



UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN



UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN

1949-2019  
70 AÑOS DE  
GRATUIDAD  
UNIVERSITARIA

I N T E C H

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

---

# EFFECTO DE LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS BASADAS EN EL HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE AGUAS CONTINENTALES

**Manuel Castro Berman**

Director: Dr. Horacio Zagarese - Codirector: Dr. Fernando Unrein

---

LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA - INSTITUTO TECNOLÓGICO  
CHASCOMÚS (INTECH) - UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

**Chascomús, 2019**

## **Efecto de las prácticas agrícolas basadas en el herbicida glifosato sobre la comunidad microbiana de aguas continentales**

---

### ***RESUMEN***

Las lagunas del pastizal pampeano, son cuerpos de agua continentales que poseen una alta biodiversidad, brindan numerosos servicios ecosistémicos como los ciclos biogeoquímicos y el reciclado de nutrientes, también, son un valorado recurso para las economías locales y regionales. Su escasa profundidad las hace muy susceptibles a los disturbios y a los estresores naturales (vientos, sequías, inundaciones) y antrópicos (eutrofización cultural). Con la intensificación del sistema productivo agrícola en la región pampeana, las lagunas se han visto particularmente afectadas, sobre todo, por la contaminación por pesticidas y fertilizantes químicos utilizados en los agroecosistemas circundantes. Entre los pesticidas, el glifosato, es el herbicida más utilizado en Argentina y el mundo. Por otro lado, es esperable que los organismos que habitan estos ecosistemas acuáticos puedan verse afectados por el ingreso de este (y otros) químicos a su hábitat. Por ejemplo, se ha observado que el agregado experimental de glifosato promueve el crecimiento de pequeñas cianobacterias (picocianobacterias), las cuales no solo son tolerantes al herbicida, sino que también poseen la capacidad de utilizarlo como una novedosa fuente de nutrientes. El objetivo general de esta tesis es relacionar la abundancia y composición de las picocianobacterias de lagos someros eutróficos con la utilización del herbicida N-fosfometilglicina (glifosato) en los agroecosistemas circundantes. En el *primer capítulo* se detalló el marco teórico y los aspectos generales del área de estudio, las lagunas y las comunidades biológicas que las habitan. En el *segundo capítulo* se evaluó la presencia de glifosato y su principal metabolito ambiental (AMPA) en las lagunas de

la región pampeana y patagónica. En el *tercer capítulo* se evaluó la distribución espacial y temporal del glifosato y el AMPA en lagunas pertenecientes a la cuenca alta y baja del Río Salado en la provincia de Buenos Aires. En el *cuarto capítulo*, se evaluó el impacto que el glifosato tiene sobre la abundancia de picocianobacterias y bacterias heterótrofas. Finalmente, en el *quinto capítulo* se evaluó el efecto del glifosato sobre la diversidad de la comunidad de picocianobacterias.

Palabras Clave: GLIFOSATO - AMPA - PICOCIANOBACTERIAS - COMUNIDAD MICROBIANA - LAGUNAS - PAMPA - PATAGONIA - ARGENTINA.

## **Effect of agricultural practices based on the herbicide glyphosate on the microbial community of inland waters**

---

### ***ABSTRACT***

Shallow lakes from the Pampa plains are inland water bodies that contribute significantly to biodiversity, provide numerous ecosystem services (i.e., biogeochemical cycles, nutrient recycling) and are also a valuable economic resource. However, their shallow depth makes them susceptible to disturbances and stress, both natural and anthropic. With the intensification of agriculture in the Pampa region, shallow lakes have been polluted with pesticides and chemical fertilizers used in the surrounding agricultural systems. Among these pesticides, glyphosate is the most widely used, both in Argentina and worldwide. On the other hand, the organisms that inhabit those environments could be particularly affected by the inputs of this (and others) pollutants. However, there are several reports from experimental studies in micro- and mesocosms that showed that glyphosate inputs promoted the growth of small size cyanobacteria (picocyanobacteria) abundances, which are not only resistant to the herbicide, but can also use it as a source of phosphorus. The general objective of this thesis is to relate the abundance and composition of the picocyanobacteria of shallow lakes with the use of the herbicide N-phosphonomethylglycine (glyphosate) in the surrounding terrestrial ecosystems. In the first chapter, it is we detailed the theoretical framework and the general aspects of the study area, shallow lakes and the biological communities that inhabit these water bodies. In the second chapter we evaluated the presence of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the study area (Pampa and Patagonia). In the third chapter we evaluated the spatial and temporal distribution of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the upper and lower basins of the Rio Salado. In the fourth chapter, we evaluated the effect that

glyphosate and its associated variables (degradation genes, land use and land cover) have on the abundance of picocyanobacteria and heterotrophic bacteria. In the fifth chapter we evaluated the effect that glyphosate has on the molecular diversity of picocyanobacteria communities.

Keywords: GLYPHOSATE - AMPA - PICOCYANOBACTERIA - MICROBIAL COMMUNITY -  
SHALLOW LAKES - PAMPA - PATAGONIA - ARGENTINA.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las personas que hicieron posible la realización de esta tesis. La primera de ellas es el Dr. Zagarese, mi director, quién me fue presentado por la Dra. Berman, mi madre. Cuando el Dr. Zagarese me propuso realizar este proyecto, lo acepté inmediatamente. Casi un año más tarde, estaba acomodándome en su laboratorio. Era mi primera experiencia como profesional y estaba realmente emocionado. En el espacio que me fue asignado tenía a mi izquierda a la Dra. Diovisalvi y a mi derecha al Dr. Metz, quien por aquel entonces era un joven recién egresado de la Universidad Nacional de Entre Ríos, y estaba, ahora, cientos de kilómetros lejos de casa, compartiendo no solo el escritorio sino también este camino conmigo.

Durante los primeros meses, y bajo la dirección de la Dra. Ferraro, aprendí los movimientos básicos del trabajo de laboratorio: limpieza, orden y disciplina. La Dra. Huber fue también una gran compañera que me acercó herramientas necesarias para trabajar en la mesada. Las saludo y les agradezco profundamente a las dos por la predisposición, la paciencia y las buenas energías.

Lejos de las mesadas, allá, en las lagunas, conocí al Sr. Escaray y al Sr. Bustingorry. El conocimiento técnico y el sentido práctico que me transmitieron fue clave para afrontar el arduo trabajo de campo que se avecinaba. Les agradezco haberme permitido acompañarlos, y por haberme acompañado, luego, a los muestreos pampeanos y patagónicos. Agradezco, aquí también, a la Dra. Diovisalvi, quién fue una inestimable compañera cuando fue necesario suplir a los mencionados señores en las campañas de muestreo. Quisiera detenerme para agradecer a las personas que colaboraron en la logística de estas campañas: la Dra. Schiaffino y la Dra. Lobato de CIT NOBA (Junín); Dra. Diéguez, Dra. Pérez y Dr. Suárez de INBIOMA (Bariloche); a los profesionales de la Administración de Parques Nacionales: Anahí Pérez, Daniel

Testoni, Laura Aréjola, Pablo Ariel Rossi, Diego Lucca y Matías Nuñez, y al Sr. L. Zingoni por permitirnos recolectar muestras en su propiedad. Al Dr. Cussac (INBIOMA, Bariloche), la Dra. Izaguirre (IEGEB, CABA) y al Sr. Cárdenas (CAB CENEA, Bariloche) por prestaron equipos y suministros esenciales.

Gran parte de esta tesis se lo debo al personal del CIM (ex CIMA) en la ciudad de La Plata, donde realicé los análisis de plaguicidas y siempre fui bienvenido. En particular, quiero agradecer y saludar al Dr. Marino, quien fue el primero en recibirme en el instituto y confió en mí para trabajar allí con total libertad.

Quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio por su compañerismo, en particular: a la Dra. Quiroga, quien, junto a la Dra. Minotti, realizaron análisis cruciales para la elaboración de esta tesis; a la Dra. Llamas por haberme brindado herramientas necesarias para el análisis de datos; agradezco también los trabajos de microscopía realizados por la Dra. Fermani; al Dr. Lagomarsino y a los Sres. Escaray y Bustingorry por realizar los análisis fisicoquímicos; a la Dra. Ferraro por realizar los análisis moleculares; a la Dra. Huber por el análisis de los datos de NGS; a la Dra. Odriozola con quien compartí numerosos cursos de posgrado; y, finalmente, al Dr. Metz por haber sido mi gran compañero durante este doctorado.

Voy a dedicarles el último párrafo a mis directores: el Dr. Zagarese y el Dr. Unrein. Este último, fue quien me introdujo al mundo microbiano, a la microscopía de epifluorescencia y a la citometría de flujo. Siempre estuvo dispuesto a guiarme y nos coordinó junto al Dr. Metz, la Dra. Huber y la Lic. Ospina para realizar distintos trabajos de investigación. En particular quiero agradecerle sus comentarios y su aporte en las primeras versiones del trabajo científico recientemente publicado. Finalmente, el principal agradecimiento se lo debo a mi director, el Dr. Zagarese. Me siento afortunado

## Agradecimientos

de haber trabajado con él y por la oportunidad que me ofreció le voy a estar siempre agradecido.

**A MELI Y A FERMÍN**

## ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	4
<b>Agradecimientos</b> .....	6
<b>A Meli y a Fermín</b> .....	9
<b>Índice general</b> .....	10
<b>Índice de tablas</b> .....	12
<b>Índice de figuras</b> .....	14
<b>Capítulo 1: Introducción y aspectos generales</b> .....	17
<b>Introducción general</b> .....	18
<b>Área de estudio</b> .....	22
<b>Criterio de selección del área de estudio</b> .....	22
<b>Localización de los cuerpos de agua estudiados</b> .....	23
<b>Región Pampeana</b> .....	27
<b>Región Patagónica</b> .....	29
<b>Características generales de las lagunas</b> .....	30
<b>Componentes biológicos analizados</b> .....	32
<b>Capítulo 2: Glifosato y AMPA en ambientes naturales</b> .....	35
<b>Resumen del capítulo</b> .....	36
<b>Objetivos</b> .....	38
<b>Introducción</b> .....	39
<b>Materiales y métodos</b> .....	48
<b>Muestreo</b> .....	48
<b>Análisis físicos y químicos</b> .....	51
<b>Análisis de glifosato y AMPA</b> .....	52
<b>Caracterización de uso de suelo y cobertura</b> .....	56
<b>Análisis estadísticos</b> .....	57
<b>Resultados</b> .....	58
<b>Características morfométricas y limnológicas de las lagunas</b> .....	58

<b>Descriptores de uso de suelo</b> .....	63
<b>Detección, niveles y distribución geográfica de los herbicidas</b> .....	66
<b>Discusión</b> .....	73
<b>Conclusiones parciales</b> .....	81
<b>Capítulo 3: Distribución temporal y espacial de glifosato y AMPA en la cuenca del Río Salado</b> .....	83
<b>Resumen del capítulo</b> .....	84
<b>Objetivos</b> .....	85
<b>Introducción</b> .....	86
<b>Materiales y métodos</b> .....	87
<b>Área de estudio</b> .....	87
<b>Toma y procesamiento de muestras</b> .....	88
<b>Análisis de glifosato y AMPA</b> .....	89
<b>Análisis estadísticos</b> .....	89
<b>Resultados</b> .....	90
<b>Características limnológicas, uso de suelo y producción agrícola en la cuenca alta y baja del Río Salado de Buenos Aires.</b> .....	90
<b>Ocurrencia, concentraciones y distribución espacial de glifosato y AMPA</b> ..	91
<b>Patrones estacionales en la ocurrencia y distribución de glifosato y AMPA en la cuenca del Río Salado</b> .....	95
<b>Discusión</b> .....	97
<b>Capítulo 4: Efecto del glifosato sobre la abundancia microbiana</b> .....	101
<b>Resumen del capítulo</b> .....	102
<b>Introducción</b> .....	104
<b>Materiales y métodos</b> .....	110
<b>Indicadores de uso de glifosato</b> .....	110
<b>Muestreo</b> .....	113
<b>Procedimientos analíticos</b> .....	115
<b>Análisis estadístico</b> .....	120
<b>Resultados</b> .....	124
<b>Características morfométricas y limnológicas de las lagunas</b> .....	124
<b>Abundancia y estructura de la comunidad microbiana</b> .....	125
<b>Presencia del gen <i>phnD</i></b> .....	128

Patrones ambientales y espaciales de la abundancia de Pcy.....	129
Análisis de regresión lineal múltiple .....	133
Discusión.....	136
¿Existe evidencia de campo sobre los efectos estimulantes del glifosato sobre las abundancias de Pcy? .....	137
¿Es la magnitud del efecto a campo comparable a lo reportado en condiciones experimentales controladas? .....	140
¿Cómo se compara el efecto del glifosato con las otras variables ambientales sobre la biomasa de Pcy?.....	142
Conclusiones Parciales .....	143
Capítulo 5: Efecto del glifosato sobre la estructura comunitaria de Pcy .....	145
Resumen del capítulo.....	146
Objetivos.....	147
Introducción.....	148
Materiales y métodos .....	151
Procesamiento de muestras y secuenciación.....	151
Diversidad molecular de Pcy .....	152
Análisis de secuencias .....	152
Análisis estadístico.....	153
Resultados .....	154
Diversidad observada .....	154
Especificidad de los primers.....	155
Patrones de diversidad molecular de Pcy .....	155
Distribución espacial y composición de la comunidad de Pcy .....	158
Indicadores de diversidad de la comunidad de Pcy.....	163
Efecto de las variables sobre la comunidad de Pcy .....	164
Discusión.....	171
Conclusiones generales.....	175
Referencias bibliográficas .....	179

## Índice de tablas

Tabla 1 Posición geográfica y cuenca de los puntos de muestreo. ....	23
--	----

Tabla 2 Estadísticos de superficie sembrada con los principales cultivos dependientes de glifosato para los municipios muestreados. VI: variación interanual. ....	29
Tabla 3 Eventos de modificación genética aprobados para su comercialización en la Argentina.....	41
Tabla 4 Exportaciones e importaciones de glifosato y de fitoterápicos totales en Argentina (www.ciafa.org.ar). ....	43
Tabla 5 Calendario de siembra para cultivos de verano para los principales países productores mundiales. ....	49
Tabla 6 Índice de estado trófico (TSI) para las lagunas pampeanas y patagónicas calculados a partir de su concentración de fósforo total y clorofila-a.....	59
Tabla 7 Valores medios ( $\bar{x}$ ), desviación estándar (DE) y rango (máximo y mínimo) de los principales parámetros físicos, químicos y biológicos estimados para las lagunas de las campañas pampeanas y patagónicas.....	60
Tabla 8 Coeficiente de correlación de Spearman y nivel de significación estadística para las variables limnológicas de la región pampeana. ....	61
Tabla 9 Coeficiente de correlación de Spearman y nivel de significación estadística para las variables limnológicas de la región Patagónica. ....	62
Tabla 10 Porcentaje de uso y cobertura por cuenca hidrográfica. ....	64
Tabla 11 Concentración de glifosato y AMPA en agua filtrada, sólidos totales en suspensión (STS) y sedimento de las lagunas pampeanas.....	67
Tabla 12 Estadísticos de las concentraciones de glifosato + AMPA por mes de muestreo para las lagunas pampeanas.....	72
Tabla 13 Niveles de glifosato reportados en la bibliografía para cuerpos de agua en Argentina. LD: Límite de detección. ....	75
Tabla 14 Frecuencias estacionales de detección de glifosato (Gli) y AMPA en sedimento y agua. ....	95
Tabla 15 Fuentes de información y variables consideradas en este capítulo .....	114
Tabla 16 Valores estadísticos de las abundancias de <i>Pcy</i> para cuerpos de agua continentales según su estado trófico para la región pampeana y del resto del mundo. ....	127
Tabla 17 Correlaciones no paramétricas de Spearman entre la abundancia de <i>Pcy</i> y <i>BH</i> y las variables ambientales de las regiones patagónicas y pampeanas. Solo se muestran las correlaciones significativas. ....	127
Tabla 18 Análisis de regresión múltiple con los indicadores de impacto de glifosato, las variables ambientales como predictores de la abundancia de <i>Pcy</i> y <i>HB</i> . En el modelo (a) se incluyó al total del conjunto de variables como predictores de la abundancia de <i>Pcy</i> , mientras que en el modelo (b) los indicadores de impacto de glifosato se excluyeron. Para modelar la abundancia de las <i>BH</i> se incluyó a todas las variables como potenciales predictores en el modelo (c). Método de selección de variables: Stepwise. $R^2_{adj}$ : coeficiente de correlación ajustado. SC: Suma de cuadrados.....	133
Tabla 19 Reporte de los parámetros estimados por el análisis de regresión múltiple. LI: límite inferior del intervalo de confianza. LS: límite superior del intervalo de confianza. VIF: factor de inflación de varianza .....	135
Tabla 20 Valores estadísticos de los principales índices de diversidad.....	163

**Índice de figuras**

Figura 1 Principales exportadores de alimentos a nivel mundial. El gráfico de torta detalla los principales productos agrícolas argentinos (Departamento de agricultura de estados unidos, usda).....	28
Figura 2 Fotografía de la Laguna Blanca en Patagonia (panel izquierdo) y la laguna La Tigra en la región pampeana (panel derecho). Fotografías: Horacio Zagarese. ....	31
Figura 3 Ilustración de algunos de los HBG más populares .....	40
Figura 4 Principales cultivos sembrados (ha.) durante la cosecha 2014-2015 ( <a href="http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones">http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones</a> ). ....	42
Figura 5 Modo de acción del glifosato .....	44
Figura 6 Principales rutas de degradación del glifosato (adaptado de Giesy et al., 2000). ....	45
Figura 7 Ecorregiones terrestres de la República Argentina (Fuente: WWF). ....	47
Figura 8 Mapa del área de estudio mostrando la distribución espacial de los sitios de muestreo para la región pampeana y Patagónica. Panel: ubicación en Sudamérica. ...	50
Figura 9 Distribución de tamaños de las lagunas muestreadas en la región Patagónica. Encima de las barras se muestra el número de lagunas. panel superior: Box-plot de la distribución de las lagunas de acuerdo a su superficie.....	58
Figura 10 Distribución de tamaños de las lagunas muestreadas en la región pampeana. Encima de las barras se muestra el número de lagunas. panel superior: Box-plot de la distribución de las lagunas de acuerdo a su superficie. ....	59
Figura 11 Distribución geográfica y descriptores de uso y cobertura de suelo para cada laguna de la región pampeana. Las líneas corresponden a las isohietas medias anuales.....	66
Figura 12 Ocurrencia de glifosato y AMPA en los lagos pampeanos. a) de acuerdo a la localización en el mapa. Símbolos oscuros indican detecciones de glifosato y/o AMPA, la forma de los símbolos indican el mes de muestreo. Los números corresponden a las cuencas propuestas por la Subsecretaría de recursos hídricos de la República Argentina, b) de acuerdo a la fecha de muestreo. El número de lagos en cada fecha en los que se detectó (barra gris) y no se detectó (barra blanca) glifosato-AMPA. ....	71
Figura 13 Concentración de herbicida (glifosato + AMPA) presente en el sedimento vs. el área del lago. Solo los lagos con detecciones positivas están ilustrados. LU (circulo blanco) es un probable valor extremo por lo que no fue incluido en el análisis de regresión simple. ....	73
Figura 14 Análisis de componentes principales (PCA) de uso y cobertura de suelo, para las lagunas de la cuenca alta y baja del Rio Salado. Subrayadas se encuentran las lagunas analizadas en este capítulo. ....	91
Figura 15 Ocurrencia y distribución de herbicida (Gli + AMPA) en los sedimentos en la cuenca alta (a) y baja (b) de la cuenca del Rio Salado. Las concentraciones máximas (■) y medias (■) están expresadas como $\mu\text{g kg}^{-1}$ , mientras que la frecuencia de detección (■) representa el porcentaje de muestras en las que se detectó Gli + AMPA. Los asteriscos indican al menos una detección positiva en el compartimento de agua filtrada. Número de muestras (■). En los paneles se encuentra señalada (circulo negro) el área de estudio. ....	94

Figura 16 Concentraciones medias estacionales de glifosato y AMPA en sedimentos y agua filtrada en los cuerpos de agua pertenecientes a la cuenca alta y baja del río salado. ....	97
Figura 17 Esguerrimiento superficial en un campo de cultivo .....	106
Figura 18 Control y complejos proteicos del operón <i>Pho</i> (tomado de Lamarche and Wanner, 2008). ....	109
Figura 19 Indicadores de impacto de glifosato. Ver detalles en el texto. ....	113
Figura 20 Fotografías de los componentes microbianos considerados en esta tesis tomados con microscopio de epifluorescencia bajo distintos filtros de luz. ....	119
Figura 21 Mapas de conectividad ensayados de acuerdo a diferentes modelos para las coordenadas de los sitios muestreados en la región pampeana en el año 2015. ....	122
Figura 22 Esquema de la estrategia planteada para responder las preguntas de este capítulo. ....	124
Figura 23 Diagrama de cajas ilustrando el percentil 25° - 75° (caja), el percentil 10° - 90° (bigotes), y el percentil 5° - 95° (círculos negros por debajo y por encima de la caja) de la abundancia de <i>Pcy</i> registradas en este estudio (Pampa n = 52 y Patagonia n = 24) y de la literatura (Pampa n = 56 y el resto del mundo n = 483). La abundancia de <i>Pcy</i> fue log transformada con propósitos ilustrativos. Las diferencias significativas están indicadas con letras encima de las barras (valor de P < 0,01). ....	126
Figura 24 Mapa de la región más austral de América del Sur incluyendo los sitios de muestreo analizados para la presencia del gen degradador de fosfonatos en <i>Pcy</i> phnD. phnD [+] en la región pampeana 29% (n = 52), phnD [-] en la región patagónica 5% (n = 84). Todas las muestras fueron colectadas del lado Argentino de los Andes. ....	129
Figura 25 Diagramas del análisis de partición de varianza representando las fracciones del R cuadrado ajustado ( $R^2_{adj}$ ) explicada por las variables ambientales, la estructura espacial y los indicadores de impacto de glifosato. (a) escala interregional (Pampa + Patagonia) y (b) escala regional (Pampa). ....	130
Figura 26 a) Mapa de calor del MEM 2 (negro) y proporción de doble cultivo en los alrededores de la laguna (círculos rojos). b) mapa de calor de doble cultivo (rojo) y abundancia de <i>Pcy</i> en la región pampeana (círculos bordó). ....	132
Figura 27 Predicción para la abundancia de <i>Pcy</i> con su intervalo de confianza de 95% (área gris) para sistemas phnD [+] (línea solida) y phnD [-] (línea punteada) en función de la proporción de doble cultivo (dc). Se consideraron valores promedios de conductividad, STS y Cl-a. Expresión de predicción: (phnD [+]) = 3,66 + 0,4 + 0,60 log(cond) + 0,58 log (STS) + 0,36 log (Cl-a) + 1,82 arcoseno (dc) <sup>1/2</sup> . Expresión de predicción (phnD [-]) = 3,66 - 0,4 + 0,60 log (cond) + 0,58 log (STS) + 0,36 log (Cl-a) + 1,82 arcoseno (dc). ....	136
Figura 28 Relación espacial entre el área convertida y el área protegida de las ecorregiones terrestres (tomado de Watson y colaboradores, 2016). ....	148
Figura 29 Resumen del experimento de secuenciación .....	151
Figura 30 Phyla más abundantes secuenciados. ....	155
Figura 31 Curvas de rarefacción para las muestras analizadas aquí. Etiquetas: códigos de las lagunas, ver tabla 1. La línea vertical corresponde a 4.400 secuencias (valor de la rarefacción). Las líneas horizontales corresponden al número de especies para cada laguna a ese valor de rarefacción. ....	157

Figura 32 Riqueza acumulada de especies según distintos estimadores para el conjunto de muestras analizadas .....	158
Figura 33 Representación espacial de los sitios de muestreo y la composición relativa de la comunidad de <i>Pcy</i> . El tamaño de los círculos corresponde al índice de Shannon (ver leyenda). .....	159
Figura 34 (a) Gráfico de barras acumulado de las principales zOTUs por lagunas, ordenadas por región y FT ascendente. (b) Proporción de las zOTUs más abundantes por región.....	160
Figura 35 Gráfico de ordenación (NMDS) basado en los valores de disimilitud de Bray-Curtis de las 98 zOTUs consideradas en este estudio. ....	161
Figura 36 Correlaciones no paramétricas entre las zOTUs más abundantes y los indicadores de impacto de glifosato y las variables ambientales. (a) OC: Otros cultivos; DC: doble cultivo; PI: pasturas implantadas; Hum: Humedales; tem: temperatura del agua; DS: profundidad de disco de Secchi; OD: oxígeno disuelto; FT: fosforo total; FDT: fosforo disuelto total; COD: carbono orgánico disuelto; Tur: turbidez nefelométrica. Solo las correlaciones significativas están ilustradas.....	162
Figura 37 Análisis de redundancia (RDA) de las variables ambientales a escala interregional (a) y regional (b). El porcentaje de variación explicada por cada eje está indicado entre paréntesis. Las variables significativas (valor de $P < 0,01$ ) están indicadas con flechas. ....	165
Figura 38 Análisis de redundancia (RDA) de los vectores espaciales a escala interregional (a) y regional (b). El porcentaje de variación explicada por cada eje está indicado entre paréntesis. Las variables significativas (valor de $P < 0,01$ ) están indicadas con flechas. ....	166
Figura 39 Análisis de redundancia (RDA) de los indicadores de impacto de glifosato escala interregional (a) y regional (b). El porcentaje de variación explicada por cada eje está indicado entre paréntesis. Las variables significativas (valor de $P < 0,01$ ) están indicadas con flechas. ....	167
Figura 40 Diagramas del análisis de partición de varianza representando las fracciones del R cuadrado ajustado ( $R^2_{adj}$ ) explicada por las variables ambientales, la estructura espacial y los indicadores de impacto de glifosato. (a) Escala interregional (Pampa + Patagonia) y (b) escala regional (Pampa).....	168
Figura 41 Diagrama de cajas comparando la riqueza de especies entre lagunas phnD+ y phnD-.....	170
Figura 42 Diagrama de cajas comparando la equitatividad de Pielou entre lagunas phnD+ y phnD-.....	171

# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y ASPECTOS GENERALES**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El glifosato (N-fosfometilglicina) es un herbicida de amplio espectro utilizado para el control de malezas en la agricultura, aunque también cuenta con una importante variedad de aplicaciones adicionales: mantenimiento de espacios públicos, control de malezas acuáticas, saneamiento de desagües, etc. Los formulados comerciales que tienen al glifosato como principio activo son los herbicidas más utilizados a nivel mundial (Pérez y colaboradores, 2007). Se caracterizan por ser post emergentes, sintéticos y no selectivos. La utilización de glifosato a escala global se vio potenciada por la introducción, en la década de 1990, de variedades híbridas y transgénicas de cultivos tolerantes a este como la soja y el maíz. Si bien el glifosato puede actuar sobre una gran variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos (síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, fotosíntesis, respiración, etc.), su principal modo de acción es la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Esta enzima, en los organismos eucariotas fotosintéticos, se localiza en los cloroplastos y forma parte de la ruta metabólica del ácido shiquímico. Su inhibición por glifosato impide la producción de corismato, que es el precursor de los aminoácidos aromáticos (Annett y colaboradores, 2014; McGrath y colaboradores, 2013).

La similitudes fisiológicas y bioquímicas entre las plantas terrestres y los organismos fotosintéticos acuáticos, sugerirían que estos últimos podrían ser particularmente vulnerables a los formulados de glifosato (Annett y colaboradores, 2014; APsHA 2012). Sin embargo, se ha observado que ciertas cianobacterias (bacterias fotosintéticas) son tolerantes a concentraciones mM de glifosato (Powell y colaboradores, 1991) y que el agregado experimental del herbicida puede estimular el crecimiento de las poblaciones de picocianobacterias (cianobacterias  $< 2\mu\text{m}$ , en

adelante Pcy) y aumentar la producción primaria fitoplanctónica (Pérez y colaboradores, 2007; Vera y colaboradores, 2010).

Los fosfonatos, tales como el glifosato y el AMPA, son moléculas orgánicas que contienen una unión covalente muy fuerte entre los átomos de carbono y fósforo. Esta unión hace que sean más difíciles de hidrolizar que las sales inorgánicas de fósforo, por lo que no son un recurso disponible para la gran mayoría de los organismos. Sin embargo, algunas Pcy, además de tolerantes, son capaces de utilizar al glifosato como una fuente de nutrientes, básicamente de fósforo (Ilikchyan y colaboradores, 2009). En este sentido, Ilikchyan y colaboradores (2009) encontraron que los genes funcionales responsables de la asimilación de fosfonatos (*phnD*) son conservados en distintas poblaciones de Pcy. Asimismo, estos organismos son capaces de crecer en medio enriquecido con fosfonatos como única fuente de fósforo. Es así como los fosfonatos de origen antropogénico (como el glifosato) podrían representar una fuente de fósforo aún no reconocida en ambientes impactados como las lagunas pampeanas.

Los rápidos cambios en el uso de la tierra en la región pampeana son un importante factor capaz de alterar el equilibrio del humedal pampeano. El progresivo reemplazo de pastizales naturales y pasturas implantadas por sistemas agrícolas con un menor consumo de agua y la adopción de prácticas de siembra directa, capaces de reducir las pérdidas evaporativas directas del suelo, permiten que una fracción mayor del agua de las precipitaciones alcance los sistemas acuáticos, tanto por escurrimiento superficial, como por drenaje profundo (Aragón y colaboradores, 2011). Dado que las lagunas ocupan las áreas más bajas del terreno, es hacia allí donde confluyen los agroquímicos, fertilizantes y demás insumos agrícolas utilizados en la cuenca (Coupe y colaboradores, 2012). Es así, como en la región Pampeana se han detectado niveles de glifosato entre los 0,1– 0,7 mg L<sup>-1</sup> en cuerpos de agua cercanos a campos cultivados,

los cuales resultan cerca de un orden de magnitud superior a los encontrados en otros sistemas acuáticos del mundo (Peruzzo y colaboradores, 2008).

### ***Hipótesis y predicciones***

Las hipótesis de trabajo de esta tesis pueden enunciarse de la siguiente manera: *“dado que algunas Pcy son tolerantes al glifosato y pueden utilizarlo como fuente de nutrientes, la exposición continuada a este herbicida por más de dos décadas ha producido en las lagunas de la región pampeana:*

1. Un aumento de la densidad y biomasa de las Pcy.
2. Una selección de poblaciones de Pcy capaces de utilizar fosfonatos, tales como el glifosato y AMPA, como fuente de fósforo.”

Las predicciones correspondientes a las hipótesis anteriores son:

1. Para niveles similares de grado trófico, las lagunas con historia de exposición al glifosato presentan densidades y biomasa de Pcy mayores que las lagunas que no han sido expuestas al herbicida. En las lagunas expuestas al glifosato las Pcy representan una importante fracción de la comunidad de autótrofos planctónicos, mientras que esto no ocurre en las lagunas no expuestas.
2. La diversidad de Pcy es mayor en las lagunas no expuestas que en las expuestas al glifosato.
3. Las Pcy con capacidad de tolerar y utilizar el glifosato son más abundantes en las lagunas expuestas que en las no expuestas, tanto en términos absolutos como relativos (i.e., % de tolerantes respecto al total de Pcy).

**Objetivo General:** El objetivo general de esta tesis es relacionar la abundancia y composición de las Pcy de lagos someros con la utilización del herbicida N-fosfometilglicina (glifosato) en los ecosistemas terrestres circundantes.

**Abordaje metodológico:** En este estudio intentaremos discriminar los efectos del glifosato, mediante recopilación bibliográfica anterior y posterior al uso del herbicida, y la selección de ambientes que no hayan sido afectados. A partir de estos, se establecerán comparaciones con ambientes impactados.

## ÁREA DE ESTUDIO

### CRITERIO DE SELECCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Para investigar la presencia de glifosato y evaluar un posible efecto sobre las comunidades microbianas, se realizaron comparaciones entre ambientes expuestos y no expuestos al glifosato. Los ambientes expuestos corresponden a lagunas pampeanas, las cuales están situadas en una región con intensa actividad agrícola. Los ambientes no expuestos corresponden a lagunas patagónicas, ubicadas en una región donde la actividad agrícola dependiente del uso de glifosato es despreciable. Las lagunas seleccionadas de ambas regiones se caracterizan por ser permanentes o semipermanentes y por tener una elevada carga de nutrientes.

El relevamiento espacial incluyó a la mayoría de las cuencas hidrográficas de la provincia de Buenos Aires y de la región norpatagónica. Varias lagunas pampeanas están incluidas en la red de monitoreo del Proyecto Argentino de Monitoreo y Prospección de Ambientes Acuáticos (PAMPA<sup>2</sup>, de CONICET). La mayoría fueron muestreadas solo una sola vez. Adicionalmente, se realizó un relevamiento temporal en lagunas pertenecientes a la cuenca alta y baja del Río Salado en la región pampeana de la provincia de Buenos Aires para investigar la distribución temporal del herbicida y su metabolito ambiental. Por otro lado, dentro de la región patagónica se seleccionaron lagunas situadas en las cercanías del embalse Piedra del Águila, en los alrededores de la ciudad de Bariloche y en el Parque Nacional Laguna Blanca. El área patagónica seleccionada carece de aptitud para la agricultura. Muestreos anteriores han permitido constatar que las mismas son naturalmente eutróficas, y que presentan niveles comparables a las lagunas pampeanas en varios de sus parámetros físicos y químicos

(conductividad, pH, oxígeno disuelto, etc.), morfométricos (área, perímetro, desarrollo de línea de costa y profundidad media) y de estado trófico (fosforo, clorofila-*a* y turbidez).

## LOCALIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE AGUA ESTUDIADOS

Esta tesis se enfoca en el efecto del glifosato sobre la comunidad microbiana en las lagunas de las región central de Argentina (Pampa) entre las latitudes 34°S y 38°S y los paralelos 63°O y 56°O, y la región sur (Patagónica) entre las latitudes 38°S 41°S y entre los paralelos 70°O y 71°O. Dentro de la región central, se muestrearon 52 lagunas en la Provincia de Buenos Aires, mientras que en la región sur se muestrearon 9 lagunas del Parque Nacional Laguna Blanca (Zapala, Neuquén), 3 lagunas en las cercanías del embalse Paso de las Piedras (Cullón Curá, Neuquén) y 12 lagunas dentro del PN Nahuel Huapi (Bariloche, Rio Negro) (Tabla 1). Por otro lado, el relevamiento temporal de la cuenca del Rio Salado, incluyó las lagunas Gómez, El Carpincho, Mar Chiquita y Rocha en la cuenca alta, y Chascomús en la cuenca baja (ver ubicación en Tabla 1).

TABLA 1 POSICIÓN GEOGRÁFICA Y CUENCA DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.

