016). Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. *Environmental pollution*, 213, 160-172.

Margalef, R. (1967). The food web in the pelagic environment. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 15(1), 548.

Mazoyer, M., & Roudart, L. (2007). *A history of world agriculture: from the neolithic age to the current crisis*. Routledge.

McCann, K. S. (2000). The diversity–stability debate. *Nature*, 405(6783), 228-233.

McCormick, P. V., & O'Dell, M. B. (1996). Quantifying periphyton responses to phosphorus in the Florida Everglades: a synoptic-experimental approach. *Journal of the North American Benthological Society*, 15(4), 450-468.

McQueen, D. J., Johannes, M. R., Post, J. R., Stewart, T. J., & Lean, D. R. (1989). Bottom-up and top-down impacts on freshwater pelagic community structure. *Ecological Monographs*, 59(3), 289-309.

Mensah, P. K., Palmer, C. G., Muller, W. J. (2013). Derivation of South African water quality guidelines for Roundup® using species sensitivity distribution. *Ecotoxicology and environmental safety*, 96, 24-31.

Mesnage, R., & Antoniou, M. N. (2018). Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Frontiers in public health*, 5, 361..

Mesnage, R., Bernay, B., & Séralini, G. E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2-3), 122-128.

Millennium Ecosystem Assessment, M. E. A. (2005). *Ecosystems and human well-being. Synthesis*.

Mohr, S., Berghahn, R., Feibicke, M., Meinecke, S., Ottenströer, T., Schmiedling, I., ... & Schmidt, R. (2007). Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. *Aquatic toxicology*, 82(2), 73-84.

Monosson, E. (2004). Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment. *Environmental health perspectives*, 113(4), 383-390.

Mullin, C. A., Fine, J. D., Reynolds, R. D., & Frazier, M. T. (2016). Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. *Frontiers in public health*, 4, 92.

Naeem S., Loreau M. & Inchausti P. (2002) Biodiversity and ecosystem functioning: the emergence of a synthetic ecological framework. In: *Biodiversity & Ecosystem Functioning – Synthesis and Perspectives* (Eds M. Loreau, S. Naeem & P. Inchausti), pp. 3–11. Oxford University Press, Oxford, U.K.

Nalewajko, C. (1966). Dry weight, ash, and volume data for some freshwater planktonic algae. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 23(8), 1285-1288.

- Ngowi, A. V. F., Mbise, T. J., Ijani, A. S. M., London, L., & Ajayi, O. C. (2007). Smallholder vegetable farmers in Northern Tanzania: Pesticides use practices, perceptions, cost and health effects. *Crop Protection*, 26(11), 1617-1624.
- Nweke, C. O., & Ogbonna, C. J. (2017). Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 12(1), 39-55.
- O'Farrell, I., Motta, C., Forastier, M., Polla, W., Otaño, S., Meichtry, N., ... & Lombardo, R. (2019). Ecological meta-analysis of bloom-forming planktonic Cyanobacteria in Argentina. *Harmful Algae*, 83, 1-13.
- Oliver, T. H., Heard, M. S., Isaac, N. J., Roy, D. B., Procter, D., Eigenbrod, F., Freckleton, R., Hector, A., Orme D.L., Petchey O.L., Proença, V., Raffaelli D. (2015). Biodiversity and resilience of ecosystem functions. *Trends in Ecology & Evolution*. 30(11), 673-684.
- Olson, R. J., Zettler, E. R., & Anderson, O. K. (1989). Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 10(5), 636-643.
- Pålsson, C., & Granéli, W. 2004. Nutrient limitation of autotrophic and mixotrophic phytoplankton in a temperate and tropical humic lake gradient. *Journal of Plankton Research*, 26(9), 1005-1014.
- Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Gonçalves, A. M., Gonçalves, F., & Pereira, R. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, 18(4), 455-463.
- Pérez, D. J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M. L., Aparicio, V. C., Costa, J. L. (2017). Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- 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). Effect of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*. 17(8), 2310-2322.
- 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.
- Pesce, S., Lissalde, S., Lavieille, D., Margoum, C., Mazzella, N., Roubex, V., & Montuelle, B. (2010). Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquatic toxicology*, 99(4), 492-499.
- Peterson, B. J. (1980). Aquatic primary productivity and the ¹⁴C-CO₂ method: a history of the productivity problem. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11(1), 359-385.
- Pinheiro, J. C., & Bates, D. M. (2000). Linear mixed-effects models: basic concepts and examples. *Mixed-effects models in S and S-Plus*, 3-56.
- Pizarro, H., Vera, M. S., Vinocur, A., Pérez, G., Ferraro, M., Helman, R. M., dos Santos Afonso, M. (2016). Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(6), 5143-5153.