Laguna (Municipalidad)	ID	Región	Posición geográfica	Cuenca <sup>a</sup>
Chascomús (Chascomús)	CH	Pampa	-35,582; -58,041	48
La Limpia (Chascomús)	LI	Pampa	-35,602; -57,811	48
El Triunfo (Lezama)	TR	Pampa	-35,851; -57,872	48
La Salada de monasterio (Chascomús)	SM	Pampa	-35,783; -57,873	48

## Capítulo 1: Introducción y aspectos generales

Vitel (Chascomús)	VI	Pampa	-35,544; -58,111	48
Las Tablillas (Chascomús)	TA	Pampa	-35,807; -58,046	48
Barrancas (Chascomús)	BS	Pampa	-35,879; -58,044	48
Chis-Chis (Chascomús)	CC	Pampa	-35,763; -57,937	48
El Burro (Chascomús)	BU	Pampa	-35,691; -57,950	48
Adela (Chascomús)	AD	Pampa	-35,692; -57,954	48
Blanca Grande (Olavarría)	BG	Pampa	-36,478; -60,894	48
Lobos (Lobos)	LO	Pampa	-35,276; -59,130	48
Rocha (Bragado)	RC	Pampa	-34,694; -60,679	48
Mar Chiquita (Junín)	MA1	Pampa	-34,484; -61,117	48
Gómez (Junín)	GO	Pampa	-34,659; -61,029	48
Carpincho (Junín)	CA	Pampa	-34,577; -60,907	48
Azotea (Gral. Viamonte)	AZ	Pampa	-35,066; -61,019	48
Bragado (Bragado)	BR	Pampa	-35,088; -60,473	48
Indio Muerto (Roque Pérez)	IM	Pampa	-35,476; -59,709	48
Monte (Monte)	MT	Pampa	-35,447; -58,813	48
Sevigne (Dolores)	SE	Pampa	-36,204; -57,744	49
Kakel Huincul (Maipú)	KH	Pampa	-36,791; -57,790	49
Samboy (Maipú)	SY	Pampa	-37,102; -57,512	49
Salada Grande (Madariaga)	SG	Pampa	-36,950; -56,980	49
Los Horcones (Madariaga)	HR	Pampa	-37,063; -57,003	49
Mar Chiquita (Mar Chiquita)	MA2	Pampa	-37,649; -57,406	50
De los Padres (Balcarce)	LP	Pampa	-37,936; -57,741	50
La Brava (Balcarce)	BV	Pampa	-37,866; -57,982	50
Paso de las Piedras (Cnel. Pringles)	PI	Pampa	-38,418; -61,759	51

Laguna Sauce Grande (Monte Hermoso)	SU	Pampa	-38,926; -61,368	51
La Tigra (Tres arroyos)	TI	Pampa	-38,347; -60,452	51
La Lujan (Tres arroyos)	LU	Pampa	-38,427; -60,318	51
La Juanita (Tres arroyos)	LJ	Pampa	-38,521; -60,140	51
San Pablo (A.G. Chávez)	SP	Pampa	-38,050; -60,034	51
Salada de Tedín Uriburu (Benito Juárez)	ST	Pampa	-37,414; -59,808	51
El Chifle (Benito Juárez)	EC	Pampa	-37,408; -59,799	51
La Barrancosa (Benito Juárez)	LB	Pampa	-37,335; -60,117	51
Chasicó (Villarino)	CS	Pampa	-38,645; -63,094	61
Cuero de Zorro (Trenque Lauquen)	ZO	Pampa	-35,794; -62,914	96
Los Quilmes (Trenque Lauquen)	QU	Pampa	-35,880; -62,872	96
Hinojo Grande (Trenque Lauquen)	HG	Pampa	-35,919; -62,503	96
Pehuajó (Pehuajó)	PE	Pampa	-35,778; -61,910	96
Flamencos Sur (Saavedra)	FS	Pampa	-37,897; -62,548	98
Flamencos Norte (Saavedra)	FN	Pampa	-37,893; -62,547	98
Cochicó (Guaminí)	CO	Pampa	-36,942; -62,329	98
Del Monte (Guaminí)	MO	Pampa	-37,009; -62,431	98
Del Venado (Guaminí)	VE	Pampa	-37,007; -62,580	98
Epecuén (Adolfo Alsina)	EP	Pampa	-37,132; -62,814	98
Los Patos (Adolfo Alsina)	PA	Pampa	-37,346; -62,938	98
La Cortada (Puán)	CT	Pampa	-37,474; -62,924	98
Puán (Puán)	PU	Pampa	-37,550; -62,775	98
Alsina (Guaminí)	AL	Pampa	-36,880; -62,222	98

## Capítulo 1: Introducción y aspectos generales

Verde (Zapala)	LV	Patagonia	-39,008; -70,384	62
Overa (Zapala)	OV	Patagonia	-39,020; -70,430	62
El Hoyo (Zapala)	EH	Patagonia	-39,010; -70,433	62
Molle (Zapala)	ML	Patagonia	-39,012; -70,418	62
Blanca (Zapala)	BL	Patagonia	-39,063; -70,371	62
Antañir (Zapala)	AN	Patagonia	-38,961; -70,390	62
Jabón (Zapala)	JA	Patagonia	-38,979; -70,373	62
La Seca (Zapala)	LS	Patagonia	-39,028; -70,407	62
La Batea (Zapala)	LL	Patagonia	-39,034; -70,409	62
Morenito (Bariloche)	LM	Patagonia	-41,095; -71,475	63
Escondido (Bariloche)	ES	Patagonia	-41,060; -71,566	63
Trébol (Bariloche)	OL	Patagonia	-41,070; -71,489	63
Fantasma (Bariloche)	FA	Patagonia	-41,093; -71,450	63
Rosalía La Esquiva (Bariloche)	LR	Patagonia	-41,201; -71,427	63
Mallín de las Cartas (Bariloche)	MC	Patagonia	-41,076; -71,525	63
La Larga (Los Lagos)	GA	Patagonia	-40,932; -71,554	63
Redonda (Los Lagos)	RE	Patagonia	-40,893; -71,562	63
Pescado (Los Lagos)	PS	Patagonia	-40,890; -71,553	63
Baguales (Los Lagos)	BA	Patagonia	-41,010; -71,502	63
Bayles Willis (Los Lagos)	BW	Patagonia	-40,624; -71,706	63
Ceferino (Los Lagos)	CE	Patagonia	-40,697; -71,703	63
Piche (Collón Cura)	HE	Patagonia	-40,373; -70,388	63
El Peludo (Collón Cura)	DO	Patagonia	-40,369; -70,405	63
Toro (Collón Cura)	TO	Patagonia	-40,319; -70,421	63

---

<sup>a</sup> De acuerdo a la clasificación propuesta por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina (<https://www.mininterior.gov.ar/obras-publicas/info-mapas.php>) : 48 Cuenca del Río Salado de Buenos Aires ,

---

49 Área canalizada al sur del Río Salado, 50 Arroyos al sur este de Buenos Aires, 51 Arroyos al sur de Buenos Aires, 61 Ríos y arroyos menores con pendiente atlántica entre el sur de buenos aires y el Río Chubut, 96 Región sin drenaje de San Luís, Córdoba, La Pampa y Buenos Aires, 98 Región lagunera al sudoeste de Buenos Aires

## **REGIÓN PAMPEANA**

### **CARACTERÍSTICAS AMBIENTALES**

La región pampeana alberga una de las planicies más extensas del mundo, incluye la parte centro-este de Argentina, la mayor parte de Uruguay y el estado brasileño más austral, Rio Grande do Sul. La provincia de Buenos Aires es uno de los focos de este estudio. Esta provincia se ubica en el sur de la ecorregión pampeana y posee un área de 307.000 km<sup>2</sup>. Su suave pendiente solo se ve interrumpida por dos cadenas montañosas que la atraviesan en sentido noroeste-sudeste: Ventania y Tandilia. El clima es templado, con veranos cálidos e inviernos fríos. La temperatura media en el norte es de 17 °C y en el sur es de 13 °C. Las precipitaciones (mayores durante el período estival) son moderadas y siguen un gradiente de aridez que varía de 1.000 mm año<sup>-1</sup> en el noreste a 400 mm año<sup>-1</sup> en el suroeste (Viglizzo y colaboradores, 1997; Viglizzo and Frank, 2006; Volpedo, 2013). El área de estudio posee un drenaje poco desarrollado lo que propicia la ocurrencia de una gran cantidad de cuerpos de agua naturales y artificiales como lagunas, ríos, arroyos, estuarios y embalses, que en conjunto comprenden el llamado Humedal Pampeano (Iriondo, 2004; Volpedo, 2013).

### **CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS**

Argentina se encuentra entre los mayores exportadores de alimentos y productos agrícolas del mundo, con una producción anual de granos de ~120 millones de toneladas (Alexandratos and Bruinsma, 2012; Figura 1). Entre esos productos, la soja es su principal mercancía (*commodity*) y desempeña un papel clave en su estructura económica (Sly, 2017). En su vasta superficie (2,78 millones de km<sup>2</sup>) un gradiente climático latitudinal y longitudinal previene que el cultivo se expanda y lo limita, en parte, a sus tres provincias centrales: Santa fe, Córdoba y Buenos Aires. Esta región pertenece a lo que se conoce como las llanuras pampeanas. Una de las áreas más fértiles y productivas del mundo, donde los precios de la tierra varían de U \$ S 1.500 / ha. a más de U \$ S 15.000 / ha. Una llanura casi ininterrumpida hacia el Océano Atlántico y un clima templado y húmedo garantizan condiciones óptimas para el desarrollo de las actividades agrícolas.

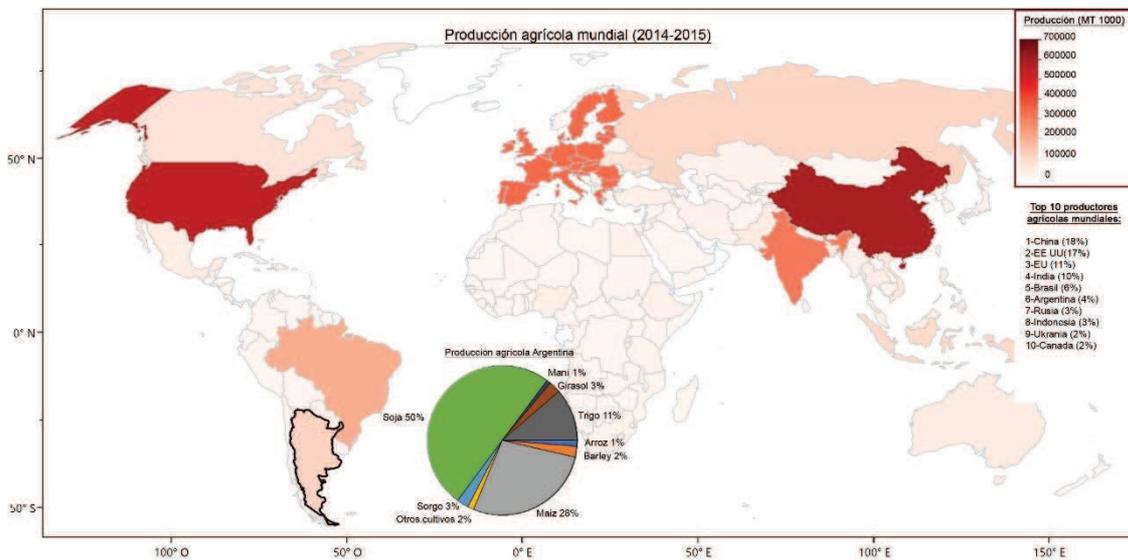


FIGURA 1 PRINCIPALES EXPORTADORES DE ALIMENTOS A NIVEL MUNDIAL. EL GRÁFICO DE TORTA DETALLA LOS PRINCIPALES PRODUCTOS AGRÍCOLAS ARGENTINOS (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE ESTADOS UNIDOS, USDA).

De acuerdo a datos públicos suministrados por el Ministerio de Agroindustria de Argentina ([datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones](http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones)), la superficie destinada a la siembra de soja en los municipios donde están ubicadas las lagunas muestreadas (Tabla 2) mostró una leve tendencia negativa entre los años que abarco este estudio (2015-2018). De manera inversa, la superficie destinada al cultivo de maíz creció en promedio un 52 % entre estos dos períodos.

**TABLA 2 ESTADÍSTICOS DE SUPERFICIE SEMBRADA CON LOS PRINCIPALES CULTIVOS DEPENDIENTES DE GLIFOSATO PARA LOS MUNICIPIOS MUESTREADOS. VI: VARIACIÓN INTERANUAL.**

<b>Campaña</b>	<b>Maíz (ha)</b>			<b>Soja (ha)</b>		
	Media	Suma	VI	Media	Suma	VI
<b>2013/14</b>	20.741	456.310	-	84.182	1.852.005	-
<b>2014/15</b>	20.181	444.000	-2,7	80.878	1.779.318	-3,9
<b>2015/16</b>	25.686	565.113	+27,3	79.882	1.757.413	-1,2
<b>2016/17</b>	29.721	653.870	+15,7	68.653	1.510.638	-14,0
<b>2017/18</b>	31.576	694.679	+6,2	63.632	1.399.920	-7,3

<http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>

## **REGIÓN PATAGÓNICA**

### **CARACTERÍSTICAS AMBIENTALES**

El muestreo norpatagónico se realizó en el año 2016 e incluyó lagunas de las provincias fitogeográficas del Monte en la Patagonia extra andina (departamentos de Zapala y Cullón Curá) y de la provincia Subantártica en el arco volcánico andino

(departamentos de Bariloche y Los lagos). En la Patagonia extra andina, la temperatura media anual ronda los 9 °C y la precipitación media anual es de 150 mm año<sup>-1</sup>. Se caracteriza por poseer un régimen de precipitaciones muy variable tanto interanualmente como entre estaciones. Por otro lado, la región andina posee un clima templado-frío con una temperatura media anual de 8 °C aproximadamente. Las precipitaciones superan los 800 mm año<sup>-1</sup> con una fuerte concentración en otoño e invierno. Numerosos lagos y valles de origen glacial salpican el paisaje de esta región.

### CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS

La principal actividad productiva en la región extra andina es la ganadería ovina sobre pasturas naturales, la cual, dada la gran variabilidad de las precipitaciones, se ve seriamente comprometida en años de sequía. Por otro lado, al sur, en Bariloche y alrededores, las actividades más relevantes son el turismo y la producción de fruta fina (frambuesa, grosella, arándano, rosa mosqueta, sauco). Cabe destacar que más de la mitad del territorio se encuentra protegido y bajo el control de la Administración de Parques Nacionales (PN Nahuel Huapi).

### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LAGUNAS**

Las lagunas pampeanas, presentan un perfil de “palangana”, poseen escasa profundidad, no poseen estratificación térmica, poseen circulación continua, su sedimento es diferente al suelo que le circunda y, finalmente, no poseen diferenciación entre la zona litoral y la zona central en cuanto a sus características físicas y químicas. Dentro del muestreo pampeano también incluimos al lago Chasicó (CS), el cuál posee

una profundidad superior a 10 metros, perfil en forma de “U”, y al Embalse Paso de las pierdas (PI) que posee una profundidad de 25 m, una capacidad de 330 hm<sup>3</sup> y abastece una población de ~360.000 habitantes. Los procesos formadores de estos cuerpos de agua son variables e incluyen: procesos eólicos (por ej. HG), eólicos-fluviales (por ej. GO, CA, Encadenadas de Chascomús), procesos litorales (por ej. MA2, SU), litorales-eólicos (por ej. SG, HR), tectónicos-fluviales-eólicos (por ej. CS, FS, FN y Encadenadas del oeste) y las de origen humano (por ej. PI). En Patagonia, las lagunas de la región extra andina, se ubican sobre planicies basálticas volcánicas y son un recurso de gran valor económico y ecológico para una región donde las precipitaciones son menores a 150 mm año<sup>-1</sup> (Mazzoni and Rabassa, 2007). Las lagunas del PN Laguna Blanca en el departamento de Zapala, comprenden la mayor cuenca lacustre endorreica en una región que es decididamente árida. Por otro lado, las lagunas en la región Andina tienen un origen glaciar y poseen gran importancia económica por su alto valor turístico (Figura 2).



**FIGURA 2 FOTOGRAFÍA DE LA LAGUNA BLANCA EN PATAGONIA (PANEL IZQUIERDO) Y LA LAGUNA LA TIGRA EN LA REGIÓN PAMPEANA (PANEL DERECHO). FOTOGRAFÍAS: HORACIO ZAGARESE.**

## COMPONENTES BIOLÓGICOS ANALIZADOS

La comunidad microbiana fue el componente biológico elegido para evaluar el efecto del glifosato en las lagunas. Por “comunidad microbiana” se hace referencia a la comunidad picoplanctónica, la cual está compuesta por organismos acuáticos de pequeño tamaño ( $< 2 \mu\text{m}$ ). Este grupo heterogéneo incluye: i) organismos autotróficos eucariotas (picoeucariotas) y ii) autotróficos procariotas (Pcy); iii) heterotróficos eucariotas (flagelados heterótrofos) y iv) heterotróficos procariotas (bacterias heterótrofas). Las comunidades microbianas son modelos excelentes para realizar evaluaciones a campo debido a su ciclo de vida corto, sus altas tasas de reproducción y su sensibilidad a los estresores.

*Picoplancton* Debido a su pequeño tamaño (de  $0,2$  a  $2 \mu\text{m}$ ) los primeros registros de este componente planctónico datan de mediados del siglo pasado (Rodhe, 1953) y no fue hasta 1978 que Sieburth acuñara el término *picoplancton* para referirse a estos, reemplazando así el término *ultrananoplancton* propuesto por Dussart (1965). Adicionalmente estableció otras tres categorías (aún vigentes) en un sistema con límites claros y definidos: el *femtoplacton* de  $0,02 - 0,2 \mu\text{m}$ ; el *nanoplancton* de  $2 - 20 \mu\text{m}$ ; y el *microplancton*, de  $20 - 200 \mu\text{m}$ . La división de organismos por tamaño, además de ser útil para realizar investigaciones en las tramas tróficas, permite prescindir de las jerarquías taxonómicas, lo cual, dependiendo del objetivo buscado, puede resultar una simplificación muy conveniente. Sin embargo, cabe mencionar, que el *picoplancton* (al igual que el *micro* y *nanoplancton*) es un grupo heterogéneo donde se encuentran organismos eucariotas y procariotas, heterótrofos y autótrofos. En este contexto, y en el marco de esta tesis, los grupos que se analizaron fueron: 1-Pcy, 2- *picoeucariotas*, 3- *bacterias heterótrofas*, y 4- *flagelados*.

1- *Pcy*. Organismos procariotas autótrofos de vida libre. En general, existe un consenso que las *Pcy* con pigmentos ricos en ficocianina dominan el picoplancton en sistemas eutróficos (como las lagunas pampeanas) mientras que las ricas en ficoeritrina dominan los cuerpos de agua oligotróficos y mesotróficos (Callieri y colaboradores, 2007; Schiaffino y colaboradores, 2013). Las *Pcy* pertenecen principalmente a los géneros *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanobium* y *Prochlorococcus*. Su distribución es cosmopolita, tanto de aguas continentales como oceánicas y son responsables de una gran proporción de la producción primaria global (Stockner, 1988; Waterbury y colaboradores, 1986). Dentro de este grupo se identificaron *Pcy* unicelulares (*UPcy*), *Pcy* en división (*+Pcy*), *Pcy* coloniales (*CPcy*) y *Pcy* filamentosas (*FPcy*).

2- *Picoeucariotas* (*Peuk*). Organismos eucariotas autótrofos de vida libre. Se los ha asociado como los organismos dominantes del picoplancton en cuerpos de agua cargados de nutrientes en los sistemas acuáticos en el hemisferio norte. Sin embargo, no parece ser el caso de las lagunas pampeana donde son ampliamente superados en número por las *Pcy* (Allende y colaboradores, 2009). Son, junto con estas, organismos clave en las tramas tróficas y contribuyen significativamente a la biomasa fitoplanctónica y a la producción primaria, tanto en cuerpos de agua continentales como marinos (Metz y colaboradores, 2019).

3- *Bacterias heterótrofas*. Organismos procariotas heterótrofos de vida libre (de ahora en más BH). Son organismos ubicuos, abundantes y de suma importancia en las tramas tróficas: (i) son fuente de alimento de amebas, coanoflagelados, dinoflagelados y ciliados; (ii) son responsables, en algunos ambientes acuáticos, de más de la mitad la captación de fosfato (Kirchman, 2000; Vadstein, 2000); y, (iii) junto con virus, hongos y protistas, son responsable del más del 90% de la utilización y degradación de materia orgánica en lagos y ríos (Wetzel, 2000). Sus formas suelen ser cocos, filamentos finos y bacilos.

4- *Flagelados heterótrofos*. Organismos eucariotas de vida libre (de ahora en más *FH*). Además de las formas no pigmentadas existen también las pigmentadas, los cuales pueden incluir autótrofos y mixótrofos. Se especula que estos últimos, junto con los *FH*, son los principales depredadores de picoplancton y BH (Nagata y colaboradores, 1994).

**CAPÍTULO 2: GLIFOSATO Y AMPA EN AMBIENTES  
NATURALES**

## RESUMEN DEL CAPITULO

El glifosato es un herbicida sistémico de amplio espectro utilizado para erradicar las malezas que compiten con los cultivos comerciales. En Argentina, el uso de herbicidas a base de glifosato aumentó considerablemente (~ 200.000 toneladas en 2012) con la introducción, en la década de 1990, de cultivos que le son tolerantes y la adopción del barbecho químico en las prácticas de labranza mínima, como la *siembra directa*. Las lagunas pampeanas podrían verse potencialmente afectados por el uso continuo de este herbicida en los sistemas agrícolas circundantes. Se muestrearon 52 lagunas pampeanas (provincia de Buenos Aires, Argentina) para evaluar la presencia y concentración de glifosato y su principal producto de degradación (AMPA). A modo comparativo, también se muestrearon 24 cuerpos de agua en un área donde la agricultura basada en el glifosato es inexistente (región norpatagónica). Mediante UPLC-MS / MS ESI ( $\pm$ ) se analizó la presencia de glifosato y AMPA en tres compartimientos: agua filtrada, sólidos totales en suspensión (STS) y sedimentos. En la región pampeana, se detectaron residuos de glifosato en más del 40% de las lagunas. Las detecciones positivas fueron más frecuentes en sedimentos y agua filtrada que en los STS. Las concentraciones medias (máximas) de glifosato fueron 2,11 (4,52)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para agua filtrada; 0,10 (0,13)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para STS y 10,47 (20,34)  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para sedimentos, respectivamente. Mientras que las concentraciones medias (máximas) de AMPA fueron 0,84 y (0,90)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para agua filtrada; 0,07 (0,07)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para STS; y 22,53 (32,89)  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para sedimentos. No se detectaron residuos de glifosato en ninguna de las muestras

de la región patagónica. Este es el primer estudio que informa sobre la presencia y las concentraciones del herbicida en los lagos de agua dulce de Argentina y Sudamérica<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Parte de estos resultados fueron publicados en Castro Berman M, Marino DJG, Quiroga MV, Zagarese E. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 2018; **200**:513–22.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este capítulo es estudiar los niveles de glifosato y AMPA (ácido aminometilfosfónico), en distintos compartimentos ambientales de dos regiones contrastantes en cuanto al uso del herbicida: Pampa y Patagonia.

### **Objetivos específicos**

- 1- Determinar las concentraciones de estos analitos en lagos Pampeanos y Patagónicos en tres compartimentos ambientales: agua filtrada, sólidos totales en suspensión (STS) y sedimentos lacunares.
- 2- Relacionar las concentraciones del herbicida con los descriptores de uso y cobertura del suelo y las variables ambientales.
- 3- Establecer la distribución espacial de las detecciones de herbicida.
- 4- Interpretar los resultados obtenidos en este estudio en relación a: i) las concentraciones reportadas en la bibliografía para otros ambientes, ii) los niveles guía de calidad de agua y, iii) las concentraciones nocivas para la biota y la salud humana.

## INTRODUCCIÓN

El glifosato es el principio activo de una serie de herbicidas no selectivos de amplio espectro. Los herbicidas basados en glifosato (HBG) se aplican sobre cultivos de invierno y de verano, y también durante el período de barbecho (Johnson y colaboradores, 2002; Pérez y colaboradores, 2017). Aunque inicialmente se adoptaron para la erradicación de malezas no deseadas, no es raro su uso como desecantes en cultivos de cereales y oleaginosas (Cuhra y colaboradores, 2016; Monsanto s.f). Además de su uso en agricultura y silvicultura, son utilizados para el mantenimiento de espacios públicos en el ejido urbano (parques, jardines) y para el control de malezas acuáticas (Held y colaboradores, 2016; Kogan and Alister, 2010; Tasker, 1995). De hecho, la presencia ubicua de glifosato en aguas servidas se ha interpretado como un indicio de que el uso no agrícolas puede contribuir sustancialmente a la contaminación de las aguas superficiales (Poiger y colaboradores, 2017).

En Argentina, existen al menos 20 empresas que comercializan más de 65 tipos diferentes de HBG (Figura 3; <https://www.mercosur.com/es/precios-de-agroquimicos-herbicidas-glifosato/>). Durante más de cuatro décadas los formulados a base de glifosato se han utilizado en el sector agropecuario, y actualmente son uno de los principales activos en el mercado mundial de fitosanitarios. Los formulados solubles poseen la sal de glifosato en una concentración equivalente del 48 al 68 % y coadyuvantes como los surfactantes (como la Polioxietil Amina, POEA) que mejoran la absorción y la translocación del principio activo en las plantas. El formulado comercial más conocido con POEA es el Roundup®. Se ha reportado que estos coadyuvantes podrían tener una mayor toxicidad que el principio activo, pero debido a que muchos de estos no se encuentran declarados y son considerados secreto de la marca las evaluaciones toxicológicas y ecotoxicológicas son limitadas (Baier et al., 2016).



FIGURA 3 ILUSTRACIÓN DE ALGUNOS DE LOS HBG MÁS POPULARES

La actividad agrícola Argentina a principios de la década de 1990 pudo revertir la tendencia productiva negativa que había tenido durante una buena parte del siglo 20. Entre los factores que favorecieron este cambio, cabe destacar tanto las reformas estructurales y de política económica (privatizaciones, eliminación de impuestos a las exportaciones, reducción de tarifas a las importaciones y apertura económica) como la rápida adopción de innovaciones tecnológicas (cultivos genéticamente modificados y

prácticas de labranza mínima) (Casal, 2009). Entre estas innovaciones, la “soja 40-3-2” tolerante a glifosato, conocida como soja Roundup Ready, fue el primero de muchos eventos de modificación genética aprobados para su comercialización. Desde entonces, el Ministerio de Agroindustria y la Comisión Nacional de Biotecnología Agrícola (CONABIA, <https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/biotecnologia/conabia/>) han autorizado la comercialización de nuevas variedades de cultivos tolerantes a glifosato (TG) (Tabla 3).

**TABLA 3 EVENTOS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA APROBADOS PARA SU COMERCIALIZACIÓN EN LA ARGENTINA.**

<b>Cultivo</b>	<b>Eventos de transformación totales aprobados</b>	<b>Eventos que involucran tolerancia a glifosato (TG)</b>	<b>Primer evento aprobado (Año) que involucra TG</b>	<b>Solicitante del primer evento aprobado</b>
<b>Soja</b>	16	10	40-3-2(1996)	Nidera S.A.
<b>Maíz</b>	30	20	176(1998)	Ciba-Geigy S.A.
<b>Algodón</b>	5	4	MON531(1998)	Monsanto Argentina S.A.I.C.
<b>Alfalfa</b>	1	1	MON-ØØ179-5 (2018)	Inderar
<b>Papa</b>	2	0	TIC-AR233-5 (2015)	Tecnoplant S.A.

Actualmente, la producción agrícola en Argentina (y en el mundo) está basada, en buena medida, en un paquete tecnológico que combina prácticas de labranza mínima (p. ej. *siembra directa*) y glifosato, para la producción de cultivos transgénicos que le son tolerantes, principalmente, soja, maíz, algodón y recientemente alfalfa. Los cuales, se estima que durante la campaña 2014-2015 ocuparon casi el 70% de la superficie cultivada total de Argentina (>25 millones de ha, <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/>; Figura 4).

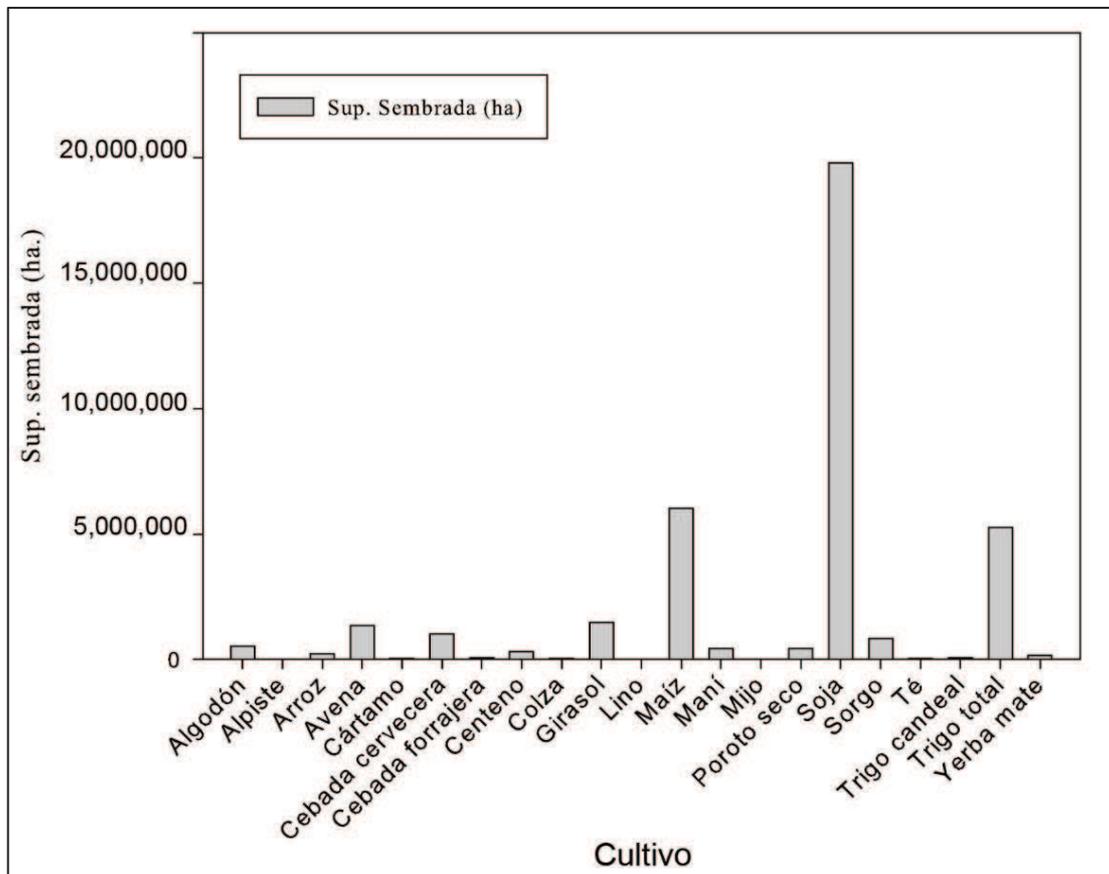


FIGURA 4 PRINCIPALES CULTIVOS SEMBRADOS (HA.) DURANTE LA COSECHA 2014-2015 ([HTTP://DATOSESTIMACIONES.MAGYP.GOB.AR/REPORTES.PHP?REPORTE=ESTIMACIONES](http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=estimaciones)).

Debido a estos factores, el uso de glifosato en Argentina ha aumentado dramáticamente desde su introducción, alcanzando aproximadamente las 200.000

toneladas en 2012 (CASAFE, 2012). Si bien se ha observado una tendencia negativa de los volúmenes de glifosato en la balanza comercial (Tabla 4), el glifosato sigue siendo un producto clave, representando el 80% del total de herbicidas comercializados en el país (www.ciafa.org.ar; CASAFE, 2012; Primost y colaboradores, 2017). Además de la abrumadora adopción de las prácticas de siembra directa, el consumo de glifosato se vio favorecido por la caducidad de su patente en el año 2000, provocando una caída en su precio y un aumento del número de fabricantes de HBG.

**TABLA 4 EXPORTACIONES E IMPORTACIONES DE GLIFOSATO Y DE FITOTERÁPICOS TOTALES EN ARGENTINA (WWW.CIAFA.ORG.AR).**

<b>Año</b>		<b>Importación glifosato</b>	<b>Exportación glifosato</b>	<b>Total, importación agroquímicos</b>	<b>Total, exportación agroquímicos</b>
<b>2014</b>	Ton	83.566.244	66.617.608	282.558	92.805.600
	U\$S	446.945.199	240.503.167	1.805.195.007	468.659.260
<b>2015</b>	Ton	62.123.880	51.688.324	262.353	77.564.816
	U\$S	249.647.191	161.808.975	1.643.716.960	455.993.097
<b>2016</b>	Ton	62.900.400	37.661.579	252.365	65.065.812
	U\$S	203.705.066	128.241.039	1.473.928.654	335.007.152
<b>2017</b>	Ton	53.969.321	27.501.708	278.486	48.708.627
	U\$S	184.594.554	94.902.234	1.611.297.149	271.562.787

*Modo de acción.* El glifosato inhibe la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una enzima de la vía del ácido shikímico responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). Sin embargo, la forma en que la inhibición por glifosato del ácido shikímico produce la muerte de la planta no se

conoce con certeza. Se argumenta que se compromete la síntesis de proteínas necesarias para el desarrollo y crecimiento de la planta (Figura 5), aunque también, hay evidencia que señala que al inhibir la EPSPS, se producen alteraciones en el flujo de carbono de la planta, lo que ocasiona una escasez de este nutriente para otras rutas metabólicas esenciales (Siehl, 1997).

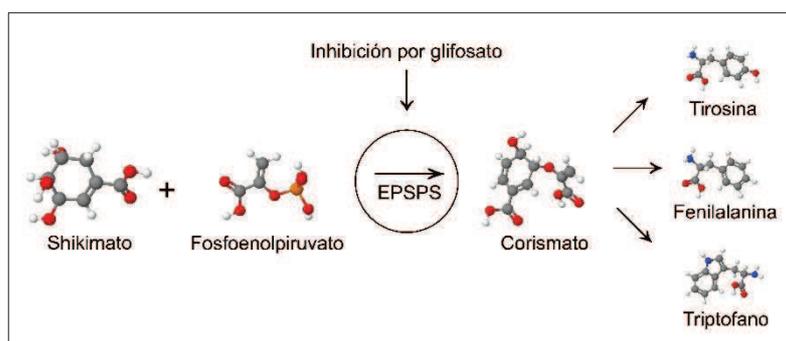


FIGURA 5 MODO DE ACCIÓN DEL GLIFOSATO

*Degradación ambiental.* En condiciones de campo, el glifosato se degrada, principalmente, a través de la actividad microbiana, dando como productos agua, CO<sub>2</sub> y fosfato (Figura 6). El primer paso en la ruta de degradación, es la escisión en glioxilato y en ácido aminometilfosfónico (AMPA). En ausencia de fosfato, se ha visto también su degradación a sarcosina y fosfato inorgánico (Pipke y colaboradores, 1987). Los mecanismos abióticos, tales como la fotólisis y/o hidrólisis, contribuyen muy poco a su degradación (Sprankle y colaboradores, 1975a). Las distintas características ambientales de los ecosistemas (temperatura, contenido de nutrientes, de materia orgánica y de ciertos metales), influyen sobre las comunidades microbianas, afectando así la tasa de degradación de los compuestos. Por otro lado, el glifosato, se adsorbe a óxidos de hierro y aluminio que inmovilizan la molécula y evitan su mineralización. Cambios en óxido-reducción pueden generar liberación de moléculas adsorbidas. Con

estas cuestiones en mente, no resulta extraño que los estudios sobre la vida media del glifosato reporten variaciones de 2 a 215 días en suelos y de 2 a 91 días en aguas superficiales. Por otro lado, el AMPA tiene una vida media más larga en suelos (60 a 240 días) y una vida media en agua comparable a la del glifosato (Battaglin y colaboradores, 2014).

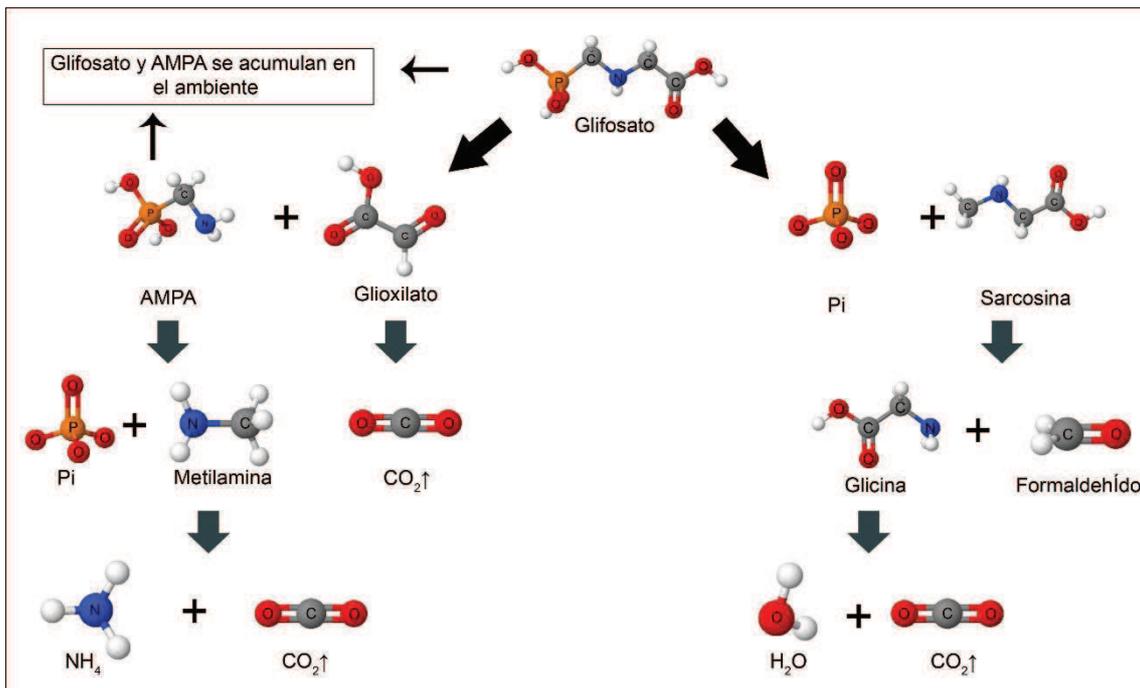


FIGURA 6 PRINCIPALES RUTAS DE DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO (ADAPTADO DE GIESY ET AL., 2000).