Pórfido, O. D., Butler, E., de Titto, E., Issaly, P., Benítez, R. (2014). Los plaguicidas en la República Argentina. Ministerio de Salud, Departamento de Salud Ambiental, Serie Temas de Salud Ambiental, (14), 193.

Porter, K. G. (1996). Integrating the microbial loop and the classic food chain into a realistic planktonic food web. In *Food Webs* (pp. 51-59). Springer, Boston, MA.

Postel, S., & Carpenter, S. (1997). Freshwater ecosystem services. *Nature's Services: societal dependence on natural ecosystems*, 195-214.

Pouličková, A., Hašler, P., Lysáková, M., & Spears, B. (2008). The ecology of freshwater epipelagic algae: an update. *Phycologia*, 47(5), 437-450.

Powell, H. A., Kerby, N. W., & Rowell, P. (1991). Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytologist*, 119(3), 421-426.

Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual review of plant biology*, 61, 317-347.

Prairie, Y. T., & del Giorgio, P. A. (2013). A new pathway of freshwater methane emissions and the putative importance of microbubbles. *Inland Waters*, 3(3), 311-320.

Primost, J. E., Marino, D. J., Aparicio, V. C., Costa, J. L., & Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environmental Pollution*, 229, 771-779.

Qiu, H., Geng, J., Ren, H., Xia, X., Wang, X., & Yu, Y. (2013). Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation. *Journal of hazardous materials*, 248, 172-176.

Quirós, R., Boveri, M. B., Petracchi, C. A., Rennella, A. M., Rosso, J. J., Sosnovsky, A., Von Bernard, H. (2006). The effects of the pampa wetlands agriculturization on shallow lakes eutrophication. *Eutrofização a América do Sul: Causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle*. Instituto Internacional de Ecología, 1-16.

Quirós, R., Drago, E. (1999). The environmental state of Argentinean lakes: an overview. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*. 4, 55-64.

Quirós, R., Renella, A. M., Boveri, M. B. Rosso, J., Sosnovsky, A. (2002). Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12, 175-185.

Relyea, R. A. (2009). A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159(2), 363-376.

Relyea, R., & Hoverman, J. (2006). Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*, 9(10), 1157-1171.

Richards, T. A., Dacks, J. B., Campbell, S. A., Blanchard, J. L., Foster, P. G., McLeod, R., Roberts, C. W. (2006). Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements. *Eukaryotic Cell*, 5(9), 1517-1531.

Rodea-Palomares, I., González-Pleiter, M., Martín-Betancor, K., Rosal, R., & Fernández-Piñas, F. (2015). Additivity and interactions in ecotoxicity of pollutant mixtures: some patterns, conclusions, and open questions. *Toxics*, 3(4), 342-369.

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

Sánchez, M.L., Lagomarsino, L., Allende, L., Izaguirre I. (2015). Changes in the phytoplankton structure in a Pampean shallow lake in the transition from a clear to a turbid regime. *Hydrobiologia* 752, 65-76.

Sandin, L., & Solimini, A. G. (2009). Freshwater ecosystem structure–function relationships: from theory to application. *Freshwater Biology*, 54(10), 2017-2024.

Sasal, M. C., Wilson, M. G., Sione, S. M., Beghetto, S. M., Gabioud, E. A., Oszust, J. D., Paravani, E.V., Demonte, L., Repetti, M.R., Bedendo, D.J., Medero, S. L., Goette, J.J., Pautasso, N., Schulz, G.A. (2017). Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La investigación acción participativa como metodología de abordaje. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 43(2), 195-205.