Hay cada vez más evidencia sobre los efectos tóxicos agudos y crónicos del glifosato y los HBG en diferentes organismos (microorganismos, algas, invertebrados, peces, anfibios y aves) (Pérez y colaboradores, 2011 y las referencias allí citadas). Sin embargo, las concentraciones de glifosato utilizadas en los experimentos de ecotoxicológicos, suelen encontrarse varios órdenes de magnitud por encima de las concentraciones cuantificadas en el ambiente, aunque estas diferencias pueden

deberse a la degradación entre el evento de contaminación y la toma de muestras. A pesar de la necesidad de identificar y cuantificar de forma precisa al glifosato y sus residuos, una serie de inconvenientes metodológicos (por ejemplo la necesidad de personal especializado, equipos costosos, uso de productos químicos caros y peligrosos; Annett y colaboradores, 2014) plantean serias restricciones a las evaluaciones ambientales rutinarias. Más aun, en condiciones de campo, tanto la probabilidad de detección de glifosato y AMPA, como su cuantificación, están influenciadas por una serie de factores que van más allá del control del investigador, tales como la fuente de contaminación (urbanas y/o agrícolas), la variación espacial y temporal en su uso, la hidrología, la dinámica y las tasas de degradación microbiana y las rutas por las que se moviliza en el ambiente (Coupe y colaboradores, 2012). Como resultado, las evaluaciones rutinarias de glifosato y AMPA en el ambiente, y particularmente en los lagos y lagunas, son escasas y para la mayor parte del mundo prácticamente inexistentes (pero ver McMurry y colaboradores, 2016),.

Más del 75% del área cultivada y la producción de oleaginosas y cereales en Argentina, se ubica en tres provincias (Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires), que en conjunto ocupan una gran proporción de los pastizales pampeanos de América del Sur (Figura 7, Ministerio de Agroindustria). Esta gran región (> 600.000 km<sup>2</sup>), alberga uno de los humedales más extensos de Sudamérica (Diovisalvi y colaboradores, 2015). Numerosos lagos permanentes y semipermanentes ocupan las tierras bajas del paisaje pampeano. Estos lagos poco profundos (localmente llamados "lagunas"), son típicamente polimícticos, eutróficos y poseen un tiempo de residencia altamente variable (Quirós, 2005). Los lagunas son ecosistemas sensibles que amortiguan los efectos negativos de las perturbaciones ambientales y antrópicas en la cuenca (Adrian y colaboradores, 2009; Williamson y colaboradores, 2014, 2009). Debido al proceso continuo de intensificación de la actividad agrícola en la región (Quirós y colaboradores, 2006), muchas de las lagunas pampeanas podrían ser susceptibles a la contaminación

por pesticidas. Las rutas de transporte más comunes incluyen: escorrentía superficial, lixiviación, rociado directo y deriva atmosférica (Annett y colaboradores, 2014). Se ha reportado la presencia de glifosato y AMPA en el agua y los sedimentos de arroyos rurales y suburbanos en las provincias de Buenos Aires (Aparicio y colaboradores, 2013; Lupi y colaboradores, 2015; Mac Loughlin y colaboradores, 2017), Santa Fe (Río Paraná; Ronco y colaboradores, 2016) y Córdoba (Bonansea y colaboradores, 2017). Sin embargo, la presencia de estos compuestos en ambientes lénticos (es decir, lagos, lagunas y/o embalses) era hasta la publicación de esta tesis un misterio.

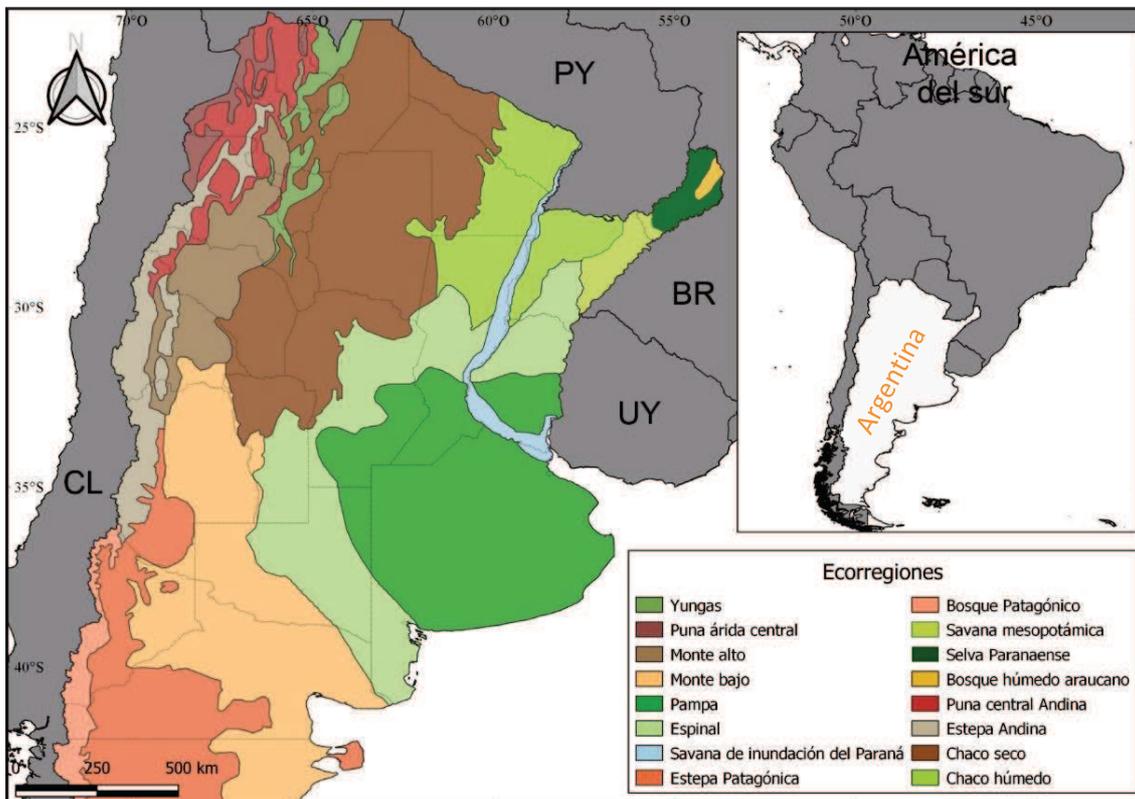


FIGURA 7 ECORREGIONES TERRESTRES DE LA REPÚBLICA ARGENTINA (FUENTE: WWF).

El objetivo de este capítulo es determinar la presencia y la concentración de glifosato y AMPA en el agua, los sedimentos lacunares y el material particulado en

suspensión (STS) de las lagunas pampeanas y patagónicas. Las lagunas patagónicas fueron seleccionadas porque se encuentran inmersas en áreas sin uso agrícola de HBG, aunque no se podrían descartar otros usos (es decir, control de malezas en carreteras y ferrocarriles, jardinería y control de malezas en áreas residenciales, parques, campos de golf, etc.). Las concentraciones residuales de herbicida se analizaron en relación con las variables limnológicas y los descriptores de uso y cobertura del suelo del área circundante a las lagunas. No existe información previa sobre los niveles de glifosato y AMPA para este tipo de cuerpos de agua en América del Sur.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MUESTREO**

Se tomaron muestras de cincuenta y dos lagunas pampeanas dentro de la provincia de Buenos Aires, para evaluar la presencia y las concentraciones de glifosato y AMPA. Las lagunas fueron seleccionadas en función de su relevancia social (agua potable), cultural (recreativa), económica (turismo, riego de tierras de cultivo), ambiental (biodiversidad) y científica (estudios sobre dinámica de nutrientes, estados alternativos de turbidez, poblacionales, etc.). Se realizaron seis campañas de muestreo, entre el 14 de septiembre y el 2 de diciembre de 2015 (es decir, durante la primavera). Aunque el glifosato se usa durante todo el año con diferentes propósitos, al focalizar el muestreo de campo en primavera, el objetivo fue maximizar las posibilidades de detección del herbicidas: el glifosato se usa como un componente importante para el barbecho químico en el período previo a la siembra de cultivos de verano (INTA, 1997a, 1997b, 1997c), como desecante para la precosecha en cultivos de invierno como el trigo y la cebada (AHDB-HGCA, 2008; Monsanto, s.f.) y como un herbicida no selectivo sobre

cultivos que le son tolerantes, principalmente soja y maíz (Tabla 5). Además, se muestrearon 24 lagunas ubicadas en áreas no agrícolas de la región norte de la Patagonia durante la primavera de 2016 en las provincias de Neuquén y Río Negro (Figura 8).

**TABLA 5 CALENDARIO DE SIEMBRA PARA CULTIVOS DE VERANO PARA LOS PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES MUNDIALES.**

País	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
EE UU												
Argentina												
Brasil												
China												
Cosecha												
Siembra												

Calendario propuesto por The Agricultural Market Information System (AMIS, [www.amis-outlook.org/](http://www.amis-outlook.org/)).

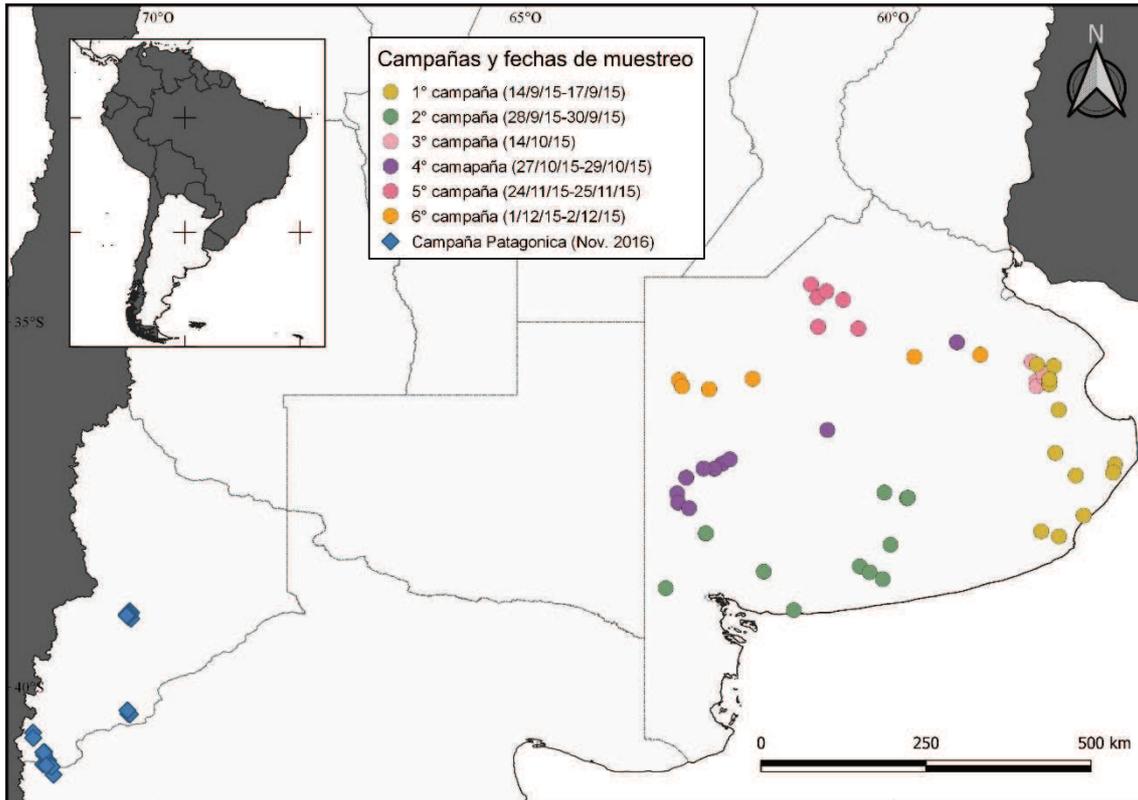


FIGURA 8 MAPA DEL ÁREA DE ESTUDIO MOSTRANDO LA DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LOS SITIOS DE MUESTREO PARA LA REGIÓN PAMPEANA Y PATAGÓNICA. PANEL: UBICACIÓN EN SUDAMÉRICA.

Los parámetros físicos y químicos como la temperatura del agua, el pH (pHmetro de Orión), la conductividad (conductímetro de Hach), la concentración de oxígeno disuelto (OD; medidor de YSI 5000), la turbidez (turbidímetro de Hach 2100 P) y la profundidad del disco Secchi se midieron *in situ*. Los sitios de muestreo típicamente tenían ~ 1,5 m de profundidad. Se seleccionó un punto de muestreo por laguna y las muestras fueron tomadas lo más lejos posible de la costa. La posición geográfica se registró satelitalmente por GPS (Garmin, U.S.A.). Se tomaron muestras de agua subsuperficiales para la determinación física, química y biológica de cada laguna. Las muestras para las determinaciones de herbicidas se recolectaron en simultaneo con las muestras para las otras determinaciones, y se almacenaron hasta su posterior análisis de acuerdo a metodologías estandarizadas. Se analizaron tres compartimentos

ambientales para la determinación de glifosato y AMPA: fracción disuelta (es decir, agua filtrada), partículas suspendidas -STS- (filtros Whatman GF/F) y sedimentos (APHA, 2012; Iwatsubo and Groat, 1999). Asimismo, también se analizaron las fracciones disueltas y particulada de los nutrientes principales (fosforo, nitrógeno y carbono).

## **ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS**

Una vez en el laboratorio, las muestras se analizaron siguiendo los métodos descritos en APHA (1992). La concentración de los sólidos totales en suspensión (STS, *seston*) se estimó a partir del filtrado de volúmenes conocidos de agua por filtros GF/F (Whatman) previamente secados y tarados. Estos filtros fueron secados hasta alcanzar un peso constante en horno (103-105 °C; método 2540D). La determinación se calculó como la diferencia entre el peso del residuo retenido en el filtro y el peso del filtro previo al filtrado.

El residuo del método 2540D fue calcinado a 530 °C, hasta alcanzar un peso constante (~3 horas), para estimar el peso seco libre de cenizas (PSLC), y por diferencia el contenido de materia orgánica. Los sólidos retenidos en el filtro representan las partículas en suspensión mientras que el peso perdido representa los *sólidos volátiles* (método 2540E).

La concentración de fósforo total (FT, agua sin filtrar) y fósforo disuelto total (FDT, agua filtrada por filtros Whatman GF/F) fue estimada por el método del ácido ascórbico, previa digestión ácida (método 4500-P-E). Las concentraciones de nitrógeno orgánico total (NOT, agua no filtrada) y nitrógeno orgánico disuelto total (NODT, agua filtrada por filtros Whatman GF/F) se estimaron por el método semi (Pro-Nitro S) micro (Ø 26 mm) Kjeldahl (método 4500-Norg-C). La concentración de clorofila-a (*Cl-a*) se

estimó por el método de espectrofotometría monocromática, previa extracción con metanol, con las correcciones necesarias para descartar la sobreestimación por feopigmentos (Lopretto & Tell, 1995). El carbono orgánico disuelto (COD) se midió con un analizador de alta temperatura Shimadzu TOC-L (agua filtrada por filtros Whatman GF/F). La concentración media de COD resultante de cada medición COD corresponde al promedio de 2-4 inyecciones de 400  $\mu$ L (coeficiente de variación (CV) <2%).

### **ANÁLISIS DE GLIFOSATO Y AMPA**

Los análisis para la detección y cuantificación de glifosato y su metabolito ambiente (AMPA) se realizaron por cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas (HPLC-MS) luego de derivatizar con cloruro de 9-fluorenilmetoxilcarbonilo (FMOC-CL; Sancho y colaboradores, 1996) en el Centro de Investigaciones del Medioambiente (UNLP-CONICET).

### **REACTIVOS Y SOLVENTES**

Los experimentos se llevaron a cabo con diclorometano de grado pesticidas (DCM,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetonitrilo (ACN,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , grado HPLC) y metanol (MeOH,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , grado HPLC) de J. T. Baker (EE. UU.). El 9-fluorenilmetil cloro formiato (FMOC-Cl,  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$ , pureza 97%) para la derivatización por HPLC, los patrones de glifosato (96%), AMPA (99%) y glifosato marcado isotópicamente (pureza 99% de  $^{13}\text{C}$  y 98% pureza de  $^{15}\text{N}$ ) fueron adquiridos en Sigma Al-Drich (St. Louis, MO, EUA). El fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), el tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) y el acetato de amonio ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ; pureza 98,6 %) se obtuvieron en Merck (todos de grado analítico;

Darmstadt, F.R. Alemania). Se usó un sistema de purificación de agua Sartorius Arium (Sartorius AG, Göttingen, Países Bajos) para obtener agua nanopura.

## **ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de sedimento húmedo fueron homogeneizadas y se transfirieron alícuotas de 5,0 g a tubos tipo Falcon <sup>TM</sup> de 50 mL (Ibáñez y colaboradores, 2005) mientras que los filtros para la determinaciones en los sólidos totales en suspensión (STS) fueron secados y transferidos a tubos tipo Falcon <sup>TM</sup> de 15 mL. Las muestras de agua fueron descongelas y homogeneizadas por agitación. Una alícuota de 1 mL de las mismas fue transferida a tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf <sup>TM</sup> de 5 mL.

## **EXTRACCIÓN DE MUESTRAS EN SOLUCIÓN BORATO/FOSFATO DE SEDIMENTO Y STS**

Las muestras de material en suspensión (STS) y sedimentos (matriz sólida) se extrajeron con una solución de  $K_2PO_4$  (0,1 mM) y  $Na_2B_4O_7$ . Esta solución lleva a la matriz sólida a un pH adecuado (pH 9) para el posterior paso de derivatización, favoreciendo los equilibrios de desplazamiento desde estos compartimentos hacia la solución (Hance, 1976; Sprankle y colaboradores, 1975b). Las muestras de sedimento se extrajeron mediante la adición de 25 mL de solución extractante (relación 1:5 sólido/extractante), mientras que las muestras de STS se extrajeron agregando 3 mL de solución de fosfato en tubos de polipropileno de 15 mL. Ambos sistemas se sonicaron por 2 ciclos, con agitación manual en los intervalos y posterior centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm (Miles and Anson Moye, 1988).

### **AGREGADO DE GLIFOSATO MARCADO**

Previo al paso de extracción se agregó a cada uno de los tres sistemas un trazador interno de glifosato marcado isotópicamente  $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$ , pureza 99%  $^{13}\text{C}$ , 98%  $^{15}\text{N}$ , marca Aldrich (Primost, 2013). De esta forma, se agregaron  $10\ \mu\text{L}$  ( $1\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) de este estándar marcado a  $1\ \text{mL}$  de esta matriz acuosa de las muestras de agua filtrada;  $100\ \mu\text{L}$  ( $20\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) a la matriz sólida de las muestras de sedimento; finalmente, se añadieron  $60\ \mu\text{L}$  de marcado ( $1\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) a la matriz sólida de las muestras de STS.

### **DERIVATIZACIÓN DE GLIFOSATO Y AMPA**

Para lograr la derivatización de los analitos, se pipeteó  $1\ \text{mL}$  de sobrenadante de cada tipo muestra en tubos tipo Falcon™ de  $15\ \text{mL}$ . El pH de las muestras de agua filtrada fue ajustado añadiendo  $50\ \mu\text{L}$  ( $40\ \text{mM}$ ) de tetraborato de sodio (pH 9) seguido de  $1\ \text{mL}$  de solución de derivatización de FMOC-CL en acetonitrilo ( $1\ \text{mg mL}^{-1}$ ). Puesto que el pH de las muestras de STS y sedimentos ya había sido ajustado con la adición de la solución extractante, se prosiguió inmediatamente a la adición de la solución de derivatización de FMOC-CL. Los tres sistemas (agua filtrada, sedimento y STS) se mantuvieron durante la noche en oscuridad y a temperatura ambiente (aprox. 12 hs; Ibáñez y colaboradores, 2005). Las muestras derivatizadas fueron purificadas con  $3\ \text{ml}$  de diclorometano (relación 1:2) y centrifugados durante 10 minutos a  $3.000\ \text{rpm}$  para favorecer la separación entre la fase orgánica (inferior) y acuosa (superior). Esta última fue recogida en tubos tipo Eppendorf™ de  $2\ \text{mL}$ , para su posterior análisis instrumental.

## **ANÁLISIS INSTRUMENTAL**

Luego de la derivatización, la fase acuosa fue inyectada en el equipo de LC-ESI-MS/MS para su determinación por HPLC-MS. Se utilizó un modelo de cromatografía líquida Agilent 1100 para la detección y cuantificación de GLI + AMPA, con una fuente de ionización electrospray operando en modo negativo, acoplado a un espectrómetro de masas de cuádruplo único VL, modelo Agilent (Agilent Technologies Inc., Miami, FL, EUA). Para la separación cromatográfica de los analitos se utilizó en una columna C18 X-SELECT™ (75 mm × 4,6 mm y tamaño de poro de 3 mm, de Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.), utilizando como fase móvil un gradiente de metanol (fase orgánica) y de agua nanopura, acondicionados con acetato de amonio como aditivo de ionización, de acuerdo con la metodología descrita por Ronco y colaboradores (2016).

## **VALIDACIÓN DEL MÉTODO**

Tanto el glifosato como el AMPA se cuantificaron por medio de una curva de calibración externa de 0 a 200  $\mu\text{L}^{-1}$  y a través de la medición del área bajo los picos cromatográficos, después de considerar la dilución efectuada en cada una de las tres matrices (agua filtrada, STS y sedimentos) y la recuperación de cada compuesto. Se utilizó el software Aligment ChemStation LC-MSD (Rev.10A.02) para la operación del sistema.

Los controles de calidad para glifosato y AMPA se aseguraron mediante el uso de duplicados, blancos y material de referencia certificado tanto en los instrumentos como en los procedimientos (Ich, 2005). Los límites de linealidad, reproducibilidad, precisión, límites de detección y cuantificación (DL y QL), el efecto de la matriz y la

recuperación se probaron en consecuencia (SANTE/EU, 2015). Se analizó el glifosato y su metabolito ambiental, AMPA. Los límites de linealidad, precisión, detección y cuantificación (DL y QL) fueron aceptables y de acuerdo a la validación metodológica de Ronco y colaboradores (2016).

Cuando la concentración de glifosato estuvo por debajo del límite de detección, se estableció en cero, cuando se encontraba entre el límite de detección y de cuantificación, se reemplazó con el valor del límite de detección. El GLI + AMPA se calculó como la suma de las concentraciones de glifosato y AMPA para cada compartimento. El porcentaje de AMPA (% de AMPA) se calculó como el porcentaje de concentración de AMPA en la concentración total de GLI + AMPA en cada compartimento.

### **CARACTERIZACIÓN DE USO DE SUELO Y COBERTURA**

Se desarrolló una clasificación de cobertura terrestre basada en una serie temporal de 24 imágenes IVM (Índice de vegetación mejorado; Huete y colaboradores, 2011) del sensor MOD13-Terra MOD13Q1 V006 abarcando el período de enero de 2015 a enero de 2016 para la región pampeana. Las lagunas patagónicas se encuentran inafectadas por la actividad agrícola, ya que se encuentran dentro de la jurisdicción de Parques Nacionales o rodeadas por terrenos que se han dedicado a la cría extensiva de ganado ovino y caprino por más de 100 años (Bisigato et al., 2016; Gaitán et al., 2011). Cada imagen IVM fue seleccionada por ser la mejor dentro de un compuesto de 16 días cercanos a la fecha de muestreo. Se eligió el tamaño de pixel de 250 m por ser la resolución espacial más detallada. Se realizó un agrupamiento 7 clases utilizando el algoritmo de la Técnica de análisis de datos autoorganizado iterativo (ISODATA; Ball and Hall, 1967; Biehl and Landgrebe, 2002). Se interpretó la marca de tiempo de IVM

de cada clase por medio de observaciones de paisaje a través de Google Earth (<https://www.google.com/earth/>) y se le asignó una clase de cobertura de la tierra / uso de la tierra (de ahora en más: uso de suelo). Las clases iniciales se reagruparon en: otros cultivos, doble cultivo, cultivos de verano, pasturas implantadas, pastizales naturales, humedales y agua. Las áreas urbanas se agregaron como una máscara del producto MODIS “Tipo de cobertura de suelo” (MCD12Q1, Tipo de cobertura de suelo = 3). Los polígonos de las lagunas se extrajeron del archivo de forma vectorial “Cuerpos de Agua” publicado por el Instituto Geográfico Nacional (<http://www.ign.gob.ar/sig#descargas>), y se definió un área de 5 km de diámetro alrededor de cada laguna estudiado. De esta área se extrajeron los datos de uso de suelo y cobertura. La cantidad de píxeles de la clase se convirtieron a porcentajes para el análisis estadístico de los datos. El procesamiento de imágenes se realizó con el software MultiSpecW32 (<http://engineering.purdue.edu/~biehl/MultiSpec/>); QGIS (<http://www.qgis.org>) y R (<https://cran.r-project.org/>), se utilizaron para el procesamiento de SIG y la organización de los datos de atributos de los lagos.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Se realizaron correlaciones no paramétricas de Spearman para relacionar los niveles de herbicida detectados con las variables ambientales consideradas (geográficas, morfométricas, limnológicas y descriptores de uso y cobertura del suelo). Se investigó la relación entre la concentración de GLI + AMPA en sedimentos (para valores distintos de cero) frente al área del lago (log 10 transformada) mediante regresión lineal. La distribución normal de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS Y LIMNOLÓGICAS DE LAS LAGUNAS

*Morfometría.* Las lagunas incluidas en este estudio, abarcaron un importante abanico de tamaños desde 0,12 km<sup>2</sup> a más de 100 km<sup>2</sup>. Las lagunas Patagónicas presentaron un área menor a 5 km<sup>2</sup> siendo la excepción BL (17 km<sup>2</sup>; figura 9). La distribución del área de las lagunas Pampeanas fue un poco más variable, aunque la mayoría presentó un área menor a 10 km<sup>2</sup> (Figura 10).

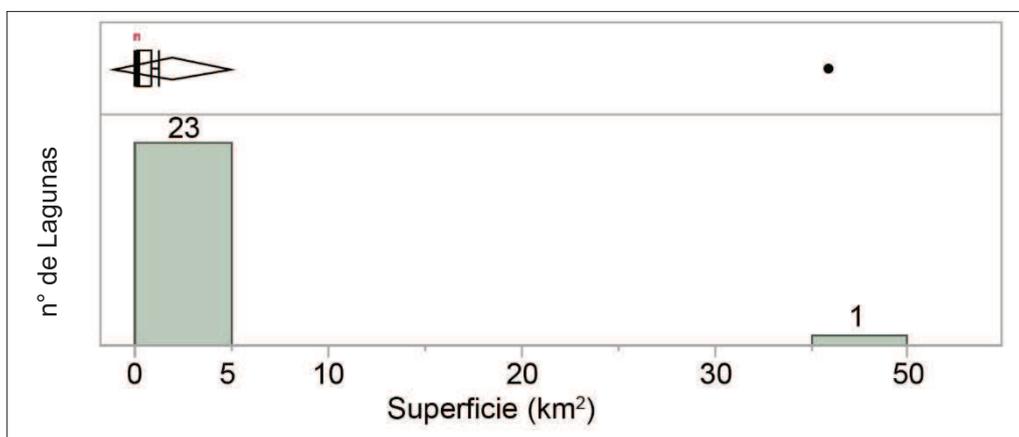


FIGURA 9 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE LAS LAGUNAS MUESTREADAS EN LA REGIÓN PATAGÓNICA. ENCIMA DE LAS BARRAS SE MUESTRA EL NÚMERO DE LAGUNAS. PANEL SUPERIOR: BOX-PLOT DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS LAGUNAS DE ACUERDO A SU SUPERFICIE.

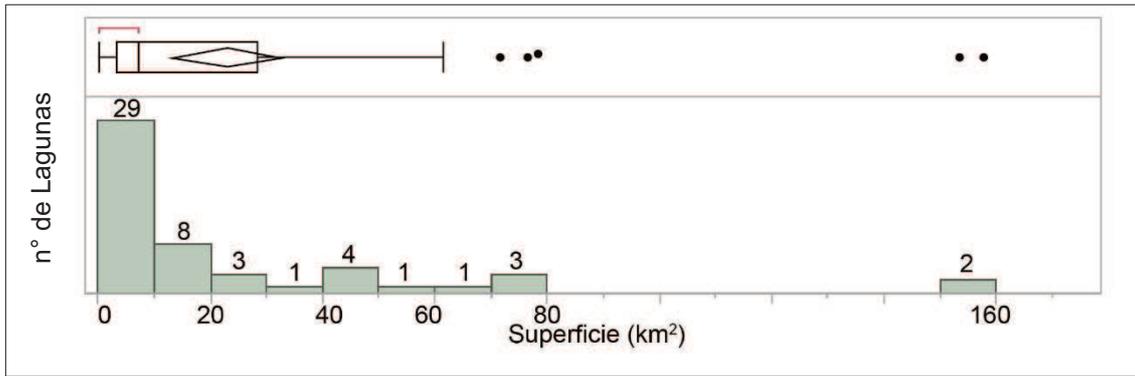


FIGURA 10 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE LAS LAGUNAS MUESTREADAS EN LA REGIÓN PAMPEANA. ENCIMA DE LAS BARRAS SE MUESTRA EL NÚMERO DE LAGUNAS. PANEL SUPERIOR: BOX-PLOT DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS LAGUNAS DE ACUERDO A SU SUPERFICIE.

*Estado trófico.* De acuerdo al Índice de Estado Trófico (TSI) propuesto por Carlson (1977) para los niveles de fósforo total (FT) y clorofila-*a* (Cl-*a*) la mayor parte de las lagunas resultaron eutróficas de acuerdo a los cálculos realizados a partir de los niveles de fósforo ( $TSI_{FT}=62\%$ ) y clorofila-*a* ( $TSI_{Cl-a}=42\%$ ) o mesotróficas ( $TSI_{FT}=22\%$ ;  $TSI_{Cl-a}=53\%$ ), y una pequeña proporción de las lagunas resultaron hipereutróficas (16%  $TSI_{FT}$ ; 3%  $TSI_{Cl-a}$ ) u oligotróficas (1%  $TSI_{Cl-a}$ ). La mayoría de las lagunas pampeanas presentaron un estado eutrófico ( $TSI_{FT}$  77%; 58%  $TSI_{Cl-a}$ ) mientras que la mayoría de las lagunas Patagónicas presentaron un estado mesotrófico ( $TSI_{FT}$  67%; 95%  $TSI_{Cl-a}$ ) (Tabla 6).

TABLA 6 ÍNDICE DE ESTADO TRÓFICO (TSI) PARA LAS LAGUNAS PAMPEANAS Y PATAGÓNICAS CALCULADOS A PARTIR DE SU CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO TOTAL Y CLOROFILA-A.

Región	TSI	Oligotrófico	Mesotrófico	Eutrófico	Hipereutrófico
Pampa (n=52)	$TSI_{FT}$	-	2%	77%	21%
	$TSI_{Cl-a}$	2%	37%	58%	4%

<b>Patagonia</b>	TSI <sub>FT</sub>	-	67%	29%	4%
<b>(n=24)</b>	TSI <sub>Cl-a</sub>	-	95%	5%	-

Calculado a partir de la ecuación de Carlson (1977) con las modificaciones sugeridas por Aizaki (1981).

*Variables físicas y químicas.* Todas las lagunas estuvieron bien oxigenadas al momento del muestreo ( $DO > 5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y registraron valores alcalinos de pH (excepto por un humedal patagónico). La temperatura media del agua fue de  $18,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para las lagunas pampeanas y de  $16,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para las patagónicas. La mayoría de las variables limnológicas mostraron rangos superpuestos para ambos conjuntos de datos. Sin embargo, los valores máximos de *Cl-a*, nitrógeno orgánico total, fósforo orgánico total y carbono orgánico disuelto fueron un orden de magnitud más altos en los lagos pampeanos (Tabla 7). Dentro de la región pampeana, se observaron rangos similares de variables físicas y químicas para las siete cuencas analizadas.

**TABLA 7 VALORES MEDIOS ( $\bar{x}$ ), DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE) Y RANGO (MÁXIMO Y MÍNIMO) DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS ESTIMADOS PARA LAS LAGUNAS DE LAS CAMPAÑAS PAMPEANAS Y PATAGÓNICAS.**

Variable	Lagunas pampeanas (n=52)				Lagunas patagónicas (n=24)			
	$\bar{x}$	DE	Max	Min	$\bar{x}$	DE	Max	Min
Temperatura del agua ( $^{\circ}\text{C}$ )	18,5	5,1	30	6,5	16,7	2,1	20,7	13
OD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	10,2	2,6	20	5	9,47	1,89	11,32	5,3
pH	8,8	0,3	9,4	8,0	8,2	1	10,3	5,6
Conductividad ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	7,97	27,79	202,1	0,32	0,85	1,45	4,58	0,02
DS (cm)	29	29	140	7	26	19	46	4
Turbidez (NTU)	88,7	76,6	363	2,7	14	30	151	1,01

STS (mg L <sup>-1</sup> )	116,8	142,5	788,4	6,7	41,6	100,4	456	1,5
PSLC (mg L <sup>-1</sup> )	40,8	47,6	344	6,7	12,79	19,34	83	1,5
COD (mg L <sup>-1</sup> )	93,23	176,30	1010	1,63	16,84	24,03	112,6	0,99
Cl-a (µg L <sup>-1</sup> )	87,8	152,2	981,1	1,6	8,8	8,9	35,4	0,01
NOT (µg N L <sup>-1</sup> )	5.063	1.474	10.830	2.856	536	218	941	201
NODT (µg N L <sup>-1</sup> )	3.790	1.072	7.235	1.926	348	213	765	123
FT (µg P L <sup>-1</sup> )	766,1	876,3	4.538	46,1	154,6	242,1	898,9	14,1
FDT (µg P L <sup>-1</sup> )	560,4	804,0	4.139,6	0,1	80,8	197,4	892,9	0,1

Abreviaciones: OD oxígeno disuelto; DS profundidad del disco de Secchi; PSLC peso seco libre de cenizas; COD carbono orgánico disuelto; Cl-a clorofila-a; NOT nitrógeno orgánico total; NODT nitrógeno orgánico disuelto total; FT fósforo total; y FDT fósforo disuelto total.

*Correlaciones entre variables.* Tanto en la región pampeana como en la patagónica, las variables asociadas a la calidad de luz del agua (turbidez nefelométrica, profundidad del disco de Secchi, STS y PSLC) tuvieron una correlación fuerte entre ellas (coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) > 0,5; Tabla 8 y Tabla 9); las fracciones disueltas y totales de nutrientes (fósforo y nitrógeno) una fuerte (y esperable) correlación positiva entre sí; por otro lado, los sólidos totales en suspensión (STS) estuvieron representados casi en su totalidad por materia orgánica.

**TABLA 8 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN Y NIVEL DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA PARA LAS VARIABLES LIMNOLÓGICAS DE LA REGIÓN PAMPEANA.**

Variable	por variable	$\rho$ de Spearman	Valor de P
<b>Turbidez</b>	DS	-0,94	<,0001
<b>STS</b>	DS	-0,65	<,0001

Capítulo 2: Glifosato y AMPA en ambientes naturales

<b>STS</b>	Turbidez	0,68	<,0001
<b>FDT</b>	Conductividad	0,51	0,0001
<b>FDT</b>	FT	0,87	<,0001
<b>TDON</b>	NOT	0,74	<,0001
<b>COD</b>	Conductividad	0,76	<,0001
<b>COD</b>	FDT	0,64	<,0001
<b>COD</b>	FT	0,67	<,0001
<b>Cl-a</b>	PSLC	0,64	<,0001
<b>Cl-a</b>	DS	-0,61	<,0001
<b>Cl-a</b>	Turbidez	0,54	<,0001
<b>PSLC</b>	DS	-0,67	<,0001
<b>PSLC</b>	STS	0,80	<,0001
<b>PSLC</b>	Turbidez	0,69	<,0001

TABLA 9 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN Y NIVEL DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA PARA LAS VARIABLES LIMNOLÓGICAS DE LA REGIÓN PATAGÓNICA.

<b>Variable</b>	<b>por variable</b>	<b><math>\rho</math> de Spearman</b>	<b>valor de P</b>
<b>PSLC</b>	Conductividad	0,65	0,001
<b>PSLC</b>	DS	-0,90	0,037
<b>PSLC</b>	STS	0,96	<,0001
<b>Conductividad</b>	pH	0,74	<,0001
<b>COD</b>	PSLC	0,58	0,003
<b>COD</b>	Conductividad	0,74	<,0001
<b>COD</b>	pH	0,59	0,002
<b>COD</b>	FT	0,68	0,000

<b>COD</b>	STS	0,60	0,002
<b>NODT</b>	DS	-0,90	0,037
<b>NODT</b>	NOT	0,86	<,0001
<b>FDT</b>	Conductividad	0,52	0,010
<b>FDT</b>	DS	-0,90	0,037
<b>FDT</b>	FT	0,66	0,000
<b>NOT</b>	Conductividad	0,51	0,011
<b>FT</b>	Conductividad	0,75	<,0001
<b>FT</b>	pH	0,76	<,0001
<b>FT</b>	STS	0,53	0,007
<b>STS</b>	Conductividad	0,74	<,0001
<b>STS</b>	DO	-0,56	0,024
<b>STS</b>	DS	-0,90	0,037
<b>Turbidez</b>	DO	-0,56	0,025

## DESCRIPTORES DE USO DE SUELO

En la región pampeana, las tierras destinadas a la agricultura fueron el descriptor principal de uso de suelo en cinco de las siete cuencas hidrográficas incluidas aquí (Tabla 10). El porcentaje de uso de suelo destinado a agricultura, esto es: doble cultivo + otros cultivos + cultivos de verano + pasturas implantadas, disminuyó con la latitud ( $r = 0,7032$ ; valor de  $P < 0,0001$ ) y la longitud ( $r = 0,5769$ ; valor de  $P < 0,0001$ ). Inversamente, el porcentaje de cobertura de pastizales naturales aumentó con la latitud ( $r = -0,6862$ ; valor de  $P < 0,0001$ ) y el de los humedales aumentó con la latitud ( $r = -$

0,7720; valor de P <0,0001) y la longitud ( $r = -0,5912$ ; valor de P <0,0001). Se evidenció un gradiente productivo en sentido noreste-suroeste de uso de suelo en el área de estudio, con una gran proporción de esta dedicada a la actividad agrícola en la región NE, mientras que el uso agrícola fue paulatinamente reemplazado por un ecosistema menos antrópico en dirección SO (pastizales y/o humedales; Figura 11). Este reemplazo de ecosistemas complejos, como humedales y pastizales naturales, por uno más simple como el agroecosistema, responde a un gradiente de precipitación que dicta la orientación productiva de los complejos agrícolas pampeanos. Finalmente, algún grado de desarrollo urbano se observó en más de la mitad de las lagunas muestreadas.

TABLA 10 PORCENTAJE DE USO Y COBERTURA POR CUENCA HIDROGRÁFICA.

ID cuenca / cuenca	OC	DC	CV	PI	PN	Hum.	Agua	Urb.
<b>48- Río Salado de Buenos Aires (n=20)</b>	13,2	4,4	30,8	30,8	5,7	6,1	6,2	2,8
<b>49- Área canalizada al sur del Río Salado (n=5)</b>	17	1,2	12,3	42,3	12,5	11,2	3,3	0,2
<b>50- Arroyos al sur este de Buenos Aires (n=3)</b>	17,7	4,3	20,4	11,7	23,3	10,3	9,3	3
<b>51- Arroyos al sur de Buenos Aires (n=9)</b>	7,3	14	15,8	3,2	29,8	24,3	3,3	2,3
<b>61- Ríos y arroyos menores con pendiente atlántica entre el sur de buenos aires y el Río Chubut (n=1)</b>	0	0	0,1	0	0,7	83,8	15,4	0

96- Región sin drenaje de San 3,4 3,5 42,6 1,9 16,7 20,8 8,7 2,4

Luís, Córdoba, La Pampa y

Buenos Aires (n=4)

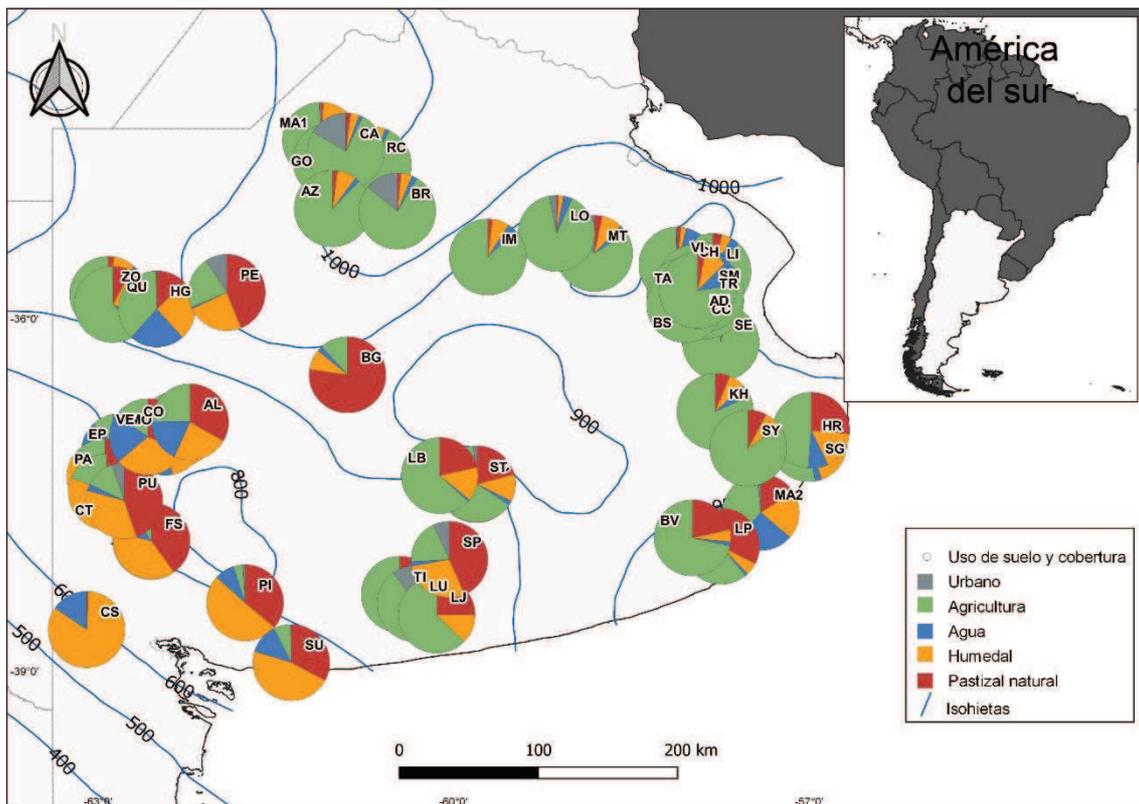
98- Región lagunera al 1,9 1,1 10,9 1,7 38,2 30,6 14,7 0,9

sudoeste de Buenos Aires

(n=10)

**Lagunas totales**

Abreviaciones: OC: otros cultivos; DC: doble cultivo; CV: cultivo verano; PI: pasturas implantadas; PN: pastizal natural; Hum.: humedal; Urb.: urbano.



**FIGURA 11 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y DESCRIPTORES DE USO Y COBERTURA DE SUELO PARA CADA LAGUNA DE LA REGIÓN PAMPEANA. LAS LÍNEAS CORRESPONDEN A LAS ISOHIETAS MEDIAS ANUALES.**

### **DETECCIÓN, NIVELES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS HERBICIDAS**

Se observó una evidente diferencia en la distribución espacial de las detecciones positivas de herbicidas en las muestras ambientales. Específicamente, no se encontraron residuos de herbicida en ninguno de los compartimentos de ninguna de las muestras patagónicas. Por el contrario, se detectaron residuos de herbicida en el 40,4% de las muestras de las lagunas pampeanas. Esto es, se realizó al menos una detección positiva de glifosato y/o AMPA en alguno de los compartimentos ambientales analizados (es decir, agua filtrada, STS y sedimentos). Se observó al menos una detección positiva de glifosato y/o AMPA en alguna de las cuencas relevadas (Tabla 11). Sin embargo, ni la presencia ni la concentración del herbicida correlacionó con este gradiente productivo, como tampoco con las precipitaciones medias anuales ni con el resto de las variables geográficas (latitud, longitud y altitud).

Como se mencionó anteriormente, se detectaron residuos de herbicidas en 21 de las 52 lagunas bonaerenses. El glifosato fue detectado en el 30,8 % de las muestras, de las cuales todas estuvieron por encima del límite de cuantificación instrumental, salvo por la muestra de agua filtrada del embalse Paso de las piedras (PI) que estuvo por debajo de este límite, pero por encima del límite de detección. El AMPA fue detectado en el 13,5 % de las muestras, de las cuales todas se encontraron por encima del umbral de cuantificación.

La frecuencia de detección de AMPA y glifosato fue mayor en los sedimentos que en agua y STS. De esta manera, se detectó glifosato en el 13 % de las muestras de aguas, en el 6 % de las muestras de STS y en el 21 % de las muestras de sedimentos.

En tanto se detectó AMPA en el 4 % de las muestras de agua, en el 4 % de las muestras de STS y en el 8 % de las muestras de sedimentos. Las concentraciones medias (máximas) de glifosato fueron de 2,11 (4,52)  $\mu\text{g L}^{-1}$  en las muestras de agua; 0,10 (0,13)  $\mu\text{g L}^{-1}$  en las de STS y 10,47 (20,34)  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en las muestras de sedimento. Por otro lado, las concentraciones medias (máximas) de AMPA fueron 0,84 y (0,90)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para el agua; 0,07 (0,07)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para los STS; y 22,53 (32,89)  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para las muestras de sedimentos.

**TABLA 11 CONCENTRACIÓN DE GLIFOSATO Y AMPA EN AGUA FILTRADA, SÓLIDOS TOTALES EN SUSPENSIÓN (STS) Y SEDIMENTO DE LAS LAGUNAS PAMPEANAS**

Laguna	Fecha de muestreo	Id <sup>a</sup> Cuenca	Glifosato			AMPA		
			Compartimento			Agua	STS	Sedim.
			Agua ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	STS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sedim. ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Agua ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	STS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sedim. ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<b>CH</b>	17/9/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>LI</b>	14/9/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>TR</b>	14/9/15	48	-	-	-	0,90	-	-
<b>SM</b>	14/9/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>VI</b>	14/10/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>TA</b>	14/10/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>BS</b>	14/10/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>CC</b>	14/10/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>BU</b>	14/10/15	48	-	-	-	-	-	12,93
<b>AD</b>	14/10/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>BG</b>	28/10/15	48	-	-	-	-	-	-

Capítulo 2: Glifosato y AMPA en ambientes naturales

<b>LO</b>	29/10/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>RC</b>	24/11/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>MA1</b>	24/11/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>GO</b>	24/11/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>CA</b>	24/11/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>AZ</b>	25/11/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>BR</b>	25/11/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>IM</b>	2/12/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>MT</b>	2/12/15	48	-	-	-	-	-	-
<b>SE</b>	15/9/15	49	1,50	-	-	-	-	-
<b>KH</b>	15/9/15	49	-	-	-	-	-	-
<b>SY</b>	15/9/15	49	-	0,13	-	-	-	-
<b>SG</b>	15/9/15	49	-	0,12	-	-	-	-
<b>HR</b>	15/9/15	49	-	-	10,73	-	-	-
<b>MA2</b>	15/9/15	50	-	-	-	-	-	-
<b>LP</b>	16/9/15	50	-	-	-	-	0,07	-
<b>BV</b>	16/9/15	50	-	-	-	0,77	-	16,04
<b>PI</b>	28/9/15	51	<QL	-	9,91	-	-	-
<b>SU</b>	29/9/15	51	-	-	5,10	-	-	-
<b>TI</b>	29/9/15	51	-	-	-	-	-	-
<b>LU</b>	29/9/15	51	-	-	20,34	-	-	32,89
<b>LJ</b>	30/9/15	51	1,61	-	-	-	-	-
<b>SP</b>	30/9/15	51	-	-	11,43	-	-	-
<b>ST</b>	30/9/15	51	2,16	-	12,16	-	-	-
<b>EC</b>	30/9/15	51	-	-	-	-	-	-
<b>LB</b>	30/9/15	51	=	-	-	-	-	-

<b>CS</b>	28/9/15	61	4,52	-	10,28	-	0,06	-
<b>ZO</b>	1/12/15	96	-	-	7,30	-	-	-
<b>QU</b>	1/12/15	96	-	-	-	-	-	-
<b>HG</b>	1/12/15	96	-	-	-	-	-	-
<b>PE</b>	2/12/15	96	-	-	-	-	-	-
<b>FS</b>	28/9/15	98	1,64	0,04	10,92	-	-	-
<b>FN</b>	28/9/15	98	-	-	12,35	-	-	-
<b>CO</b>	27/10/15	98	-	-	4,65	-	-	-
<b>MO</b>	27/10/15	98	1,25	-	-	-	-	-
<b>VE</b>	27/10/15	98	-	-	-	-	-	-
<b>EP</b>	27/10/15	98	-	-	-	-	-	-
<b>PA</b>	28/10/15	98	-	-	-	-	-	-
<b>CT</b>	28/10/15	98	-	-	-	-	-	28,25
<b>PU</b>	28/10/15	98	-	-	-	-	-	-
<b>AL</b>	28/10/15	98	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> De acuerdo a la clasificación de la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina (<https://www.mininterior.gov.ar/obras-publicas/info-mapas.php>) : 48 Cuenca del Río Salado de Buenos Aires , 49 Área canalizada al sur del Río Salado, 50 Arroyos al sur este de Buenos Aires, 51 Arroyos al sur de Buenos Aires, 61 Ríos y arroyos menores con pendiente atlántica entre el sur de buenos aires y el Río Chubut, 96 Región sin drenaje de San Luís, Córdoba, La Pampa y Buenos Aires, 98 Región lagunera al sudoeste de Buenos Aires; - = Debajo del límite de detección; <LQ = Menor al límite de cuantificación.

## Capítulo 2: Glifosato y AMPA en ambientes naturales

Glifosato y AMPA rara vez se detectaron juntos en una misma laguna, siendo la excepción las lagunas Chasicó (CS) y La Lujan (LU). Más aún, más del 70% de las detecciones de herbicidas (ya sea glifosato o AMPA) se realizaron solo en uno de los tres compartimentos analizados: es decir, en agua superficial, en STS o en sedimento. La Luján (LU) fue la única laguna donde se encontraron ambos compuestos en el mismo compartimento (en sedimento, Tabla 11).

Con respecto a la distribución temporal del herbicida y su metabolito ambiental, en septiembre se realizaron la mayor cantidad de detecciones positivas (76%), seguido por octubre (19%) y diciembre (5%), no se registraron detecciones positivas en noviembre (Figura 12). Además, en septiembre, la concentración media de GLI + AMPA fue varias veces superior a las de los otros meses. De la misma forma, la sumatoria y los valores máximos de las concentraciones totales de GLI + AMPA del mes de septiembre superaron a las de octubre, noviembre y diciembre en un orden de magnitud tanto en la fracción disuelta y como en la particulada (Tabla 13).

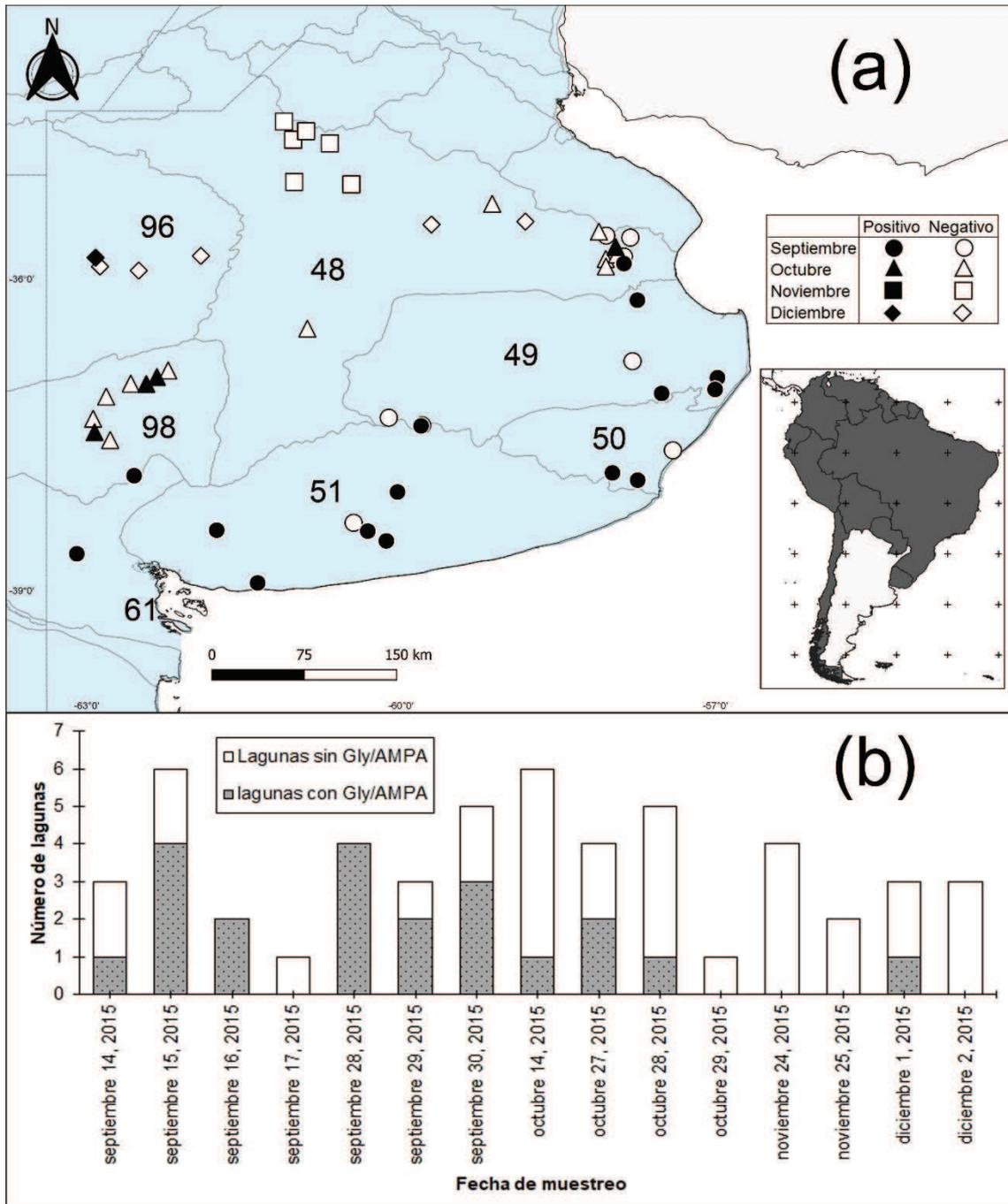


FIGURA 12 OCURRENCIA DE GLIFOSATO Y AMPA EN LOS LAGOS PAMPEANOS. A) DE ACUERDO A LA LOCALIZACIÓN EN EL MAPA. SÍMBOLOS OSCUROS INDICAN DETECCIONES DE GLIFOSATO Y/O AMPA, LA FORMA DE LOS SÍMBOLOS INDICAN EL MES DE MUESTREO. LOS NÚMEROS CORRESPONDEN A LAS CUENCAS PROPUESTAS POR LA SUBSECRETARÍA DE RECURSOS HÍDRICOS DE LA REPÚBLICA ARGENTINA, B) DE ACUERDO A LA FECHA DE MUESTREO. EL NÚMERO DE LAGOS EN CADA FECHA EN LOS QUE SE DETECTÓ (BARRA GRIS) Y NO SE DETECTÓ (BARRA BLANCA) GLIFOSATO-AMPA.

TABLA 12 ESTADÍSTICOS DE LAS CONCENTRACIONES DE GLIFOSATO + AMPA POR MES DE MUESTREO PARA LAS LAGUNAS PAMPEANAS.

Compartimento	Estadísticos	Mes			
		Sept.	Oct.	Nov.	Dic.
<b>GLI + AMPA agua (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	Suma	14,10	1,25	0,00	0,00
	Media	0,59	0,08	0,00	0,00
	$\bar{x}$	1,08	0,31	0,00	0,00
	Mín.	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máx.	4,52	1,25	0,00	0,00
<b>GLI + AMPA STS (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	Suma	0,42	0,00	0,00	0,00
	$\bar{x}$	0,02	0,00	0,00	0,00
	DE	0,04	0,00	0,00	0,00
	Mín.	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máx.	0,13	0,00	0,00	0,00
<b>GLI + AMPA sedimento (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	Suma	152,15	45,83	0,00	7,30
	$\bar{x}$	6,34	2,86	0,00	1,22
	DE	11,46	7,55	0,00	2,98
	Mín.	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máx.	53,23	28,25	0,00	7,30

La concentración total del herbicida (es decir, GLI + AMPA) encontrada en los sedimentos mostró una correlación negativa significativa con el área del lago y el perímetro (Rho = -0,7407, valor de P = 0,0024; valor de P = -0,7011, Rho = 0,0052; respectivamente; Figura 13). No se encontraron relaciones entre GLI + AMPA en muestras de STS y de agua y la morfometría de la laguna.

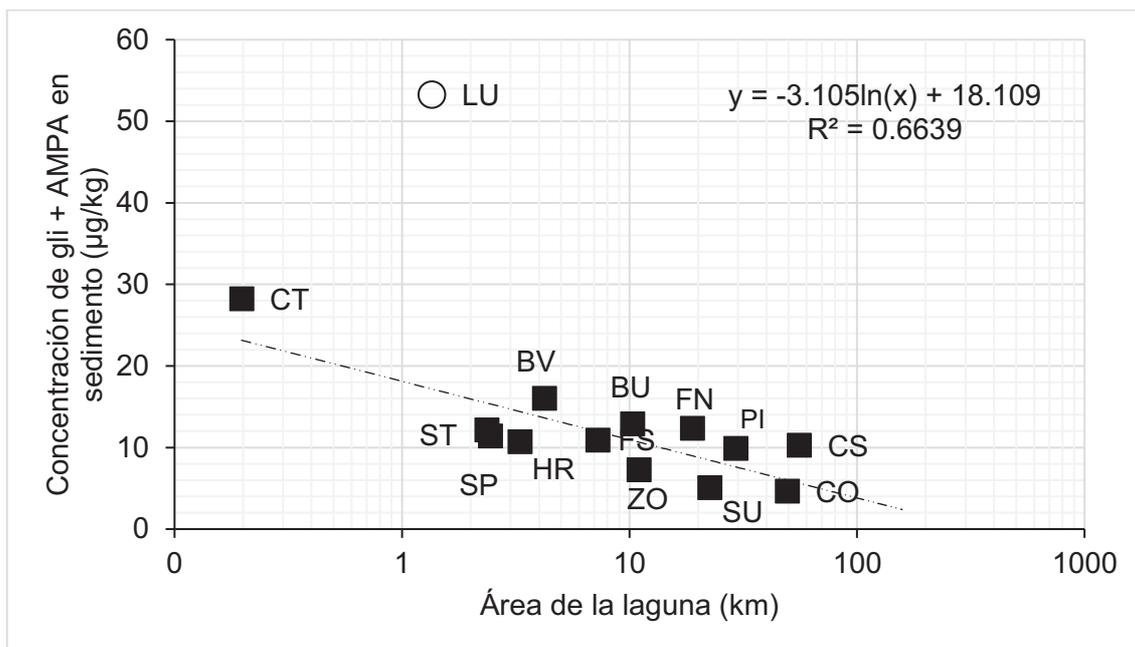


FIGURA 13 CONCENTRACIÓN DE HERBICIDA (GLIFOSATO + AMPA) PRESENTE EN EL SEDIMENTO VS. EL ÁREA DEL LAGO. SOLO LOS LAGOS CON DETECCIONES POSITIVAS ESTÁN ILUSTRADOS. LU (CIRCULO BLANCO) ES UN PROBABLE VALOR EXTREMO POR LO QUE NO FUE INCLUIDO EN EL ANÁLISIS DE REGRESIÓN SIMPLE.

## DISCUSIÓN

La producción agrícola en Argentina se basa fundamentalmente en un paquete tecnológico que combina el barbecho químico con prácticas de labranza mínima, como la siembra directa, y la utilización de HBG para la producción de cultivos transgénicos que le son tolerantes. Los HBG son los herbicidas más utilizados en el país, donde se aplican entre 180 y 200 millones de litros anualmente (Aparicio y colaboradores, 2013). Las fuertes diferencias geográficas en la actividad agrícola Argentina son notables: el glifosato se utiliza ampliamente en la provincia de Buenos Aires, donde más del 70% de la tierra cultivable está comprometida a este modelo agrícola (CASAFE, 2012; Pac, 2015), pero el uso del glifosato con fines agrícolas en Patagonia se limita a áreas muy

específicas (por ejemplo en el valle frutihortícola de Río Negro), siendo virtualmente nulo su uso en el resto de la región. Las lagunas incluidas aquí pueden considerarse como una muestra representativa de los cuerpos de agua lénticos pampeanos y patagónicos poco profundos. En otras palabras, sus características limnológicas (concentraciones de nutrientes, clorofila-*a*, conductividad, transparencia del agua y profundidad media) estuvieron dentro de los rangos de valores reportados para los ambientes pampeanos (Diovisalvi y colaboradores, 2015) y patagónicos (Zagarese y colaboradores, 2017). Estos resultados revelaron la ausencia de residuos de glifosato y AMPA en todos los sitios de la Patagonia, lo que confirma que el uso de glifosato (agrícola o no) en los sitios de muestreo fue mínimo y/o inexistente. Por otro lado, se detectaron residuos de herbicidas en más del 40% de los lagos pampeanos, lo que sugiere que el glifosato y el AMPA son contaminantes habituales en los ambientes naturales de la provincia de Buenos Aires. Las frecuencias de detección de los analitos (30,8% y 13,5% de los lagos por glifosato y AMPA, respectivamente) fueron comparables a las reportadas por Battaglin (2014) para lagos, reservorios y estanques en los Estados Unidos (33,7 para glifosato y 29,7% para AMPA).

Dada la ausencia de estudios que abarquen esta problemática ambiental en lagunas del humedal pampeano, es forzoso comparar estos resultados con valores reportados para otros tipos de ecosistemas acuáticos (Tabla 14). Los rangos de concentraciones de glifosato (agua superficial: 0 - 4,52  $\mu\text{g L}^{-1}$ , STS: 0 - 0,13  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sedimento: 0 - 20,34  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y AMPA (agua superficial: 0 - 0,90  $\mu\text{g L}^{-1}$ , STS: 0 - 0,07  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sedimento: 0 - 32,89  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) fueron comparables o inferiores a los reportados para ríos y arroyos en Argentina. En un estudio a escala de cuenca del río Paraná y sus principales tributarios, Ronco y colaboradores (2016) detectaron residuos de glifosato en el 15% ( $n = 23$ ) de las muestras de agua superficial con una concentración máxima de 1,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  y media de 0,60  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Sin embargo, estos autores reportaron concentraciones medias y máximas de glifosato en los sedimentos varias veces

superiores a las reportadas aquí (media= 742  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , máx.= 3.294  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Bonansea y colaboradores (2017) examinaron los compartimentos ambientales del río Suquía en la provincia de Córdoba, el mismo pertenece a una cuenca agrícola con un uso intenso de glifosato. En este trabajo, reportaron que el 35% de las muestras contenían residuos de glifosato, AMPA o ambos, con una concentración máxima de 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  en agua y 1.882,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en sedimento. Aparicio y colaboradores (2013), estudiaron 44 arroyos del Sudeste de Buenos Aires e informaron la aparición de glifosato en el 67% de las muestras de STS (concentración máxima: 562  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y AMPA en el 20% de las muestras de STS (concentración máxima: 210  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Finalmente, Peruzzo y colaboradores (2008), en el primer estudio relacionado de la Argentina, reportaron concentraciones máximas de glifosato (agua: 2.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sedimento: 3.000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en muestras de un humedal formado por un arroyo de primer orden, luego de correr a través de un campo de soja en el norte de la Provincia de Buenos Aires.

**TABLA 13 NIVELES DE GLIFOSATO REPORTADOS EN LA BIBLIOGRAFÍA PARA CUERPOS DE AGUA EN ARGENTINA. LD: LÍMITE DE DETECCIÓN.**

Referencia	Fecha	Cuerpo de agua	Agua (rango)		STS (rango)		Sedimento (rango)	
			GLI ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	AMPA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	GLI ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	AMPA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	GLI ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	AMPA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<b>Bonansea (2017)</b>	2010-	Río	<LD-	<LD-	<LD-	<LD-	<LD-	<LD-
	2011		125	4,8	1.570	684	1.882	266,1
<b>Aparicio (2013)</b>	2011-	Arroyos	<LD-	<LD-	<LD-	<LD-	<LD-	<LD-
	2012		7,6	2,3	562	210	221	235
<b>Lupi (2015)</b>	2013	Arroyos	-	-	-	-	5,3– 26,3	-

<b>Mac Loughlin (2017)</b>	2015-2016	Arroyos	-	-	-	-	11,0–404,4	18,0–224,9
<b>Peruzzo (2008)</b>	2003-2004	Arroyos	<LD-700	-	-	-	<LD-5.000	-
<b>Primost (2017)</b>	2012	Arroyos	<LD-180	LD-190	196-548	100-475	<LD-3.294	181-7.219
<b>Ronco (2016)</b>	2011-2012	Ríos	<LD-0,7	<LD	<LD-0,21*	<LD-0,04*	<LD-3.004	<LD-5.374
<b>*Calculado como µg L<sup>-1</sup></b>								

Teniendo en cuenta que el AMPA es el principal producto de degradación del glifosato, se ha propuesto que el porcentaje de AMPA (%AMPA) con respecto a la concentración total de herbicida ( $\% \text{ de AMPA} = \text{AMPA} \div (\text{AMPA} + \text{GLIFOSATO})$ ) proporcione indicios sobre el destino, el transporte y la consecuente degradación del herbicida (Coupe y colaboradores, 2012). De acuerdo con Coupe y colaboradores (2012), los valores bajos de %AMPA indican que se ha producido una pequeña degradación del glifosato, ya sea debido a una baja tasa de degradación microbiana y/o porque la muestra podría haberse recolectado poco después de la aplicación del herbicida. Recíprocamente, un %AMPA alto indica que la mayoría del glifosato se ha degradado al momento de la recolección de la muestra. Dentro del conjunto de 52 lagunas pampeanas incluidas en la presente tesis, la frecuencia de detección del glifosato fue mayor (30,8% de los lagos) que la de AMPA (13,5% de los lagos). Aunque, sorprendentemente, rara vez estos compuestos se detectaron juntos, las dos excepciones son las lagunas La Luján (LU) y Chasicó (CS). Tal patrón mutuamente excluyente de ocurrencia, no fue previsto y podría estar indicando que las muestras donde solo se detectó glifosato habrían sido recolectadas durante las primeras aplicaciones de primavera, mientras que aquellas donde solo se detectó AMPA,

indicarían aplicaciones de glifosato lejanas en el tiempo, quizás durante el barbecho químico para la siembra de trigo (en invierno).

El muestreo de las lagunas pampeanas se realizó entre el 14 de septiembre y el 2 de diciembre de 2015. Debido a la gran extensión del área de muestreo, las lagunas geográficamente cercanas se visitaron prácticamente en simultáneo, mientras que para las lagunas que se encontraban más alejadas entre sí, el intervalo de tiempo entre las fechas de muestreo fue mayor, del orden de semanas. A pesar de estas salvedades, resulta sugestivo que la mayoría de las detecciones positivas se hayan observado durante los meses de septiembre y octubre, y solo se haya realizado una detección positiva de glifosato (en los sedimentos) a principios de diciembre (Cuero de Zorro, ZO), durante noviembre no hubo detecciones positivas. Estos resultados sugieren que el momento de realizar los muestreos puede haber afectado la probabilidad de detecciones positivas. La relación entre la frecuencia de las detecciones positivas y la época del año se ha investigado particularmente en arroyos de cuencas agrícolas en la provincia de Buenos Aires. Aparicio y colaboradores (2013) evaluaron la presencia del herbicida en muestras de agua de 44 arroyos del sudeste de la provincia de Buenos Aires que atraviesan campos tratados con glifosato. Estos investigadores, informaron que la aparición de glifosato y AMPA disminuyó de abril (35% y 33%) a septiembre (4% y 0%). Sin embargo, la presencia del herbicida en muestras de sedimentos se mantuvo alta durante todo el estudio (66% y 89% para glifosato y AMPA, respectivamente). En este sentido, Mac Loughlin y colaboradores (2017), encontraron diferencias significativas en las concentraciones de glifosato y AMPA entre campañas agrícolas consecutivas en arroyos periurbanos pertenecientes a la cuenca frutihortícola del Gran La Plata.

*A priori*, se habría esperado encontrar alguna asociación entre las detecciones y concentraciones de herbicidas y las variables de uso de suelo, ya sea a pequeña escala (nuestra zona circundante definida de 5 km alrededor de cada laguna) o a gran escala

geográfica (cuencas hidrográficas). De hecho, se observó una estructura espacial bien definida para las clases de uso de suelo y cobertura, relacionada con el gradiente de precipitación, que junto con las características pedológicas son los que determinan el tipo y la extensión de las actividades agrícolas (Gonzalez y colaboradores, 2010). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias en la presencia y concentración de glifosato-AMPA entre las cuencas hidrográficas, ni relaciones significativas con las principales actividades agrícolas en el área circundante o con las diferencias en el uso y cobertura de suelo de cada laguna. De hecho, la falta de detecciones positivas de herbicidas en las lagunas del tramo superior de la cuenca del río Salado resultó sorprendente (lagunas: GO, CA, MA1 y RC). Esta cuenca es una de las zonas agrícolas más productivas de la Pampa ondulada (zona núcleo) y es allí donde se localizan la mayor cantidad de establecimientos agrícolas dedicados a la producción de soja y maíz, dos cultivos altamente dependientes de las aplicaciones regulares de glifosato. Aunque el motivo es desconocido, esta ausencia de detecciones podría estar relacionado a lo mencionado anteriormente. Aunque no se pueden descartar otras variables como altas tasas de degradación microbiana del herbicida o un nulo transporte del herbicida desde la fuente de origen hacia el cuerpo de agua receptor.

A una escala aún más pequeña (tanto geográficamente, es decir, lagunas con una superposición sustancial en las variables de uso de suelo; y temporalmente, es decir, lagunas muestreadas el mismo día) se encontraron grandes diferencias en las concentraciones de herbicida entre lagunas cercanas, separadas por escasos metros, que fueron muestreadas casi simultáneamente. Ejemplos de lagunas separadas apenas por una ruta que presentaron grandes diferencias en cuanto a las concentraciones de herbicidas son: las lagunas El Chifle (EC) y la Salada de Tedín Uriburu (ST) en el partido de Benito Juárez y El Burro y Adela en el partido de Chascomús. En conjunto, estos resultados sugieren que la probabilidad de detectar el herbicida en los diferentes

compartimentos ambientales varía ampliamente de un cuerpo de agua a otro, y probablemente también a lo largo del tiempo.