Saxton, M. A., Morrow, E. A., Bourbonniere, R. A., Wilhelm, S. W. (2011). Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*. 37(4), 683-690.

Scanlon, B. R., Jolly, I., Sophocleous, M., Zhang, L. (2007). Global impacts of conversions from natural to agricultural ecosystems on water resources: Quantity versus quality. *Water Resources Research*. 43(3), W03437.

Scheffer, M., Hosper, S. H., Meijer, M. L., Moss, B. Jeppesen E. (1993). Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 275-279.

Schulz, B., & Segobye, K. (2016). 2, 4-D transport and herbicide resistance in weeds. *Journal of experimental botany*, 67(11), 3177-3179.

Secretaría de Agroindustria (2019)
<https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/biotecnologia/conabia/>

Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J. C., Bérard, A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40(2), 198-208.

Seifertová, D., Skůpa, P., Rychtář, J., Laňková, M., Pařezová, M., Dobrev, P. I., ... & Zažímalová, E. (2014). Characterization of transmembrane auxin transport in *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Journal of plant physiology*, 171(6), 429-437.

SENASA, 2017. Importación de Fitoterapicos 2013, 2014, 2015, data on website.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.

Shaw, D. R., & Arnold, J. C. (2002). Weed control from herbicide combinations with glyphosate. *Weed Technology*, 16(1), 1-6.

Shaw, L. (2013). 2, 4-D and Glyphosate affect aquatic biofilm accrual, gross primary production, and community respiration.

Shushkova, T., Ermakova, I., & Leontievsky, A. (2010). Glyphosate bioavailability in soil. *Biodegradation*, 21(3), 403-410.

Singh, B. K., & Shaner, D. L. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology*, 12(3), 527-530.

Singh, P. K., Shrivastava, A. K. (2016). Role of initial cell density of algal bioassay of toxic chemicals. *Journal of basic microbiology*, 56(7), 812-819.

Smith, V. H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(2), 126-139.

Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. *Journal of integrative plant biology*, 56(2), 106-113.

Souza, M. L. D., & Ferragut, C. (2012). Influence of substratum surface roughness on periphytic algal community structure in a shallow tropical reservoir. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 24(4), 397-407.

Stanier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual review of microbiology*, 31(1), 225-274.

Sun, K., Liu, W., Liu, L., Wang, N., & Duan, S. (2013). Ecological risks assessment of organophosphorus pesticides on bloom of *Microcystis wesenbergii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 98-105.

Sun, M., Li, H., & Jaisi, D. P. (2019). Degradation of glyphosate and bioavailability of phosphorus derived from glyphosate in a soil-water system. *Water research*, 163, 114840.

Sura, S., Waiser, M., Tumber, V., Lawrence, J. R., Cessna, A. J., Glozier, N. (2012). Effects of glyphosate and two herbicide mixtures on microbial communities in prairie wetland ecosystems: a mesocosm approach. *Journal of environmental quality*, 41(3), 732-743.

Szekacs, A., & Darvas, B. (2012). Forty years with glyphosate. *Herbicides-properties, synthesis and control of weeds*, 247-284.

Thompson, H. M. (1996). Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology*, 5(2), 59-81.

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

Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., Fernie, A. R. (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in plant science*, 4.

Troyer, J. R. (2001). In the beginning: the multiple discovery of the first hormone herbicides. *Weed Science*, 49(2), 290-297.

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

Tucker, C. S., & D'Abramo, L. R. (2008). Managing high pH in freshwater ponds. Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center.

Tzin, V., & Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 8.

Utermöhl, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt IntVerLimnol* 9:1-38.

Vara, A. M. (2004). Transgénicos en Argentina: más allá del boom de la soja. *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad-CTS*, 1(3), 101-129.

Vats, S. (2015). Herbicides: history, classification and genetic manipulation of plants for herbicide resistance. In *Sustainable Agriculture Reviews* (pp. 153-192). Springer, Cham.

Vencill, W. K. (2002). *Herbicide Handbook* (No. Ed. 8). Weed Science Society of America.

Venrick, E. L. (1978). Systematic sampling in a planktonic ecosystem. *Fishery Bulletin*, 76(3), 617-627.

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.