Para el conjunto de lagunas en los que se detectó el herbicida en muestras de sedimento, se encontró una relación negativa significativa entre la concentración de herbicida en este compartimento y el área y perímetro de la laguna. Del mismo modo, Coupe y colaboradores (2012) encontraron que la concentración media de glifosato y AMPA fue varios órdenes de magnitud superior en lagos pertenecientes a cuencas pequeñas que aquellos pertenecientes a cuencas mayores. Estos autores sugieren la posibilidad de que la distancia de transporte del herbicida desde sus fuentes hasta los lagos aumentará con el tamaño de la cuenca, por lo que una cuenca grande podría proporcionar más tiempo y oportunidades para la degradación del herbicida, en suelos o arroyos, antes de llegar a los lagos. Además, los lagos más grandes tienden a tener una relación de perímetro/área más baja, lo que podría resultar en tasas de dilución más altas en los lagos grandes que en los pequeños. El glifosato y otros insumos agropecuarios pueden llegar a los sistemas acuáticos por distintas vías: deriva o por escurrimiento superficial adherido a las partículas de suelo (Figura 14; Bowmer, 1982; Environmental Protection Agency, 1993; Feng and Thompson, 1990; Goldsborough and Brown, 1988). Además, en Argentina se ha observado que otra forma en que el glifosato puede llegar a los cuerpos de agua es mediante la acción humana directa, como por ejemplo, el lavado de los tanques de las máquinas de fumigación en arroyos y cuerpos de aguas cercanos a los campos de cultivo o simplemente el descarte de recipientes vacíos en los mismos (Alonso y colaboradores, 2018; Vera y colaboradores, 2010). Tampoco es despreciable el transporte de pesticidas a través de la atmósfera y su posterior deposición a través del agua de lluvia. En este sentido, en un estudio novedoso para la región, Alonso y colaboradores (2018) reportaron una alta frecuencia de detección de glifosato y AMPA (>80%) en agua de lluvia y advirtieron que más de una

fuentes de herbicidas podría estar contribuyendo a su presencia en la atmósfera y favorecer así a la contaminación del ambiente. Por lo tanto, las comunidades acuáticas podrían estar expuestas a formulaciones de glifosato a través de diferentes vías (Geyer y colaboradores, 2016).

Con respecto al riesgo que podría generar la presencia de herbicida, cabe destacar que ninguna de las concentraciones de glifosato observadas excedió el valor máximo aceptable para consumo ( $280 \mu\text{g L}^{-1}$ ), según la legislación Argentina, y también se encuentran dentro de los niveles recomendados para Australia ( $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Canadá ( $280 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Japón ( $4.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y los Estados Unidos ( $700 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Hamilton y colaboradores, 2003); sin embargo, eran más altos que el nivel más estricto establecido por la Comunidad Europea ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Dolan y colaboradores, 2013). La presencia de glifosato en el embalse Paso de las Piedras (PI) y otros cuerpos de agua recreativos debe advertirnos sobre la posibilidad de exposición humana a este biocida, por contacto directo o ingesta.

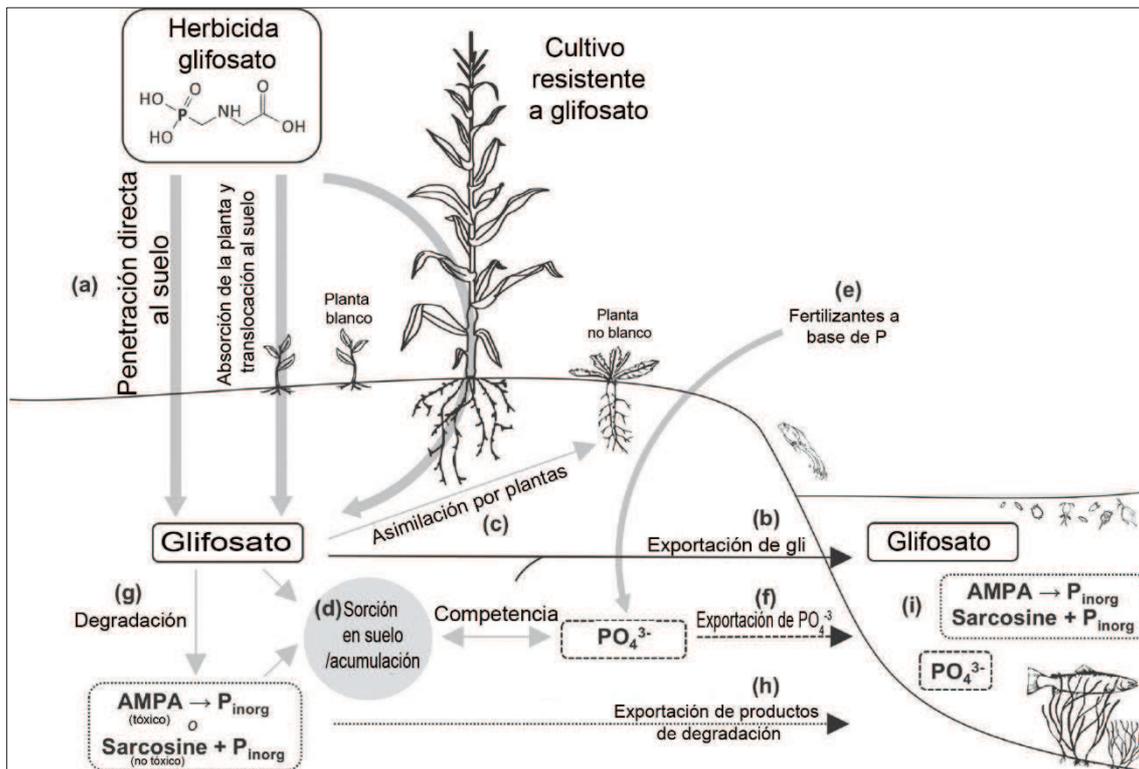


FIGURA 14 TRANSPORTE Y DESTINO DEL GLIFOSATO EN LOS AGROECOSISTEMAS. (A) UNA VEZ APLICADO PUEDE PENETRAR AL SUELO DE MANERA DIRECTA O EXUDADO A TRAVÉS DE LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS QUE LO ABSORBIERON. (B) UNA VEZ EN EL SUELO PUEDE SER EXPORTADO DIRECTAMENTE POR ESCORRENTÍA SUPERFICIAL O FILTRARSE EN AGUAS SUPERFICIALES. (C) UNA FRACCIÓN DEL GLIFOSATO PUEDE SER ASIMILADA POR PLANTAS NO BLANCO. (D) LA MAYOR PARTE DEL GLIFOSATO SERÁ RETENIDA POR LAS PARTÍCULAS DEL SUELO DEPENDIENDO DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUELO, EL PH Y EL CONTENIDO DE FOSFATOS (E) NATURALES O ANTRÓPICOS COMO LOS FERTILIZANTES. (D Y F) EL GLIFOSATO PUEDE COMPETIR CON EL FOSFATO POR LOS SITIOS DE SORCIÓN, INFLUENCIANDO ASÍ LA MOVILIDAD DE ESTOS COMPUESTOS. (G) LAS RUTAS DE DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO, AMPA Y SARCOSINA, LIBERAN P INORGÁNICO, ESTOS COMPUESTOS TAMBIÉN PUEDEN LLEGAR A LAS LAGUNAS (H). FINALMENTE, (I) EL GLIFOSATO TAMBIÉN PUEDE SER DEGRADADO EN EL CUERPO DE AGUA. NO FUE CONSIDERADA LA DERIVA ATMOSFÉRICA. ESQUEMA TOMADO DE (HÉBERT Y COLABORADORES, 2019).

## CONCLUSIONES PARCIALES

Se podrían unir las distintas piezas de información recopiladas en este capítulo para producir así una imagen preliminar sobre la presencia de glifosato y AMPA en los cuerpos de agua lénticos continentales del área de estudio: i) los residuos de glifosato fueron detectados solo en las lagunas de la región Pampeana; ii) el herbicida se detectó principalmente como glifosato o su producto de degradación, AMPA, pero la detección simultánea de ambos químicos fue poco frecuente; iii) de manera similar, el herbicida se detectó con más frecuencia en solo un compartimento ambiental, más a menudo en la matriz sólida (sedimentos); iv) no se observaron diferencias evidentes en la detección de herbicidas entre cuencas hidrográficas o entre lagunas con usos de suelo contrastantes; v) en contraposición, se encontraron grandes diferencias en las concentraciones de herbicidas entre las lagunas cercanas que se muestrearon prácticamente en simultáneo; y vi) la frecuencia de las determinaciones positivas fue alta en septiembre y octubre, pero prácticamente nula en noviembre y diciembre. En conjunto, toda esta información sugiere que los procesos de transporte, degradación y detección de los herbicidas son altamente dinámicos y complejos.

Es probable que los procesos productivos, dicten los pulsos del herbicida hacia los ecosistemas no blanco, debido a mayores tasas y volúmenes de aplicación en momentos específicos del año (p. ej. durante el barbecho químico) y su posterior translocación hacia los cuerpos de agua. Sin embargo, no se puede descartar que procesos locales, como la elección de los productores sobre qué cultivos producir, los momentos de aplicación del herbicida, el lavado de la maquinaria de fumigación y su posterior descarte, podrían desempeñar papeles importantes en la polución de los ecosistemas y en particular de las lagunas. Por lo tanto, la contribución del glifosato a la contaminación de los lagos sigue siendo altamente impredecible (Neumann y colaboradores, 2002).

**CAPÍTULO 3: DISTRIBUCIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL DE GLIFOSATO Y  
AMPA EN LA CUENCA DEL RÍO SALADO**

## RESUMEN DEL CAPÍTULO

En este capítulo se investigó la ocurrencia, concentración y distribución espacial y temporal de glifosato y AMPA, en lagunas pertenecientes a la cuenca alta y baja del Río Salado (Pcia. de Buenos Aires, Argentina). El muestreo se realizó entre mayo de 2017 y agosto de 2018 y se analizaron los sedimentos y el agua de 5 lagunas (Chascomús, Rocha, Mar Chiquita, Gómez y Carpincho) y 4 tributarios de la laguna Chascomús (Tambera, Intech, Valdez y Brown). Para el total de muestras (n=74), el 61 % fueron positivas para alguno de los dos compuestos en alguno de los dos compartimentos ambientales (agua y sedimentos). Se detectó AMPA en el 57 % de las muestras y glifosato en el 14 % de las muestras. Las concentraciones medias (máximas) en sedimento fueron de 1,78 (77,52)  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  y de 10,55 (105,70)  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para glifosato y AMPA, respectivamente. En las muestras de agua, las concentraciones medias (máximas) fueron de 0,02 (0,93)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para AMPA, mientras que no se detectó glifosato en ninguna de las muestras de agua filtrada. Se observó una mayor frecuencia de detección en el tramo superior de la cuenca (76 % detecciones positivas) que en el inferior (48 % detecciones positivas). También se observó una marcada estacionalidad en las frecuencias de detección y en las concentraciones, siendo mayores durante la primavera y el verano en la cuenca alta, y durante el verano y el otoño en la cuenca baja.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este capítulo es relacionar la distribución espacial y temporal y las fuentes de contaminación de glifosato y AMPA en lagunas de la cuenca del Rio Salado con la utilización del herbicida en los ecosistemas terrestres circundantes.

### **Objetivos específicos**

- 1- Se evaluó la presencia de glifosato y AMPA en ambientes pertenecientes a cuencas orientadas a la producción de granos (cuenca alta del Rio Salado) en las que la demanda de agroquímicos es alta y en cuerpos de agua pertenecientes a cuencas mixtas, agrícola/ganadera (cuenca baja del Rio Salado), en las que la utilización de agroquímicos es menor.
- 2- Se analizó la presencia y concentración de glifosato y AMPA en la desembocadura de los principales tributarios de la laguna Chascomús a fin de identificar las principales fuentes de contaminación.

## INTRODUCCIÓN

El uso de los agroquímicos, y en especial el del glifosato, se ha intensificado en las últimas décadas. Si bien la nueva generación de formulados comerciales es promocionan como no bioacumulable y ambientalmente benignos (<http://descubri.monsanto.com.ar/glifosato/>), las concentraciones liberadas al ambiente podrían significar un riesgo para las aguas superficiales, los sedimentos y el agua subterránea (Montiel-León y colaboradores, 2019; Struger y colaboradores, 2017).

La cuenca del Río Salado, es uno de los hidro sistemas más importantes de la región pampeana. Con una superficie de 87.775 km<sup>2</sup> incluye el sector septentrional de la provincia de Buenos Aires, la parte sur de Santa Fe y una porción de la provincia de Córdoba. Su principal cause es el río Salado, el cual es un típico río de llanura de más de 600 km de longitud, caracterizado por poseer un régimen hídrico muy variable, desde un caudal de 100 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> en periodos de sequía a más 1.500 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> durante los periodos de inundación (Gabellone y colaboradores, 2005). También alberga gran cantidad de lagunas, humedales y otros cuerpos de agua, que ocupan cerca de 10.000 km<sup>2</sup> de superficie en periodos normales de caudal. Esta cuenca es una de las unidades más antropizadas del país con pocas áreas sin alterar.

En este capítulo se determinó la ocurrencia y concentración de glifosato y AMPA en lagunas pertenecientes a la cuenca alta y baja del Río Salado (Pcia. Bs. As.). El muestreo se realizó durante la campaña agrícola 2017 - 2018. Las lagunas muestreadas en la cuenca alta fueron: Gómez (GO), Rocha (RC), Carpincho (CA) y Mar Chiquita (MA1) en el partido de Junín. Por otro lado, en la cuenca baja se muestreo la laguna Chascomús perteneciente al sistema lacustre de las encadenadas de Chascomús (CH). La laguna de Chascomús se muestreó en tres puntos (CH1, CH2 y CH3), además se tomaron muestras en la desembocadura de algunos de sus principales tributarios: los

arroyos Valdez (VA), Intech (AI), Las Tambera (LT) y Monte Brown (MB). La hipótesis de este capítulo puede enunciarse de la siguiente manera: “dado que la presencia de glifosato en los cuerpos de agua está asociada a su utilización en los sistemas agrícolas circundantes, en regiones con intensa actividad agrícola la exposición continuada a este herbicida ha producido en las lagunas de la región pampeana: (1) una presencia persistente del herbicida y su metabolito (AMPA) en lagunas ubicadas en zonas con intensa actividad agrícola; (2) una mayor concentración de glifosato y AMPA en lagunas de la cuenca alta que en las de la cuenca baja, que poseen un perfil ganadera; (3) una dinámica estacional del herbicida que responde a los momentos de aplicación en los sistemas agrícolas circundantes”. Parte del ímpetu de este capítulo fue resolver la ausencia de detecciones positivas observadas en las lagunas pertenecientes a la zona núcleo sojera en el partido de Junín (Gómez, Carpincho, Mar Chiquita y Rocha).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **ÁREA DE ESTUDIO**

#### ***LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO***

Las lagunas de Gómez (GO), Carpincho (CA), Mar Chiquita (MA1) y Rocha (RC) están localizadas en el noroeste de la provincia de Buenos Aires, en la cuenca alta del Río Salado. Estos cuerpos de agua se encuentran interconectados por este río y se localizan en un radio de 28 km. MA1 se encuentra aguas arriba de la cuenca (34°25'S; 61°10'O); posee una superficie de 52.800 ha, y su profundidad media es de 1,5 m. Fluye

por un canal hacia la laguna de Gómez (34°37'S; 61°07'W), la cual posee una superficie de 36.660 ha, una profundidad media de 1,1 m., se encuentra a 75 m s.n. m por encima de la laguna de Carpincho (34°35'S; 60°54'O), conectándose con esta a través de un canal artificial. La laguna de Carpincho, posee una superficie de 440 ha y una profundidad media de 1,4 m. La laguna de Rocha (34°42'S; 60°43'O), se encuentra aguas abajo, cerca de la ciudad de Chacabuco, cuenta con una superficie de 400 ha y una profundidad media de 1,4 m (Maria J. Barla y colaboradores, 2003).

En la cuenca baja, la laguna Chascomús (35° 35'S; 58°2'O) posee una superficie de 3.000 ha y pertenece a una serie de tributarios que llegan al Río Salado por su margen izquierda, localizados en el tramo inferior de la cuenca. Constituye el segundo eslabón de las Encadenadas de Chascomús. La laguna recibe 7 afluentes: Monte Brown, Vitel, Valdez, Las Tamberas, del Monte Brown, del Manolito, Intech, San Felipe y un emisario que lo comunica con la Laguna de Adela: el Arroyo Girado. El A° Valdés (VA) es un curso permanente solo en su desembocadura y nace en el km 112 de la Ruta 2. Este arroyo actúa de colector de los excesos pluviales. Una red de canales y zanjales lo comunican, también, con el Río Samborombón. Los arroyos del Monte Brown (MB) y las Tamberas (LT), son pequeños cursos temporarios (1-7 km de longitud) con distinto grado de canalización ubicados en el sector noroeste y suroeste, respectivamente (Patricia and Miretzky, 2001). El A° Intech (AI) es un pequeño arroyo temporario que atraviesa campos de cultivos y desemboca en la costa sureste de la laguna.

## **TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

Las muestras para el análisis de glifosato y AMPA fueron tomadas entre mayo de 2017 y agosto de 2018 en la laguna Chascomús. Los sitios de muestreo incluyeron

la laguna Chascomús y sus afluentes: LT, MB, AI Y VA. La laguna de Chascomús fue muestreada mensualmente y rutinariamente en tres puntos: CH 1, CH 2 y CH 3. Mientras que los afluentes fueron muestreados en la desembocadura de la laguna. En la cuenca alta, los muestreos se realizaron entre agosto de 2017 y agosto de 2018. La región este de la laguna de Gómez (GOE) y la laguna de Carpincho (CA) fueron muestreadas mensualmente, mientras que la región norte de Gómez (GON), MA1 y RC fueron muestreadas estacionalmente. Los muestreos en la cuenca alta se realizaron en simultaneo con los de la cuenca baja, luego las muestras se transportaron al Laboratorio de Ecología Acuática en INTECH para su procesamiento siguiendo los protocolos de conservación recomendados. En el caso de los sitios de muestreo en la cuenca baja, debido a su cercanía a las instalaciones del INTECH, resultó posible realizar los muestreos y el procesamiento de las muestras en un mismo día.

## **ANÁLISIS DE GLIFOSATO Y AMPA**

Se tomaron muestras para el análisis de glifosato y AMPA en los sedimentos y el agua filtrada siguiendo la metodología descrita en la sección de métodos del *capítulo 2*.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Con el fin de examinar las similitudes y diferencias entre las lagunas se utilizó un análisis de componentes principales (PCA) basado en el conjunto de variables de uso y cobertura de suelo. Adicionalmente, se comparó la concentración de glifosato entre

cuenca por medio de la prueba de rango de Wilcoxon. Estos análisis fueron implementados sin transformar las variables y realizados con los paquetes “*vegan*” y “*coin*” (Hothorn y colaboradores, 2006) del entorno R (<http://cran.r-project.org>).

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS, USO DE SUELO Y PRODUCCIÓN AGRÍCOLA EN LA CUENCA ALTA Y BAJA DEL RIO SALADO DE BUENOS AIRES.

Las características limnológicas de las lagunas de la cuenca del Salado en ambos tramos resultaron similares, aunque la cuenca alta presentó mayor conductividad, turbidez nefelométrica y STS.

Con respecto a los aspectos productivos, durante la campaña agrícola 2017/18, más del 60 % de la superficie de los partidos de Junín y Bragado, en la cuenca alta, estuvo destinado a la producción de cultivos altamente dependientes de las aplicaciones de glifosato (soja y maíz). Por otro lado, en la cuenca baja, solo el 13 % de la superficie del partido de Chascomús estuvo destinado a la producción de estos cultivos (MAGyP). De acuerdo a los análisis de imagen satelital de uso de suelo y cobertura desarrollados en el *capítulo 2*, se observó una clara diferencia en el uso de suelo entre las lagunas de la cuenca alta y baja. Globalmente, en las lagunas de la cuenca alta la proporción de cultivos alrededor de las lagunas y, particularmente, la de cultivos de verano, fue alta (>60% de uso agrícola) y mayor que en las lagunas de la cuenca baja (<40% de uso de suelo agrícola), en las que se observó, principalmente, un sistema productivo mixto con una gran proporción de pasturas implantadas y pastizales naturales. Del análisis de componentes principales con las lagunas pertenecientes a la cuenca alta y baja se

desprende que los sitios, se agruparon de acuerdo a las variables de uso de suelo. Por un lado, las lagunas de la cuenca alta estuvieron asociadas a las categorías *cultivo de verano* y *doble cultivo*, mientras que las lagunas de la cuenca baja a *pasturas implantadas*, *pastizales* y *otros cultivos* (Figura 14).

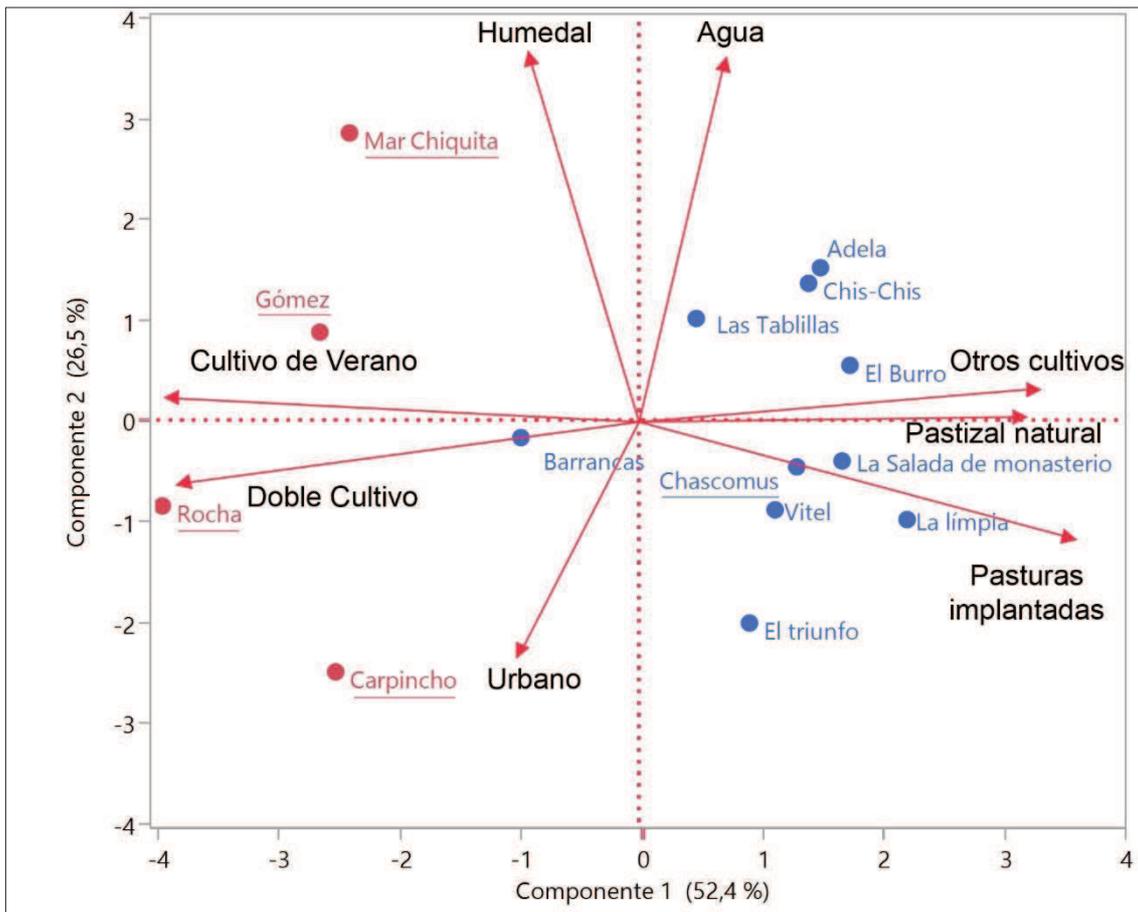


FIGURA 14 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE USO Y COBERTURA DE SUELO, PARA LAS LAGUNAS DE LA CUENCA ALTA Y BAJA DEL RÍO SALADO. SUBRAYADAS SE ENCUENTRAN LAS LAGUNAS ANALIZADAS EN ESTE CAPÍTULO.

## OCURRENCIA, CONCENTRACIONES Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE GLIFOSATO Y AMPA

Considerando ambos tramos de la cuenca, se encontraron residuos de glifosato y/o AMPA en el 61 % de las muestras de sedimento y agua filtrada (n=74). El compuesto más frecuentemente detectado fue el AMPA (57%), mientras que el glifosato fue detectado en el 14 % de las muestras. Por otro lado, fue más frecuente la detección de herbicida en los sedimentos (58% detecciones positivas) que en el agua filtrada (5% de detecciones positivas). La coocurrencia de ambos compuestos en una misma muestra fue baja, en sedimentos en el 9% de las muestras se detectó en conjunto AMPA y glifosato, en las cuales el %AMPA estuvo por encima del 85%, en el 4% de las muestras solo se detectó glifosato (%AMPA=0%) y en el 45% solo se detectó AMPA (%AMPA=100%). Asimismo, en solo 2 muestras se detectaron residuos de herbicida en ambos compartimentos (es decir, agua y sedimentos).

Las concentraciones de glifosato en los sedimentos abarcaron aproximadamente tres órdenes de magnitud (0,07 - 77,52  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) con una media de 1,78  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Las concentraciones de AMPA en los sedimentos también abarcaron un amplio rango de concentraciones (0,04 - 105,70  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) con una media de 10,55  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Las concentraciones de AMPA en el agua filtrada variaron entre 0,14 y 0,93  $\mu\text{g L}^{-1}$  con un valor medio de 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ . No se detectó glifosato en el agua filtrada en ninguna de las muestras.

Glifosato y AMPA fueron detectados en ambos tramos de la cuenca, sin embargo, fue particularmente frecuente en la cuenca alta (Figura 15). En este sentido, se observaron diferencias significativas (valor de  $P < 0,01$ ) en las concentraciones de herbicida (GLI + AMPA) cuantificada en los sedimentos entre ambos tramos de la cuenca, siendo superiores en la cuenca alta (<LD - 105,70  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) que en la baja (<LD - 77,52  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). No se observaron diferencias entre los tramos en las concentraciones de AMPA cuantificadas en el agua filtrada. Además, las detecciones positivas fueron más frecuentes en la cuenca alta (76% detecciones positivas) que en la cuenca baja

(48% detecciones positivas). Por otro lado, en la cuenca baja, las detecciones positivas en los afluentes (56% detecciones positivas) fueron mayores que en la laguna Chascomús (41% detecciones positivas). En los sedimentos, las concentraciones medias (máximas) de GLI + AMPA en la laguna fueron de  $7,91 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $77,52 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), mientras que en los afluentes fueron de  $6,76 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $31,01 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Capítulo 3: Distribución temporal y espacial de glifosato y AMPA en la cuenca del Río Salado

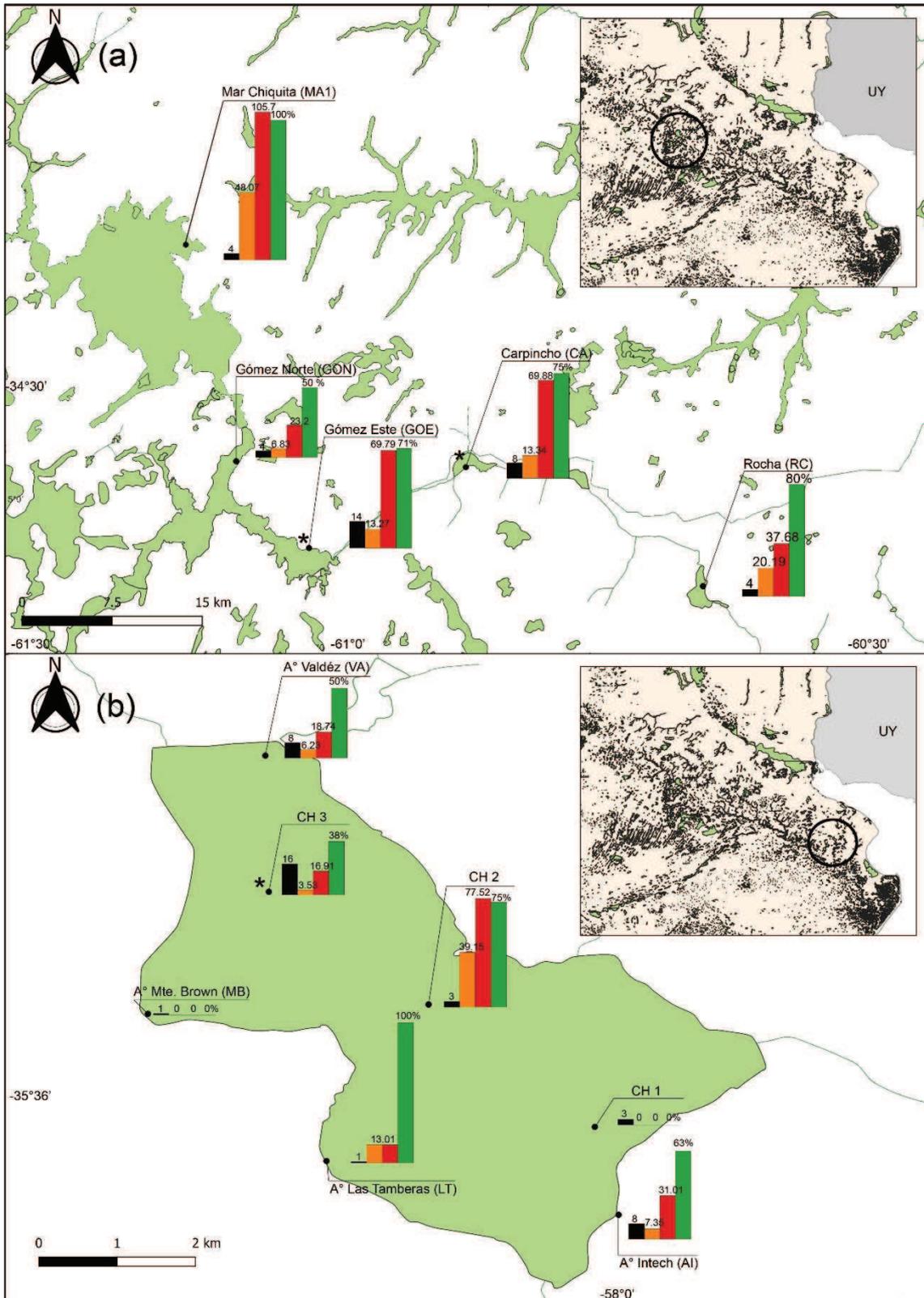


FIGURA 15 OCURRENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE HERBICIDA (GLI + AMPA) EN LOS SEDIMENTOS EN LA CUENCA ALTA (A) Y BAJA (B) DE LA CUENCA DEL RÍO SALADO. LAS CONCENTRACIONES MÁXIMAS (■) Y MEDIAS (■) ESTÁN EXPRESADAS COMO  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , MIENTRAS QUE LA FRECUENCIA DE DETECCIÓN (■) REPRESENTA EL PORCENTAJE DE MUESTRAS EN LAS QUE SE DETECTÓ GLI + AMPA. LOS ASTERISCOS INDICAN AL MENOS

UNA DETECCIÓN POSITIVA EN EL COMPARTIMENTO DE AGUA FILTRADA. NÚMERO DE MUESTRAS (■). EN LOS PANELES SE ENCUENTRA SEÑALADA (CIRCULO NEGRO) EL ÁREA DE ESTUDIO.

## PATRONES ESTACIONALES EN LA OCURRENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE GLIFOSATO Y AMPA EN LA CUENCA DEL RÍO SALADO

El monitoreo de glifosato y AMPA, durante una campaña agrícola completa, permite evaluar patrones estacionales en la ocurrencia de estos compuestos. En ambos tramos de la cuenca se observó una estacionalidad en la ocurrencia de glifosato y AMPA (Tabla 14). En la cuenca alta, las detecciones positivas fueron altas durante todo el año, aunque mayores durante la primavera y el verano. En la cuenca baja, la laguna Chascomús se caracterizó por una menor frecuencia de detección, y por mayores detecciones durante el verano y el otoño.

TABLA 14 FRECUENCIAS ESTACIONALES DE DETECCIÓN DE GLIFOSATO (GLI) Y AMPA EN SEDIMENTO Y AGUA.

Estación-año	Alta			Baja		
	% AMPA	%Gli	N	% AMPA	%Gli	N
<b>Otoño-2017</b>	*	*		0%	17%	6
<b>Invierno-2017</b>	67%	0%	3	0%	10%	10
<b>Primavera-2017</b>	80%	20%	10	56%	22%	9
<b>Verano-2018</b>	86%	14%	7	80%	10%	10
<b>Otoño-2018</b>	71%	0%	7	100%	50%	2
<b>Invierno-2018</b>	57%	14%	7	67%	0%	3

\* no se tomaron muestras

Los niveles de glifosato acompañaron el patrón estacional observado en las frecuencias de detección (Figura 16). Así, las concentraciones medias de AMPA en los sedimentos en la cuenca alta se mantuvieron constantes y por encima de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  durante todo el período de estudio. Los valores máximos se observaron durante la primavera y los mínimos en invierno de 2017 y otoño de 2018. Las concentraciones de glifosato en sedimento, al igual que en AMPA, revelaron un máximo durante la primavera y un aumento en las concentraciones durante el invierno de 2018. Las concentraciones de AMPA en forma disuelta fueron máximas durante el invierno de 2017, posteriormente, se mantuvieron por debajo del límite de detección. En los sitios de muestreo de la cuenca baja, las concentraciones de AMPA en los sedimentos aumentaron paulatinamente hasta alcanzar el máximo durante el verano de 2017 para luego disminuir hacia el invierno de 2018. Las concentraciones de glifosato en los sedimentos tuvieron un comportamiento inverso al del AMPA: tuvieron un máximo durante otoño de 2017 y disminuyeron hasta otoño de 2018, cuando se observó un nuevo pico de concentración. Este pico en la concentración de glifosato en sedimentos fue coincidente con el aumento en la concentración de AMPA disuelto en el agua.

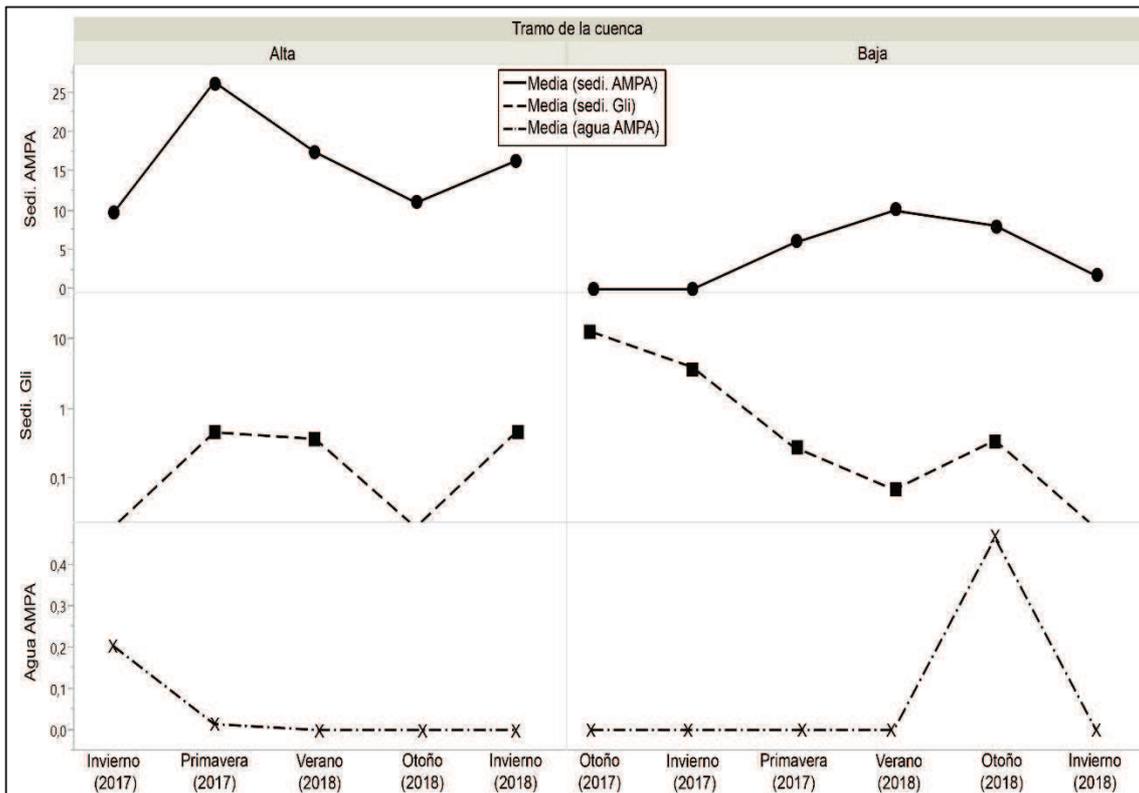


FIGURA 16 CONCENTRACIONES MEDIAS ESTACIONALES DE GLIFOSATO Y AMPA EN SEDIMENTOS Y AGUA FILTRADA EN LOS CUERPOS DE AGUA PERTENECIENTES A LA CUENCA ALTA Y BAJA DEL RIO SALADO.

## DISCUSIÓN

La presencia y ocurrencia de glifosato y AMPA en los cuerpos de agua de la cuenca del Rio Salado, estuvo presumiblemente influenciada por las actividades agrícolas desarrollados en la cuenca. En general, los resultados corroboraron la hipótesis planteada. En este sentido, la presencia del herbicida en la cuenca alta fue persistente, y salvo en el sector norte de la laguna de Gómez (GON), la frecuencia de detección estuvo por encima del 70%. En la laguna de Mar Chiquita (MA1), el 100% de las muestras analizadas fueron positivas y fue donde se registraron las máximas concentraciones de herbicida ( $105,70 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). La contaminación por glifosato y AMPA en la laguna de Carpincho podría tener un origen mixto (agrícola y urbano) dada la

cercanía de esta laguna a la ciudad de Junín. En la cuenca baja, en la laguna Chascomús se observó que los arroyos VA, LT y AI contribuyeron a la polución de la laguna con aportes, principalmente, de AMPA, aunque también se detectó glifosato en dos ocasiones en VA. El centro de la laguna de Chascomús (CH 2) fue el punto más contaminado por glifosato y donde se detectaron las mayores concentraciones de toda la cuenca:  $77,52 \mu\text{g kg}^{-1}$  en otoño de 2017 seguido de  $39,95 \mu\text{g kg}^{-1}$  en invierno de 2017. La ausencia de residuos de herbicida en CH 1 y MB podría deberse al escaso número de muestras analizadas. En la laguna Chascomús, se observaron grandes diferencias en las concentraciones observadas entre sitios que fueron muestreados el mismo día. Esto es, la detección de herbicidas en un punto de la laguna no significó la detección en el resto de los puntos para una misma fecha de muestreo. Lo que indicaría que las fuentes de contaminación estarían siendo influenciadas por factores locales que dictarían los pulsos de glifosato y AMPA hacia la laguna. Algunos de estos factores ya fueron mencionados en el capítulo anterior: decisiones de los productores sobre qué cultivos producir, cuándo realizar las aplicaciones, lavado de maquinaria agrícola en los cuerpos de agua, entre otras.

En general, tanto las concentraciones como las frecuencias de detección de glifosato y AMPA reportadas aquí, fueron mayores a las observadas en el *capítulo 2*. Así, las frecuencias de detección de AMPA en los sedimentos fueron 7 veces más frecuentes (57% este capítulo vs. 8% capítulo 2) y las concentraciones medias fueron 6 veces mayores ( $10,55 \mu\text{g kg}^{-1}$  vs.  $1,73 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Las concentraciones medias de glifosato fueron similares, aunque las frecuencias de detección fueron menores en este estudio. Por otro lado, las concentraciones máximas de glifosato y AMPA detectadas en los sedimentos fueron casi 4 y 3 veces mayores a las detectadas en los sedimentos de las lagunas analizadas en el *capítulo 2*. Los estadísticos observados (frecuencia,

concentraciones medias y máximas) en las concentraciones de AMPA disuelto fueron similares para ambos conjuntos de muestras.

Al igual que en el estudio espacial de glifosato (*capítulo 2*) se observó: (i) un patrón mutuamente excluyente en la ocurrencia del glifosato y el AMPA; y (ii) que la detección de herbicida en más de un compartimento fue infrecuente (97% de las muestras). Si se considera al porcentaje de AMPA (%AMPA) como un indicador del grado de degradación del glifosato en la mayoría de los casos el glifosato había sido degradado (%AMPA = 100%) al momento de tomar la muestra, y en los casos en los que ambos compuestos se detectaron juntos, la concentración de AMPA era en promedio unas 13 veces mayor a la de glifosato. La tendencia observada de detección de residuos de herbicida en solo un compartimento, principalmente en los sedimentos, pareciera ser el comportamiento de estos compuestos en las lagunas. Presumiblemente, la mayor frecuencia de detección en sedimentos podría estar indicando: i) la alta afinidad del glifosato por los sedimentos al que se adsorbería rápidamente una vez en la laguna; ii) el glifosato alcanzaría estos cuerpos de agua principalmente por escorrentía al unirse a las partículas del suelo; iii) y, finalmente, la menor tasa de degradación del glifosato en la fracción sólida (sedimentos) que en la fracción disuelta (agua filtrada) (Zaranyika and Nyandoro, 1993).

Las aplicaciones de glifosato para el control de malezas en cultivos de maíz y soja de primera, se realizan comúnmente entre 30 y 60 días previos a la siembra, que se realiza entre septiembre y octubre, hasta antes de emergencia. En soja de segunda (diciembre) las aplicaciones se realizan previa o posteriormente a la cosecha de trigo, hasta antes de la emergencia (INTA 1997; INTA, 1997). Por lo tanto, los picos de concentración de glifosato y AMPA observados en primavera y verano en ambos tramos de la cuenca, podrían corresponder a este tipo de aplicaciones. Las cuales fueron transportadas, posteriormente, desde los establecimientos agrícolas hacia la laguna y

sus afluentes. Por otro lado, los picos de glifosato detectados en invierno y otoño podrían corresponder a aplicaciones de glifosato previas a la siembra de trigo, la que se realiza durante el período invernal.

Colectivamente, los resultados aquí expuestos sugieren la existencia de patrones espaciales y temporales tanto en la frecuencia de detección como en las concentraciones de herbicidas en las lagunas pampeanas. Estos cuerpos de agua, se encuentran expuestos a fuentes de contaminación difusas y puntuales de origen diverso, tanto agrícola como urbano. Se observó que, en cuencas con alto grado de desarrollo agrícola, la probabilidad de realizar detecciones positivas es alta y mayor que en lagunas pertenecientes a cuencas con otra orientación productiva, como es el caso de la laguna Chascomús y sus afluentes. Se observó un comportamiento estacional con máximos durante la primavera y el verano, que responderían a los momentos de aplicación recomendados para los principales cultivos producidos en las cuencas. Sin embargo, las detecciones positivas en otros momentos del año advierten sobre posibles fuentes de contaminación que podrían haber sido inadvertidas en este estudio y que contribuirían a la polución de las lagunas de manera puntual (red de desagüe urbana, canales aliviadores y otros arroyos) y difusa (escorrentía urbana y agrícola). Finalmente, de acuerdo a las últimas estimaciones agrícolas realizadas por el Ministerio de Agroindustria de la Nación, tanto en la cuenca alta como baja del Río Salado, se observó un aumento promedio del 48% de la superficie destinada a maíz entre la campaña agrícola 2015-2016 y la campaña agrícola 2017-2018; estas estimaciones harían suponer que la presencia de agroquímicos en el ambiente continuará de manera persistente. Resta discutir el rol que juegan las características limnológicas y morfométricas de cada cuerpo de agua como también las concentraciones de grupos fosfatos y la presencia iones (como los óxidos de aluminio) en la frecuencia y concentraciones detectadas.

**CAPÍTULO 4: EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA  
ABUNDANCIA MICROBIANA**

## RESUMEN DEL CAPÍTULO

Los herbicidas a base de glifosato (HBG) son los fitosanitarios más utilizados a nivel mundial. A pesar que el glifosato posee un efecto negativo sobre la biota, puede estimular el crecimiento de pequeñas ( $\varnothing < 2\mu\text{m}$ ) cianobacterias (picocianobacterias, Pcy) que son capaces de metabolizarlo y degradarlo. Estudios experimentales previos en microcosmos y mesocosmos han reportado aumentos en la abundancia de Pcy en respuesta al agregado de glifosato, pero la evidencia de campo comparable a estos estudios era, hasta ahora, inexistente. Para abordar esta cuestión, se realizó un relevamiento extensivo donde se recolectó información sobre la abundancia de Pcy en 52 lagunas de la región pampeana (con más de 20 años de uso de HBG) y 24 lagunas de la región patagónica (virtualmente sin historial de uso) y se plantearon tres interrogantes: (1) ¿existe evidencia de campo sobre el efecto estimulante del glifosato sobre la abundancia de Pcy?, (2) ¿es la magnitud del efecto del glifosato a escala de campo comparable a lo reportado bajo condiciones experimentales?, y (3) ¿cómo se compara la magnitud de este efecto con el efecto de otros predictores de la abundancia de Pcy tales como son las variables ambientales y espaciales? Para contestarlos, nos valimos de tres indicadores de impacto de glifosato: i) la concentración del herbicida; ii) la presencia de genes del metabolismo de fosfonatos (responsables de la degradación de glifosato y AMPA), en muestras ambientales de ADN; y, iii) descriptores de uso y cobertura de los alrededores de las lagunas. Los resultados expuestos este capítulo son consistentes con la hipótesis de que las prácticas agrícolas basadas en el herbicida glifosato tienen importantes efectos en las comunidades microbianas de agua dulce, particularmente, promueven la abundancia de Pcy en estos ambientes<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Parte de estos resultados fueron publicados en Castro Berman y colaboradores (2020).

## **Objetivos**

El objetivo general de este capítulo es evaluar el efecto de los indicadores de impacto de glifosato sobre la abundancia de las comunidades microbianas en las lagunas pampeanas y patagónicas.

### **Objetivos específicos**

- 1- Evaluar si existe efecto del uso del glifosato en los sistemas agrícolas sobre la abundancia de las comunidades microbianas, particularmente sobre la abundancia de Pcy, en las lagunas.
- 2- Comparar la magnitud del efecto de los indicadores de impacto de glifosato a escala de campo con el reportado bajo condiciones experimentales.
- 3- Cuantificar la importancia del glifosato sobre la abundancia de las comunidades microbianas, y compararlo con los efectos de otras variables ambientales y geográficas.
- 4- Plantear escenarios con distinto grado de impacto a fin de predecir la abundancia de Pcy.
- 5- Interpretar los resultados obtenidos en este estudio en relación a: i) las abundancias reportadas en la bibliografía, ii) La respuesta observada en las distintas comunidades microbianas y, iii) las consecuencias para la biota y la salud humana.

## INTRODUCCIÓN

Los pesticidas son utilizados con la intención explícita de ejercer efectos tóxicos en los organismos. Desafortunadamente, su ocurrencia no se limita exclusivamente a la ubicación donde se aplican y su presencia en otros ambientes ha sido extensamente reportada (Allinson y colaboradores, 2015; Battaglin y colaboradores, 2014; Castro Berman y colaboradores, 2018; Richards and Baker, 1993). Esta movilidad representa un potencial riesgo toxicológico hacia los organismos no blanco y también podría tener efectos en la estructura y función de los ecosistemas no agrícolas (Deneer, 2000). Los pesticidas y otros insumos agropecuarios (por ejemplo fertilizantes químicos), en general, provocan un incremento en los niveles tróficos de los sistemas acuáticos (Austin y colaboradores, 1991).

Las comunidades microbianas son componentes fundamentales de las tramas tróficas acuáticas, y además, desempeñan un papel muy importante en la productividad primaria, el reciclado de nutrientes, la captura de la materia orgánica y el resto de los ciclos biogeoquímicos tanto en aguas continentales como oceánicas (Sherr and Sherr, 2000). Por lo tanto, las alteraciones que los estresores (ambientales y/o antropogénicos) puedan tener, como por ejemplo un aumento en el nivel trófico, repercutirán en la funcionalidad de los sistemas acuáticos y los servicios ecosistémicos que brindan (Cardinale y colaboradores, 2012). En las lagunas pampeanas, las Pcy son los organismos mayoritarios del componente de autótrofos. De hecho, algunos valores de abundancia se encuentran entre los máximos reportados para lagos con estado trófico similar en otras partes del mundo (Fermani y colaboradores, 2015; Silviso y colaboradores, 2011).

Los primeros cambios en el uso de la tierra en el pastizal pampeano datan del siglo XVI, cuando los conquistadores del Imperio Español, introdujeron el ganado

vacuno desde Potosí, Santiago de Chile y Paraguay (Tieffemberg, 2012). A pesar de haber sido abandonados, estos ejemplares se encontraron en una región con condiciones casi inmejorables para su reproducción: abundante agua y alimento, un clima benigno y la ausencia de depredadores. Así, luego de la recolonización del territorio y durante el período de organización nacional, la ganadería fue el principal componente de la economía, representando el ~55% del PBI para el año 1875 (Reca, 2006). A principios del siglo 20, con la introducción y expansión de los cultivos de trigo, maíz y lino, la ganadería le cedió, paulatinamente, participación a esta nueva actividad. Luego de una etapa de rápido crecimiento (1902-1930), la actividad agrícola sufrió un fuerte período de estancamiento/declinación (1930-1953), seguido de una etapa de (lento) crecimiento hasta que a fines de 1980 los volúmenes de siembra fueron comparables a los de 1930 (Reca, 2006). Debido a una conjunción de factores, durante la década de 1990, se observó un proceso de expansión e intensificación de la actividad agrícola, entre los que se destacan la contracción de la actividad ganadera, el aumento de los precios relativos de ciertos productos agrícolas, el aumento en las precipitaciones, la introducción de variedades transgénicas de soja (1996), maíz (1998) y algodón (1998) y los avances tecnológicos en siembra y protección de cultivos. Esta situación produjo un desplazamiento de la frontera agrícola por fuera de la región pampeana y una reestructuración de la producción, en la cual la soja dejó de ser un cultivo marginal para convertirse en la primera opción para la mayoría de los productores (Vazquez y Zulaica, 2013).

Quirós (2006) denominó a este rápido proceso de intensificación, reestructuración y expansión de la producción agrícola en el pastizal pampeano y su humedal, como “agriculturización”. Este proceso drenó, en algunos casos, los sistemas acuáticos para su aprovechamiento productivo o como fuente de agua, y en otros agravó su eutrofización cultural, incrementando los ingresos de insumos agrícolas,

#### Capítulo 4: Efecto del glifosato sobre la abundancia microbiana

especialmente fertilizantes y pesticidas químicos a los mismos (Figura 17). En muchos casos, la agriculturización promovió cambios en los estados de equilibrio (ver Scheffer y colaboradores, 1993) de las lagunas pampeanas, virando las lagunas claras, vegetadas y dominadas por macrófitas sumergidas (*Myriophyllum sp.* y *Ceratophyllum demersum*) y emergentes (*Schoenoplectus californicus*) hacia un estado de equilibrio turbio, caracterizado por una alta turbidez y abundancia de fitoplancton (Allende y colaboradores, 2009). Particularmente, la presencia de glifosato ha sido extensamente detectada en ambientes naturales de la región pampeana (Alonso y colaboradores, 2018; Aparicio y colaboradores, 2013; Castro Berman y colaboradores, 2018; Lupi y colaboradores, 2015). Como se vio en los capítulos anteriores, la detección de glifosato en las lagunas pampeanas está influenciada por un complejo escenario creado por la distribución espacial de las lagunas, la heterogeneidad de los usos de suelo, los patrones de aplicación de pesticidas y diversas fuentes de contaminación.



FIGURA 17 ESCURRIMIENTO SUPERFICIAL EN UN CAMPO DE CULTIVO

El glifosato, pertenece a una familia de moléculas orgánicas que poseen una unión covalente entre los átomos de fósforo y carbono, llamadas fosfonatos. Se requiere una alta energía de activación para hidrolizar este enlace C-P, por lo que solo algunas procariontas y hongos son capaces de asimilarlos como fuente de P, N o C. Existen microorganismos que poseen la capacidad de acumular, desintoxicar, e incluso metabolizar este y otros pesticidas (ver Haro and De Lorenzo, 2001; Singh y colaboradores, 2016; Stanley and Preetha, 2016). Por ejemplo, algunas cepas de *Pcy* son capaces de hidrolizar glifosato, lo que les permite crecer en medio enriquecido con glifosato como única fuente de fósforo (Ilikchyan y colaboradores, 2009). Existen cuatro mecanismos descritos para la asimilación de fosfonatos, tres de estos mecanismos incluyen enzimas sustrato específicas (fosfonatasas) con sus respectivos mecanismos de transportes, y el otro es un mecanismo multi enzimático de amplia especificidad denominado mecanismo de liasa de C-P (ver detalle en cuadro 1). Este último, escinde la unión C-P a carbono y  $P_i$  y es codificado por una serie de genes, incluido el operón *phnCDE*, que codifica la proteína ABC para el transporte de una gran variedad de fosfonatos (Fn) (Ilikchyan y colaboradores, 2010; Kutovaya y colaboradores, 2013). Particularmente, las *Pcy* poseen un sistema híbrido compuesto por el mecanismo C-P con su operón *phnCDE* y también, por los genes *phnX* y *phnW* asociados a fosfonatasas (Moore y colaboradores, 2005; Su y colaboradores, 2007).

**Cuadro 1 Regulón Pho** Los genes que codifican las proteínas participantes en la respuesta al estrés por fósforo (y la asimilación de fuentes alternativas al fosfato inorgánico), son regulados por el operón Pho. Presente en *E. coli* y también en cianobacterias. Este sistema censa la concentración de fosfato inorgánico ( $P_i$ ) y controla la expresión de genes con gran afinidad para el transporte de  $P_i$  y de otras fuentes alternativas de P (como los fosfonatos). Es un sistema que funciona de manera similar en bacterias y cianobacterias y consta de una serie de complejos proteicos encargados de su activación e inhibición: Pst, PhoR (SphS en cianobacteria), PhoB (SphR en cianobacteria) y PhoU (Figura 18). El sistema Pst (proteína específica de fosfato) está relacionado a los mecanismos moleculares que prenden y apagan el regulón Pho. Está compuesto por cuatro proteínas (PstS, PstC, PstA y PstB) que forman un transportador ABC con alta afinidad para la captura y transporte de  $P_i$  al citoplasma. Junto a la proteína PhoU forman el operón *pstSCAB-phoU* (Keasling y colaboradores, 1998). La proteína de membrana PhoR (SphS en cianobacteria), censa la concentración periplásmica de  $P_i$  en conjunto con el sistema transportador Pst. El componente PhoB (SphR en cianobacterias) es una proteína reguladora de respuesta que actúa como dominio de unión al ADN en secuencias específicas (caja *pho*) que actúa activando o desactivando la transcripción (Amemura y colaboradores, 1986; Smith and Payne, 1992). La limitación por fósforo activa el complejo PhoR el cual es autofosforilado y transfiere un grupo fosforilo a PhoB. El PhoB fosforilado se une a la caja *pho* en un promotor y activa la transcripción. Cuando el  $P_i$  está en exceso, el sistema Pst-PhoU forma un complejo con PhoR, que impide la activación de PhoB (Metcalf and Wanner, 1993; Muda y colaboradores, 1992). En un ambiente rico en  $P_i$ , este ingresa al periplasma por medio de porinas o por hidrólisis de fosfatos orgánicos por medio de fosfatasas, que se encuentran constitutivamente expresadas.

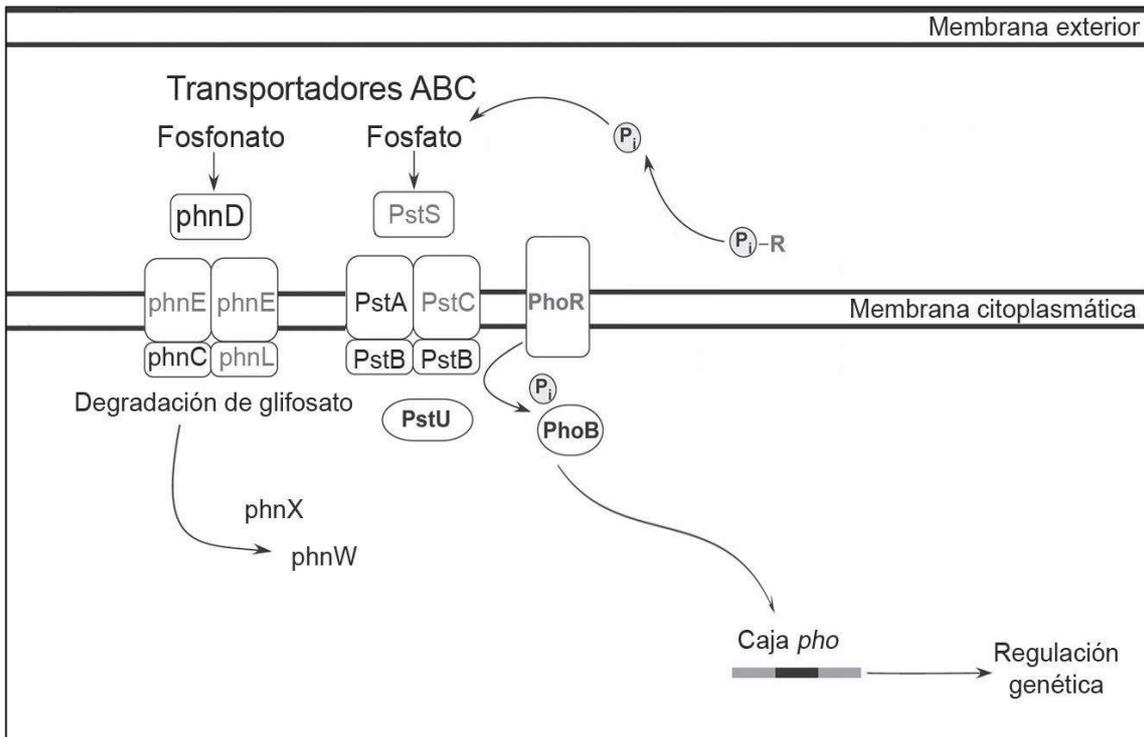


FIGURA 18 CONTROL Y COMPLEJOS PROTEICOS DEL OPERÓN PHO (TOMADO DE LAMARCHE AND WANNER, 2008).

Es notable que todas las Pcy poseen los genes *phnCDE* para el transporte de fosfonatos, y genes potenciales para la degradación de estos (Ilikchyan, 2009; Moore y colaboradores, 2005; Palenik y colaboradores, 2003; Su y colaboradores, 2007). Más aún, la presencia de múltiples copias de del gen *PstS* en Pcy indica la importancia de la asimilación del fosforo en estos organismos, particularmente en ambientes deficitarios o con fuentes alternativas al  $P_i$  (Su y colaboradores, 2007).

Puesto que el gen *phnD* se transcribe en conjunto con los genes *phnC* y *phnE* formando el operón *phnCDE*, su presencia y actividad podría explicar el efecto positivo del agregado experimental de glifosato sobre la biomasa de Pcy. Este fenómeno ha sido observado en numerosos estudios experimentales en microcosmos y mesocosmos (Pérez y colaboradores, 2007; Pizarro y colaboradores, 2016; Qiu y colaboradores,

2013; Vera y colaboradores, 2010; Zhang y colaboradores, 2016). Dichas observaciones contrastan con el efecto tóxico y perjudicial que el herbicida tendría sobre otras comunidades algales y componentes de la biota (Annett y colaboradores, 2014).

Por otra parte, dado que los primeros reportes sobre la existencia y distribución ubicua de las Pcy en ambientes acuáticos (Malinsky-Rushanksy y Berman, 1991; Stockner, 1988; Weisse y Kenter, 1991) son contemporáneos con la expansión e intensificación del glifosato en la agricultura hacia mediados de la década de 1990 (Baylis, 2000; Trigo, 2011), se sospecha que los patrones espaciales de distribución de las Pcy de agua dulce podrían haber sido inadvertidamente influenciados por los cambios en el uso de la tierra, y la incorporación de las nuevas tecnologías agrícolas. Específicamente, se hipotetizó que la adopción de HBG ha aumentado la abundancia de Pcy en la región pampeana. En este capítulo, se plantearon tres interrogantes que se abordarían de manera secuencial: (1) ¿existe evidencia de campo compatible con los efectos estimulantes del glifosato sobre las abundancias de Pcy observados en condiciones experimentales?; (2) ¿resulta comparable la magnitud del efecto a campo con lo observado en condiciones experimentales controladas?; (3) ¿cómo se compara el efecto del glifosato con las otras variables ambientales sobre la biomasa de Pcy? A fin de responder estos interrogantes, se realizó un relevamiento espacial a gran escala, en el cual se recolectó información de 52 lagunas dentro de la región pampeanas (un área con casi tres décadas de uso de glifosato) y 24 lagunas patagónicas (virtualmente sin registros de uso de glifosato).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **INDICADORES DE USO DE GLIFOSATO**

Evaluar el efecto de los agroquímicos (en particular el del glifosato) en las comunidades microbianas naturales es un desafío. Como primera consideración, cabe destacar que la degradación de glifosato a AMPA es un proceso relativamente rápido, y que la vida media de ambos compuestos es corta en ambientes acuáticos (~1 a 12 semanas; Battaglin y colaboradores, 2014). A pesar de ello, sus efectos podrían ser más duraderos de lo previsto. En este sentido, Vera y colaboradores (2010) observaron que a pesar de la corta vida media del glifosato, mesocosmos tratados con un único pulso de Roundup®, mantuvieron altas abundancias de Pcy y turbidez luego de un período de recuperación de un año. Una segunda consideración es que la decisión sobre qué y cuándo realizar las aplicaciones de agroquímicos corresponde a cada productor. Dichas aplicaciones, se encuentran a su vez condicionadas por el cultivo elegido y su desarrollo a lo largo del período productivo. Si bien a nivel regional (a escala de cuenca hidrográfica, por ejemplo) se puede estimar cuándo serán los eventos más probables de aplicación de agroquímicos, la ventana de tiempo en la que efectivamente se realizan son decisiones técnicas ajenas al investigador científico. Más aún, el posterior transporte del herbicida hacia los cuerpos de agua, es un fenómeno aún más impredecible, pues depende tanto de factores ambientales (climáticos, hidrográficos y edáficos) como humanos (por ejemplo, malas prácticas agrícolas; Castro Berman y colaboradores, 2018). Esto implica que la determinación analítica del herbicida es por sí misma una herramienta limitada para evaluar un potencial efecto del glifosato sobre las comunidades biológicas en el ambiente, y en particular en los cuerpos de agua dulce.

En vista de estas consideraciones, nos valimos de dos indicadores adicionales de impacto de glifosato. El primero de estos, es la presencia del gen *Synechococcus.phnD* (de ahora en más *phnD*) en muestras de ADN ambiental. Como ya se mencionó, el gen *phnD* es parte del operón *phnCDE* que codifican proteínas de membrana de Fn tipo ABC, presentes en muchas de las secuencias de genoma de Pcy.

La detección de *phnD* en ambientes naturales, proporciona un indicio de la capacidad de las Pcy de utilizar fosfonatos, incluido el glifosato, como una fuente alternativa de fósforo (Ilikchyan, y colaboradores, 2009). El segundo indicador de impacto de glifosato, es la caracterización del uso y cobertura de suelo en los alrededores de cada laguna. Tal caracterización nos permite discriminar entre usos de suelo altamente dependientes de glifosato (por ejemplo, doble cultivo<sup>3</sup> y cultivos de verano<sup>4</sup>) de otros usos menos dependientes (pasturas implantadas, urbano y otros cultivos) o sin dependencia alguna (humedales y pastizales naturales).

Los indicadores de impacto de glifosato aquí propuestos, podrían ser ordenados de acuerdo a su nivel de especificidad y a su estabilidad como indicadores (Figura 19). Así la detección y cuantificación de glifosato y AMPA es el indicador más específico pero el más propenso a ser influenciado por eventos aleatorios. En el otro extremo, se encuentran las variables de uso de suelo, las cuales se estimaron en base al análisis de imágenes satelitales de las actividades realizadas en los alrededores de las lagunas durante un año, lo que convierte a estas variables en indicadores muy estables en cuanto a la información que proporcionan. La presencia del gen *phnD* indica la potencial capacidad de las Pcy de degradar fosfonatos, pero dado que las Pcy poseen un sistema híbrido para la asimilación de fuentes alternativas de P<sub>i</sub>, otros mecanismos, como el que involucra las enzimas fosfonatasas, podrían estar siendo inadvertidos, y por lo tanto se estaría subestimando el impacto que el glifosato podría tener. De acuerdo a estos criterios, los indicadores están ordenados de la siguiente manera: (i) ocurrencia y concentración de GLI + AMPA en la columna de agua, el material particulado (STS) y sedimento de la laguna; (ii) presencia/ausencia del gen *synechococcus. phnD* (*phnD* [+]

---

<sup>3</sup> Dos productos diferentes cultivados en la misma área durante una temporada de cultivo. Es notable la contribución que realiza el doble cultivo trigo-soja a los sistemas de producción agrícola de la Pampa Húmeda.

<sup>4</sup> Soja y/o maíz.

/ *phnD* [-]) en el ADN ambiental; y (iii) descriptores de uso y cobertura del suelo de los alrededores de la laguna.

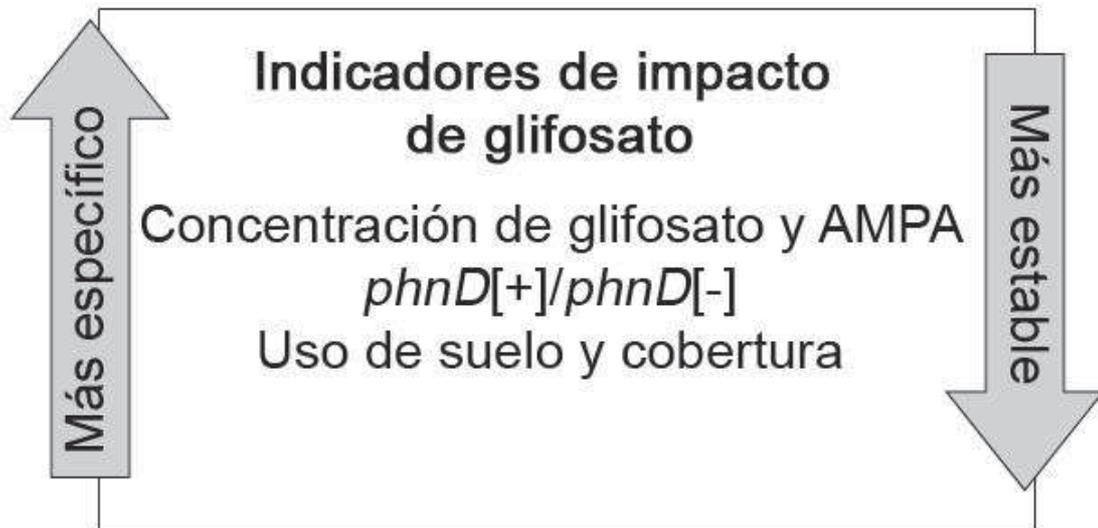


FIGURA 19 INDICADORES DE IMPACTO DE GLIFOSATO. VER DETALLES EN EL TEXTO.

## MUESTREO

Para contestar los interrogantes planteados en la parte, se utilizó del conjunto de lagunas pampeanas y lagunas patagónicas parcialmente descriptos y analizados. Adicionalmente, se evaluó la presencia del gen *phnD* en 60 muestras de cuerpos de agua patagónicos colectadas por el Dr. Epele (ver Epele y colaboradores, 2018). También se realizó una búsqueda bibliográfica para evaluar la abundancia de Pcy en otros cuerpos de agua de otras locaciones. Esta búsqueda incluyó más de 500 datos de lagos, lagunas, embalses, turberas y ríos de alrededor del mundo. Resumiendo, las fuentes de información son: (i) datos generados en esta tesis; (ii) lagunas de la región

Capítulo 4: Efecto del glifosato sobre la abundancia microbiana

más austral de la cuenca del Río Paraná (comunicación personal, M. Devercelli; -33,94° S -58,40° W; Argentina); (iii) evaluación del gen *phnD* en muestras de cuerpos de agua patagónicos (comunicación personal, Luis Epele); y (iv) reportes de la literatura. La tabla 15 resume los datos y fuentes de información analizados en este capítulo.

**TABLA 15 FUENTES DE INFORMACIÓN Y VARIABLES CONSIDERADAS EN ESTE CAPÍTULO**

<b>Fuentes de información</b>			
	Este estudio	Epele y colaboradores (2018)	Referencia bibliográfica*
<b>N° de muestras</b>	76	60	539
<b>Ubicación</b>	Pampa- Patagonia	Patagonia	Resto del mundo- Pampa
<b>Variable dependiente</b>	Abundancia de Pcy	Calidad de agua	Abundancia de Pcy
<b>Indicadores de impacto de glifosato</b>	1- Concentración de glifosato concentración; 2- <i>phnD</i> ; 3-uso y cobertura de suelo	<i>phnD</i> ; Uso de suelo	-
<b>Variables ambientales</b>	Estado trófico, variables fisicoquímicas	-	Estado trófico

---

\*PAMPA: ALLENDE Y COLABORADORES, 2009; FERMANI Y COLABORADORES, 2015; SILVOSO Y COLABORADORES, 2011. RESTO DEL MUNDO: BELYKH Y COLABORADORES, 2005; CAMACHO Y COLABORADORES, 2003; COLLOS Y COLABORADORES, 2009; DITTRICH Y COLABORADORES, 2004; FAHNENSTIEL AND CARRICK, 1992; FELFÖLDI Y COLABORADORES, 2009; HEPPERLE AND KRIENITZ, 2001; JASSER AND ARVOLA, 2003; LAVALLÉE AND PICK, 2002; PICK, 1991; PICK AND BERUBE, 1992; SARMENTO Y COLABORADORES, 2008; SCHIAFFINO Y COLABORADORES, 2013; SIMEK Y COLABORADORES, 1996; STOCKNER AND SHORTREED, 1991A; VICTORIA QUIROGA Y COLABORADORES, 2013; VÖRÖS AND PADISÁK, 1991; WEISSE, 1988; WEISSE Y COLABORADORES, 1991; M. DEVERCELLI COMUNICACIÓN PERSONAL.

---

## **PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**

### **DETERMINACIONES DE VARIABLES LIMNOLÓGICAS, DE USO Y COBERTURA DE SUELO Y CONCENTRACIONES GLIFOSATO Y AMPA**

Las determinaciones de estas variables se realizaron de acuerdo a lo detallado en la sección de métodos del *capítulo 2*.

### **DETECCIÓN DEL GEN PHND**

Para evaluar la presencia del gen *phnD* en muestras ambientales, se filtró un litro de agua por red de zooplancton (poro de red de  $\varnothing$  45  $\mu\text{m}$ ), la misma se conservó en frío (4 °C) hasta su posterior procesamiento (no más de 4 horas desde el evento de muestreo). Para los análisis moleculares se filtró utilizando una bomba de vacío (dependiendo de turbidez de la laguna) un volumen estimado de 25 ml (lagunas turbias) a 200 ml (lagunas claras) por un filtro de policarbonato blanco de 0,22  $\mu\text{m}$  ( $\varnothing$  47 mm, Millipore). Los filtros se congelaron inmediatamente con  $\text{N}_2$  y se almacenaron a -80 °C

en recipientes plásticos libres de DNasa y RNasa hasta el momento de extracción del ADN.

### EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del material genético ambiental contenido en los filtros se realizó de acuerdo a las modificaciones para lagunas pampeanas propuestas por Llamas y colaboradores (2013) al protocolo de extracción por CTAB descrito por Fernández Zenoff y colaboradores (2006). La concentración y calidad de los ácidos nucleicos extraídos se estimó usando un equipo Synergy™ H1 (BioTek). Los filtros se incubaron a 60 °C por 30' en solución de lisis CTAB tibio (2 % CTAB, 1,4M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8). Luego, se realizó la purificación de los lisados, que consistió en la adición de una solución (0,7 mL) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), seguido por centrifugación por 10' a 14.000 rpm. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a otro tubo tipo Eppendorf™ estéril. Este lavado se repitió tres veces con la solución alcohólica mencionada. Luego de la purificación, el ADN se precipitó con isopropanol frío, incubándose por una hora a 4 °C y centrifugándose por 30' a 14.000 rpm. Finalmente, se lavó el pellet con etanol frío (80%), se dejó secar a temperatura ambiente y se suspendió en 40 µL de solución reguladora TE 1×.

### AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS CORRESPONDIENTES AL GEN *PHND*

Para la amplificación del gen *phnD* se utilizó 1 µL de molde de ADN

ambiental y los oligonucleótidos *phnD\_syn119F*:5'-TCGGNGCM  
ATYCCSGATCAGAACCCSG-3'; *phnD\_syn734R*:5'-TTGGGCTGSGCGASCCAGTGG

TARTC-3'; *phnD* syn731R2: 5'-GGNCGNGCCACCCAGTGGTARTC-3'. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Para formar la mezcla de reacción, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de ADN ambiental (concentración final 5 ng ADN  $\mu\text{L}^{-1}$ ) a 24  $\mu\text{L}$  de mezcla de PCR compuesto por: 2,5  $\mu\text{L}$  concentración final 10 $\times$  de solución reguladora (Invitrogen <sup>TM</sup>), 0,25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los desoxirribonucleicos (concentración final: 10 mM), 0,75  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (concentración final: 0,5 mM), 1,25  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (*cebador*, concentración final: 10  $\mu\text{M}$ ), 0,125  $\mu\text{L}$  de la enzima *Taq* ADN polimerasa (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ , Invitrogen <sup>TM</sup>, CA, USA, <http://www.invitrogen.com>), y 16,625  $\mu\text{L}$  de agua nano pura.

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando un equipo T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BIO-RAD) de acuerdo a los protocolos propuestos por Ilikchyan y colaboradores (2009), con las siguientes modificaciones: el termociclado fue precedido por un paso de calentamiento a 94 °C de 5 minutos, seguido de 10 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto cada uno; hibridación/templado (*annealing*) a 65 por 1 minuto y, finalmente, el paso de extensión a 72 °C por 3 minutos. En cada paso, la temperatura fue disminuyendo 1 °C por cada ciclo hasta alcanzar los 56 °C (ciclos *touchdown*). Luego de los ciclos *touchdown*, 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto; *annealing* a 55 °C por 1 minuto, y extensión/elongación a 72 °C por 3 minutos y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos completaron la PCR.

Una alícuota del producto de PCR fue analizado y cuantificado contra un marcador de peso molecular estándar (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen <sup>TM</sup>) en un gel de agarosa (1%). Como control positivo se utilizó ADN extraído de cultivo de *Synechococcus* aislado de la laguna pampeana La Barrancosa (LB).

## **ABUNDANCIAS Y ESTIMACIONES DE PCY Y BH**

## Capítulo 4: Efecto del glifosato sobre la abundancia microbiana

Las muestras para realizar las estimaciones de picoplancton (Pcy, Peuk y BH) y de flagelados heterótrofos (FH) por microscopía de epifluorescencia, se colectaron en tubos tipo Falcon™ de 50 mL y se fijaron con glutaraldehído frío (previamente filtrado, concentración final: 1%). Se almacenaron en frío (4 °C) y en oscuridad hasta su posterior procesamiento (dentro de las primeras 24 h desde el evento de muestreo). De acuerdo a la densidad de microorganismos, turbidez y contenido de STS, las muestras fueron filtradas a fin de hacer posible su cuantificación. De esta manera, se filtró, entre 20 µL (por ejemplo, lagunas turbias con alto contenido de STS, organismos y turbidez) y 5.000 µL (por ejemplo, lagunas claras con escaso contenido de STS, organismos y baja turbidez) para picoplancton; y, bajo el mismo criterio, entre 100 µL y 15.000 µL para la cuantificación de FH. Se tiñeron las muestras con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, solución final: 5 µg mL<sup>-1</sup>, Porter and Feig, 1980) y cada volumen elegido se filtró por vacío (nunca excediendo los 254 mm HG) por filtros de policarbonato negro de poro de ø 0,22 µm para picoplancton y ø 0,80 µm para FH. Luego, los filtros se montaron en una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia sobre un portaobjetos y fueron cubiertos con un cubreobjetos. Finalmente, los filtros fueron congelados (-20 °C) y almacenados hasta su posterior análisis. Para estimar el número de organismos se utilizó un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i (1.000x). Dentro de la fracción picoplanctónica, se identificaron bacterias concoides heterótrofas (BH) bajo luz UV (BP 340 - 380 nm, FT 400 nm, BP 435 - 485 nm), Pcy bajo luz verde (BP 510 - 560 nm, FT 565 nm, LP 590 nm) y Peuk bajo luz azul (BP 450 - 490 nm, FT 500 nm, LP 515 nm). Los FH fueron cuantificados bajo luz azul y UV, para discriminar a los organismos heterótrofos de los autótrofos.

Se observó una alta variabilidad morfológica (células aisladas, filamentos y colonias), la cual fue categorizada y su abundancia estimada (Figura 20). Así, dentro la comunidad de BH estuvo presente un morfo filamentoso al cual se identificó como BHF.

La comunidad de Pcy estuvo compuesta por (i) células unicelulares aisladas (*UPcy*); (ii) en división celular (*+Pcy*); (iii) micro agregados y colonias (*CPcy*); (iv) finalmente, se identificó la presencia de filamentos cortos (*FPcy*). Se categorizó a los Flagelados Heterótrofos (FH) de acuerdo a su tamaño:  $<2\ \mu\text{m}$ ,  $2\text{-}5\ \mu\text{m}$ ,  $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ , y  $>10\ \mu\text{m}$ . Un máximo de 12% de error fue aceptado para estimar la entidad más frecuente de los componentes planctónicos analizados.

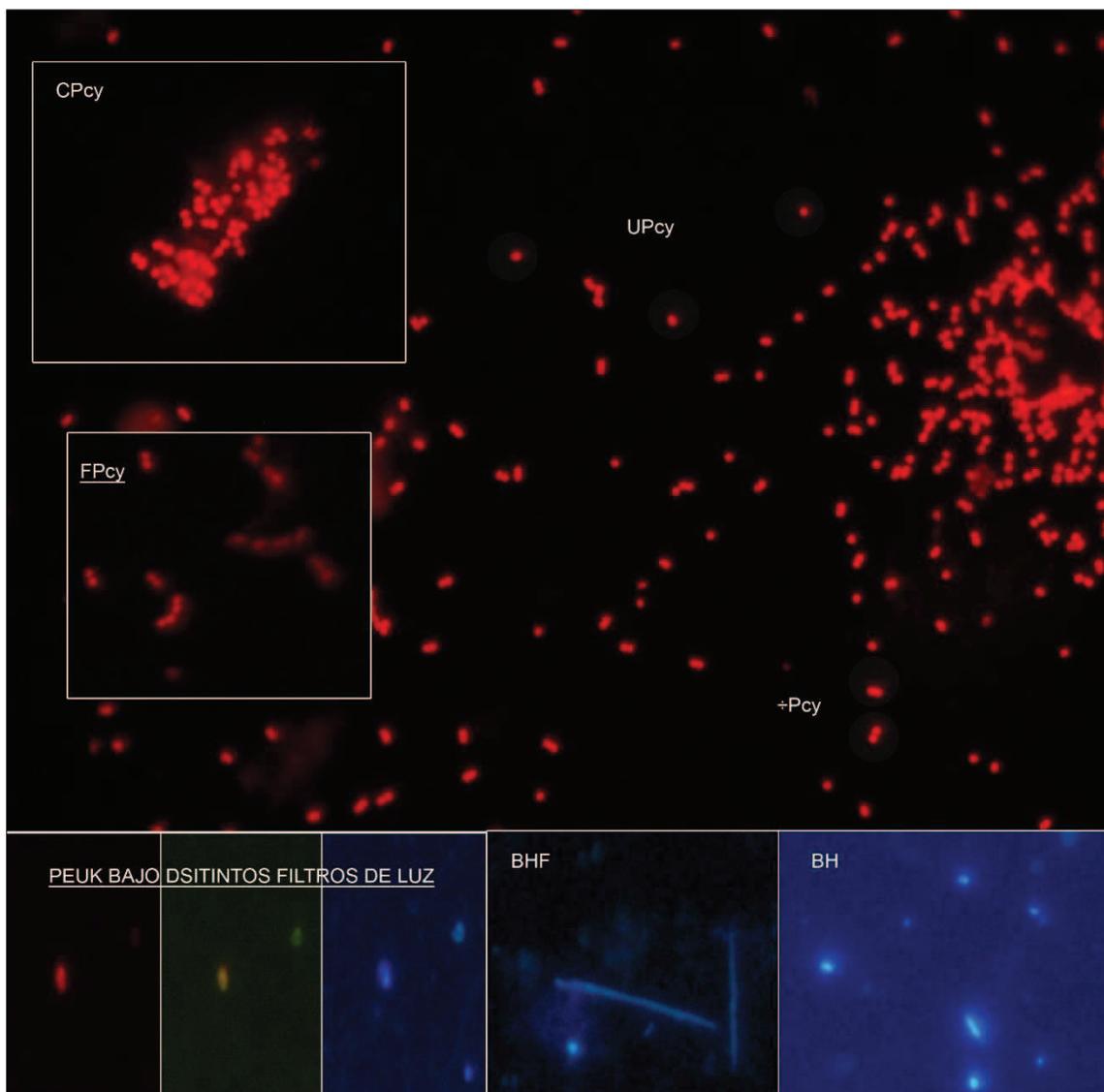


FIGURA 20 FOTOGRAFÍAS DE LOS COMPONENTES MICROBIANOS CONSIDERADOS EN ESTA TESIS TOMADOS CON MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA BAJO DISTINTOS FILTROS DE LUZ.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de evaluar la variabilidad de los efectos del glifosato sobre los patrones de abundancias de los componentes microbianos, pero particularmente de Pcy, se consideraron tres tipos de variables explicativas: (1) variables descriptoras de características limnológicas (turbidez, nutrientes, materia orgánica, variables morfométricas, etc.), (2) indicadores de impacto de glifosato (concentración de glifosato y AMPA, presencia/ausencia de *phnD* y uso y cobertura de suelo) y (3) la estructura espacial (es decir sus coordenadas geográficas). Se aplicó la transformación  $\log_{10}(x+1)$  a las variables limnológicas, las cuales incluyeron NOT, NODT, FT, FDT, turbidez nefelométrica, STS, PSLC, *Cl-a*, área, oxígeno disuelto, temperatura del agua, pH, conductividad, COD y profundidad del disco de Secchi. Las proporciones (uso del suelo) fueron transformadas por el arcoseno de la raíz cuadrada.

Se obtuvieron estadísticos resumen (media, máx., min. y desvío estándar), a fin de evaluar los rangos de variación media y desvío de las variables ambientales y de los indicadores de impacto de glifosato para ambas regiones (Pampa y Patagonia). También se calcularon las correlaciones (índice de correlación de Spearman) para explorar el grado de asociación entre las variables y discriminar las redundantes. Asimismo, se comparó la abundancia de Pcy y BH entre regiones por medio de la prueba de rango de Wilcoxon. Estos análisis fueron implementados sin transformar las variables y realizados con los paquetes “*pspearman*” (Savicky, 2015) y “*coin*” (Hothorn y colaboradores, 2006) del entorno R (<http://cran.r-project.org>).

Se examinaron los patrones de abundancia de Pcy, por medio de las técnicas multivariantes de ordenación Análisis de Redundancia (RDA) y de Partición de Varianza para determinar las fracciones únicas y compartidas de la variación explicadas por el

conjunto de variables ambientales, los indicadores de impacto de glifosato y el componente geográfico (Peres-Neto y colaboradores, 2006).

Para interpretar la estructura espacial, se utilizaron mapas de auto vectores basados en distancia (dbMEM, Peres-Neto et al y colaboradores, 2006), estos mapas transformaron las coordenadas cartesianas ( $x$  e  $y$ ) de cada laguna en variables predictoras espaciales, tanto a escala pequeña como grande, para utilizarlos en los análisis de regresión, ordenación y correlación, de acuerdo a lo propuesto por Dray y colaboradores (2006). Basados en las coordenadas de los puntos de muestreo se obtuvo una primera matriz de conectividad (B). Se probaron distintos modelos de conectividad: Gabriel, vecinos relativos, esfera de influencia, triangulación de Delaunay, (Figura 21). El modelo de Gabriel (Borcard y colaboradores, 2011a) fue seleccionado según el criterio de información de Akaike (AIC) para definir la conectividad entre sitios vecinos (Borcard y colaboradores, 2011b). Luego, se utilizó el esquema en “W” por defecto (Patuelli y colaboradores, 2006) proporcionado por la función ‘*nb2listw*’ del paquete “*spdep*” (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) para estimar la intensidad de estas conexiones (es decir, matriz de intensidad/peso, A). La matriz final de peso espacial (W) se obtuvo como el producto Hadamard (es decir, término a término) de las matrices A y B. Luego, se identificaron las variables espaciales significativas (MEM) por selección *forward* siguiendo el procedimiento de dos pasos propuesto por Blanchet y colaboradores (2008) (es decir, MEMs significativos con valor de  $P < 0,05$  luego de 999 permutaciones aleatorias). Las tablas fueron destendenciadas antes de testear las correlaciones espaciales para evitar relaciones espurias (Borcard y colaboradores, 2011a).

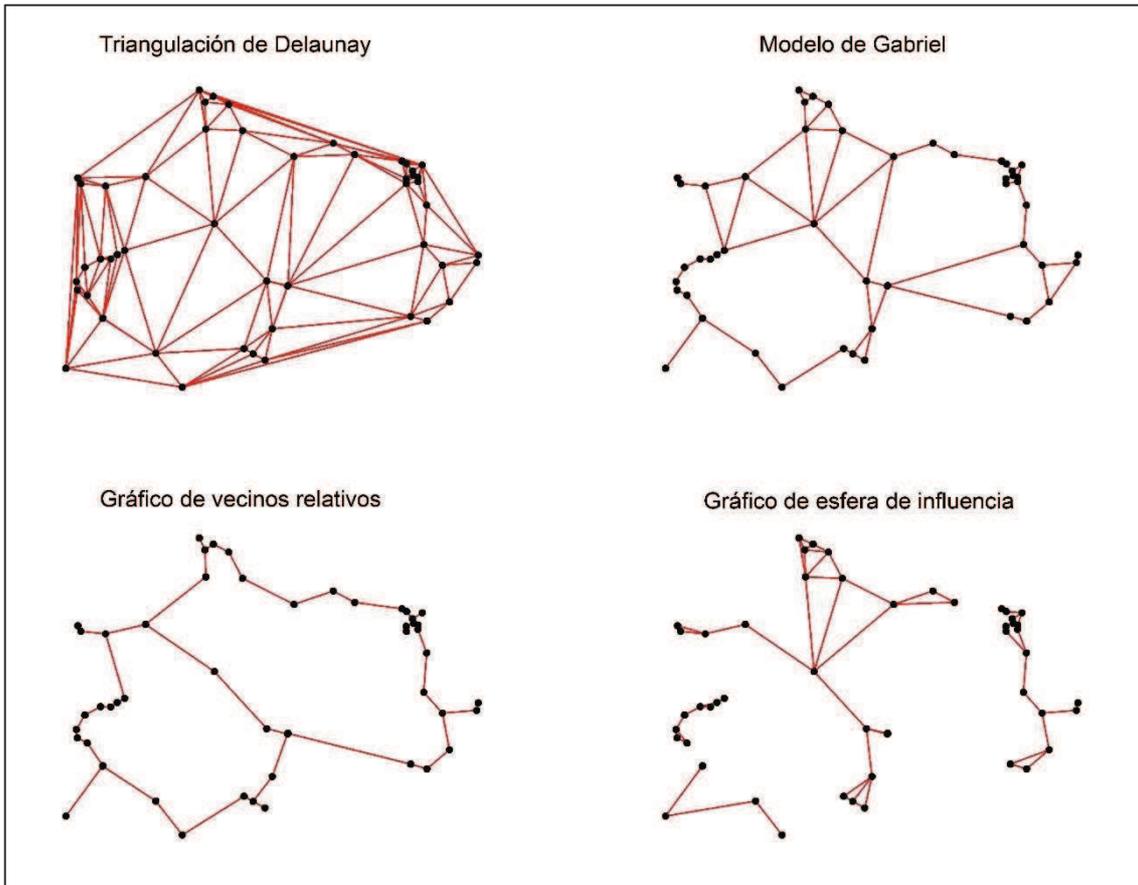


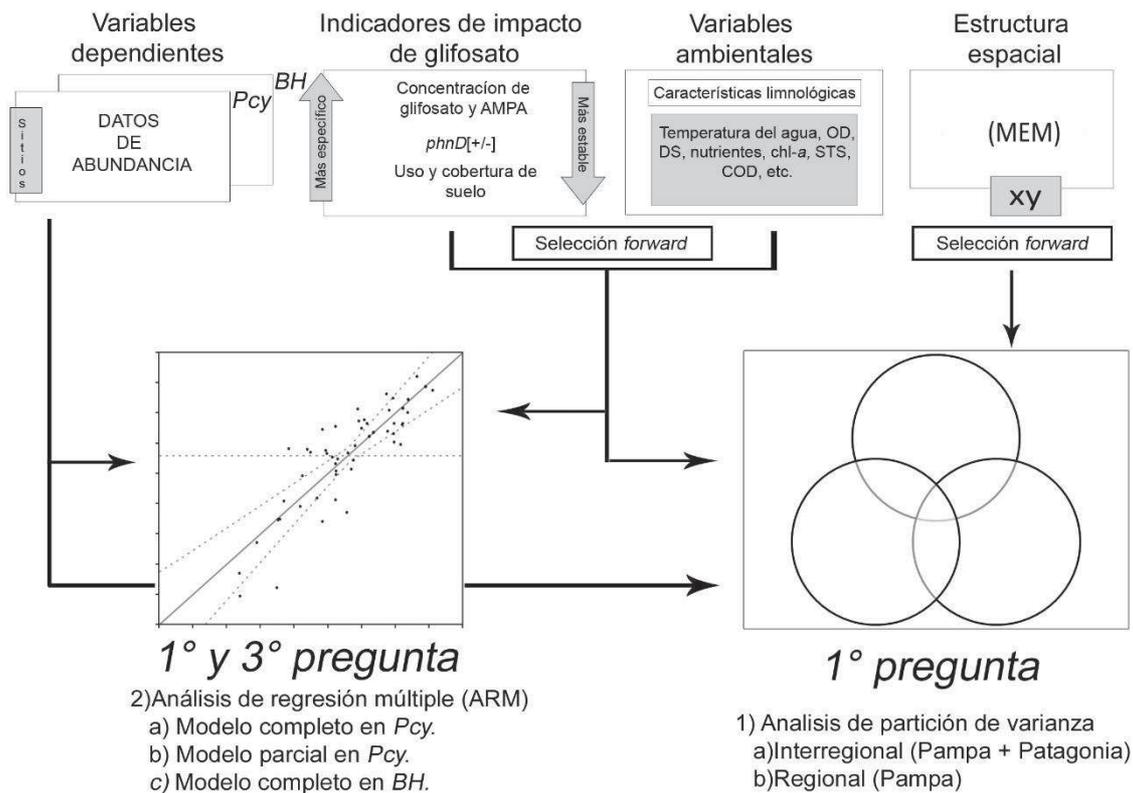
FIGURA 21 MAPAS DE CONECTIVIDAD ENSAYADOS DE ACUERDO A DIFERENTES MODELOS PARA LAS COORDENADAS DE LOS SITIOS MUESTREADOS EN LA REGIÓN PAMPEANA EN EL AÑO 2015.

Se realizaron análisis de partición de varianza utilizando la función “*varpart*” del paquete *Vegan* (Oksanen y colaboradores, 2013). Este análisis se desarrolló a una escala interregional (incluida la región pampeana y patagónica) y regional (incluyendo solo a la región pampeana). Las variables ambientales y de impacto de glifosato significativas se identificaron aplicando la selección hacia delante de dos pasos ya mencionada (*forward double-step*, valor de  $P < 0,05$  luego de 999 permutaciones aleatorias) y se utilizaron para desarrollar los RDA parciales del análisis de partición de varianza (Peres-Neto y colaboradores, 2006). Se reportaron los  $R^2_{adj}$  (R cuadrado ajustado) de las contribuciones puras y compartidas por los tres conjuntos de variables explicativas (Kromrey and Hines, 1995). Se probó la significancia de las fracciones puras

de cada conjunto de variables, la significancia de los ejes y de los distintos modelos, utilizando la función 'anova.cca' del paquete "vegan". Finalmente, se realizaron correlaciones no paramétricas entre los MEMs significativos y los indicadores de impacto de glifosato.

Se utilizó el análisis de regresión múltiple (stepwise), para evaluar el efecto de los indicadores de impacto de glifosato en las abundancias de Pcy y BH. Además de los tres indicadores de impacto de glifosato, el modelo incluyó todas las variables ambientales y la abundancia de FH como variable biológica. Se ensayaron diferentes métodos de selección de variables (hacia adelante, hacia atrás y la combinación de ambas) y diferentes criterios para considerar la bondad de ajuste y fortaleza de los diferentes modelos propuestos (AIC, criterio de información bayesiano (BIC) y prueba sobre el valor de F). Los datos se analizaron por mínimos cuadrados y análisis de covarianza (ANCOVA) y ajustados al modelo de regresión múltiple:  $Y = \beta_0 + \beta_1 \times (X_1) + \beta_2 \times (X_2) + \dots + \beta_k \times (X_k) + \varepsilon$ . El error  $\varepsilon$  se supuso independiente y normalmente distribuido, con media 0 y varianza  $\sigma^2$ . Se implementaron los paquetes *vegan* (Oksanen y colaboradores, 2013), *tidyverse* (Wickham, 2017) y *leaps* (Lumley and Miller, 2017) todos del entorno R (Team, 2014).

La figura 22 resume de manera esquemática la estrategia estadística seguida para contestar los interrogantes.



**2° pregunta:** Comparación con bibliografía y resultados de ARM.

FIGURA 22 ESQUEMA DE LA ESTRATEGIA PLANTEADA PARA RESPONDER LAS PREGUNTAS DE ESTE CAPÍTULO.

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS Y LIMNOLÓGICAS DE LAS LAGUNAS

Las lagunas incluidas en este estudio abarcaron un amplio rango de tamaño, desde 0,12 km<sup>2</sup> a más de 100 km<sup>2</sup>. Todas las lagunas estuvieron bien oxigenadas (OD > 5 mg L<sup>-1</sup>) y presentaron un pH alcalino (excepto por un cuerpo de agua patagónico). Al momento del muestreo, la temperatura media del agua fue de 18,5 °C (± 5 °C) para las lagunas pampeanas y de 16,7 °C (± 2,1 °C) para las patagónicas. Como ya se

mencionó, de acuerdo al TSI propuesto por Carlson (1977) la mayoría de las lagunas presentaron un estado mesotrófico (TSI<sub>FT</sub>: 22%, TSI<sub>Cl-a</sub>: 53%) o eutrófico (TSI<sub>FT</sub>: 62%, TSI<sub>Cl-a</sub>: 43%) con algunas en el rango hipertrófico del espectro (TSI<sub>FT</sub>: 16%, TSI<sub>Cl-a</sub>: 3%). Los cuerpos de agua pertenecientes a la revisión bibliográfica registraron valores mayormente mesotróficos (68%; n=329), seguidos por oligotróficos (18%; n= 87) y eutróficos (12%; n=58), una menor proporción de hipereutrófico (1%; n=4) e incluso fueron observados algunos valores distrófico (1%; n =5).

## **ABUNDANCIA Y ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA**

Las abundancias de Pcy en las lagunas pampeanas registraron valores entre  $2,9 \times 10^3$  y  $1,3 \times 10^7$  org. mL<sup>-1</sup> (media:  $1,8 \times 10^6$  org. mL<sup>-1</sup>; n= 52). Estas estimaciones son similares (y estadísticamente indiferenciables) a las abundancias reportadas con anterioridad para lagunas de la región: 0 to  $7,7 \times 10^7$  org. mL<sup>-1</sup> (media:  $4,8 \times 10^6$  org. mL<sup>-1</sup>; n= 56). Por otro lado, la abundancia de Pcy en los lagos patagónicos varió entre 0 y  $2,5 \times 10^6$  org. mL<sup>-1</sup> (media:  $2,0 \times 10^5$  org. mL<sup>-1</sup>; n= 24). Estos valores fueron similares (y estadísticamente indiferenciables) a los valores reportados para cuerpos de agua de otros lugares del mundo: 0 a  $1,8 \times 10^7$  org. mL<sup>-1</sup> (media:  $3,4 \times 10^5$  org. mL<sup>-1</sup>; n= 483). Las abundancias de Pcy en las lagunas pampeanas fueron, aproximadamente, un orden de magnitud superiores que aquellas reportadas para otras partes (es decir, Patagonia vs. resto del mundo, test de Wilcoxon valor de P <0,0001; Figura 23) y significativamente superiores que aquellas con estado trófico similar (comparaciones de lagunas en el rango eutrófico: test de Wilcoxon valor de P =0,006; comparaciones de lagunas en el rango mesotrófico: test de Wilcoxon valor de P =0,0003; Tabla 16). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las abundancias de BH entre las lagunas

muestreadas en la Pampa y la Patagonia: Pampa:  $4,4 \times 10^6$  org. mL<sup>-1</sup> a  $3,5 \times 10^8$  org. mL<sup>-1</sup> (media:  $4,7 \times 10^7$  org. mL<sup>-1</sup>; n= 52); Patagonia:  $2,6 \times 10^6$  org. mL<sup>-1</sup> a  $4,6 \times 10^8$  org. mL<sup>-1</sup> (media:  $9,3 \times 10^7$  org. mL<sup>-1</sup>; n= 22).

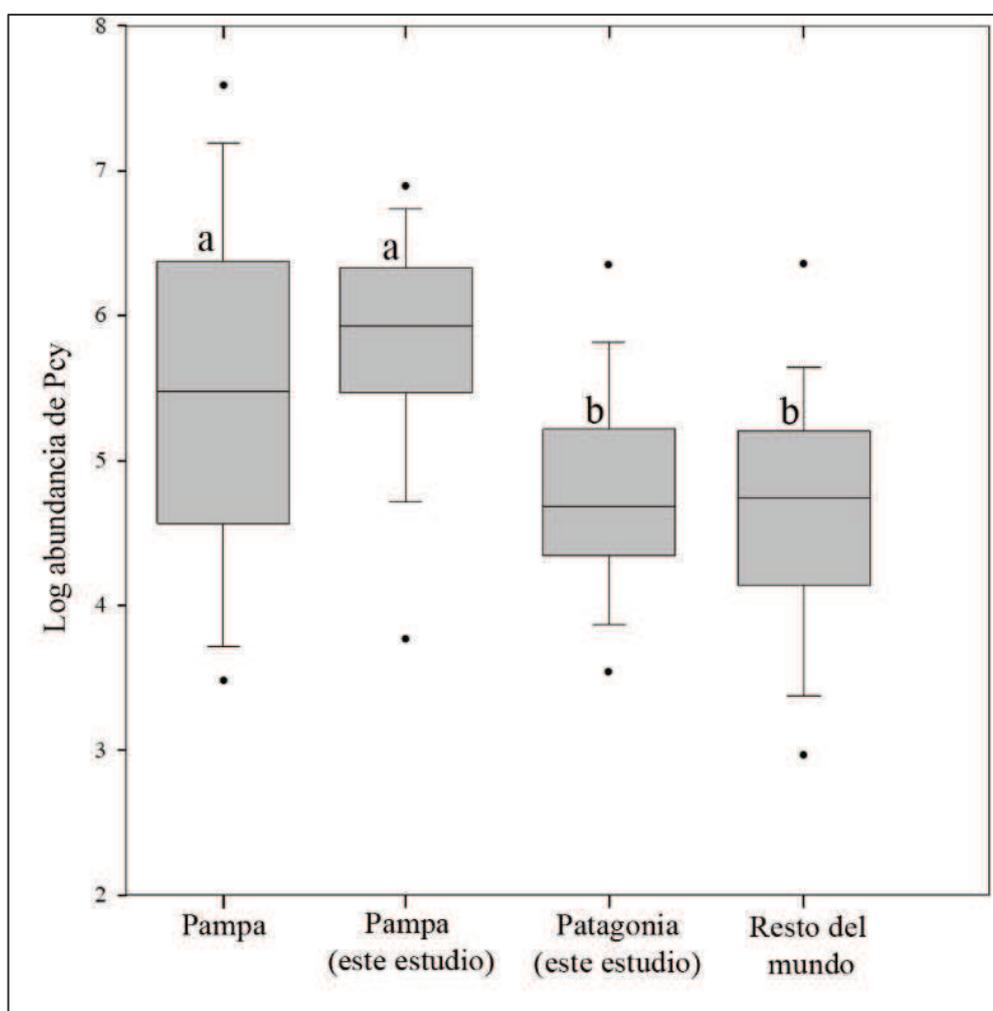


FIGURA 23 DIAGRAMA DE CAJAS ILUSTRANDO EL PERCENTIL 25° - 75° (CAJA), EL PERCENTIL 10° - 90° (BIGOTES), Y EL PERCENTIL 5° - 95° (CÍRCULOS NEGROS POR DEBAJO Y POR ENCIMA DE LA CAJA) DE LA ABUNDANCIA DE PCY REGISTRADAS EN ESTE ESTUDIO (PAMPA N = 52 Y PATAGONIA N = 24) Y DE LA LITERATURA (PAMPA N = 56 Y EL RESTO DEL MUNDO N = 483). LA ABUNDANCIA DE PCY FUE LOG TRANSFORMADA CON PROPÓSITOS ILUSTRATIVOS. LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ESTÁN INDICADAS CON LETRAS ENCIMA DE LAS BARRAS (VALOR DE P < 0,01).

TABLA 16 VALORES ESTADÍSTICOS DE LAS ABUNDANCIAS DE PCY PARA CUERPOS DE AGUA CONTINENTALES SEGÚN SU ESTADO TRÓFICO PARA LA REGIÓN PAMPEANA Y DEL RESTO DEL MUNDO.

	Media	Máximo	Mínimo
<b><u>Mesotrófico</u></b>			
Pampa (org. mL <sup>-1</sup> ) (n=19)	7,9×10 <sup>5</sup>	3,8×10 <sup>6</sup>	2,9×10 <sup>3</sup>
Resto del mundo (org. mL <sup>-1</sup> ) (n=352)	1,8×10 <sup>5</sup>	5,0×10 <sup>6</sup>	0
<b><u>Eutrófico</u></b>			
Pampa (org. mL <sup>-1</sup> ) (n=68)	2,8×10 <sup>6</sup>	7,7×10 <sup>7</sup>	0
Resto del mundo (org. mL <sup>-1</sup> ) (n=59)	1,6×10 <sup>6</sup>	1,8×10 <sup>7</sup>	0

Para evaluar correlaciones entre las abundancias microbiana y las variables ambientales, se realizó el test par a par por rangos de Spearman. En lagunas de la región pampeana, la abundancia de Pcy correlacionó con la turbidez nefelométrica, profundidad del disco de Secchi (DS), Cl-a, peso seco libre de ceniza (PSLC) y los sólidos totales en suspensión (STS), mientras que la abundancia de BH correlacionó con DS y la Cl-a (Tabla 17). Con respecto a la región patagónica, la abundancia de Pcy no evidenció correlaciones con ninguna de las variables ambientales, mientras que la abundancia de BH correlacionó positivamente con la turbidez nefelométrica.

TABLA 17 CORRELACIONES NO PARAMÉTRICAS DE SPEARMAN ENTRE LA ABUNDANCIA DE PCY Y BH Y LAS VARIABLES AMBIENTALES DE LAS REGIONES PATAGÓNICAS Y PAMPEANAS. SOLO SE MUESTRAN LAS CORRELACIONES SIGNIFICATIVAS.

Variable	Pampa	Patagonia
----------	-------	-----------

Capítulo 4: Efecto del glifosato sobre la abundancia microbiana

		<u>Pcy</u>	<u>BH</u>	<u>Pcy</u>	<u>BH</u>
<b>Rho de Spearman</b>	Turbidez	0,60**		0,88**	
	STS	0,55**			
	PSLC	0,67**			
	DS	-0,64**	-0,56**		
	Cl-a		0,55**		

Abreviaciones STS: Sólidos totales en suspensión; PSLC: peso seco libre de cenizas; DS: profundidad del disco de Secchi. Códigos de significancia: '\*\*' 0,001.

**PRESENCIA DEL GEN *PHND***

El gen *Synechococcus.phnD* fue detectado en el 29% de las muestras pampeanas y en el 5% de las lagunas patagónicas (Figura 24).

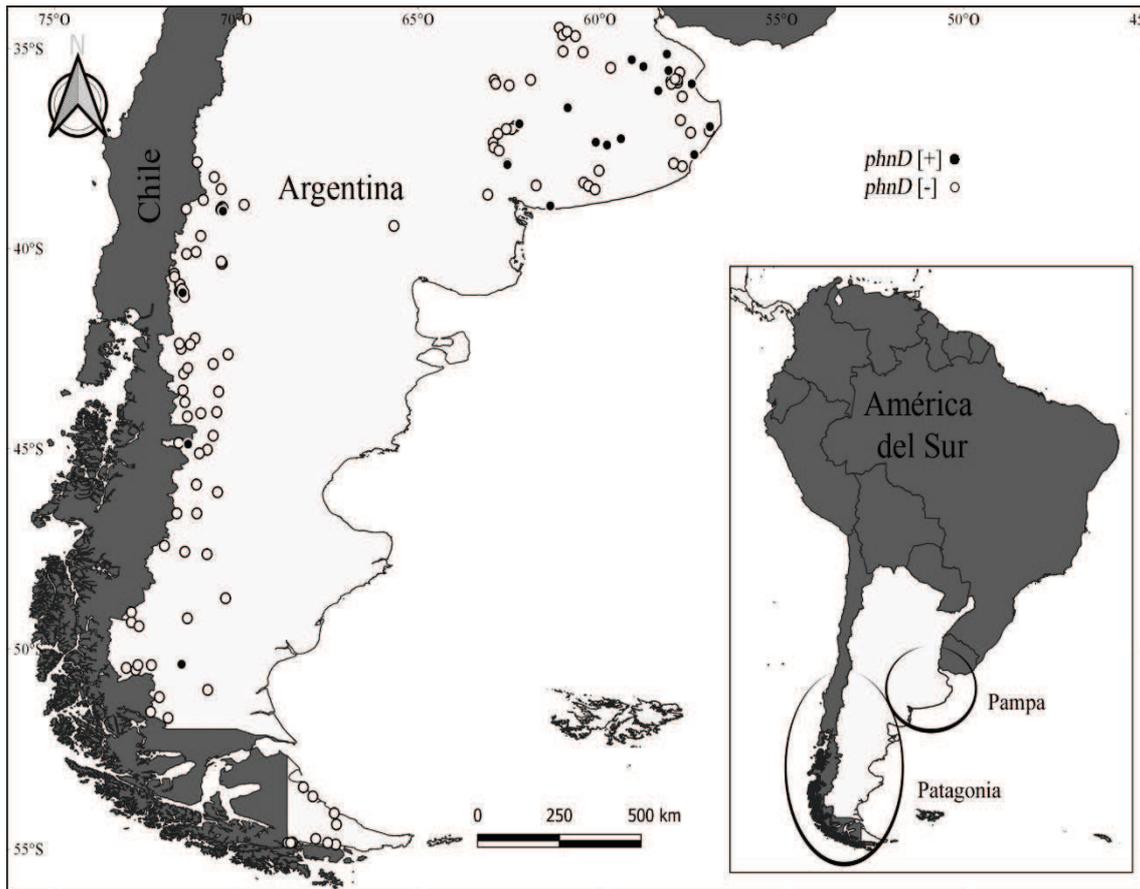


FIGURA 24 MAPA DE LA REGIÓN MÁS AUSTRAL DE AMÉRICA DEL SUR INCLUYENDO LOS SITIOS DE MUESTREO ANALIZADOS PARA LA PRESENCIA DEL GEN DEGRADADOR DE FOSFONATOS EN PCY PHND. PHND [+] EN LA REGIÓN PAMPEANA 29% (N = 52), PHND [-] EN LA REGIÓN PATAGÓNICA 5% (N = 84). TODAS LAS MUESTRAS FUERON COLECTADAS DEL LADO ARGENTINO DE LOS ANDES.

### PATRONES AMBIENTALES Y ESPACIALES DE LA ABUNDANCIA DE PCY

Los análisis de partición de varianza (APV) indicaron una gran predictibilidad de la variación en la abundancia de Pcy basado en las variables ambientales, los indicadores de impacto de glifosato y la estructura espacial. Estos modelos explicaron un 82 % y un 83 % de la variación total de Pcy a escala interregional (Figura 25a, es decir Pampa y Patagonia) y regional (Figura 25b, Pampa), respectivamente. Los

componentes espaciales tuvieron un gran efecto, tanto a escala regional (27%) como interregional (34%), mientras que la cantidad de variación explicada por los componentes espaciales en conjunto con los indicadores de impacto de glifosato fue grande, tanto a escala regional (29%) como interregional (31%).

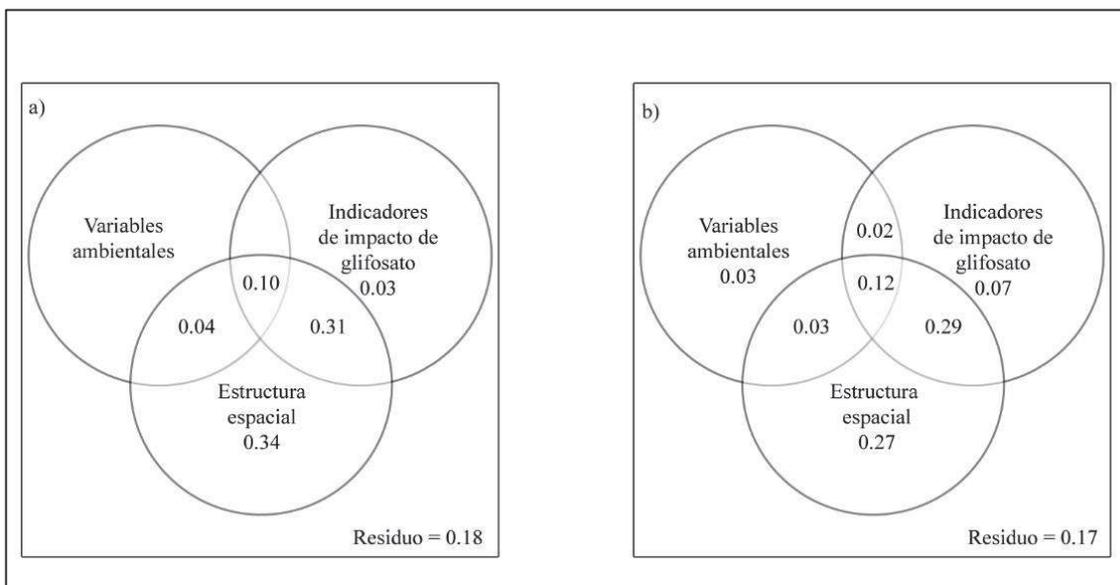


FIGURA 25 DIAGRAMAS DEL ANÁLISIS DE PARTICIÓN DE VARIANZA REPRESENTANDO LAS FRACCIONES DEL R CUADRADO AJUSTADO ( $R^2_{ADJ}$ ) EXPLICADA POR LAS VARIABLES AMBIENTALES, LA ESTRUCTURA ESPACIAL Y LOS INDICADORES DE IMPACTO DE GLIFOSATO. (A) ESCALA INTERREGIONAL (PAMPA + PATAGONIA) Y (B) ESCALA REGIONAL (PAMPA).

De los indicadores de impacto de glifosato, la presencia del gen *phnD* y la proporción de doble cultivo, fueron seleccionadas para explicar la variación en la abundancia de Pcy, a una escala interregional. Cuando solo la región pampeana fue considerada en el análisis, la proporción del descriptor de uso de suelo “otros cultivos” resultó también seleccionado. Entre las variables ambientales, la profundidad del disco de Secchi como el PSLC contribuyeron significativamente a explicar la variación observada a escala regional, mientras que la turbidez nefelométrica fue seleccionada solo a escala interregional. La proporción de doble cultivo correlacionó vector MEM 2 a

escala interregional ( $\rho = 0,66$ , valor de  $P < 0,0001$ ) y a escala regional lo hizo con el MEM 3 ( $\rho = 0,51$ , valor de  $P < 0,0001$ ); mientras que en el análisis regional lo hizo con los vectores: MEM 3 y MEM 2 (Figura 26).

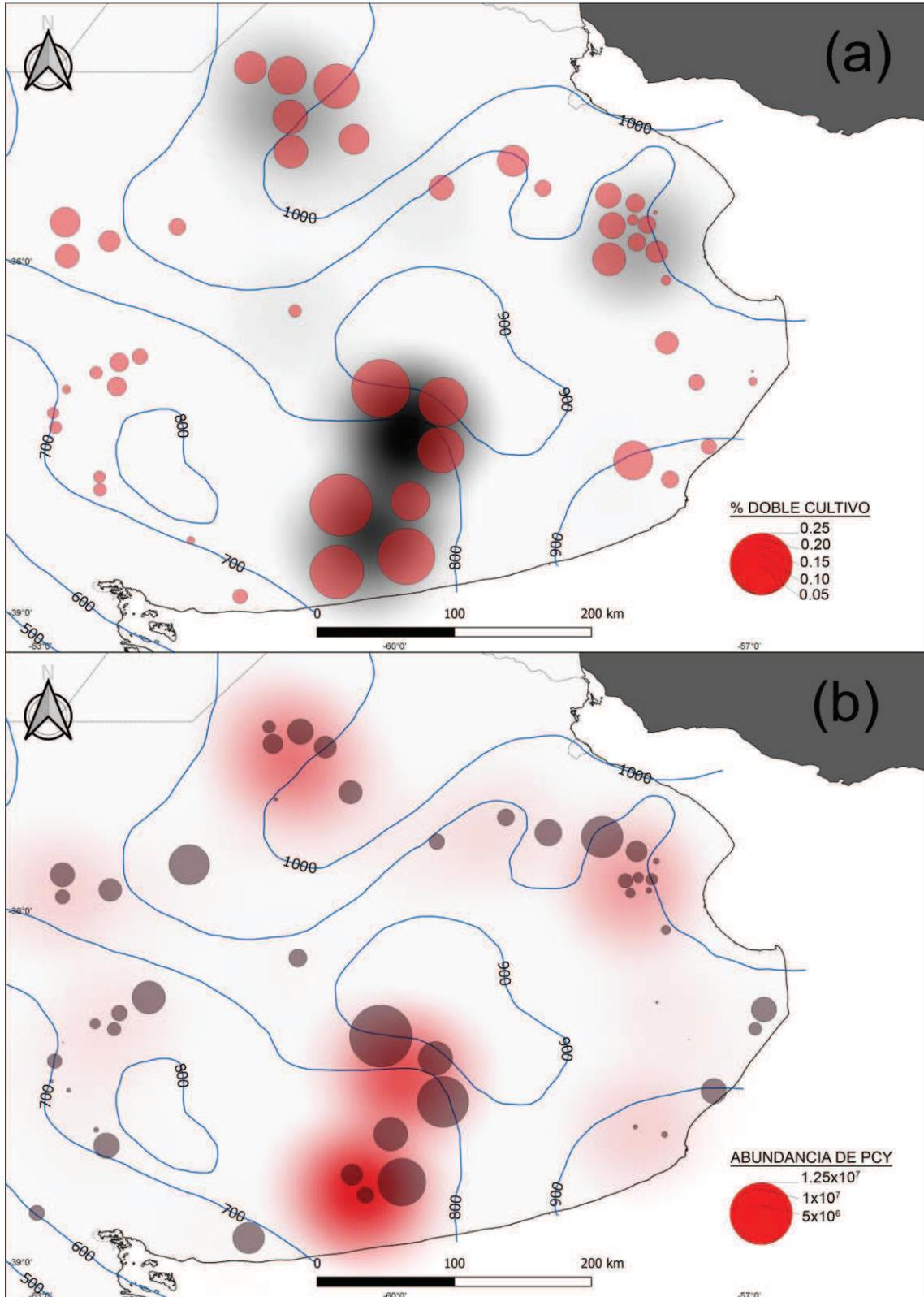


FIGURA 26 A) MAPA DE CALOR DEL MEM 2 (NEGRO) Y PROPORCIÓN DE DOBLE CULTIVO EN LOS ALREDEDORES DE LA LAGUNA (CÍRCULOS ROJOS). B) MAPA DE CALOR DE DOBLE CULTIVO (ROJO) Y ABUNDANCIA DE PCY EN LA REGIÓN PAMPEANA (CÍRCULOS BORDÓ).

## ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAR MÚLTIPLE

El análisis de regresión múltiple se utilizó para explorar las relaciones entre la abundancia de Pcy (variable dependiente) y el conjunto de variables explicativas: los indicadores de impacto de glifosato y las variables ambientales. Para la región pampeana, el modelo seleccionó la concentración de STS y la presencia del gen *phnD* (Tabla 18a, valor de  $P < 0,01$ ,  $R^2$  acumulado = 0,53), seguidos por la proporción de doble cultivo (valor de  $P < 0,001$ ,  $R^2$  acumulado = 0,68). El efecto de la conductividad y la *Cl-a* fue comparativamente inferior, pero aun así estadísticamente significativo (valor de  $P < 0,01$ ). Un alto porcentaje (74%) de la variación en la abundancia de Pcy pudo ser explicada por el mejor modelo probado para este conjunto de muestras. A modo comparativo, la cantidad de variación explicada se redujo de 74% a 44% cuando se excluyeron los indicadores de impacto de glifosato como variables predictoras del modelo (Tabla 18b). Por otro lado, el análisis de regresión múltiple para la abundancia de BH mostró que ~45% de la variación en las lagunas pampeanas pudo ser explicada por la concentración de *Cl-a*, la temperatura del agua, la concentración de NODT y la turbidez nefelométrica; cabe destacar que la abundancia de FH, conocidos depredadores tanto de Pcy como de BH, no fue seleccionada como una variable relevante para estas fracciones del picoplancton, en ninguno de los análisis aquí realizados (Tabla 18c).

**TABLA 18 ANÁLISIS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE CON LOS INDICADORES DE IMPACTO DE GLIFOSATO, LAS VARIABLES AMBIENTALES COMO PREDICTORES DE LA ABUNDANCIA DE PCY Y HB. EN EL MODELO (A) SE INCLUYÓ AL TOTAL DEL CONJUNTO DE VARIABLES COMO PREDICTORES DE LA ABUNDANCIA DE PCY, MIENTRAS QUE EN EL MODELO (B) LOS INDICADORES DE IMPACTO DE GLIFOSATO SE EXCLUYERON. PARA MODELAR LA ABUNDANCIA DE LAS BH SE INCLUYÓ A TODAS LAS VARIABLES COMO POTENCIALES**

PREDICTORES EN EL MODELO (C). MÉTODO DE SELECCIÓN DE VARIABLES: STEPWISE. R<sup>2</sup>ADJ: COEFICIENTE DE CORRELACIÓN AJUSTADO. SC: SUMA DE CUADRADOS.

Variable seleccionada	SC	F	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub> acumulado	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<b>Modelo a: variable dependiente Log Pcy</b>				0,74**
<b>STS*</b>	1,31	10,52	0,37	
<b>phnD**</b>	4,47	43,90	0,53	
<b>Doble cultivo**</b>	1,93	15,52	0,68	
<b>Conductividad*</b>	1,14	9,12	0,70	
<b>Cl-a*</b>	1,08	8,64	0,74	
<b>Modelo b: variable dependiente Log Pcy</b>				0,44**
<b>Profundidad de disco de Secchi **</b>	10,58	38,52	0,33	
<b>DOC*</b>	2,68	9,76	0,44	
<b>Modelo c: variable dependiente Log BH</b>				0,46°
<b>Cl-a °</b>	0,38	4,77	0,32	
<b>Temperatura del agua °</b>	0,41	5,16	0,36	
<b>NODT °</b>	0,52	6,57	0,42	
<b>Turbidez nefelométrica °</b>	0,39	4,96	0,46	
Código de significancia: *** <0,001 ** <0,01 ° <0,05				

Se utilizaron los parámetros estimados en el modelo completo (Tabla 18, modelo a), para desarrollar una ecuación de predicción a fin de simular posibles escenarios del efecto del glifosato sobre la abundancia de Pcy (Tabla 19). Para estas simulaciones, las tres variables ambientales (STS, Cl-a y conductividad) se mantuvieron constantes, asignándoles el valor promedio estimado para el conjunto de lagunas pampeanas; la presencia del gen *phnD* fue establecido como 1 (*phnD* [+]) ó 0 (*phnD* [-]); la proporción de doble cultivo se dejó variar entre los valores mínimos y máximos observados en nuestro muestreo (de 0 a 25%). Los resultados de la simulación se ilustran en la figura

27. El escenario de mayor impacto (etiquetado como “b”) corresponde a una abundancia de Pcy de 22,5 veces mayor a la del escenario de menor impacto (etiquetado como “a”). La abundancia media de Pcy proyectada en el escenario de mayor impacto fue levemente menor que aquellas reportadas para ambientes acuáticos en la región pampeana, mientras que la abundancia media proyectada para el escenario de menor impacto fue similar a aquellas reportadas para lagunas mesotróficas de la Patagonia y del resto del mundo.

TABLA 19 REPORTE DE LOS PARÁMETROS ESTIMADOS POR EL ANÁLISIS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE. LI: LÍMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA. LS: LÍMITE SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA. VIF: FACTOR DE INFLACIÓN DE VARIANZA

<b>Término</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Std</b>	<b>LI 95%</b>	<b>LS 95%</b>	<b>VIF</b>	<b>p valor</b>
<b>Intercepto</b>	3,66	0,29	3,08	4,25	,	<,0001
<b><i>phnD</i> [+]</b>	0,40	0,06	0,28	0,53	1,24	<,0001
<b>Conductividad (<i>cond</i>)</b>	0,60	0,2	0,20	1,01	1,43	0,0042
<b>STS</b>	0,58	0,18	0,22	0,94	1,61	0,0023
<b>Chl-a</b>	0,36	0,12	0,11	0,61	1,62	0,0053
<b>Doble cultivo (<i>DC</i>)</b>	1,82	0,46	0,89	2,75	1,28	0,0003

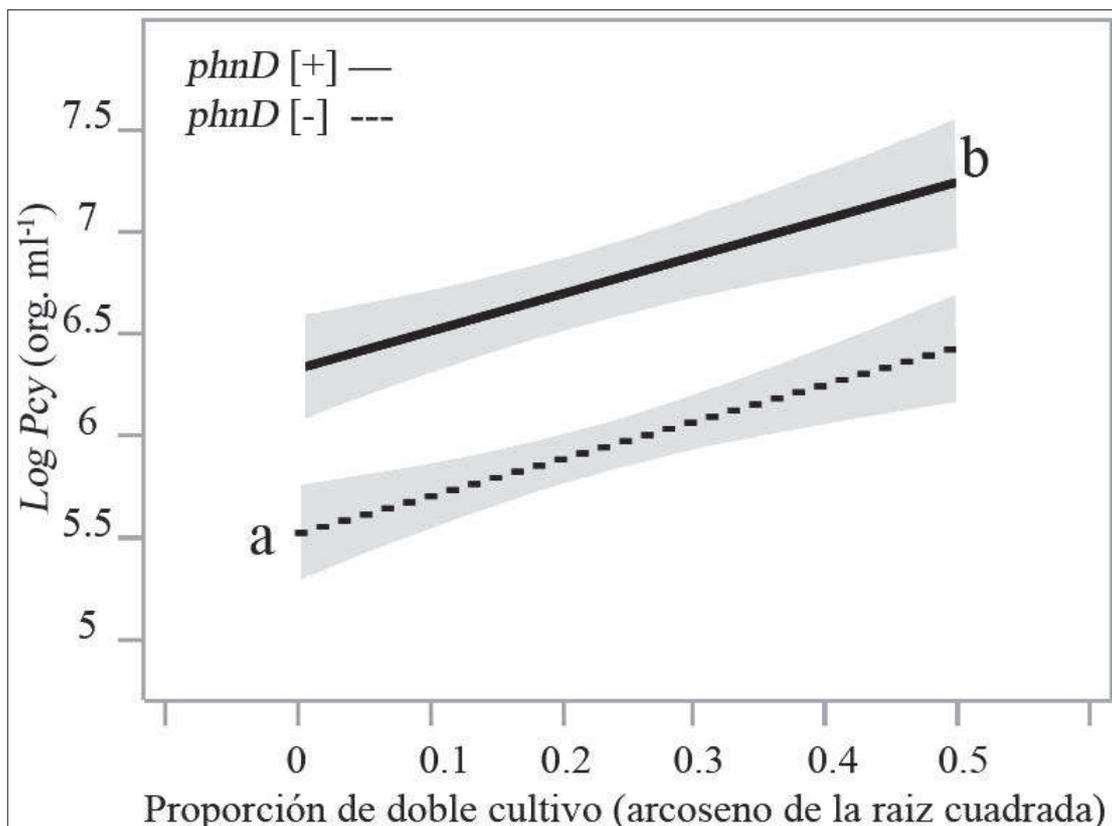


FIGURA 27 PREDICCIÓN PARA LA ABUNDANCIA DE PCY CON SU INTERVALO DE CONFIANZA DE 95% (ÁREA GRIS) PARA SISTEMAS PHND [+] (LÍNEA SOLIDA) Y PHND [-] (LÍNEA PUNTEADA) EN FUNCIÓN DE LA PROPORCIÓN DE DOBLE CULTIVO (DC). SE CONSIDERARON VALORES PROMEDIOS DE CONDUCTIVIDAD, STS Y CL-A. EXPRESIÓN DE PREDICCIÓN: (PHND [+]) =  $3,66 + 0,4 + 0,60 \text{ LOG}(\text{COND}) + 0,58 \text{ LOG}(\text{STS}) + 0,36 \text{ LOG}(\text{CL-A}) + 1,82 \text{ ARCOSENO}(\text{DC})^{1/2}$ . EXPRESIÓN DE PREDICCIÓN (PHND [-]) =  $3,66 - 0,4 + 0,60 \text{ LOG}(\text{COND}) + 0,58 \text{ LOG}(\text{STS}) + 0,36 \text{ LOG}(\text{CL-A}) + 1,82 \text{ ARCOSENO}(\text{DC})$ .

## DISCUSIÓN

En este capítulo, se investigó el efecto que el herbicida glifosato podría tener sobre la abundancia de Pcy en las lagunas pampeanas y patagónicas. Aquí se contrastó a las lagunas pampeanas, inmersas en un paisaje altamente agrícola, con las lagunas patagónicas, localizadas en una región sin historial de uso de glifosato. Estudios previos han demostrado que el agregado experimental de este químico tiene un efecto estimulante en la abundancia de Pcy (Gattás y colaboradores, 2016; Pérez y

colaboradores, 2007; Vera y colaboradores, 2010). El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto del herbicida bajo condiciones de campo, información que era hasta el momento inexistente. El relevamiento de campo fue diseñado para dar respuesta a los planteos formulados en la sección introductoria: (1) ¿existe evidencia de campo compatible con los efectos estimulantes del glifosato sobre las abundancias de Pcy observados en condiciones experimentales?; (2) ¿resulta comparable la magnitud del efecto a campo con lo observado en condiciones experimentales controladas?; (3) ¿cómo se compara el efecto del glifosato con las otras variables ambientales sobre la biomasa de Pcy?

### **¿EXISTE EVIDENCIA DE CAMPO SOBRE LOS EFECTOS ESTIMULANTES DEL GLIFOSATO SOBRE LAS ABUNDANCIAS DE PCY?**

Parte del impulso de este trabajo fue proporcionado por dos observaciones: la primera fue que las abundancias de Pcy en la región pampeana fueran sustancialmente mayores que las registradas en otros sistemas a nivel mundial y la segunda, es el perfil productivo dependiente de aplicaciones regulares de glifosato en la región pampeana. Ambas observaciones se encuentran en sintonía con el crecimiento de las poblaciones de Pcy producto de las agregaciones experimentales de glifosato (Pérez y colaboradores, 2007; Pizarro y colaboradores, 2012). Los resultados obtenidos aquí son consistentes con la evidencia previa disponible: en primer lugar, los valores de abundancia de Pcy reportados en esta tesis resultaron similares a los valores reportados anteriormente para la región pampeana (Allende y colaboradores, 2009; Fermani y colaboradores, 2015; Silviso y colaboradores, 2011) y, en segundo lugar, tanto los reportes previos, como los aquí presentados para la abundancia de Pcy, fueron

significativamente superiores a aquellos reportados para cuerpos de agua en el resto del mundo (ver tabla 16).

En un segundo nivel de análisis, se utilizaron regresiones lineales múltiples, para investigar la posible asociación entre los patrones de abundancia de Pcy observados en la región pampeana con los tres indicadores de impacto de glifosato planteados: (i) las concentraciones de glifosato y AMPA, (ii) la presencia del gen *phnD* en las muestras ambientales y, (iii) la caracterización del uso de la tierra en los márgenes de las lagunas.

No se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre el indicador “concentración de glifosato y AMPA” y la abundancia de Pcy. A pesar de que, a primera vista, esto parecería ser contraintuitivo, tales resultados son, en realidad, esperables. Es importante tener en cuenta que el glifosato no tiene un efecto negativo, es decir tóxico, sobre los ensambles comunitarios de Pcy. Por el contrario, se conoce que al menos algunas cepas de Pcy pueden metabolizarlo y degradarlo. Como el desarrollo de las poblaciones de Pcy y la degradación del glifosato ocurren en una misma escala temporal, es razonable que altas abundancias de Pcy puedan ser detectadas luego de que la mayoría del glifosato haya sido degradado y/o utilizado por ellas, aunque no pueden descartarse otros destinos del glifosato. Por ejemplo, Huntscha y colaboradores (2018) atribuyeron las tasas de disipación de glifosato y AMPA en el epilimnion del lago Greifensee (Suiza) a procesos de biodegradación llevados a cabo por cianobacterias capaces de degradar fosfonatos.

Los análisis estadísticos ensayados, fueron coincidentes en identificar a los otros dos indicadores de impacto (presencia del gen *phnD* y la proporción de doble cultivo, *dc*) como variables relevantes para explicar una significativa fracción de la variabilidad observada en los patrones de abundancia de Pcy. El gen *phnD* de las Pcy, forma parte de los mecanismos fisiológicos que le confieren la habilidad de asimilar fosfonatos (por ejemplo Haro y De Lorenzo, 2001; Singh y colaboradores, 2016; Stanley y Preetha,

2016), y también, tolerancia al glifosato (Ilikchyan y colaboradores, 2010, Kutovaya et al, 2013). Las Pcy, tanto marinas como de agua dulce, típicamente poseen el mecanismo de degradación de fosfonatos para hidrolizar el 2-aminometil fosfónico por medio de fosfonatasas y el mecanismo multi enzimático de transporte asociado a liasas de C-P (Palenik y colaboradores, 2003; Su y colaboradores, 2007). Este último, depende de los transportadores ABC de fosfonatos, codificados por los genes *phnCDE*. Ilikchyan y colaboradores (2009) demostraron que las Pcy del género *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, de una gran variedad de ambientes, poseen y expresan el gen *phnD*. Estos autores proponen que la presencia del gen *phnD*, puede ser utilizado como un proxy de la presencia de Fns en el ambiente y su potencial utilización por parte de las Pcy. En este sentido, Huntscha y colaboradores (2018) observaron que la gran concentración de genes asociados a la degradación y asimilación de fosfonatos (*phnCDE*) fue coincidente con una alta concentración de *Cl-a* y, particularmente, con picos en las abundancias de *Synechococcus*. Por lo tanto, la mayor abundancia de Pcy y la mayor frecuencia de detección del gen *phnD* en la Pampa comparado con las reportadas para la Patagonia (y en otras regiones del mundo), sugerirían que las prácticas agrícolas basadas en el uso masivo del herbicida glifosato podrían estar afectando el ecosistema acuático, y en particular a las comunidades de Pcy, promoviendo su crecimiento. El doble cultivo (o multicultivo) es una práctica agropecuaria muy extendida en los establecimientos agrícolas pampeanos. Esta práctica debe su nombre al hecho de que se cosechan dos (o más) cultivos en un mismo calendario agrícola (soja en otoño seguida del trigo en primavera, Caviglia y colaboradores, 2004). El doble cultivo requiere un mayor uso de insumos (tales como pesticidas, fertilizantes, sistemas de riego y maquinaria), que los sistemas agrícolas tradicionales (Borchers y colaboradores, 2014), por lo tanto, esta práctica podría

aumentar las probabilidades que tales a insumos lleguen a los cuerpos de agua, contaminándolos.

Finalmente, el análisis de partición de varianza permitió comprender el efecto de la estructura espacial y el uso del glifosato sobre la abundancia de Pcy. Los filtros espaciales capturaron una buena proporción de la variación observada en los patrones de abundancia. Gran parte de la variación estuvo espacialmente estructurada, y resultó explicada por los indicadores de impacto de glifosato, y en menor medida, por las variables ambientales. Más aún, una gran parte de la variabilidad explicada por los indicadores de impacto de glifosato, estuvo espacialmente estructurada, lo cual probablemente esté reflejando el gradiente de precipitación NE-SO que dicta la aptitud, el tipo y los límites de las actividades agrícolas desarrolladas en la región pampeana.

### **¿ES LA MAGNITUD DEL EFECTO A CAMPO COMPARABLE A LO REPORTADO EN CONDICIONES EXPERIMENTALES CONTROLADAS?**

Los modelos de regresión permitieron estimar el potencial efecto que las prácticas agrícolas basadas en el glifosato podrían tener sobre la abundancia de Pcy en posibles escenarios con distinto grado de impacto (ver figura 27). Se estimó un incremento de 22,5 veces la abundancia de Pcy entre el escenario de menor impacto (dc = 0%) y el escenario de mayor impacto (dc = 25%, que fue la máxima proporción de doble cultivo registrado para las lagunas pampeanas). Cabe considerar, que estas son estimaciones moderadas, sobre todo porque aún el escenario de menor impacto podría estar siendo afectado por fuentes de glifosato no ponderadas. La magnitud del incremento en la abundancia estimada por los modelos es comparable a los incrementos reportados experimentalmente seguidos por el agregado de glifosato. En su estudio en mesocosmos, Pérez y colaboradores (2007) observaron un incremento de 40 veces en

la abundancia de Pcy luego del agregado de una única dosis de Roundup®. Vera y colaboradores (2012), observaron que a la segunda semana de haber aplicado una dosis única de Atanor® (3,5 mg L<sup>-1</sup>) la abundancia de Pcy habían aumentado 1,5 veces con respecto a los controles, volviéndose, así, la fracción dominante de la comunidad de autótrofos. De manera similar, Pizarro y colaboradores (2016) observaron un incremento de 2 a 2,5 veces la abundancia de Pcy en los mesocosmos tratados con glifosato con respecto a los controles. Saxton y colaboradores (2011) observaron que el efecto tóxico del glifosato (1 mM) sobre fitoplancton incubado del lago Erie fue contrarrestado por incrementos en la abundancia de *Synechococcus*, mientras que Stefano y colaboradores (2018) observaron una estimulación rápida de las cianobacterias y la concentración de *C1-a* con la adición de glifosato grado técnico (6 ppm).

Por último, la abundancia de Pcy fue 2,5 veces mayor en el grupo de muestras donde el gen *phnD* fue detectado que en las cuales estuvo por debajo del límite de detección instrumental. El gen *phnD*, se encuentra ampliamente distribuido entre las poblaciones de cianobacterias (Aiba y colaboradores, 1993; Nagaya y colaboradores, 1994). Este le confiere tolerancia y por lo tanto la ventaja adaptativa de desarrollarse en ambientes impactados por glifosato (Powell y colaboradores, 1991; Lipok y colaboradores, 2007; Forlani y colaboradores, 2008; López-Rodas y colaboradores, 2007; Hove-Jensen y colaboradores, 2014 y las citas mencionadas allí). La presencia del gen *phnD* es un rasgo funcional de la comunidad de Pcy (es decir, una respuesta a una variable externa forzante) y como tal se puede esperar que su frecuencia de ocurrencia aumente con el grado de impacto del glifosato.

## **¿CÓMO SE COMPARA EL EFECTO DEL GLIFOSATO CON LAS OTRAS VARIABLES AMBIENTALES SOBRE LA BIOMASA DE PCY?**

Para tener una idea del poder explicativo de los indicadores de impacto de glifosato, y evaluarlo con respecto al poder explicativo de las otras variables ambientales, se comparó el desempeño del modelo “completo” (modelo *a* en tabla 18) con el desempeño del modelo “parcial” (modelo *b* en tabla 18, en el cual incluyó las variables ambientales, pero excluyó los indicadores de impacto de glifosato). El modelo completo seleccionó a las variables ambientales: STS, conductividad y a la concentración de clorofila *a* y a la presencia del gen *phnD* y a la proporción de doble cultivo, como indicadores de impacto de glifosato. Contabilizando así el 74% de la variación observada en la abundancia de Pcy. El mejor modelo parcial, seleccionó a la profundidad de disco de Secchi y al PSLC, y contabilizó el 44% de la variación observada en la abundancia de Pcy. En otras palabras, ambos modelos presentaron grandes diferencias, de esta manera, excluir a los indicadores de impacto de glifosato resultó en una pérdida del ~30% del poder explicativo del modelo. Esto sugiere que los indicadores de impacto de glifosato son importantes estructuradores de la abundancia de Pcy. Con respecto a la abundancia de BH, el mejor modelo ajustado explicó el 46% de esta variación y no consideró ni a los indicadores de impacto de glifosato estimados en este estudio ni a la abundancia de FH como variables relevantes para explicar su abundancia, a pesar de ser conocidos depredadores de BH y de Pcy (Fermani y colaboradores, 2015). Para resumir, el efecto de las variables ambientales “puras” contribuyó de igual manera para explicar la variación en las abundancias de Pcy como de BH, sin embargo, los indicadores de impacto de glifosato solo contribuyeron a explicar la variación observada en Pcy, pero no la variación observada en la abundancia de BH.

## CONCLUSIONES PARCIALES

En conjunto, la evidencia expuesta en este capítulo es consistente con la hipótesis de que el glifosato tiene un efecto estimulante sobre la abundancia de Pcy. Dicha hipótesis fue formulada a partir de lo observado en estudios experimentales. A diferencia de estos estudios, los efectos informados aquí, no son consecuencia de una única (o más de una) aplicación planeada de glifosato; sino que son probablemente resultado de la exposición crónica al glifosato durante años. Estos resultados apoyan las afirmaciones de que las prácticas agrícolas basadas en el uso intensivo de glifosato (por ejemplo, el doble cultivo) tienen consecuencias específicas: promueven la abundancia de cianobacterias de pequeño tamaño, las cuales son capaces de metabolizar glifosato y AMPA. Esta conclusión está respaldada por los siguientes hallazgos: (i) mayor abundancia de Pcy en lagunas impactados por la agricultura en la región pampeana comparados con otros cuerpos de agua; (ii) frecuencias de detección mayores de glifosato, AMPA y *phnD* en la región pampeana que en la región control, Patagonia; (iii) un efecto prominente de los indicadores de impacto de glifosato con respecto a los componentes espaciales y ambientales; (iv) el efecto positivo del doble cultivo y el *phnD* como promotor de las abundancias de Pcy; y (v) el efecto despreciable de los indicadores de glifosato sobre la abundancia de BH.

Estos hallazgos tienen una gran importancia para redefinir las evaluaciones biológicas en otras áreas altamente agrícolas (por ejemplo, el "corn belt" en el Medio Oeste de los Estados Unidos) y en potenciales áreas impactadas por la agricultura como El Cerrado en la región centro-oeste de Brasil. Generalmente, el uso de glifosato, en los sistemas agrícolas de la región pampeana, es reconocido como un potencial promotor de las comunidades de cianobacterias (O'Farrell y colaboradores, 2019). Sin embargo, no es considerado explícitamente como una variable relevante, a pesar de la

## Capítulo 4: Efecto del glifosato sobre la abundancia microbiana

importancia sanitaria y ecológica que tiene este grupo como formador de floraciones nocivas para poblaciones humanas y animales (Jakubowska and Szeląg-Wasielewska, 2015).

**CAPÍTULO 5: EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA  
ESTRUCTURA COMUNITARIA DE PCY**

## RESUMEN DEL CAPÍTULO

Mediante el análisis de técnicas de secuenciación masiva, se indagó sobre la estructura comunitaria de las Pcy. Se secuenciaron un total de 51 lagunas pampeanas y patagónicas utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar regiones hipervariables del gen 16S. Se observó una alta especificidad de los primers, una óptima profundidad de secuenciación y un muestreo adecuado. La estructura comunitaria de Pcy estuvo moldeada tanto por factores geográficos, variables ambientales y de impacto de glifosato. Los índices de diversidad fueron mayores en la región pampeana que en la patagónica. Dentro de la región pampeana, las lagunas con mayor nivel de impacto tuvieron una mayor riqueza específica pero una menor equitatividad de Pcy.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este capítulo es evaluar el efecto que las prácticas agrícolas basadas en el herbicida glifosato tienen sobre la composición comunitaria de Pcy y sus indicadores de diversidad.

### **Objetivos específicos**

- 1- Explorar la diversidad molecular de las Pcy de agua dulce pertenecientes a regiones contrastantes (Pampa y Patagonia).
- 2- Evaluar la variación en los índices de diversidad y la riqueza de Pcy en lagunas con distinto grado de impacto.
- 3- Evaluar el efecto que los indicadores de impacto de glifosato tienen sobre la estructura comunitaria de Pcy.

## INTRODUCCIÓN

Los pastizales templados se encuentran entre los biomas que más han sufrido la pérdida de hábitat debido a su transformación a otro tipo de sistema, principalmente a sistemas productivos agrícolas, más simples y frágiles (Hoekstra y colaboradores, 2005). Se estima que casi la mitad de los pastizales naturales del mundo han sido convertidos a otros usos, y que menos del 5 % de su cobertura se encuentra protegida. En el pastizal pampeano, el área convertida a otros usos supera a la proporción de área protegida en unas ocho veces y ha sido catalogada como amenazada y críticamente amenazada de acuerdo al Índice de Riesgo de Conservación (ICR; Figura 28).

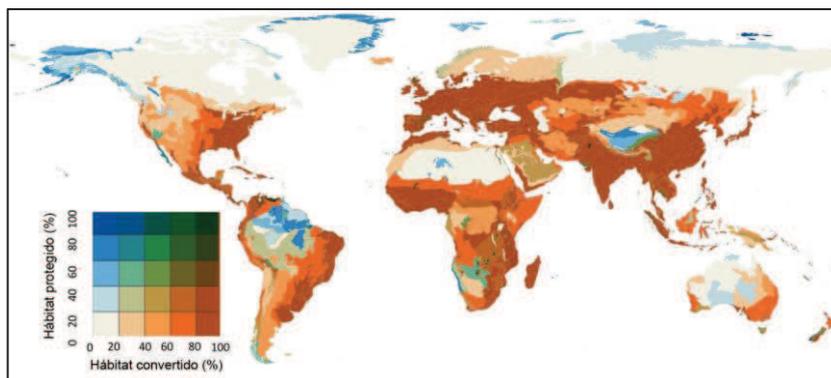


FIGURA 28 RELACIÓN ESPACIAL ENTRE EL ÁREA CONVERTIDA Y EL ÁREA PROTEGIDA DE LAS ECORREGIONES TERRESTRES (TOMADO DE WATSON Y COLABORADORES, 2016).

Los humedales del pastizal pampeano, se distribuyen entre suelos agrícolas y ganaderos con un alto potencial productivo, por lo que su deterioro ambiental es esperable debido, principalmente, al proceso de “agriculturización” (Quirós, 2006) mencionado en el *Capítulo 4* (Crist y colaboradores, 2017). El desarrollo económico y el crecimiento poblacional en el pastizal pampeano, afectan directamente el equilibrio de

las lagunas pampeanas. Específicamente, promueven su turbidez por los aportes de nutrientes, agroquímicos y sedimentos desde los sistemas agrícolas circundantes, y generan alteraciones en sus regímenes hídricos, si se considera, por ejemplo, que aproximadamente el 85% del total de extracciones de agua dulce, son para sustentar las actividades agrícolas nos podemos dar una idea del estrés al que se ven sometidos (Gleick, 2003).

En capítulos anteriores, se ha demostrado que la contaminación de glifosato y AMPA en los cuerpos de agua del pastizal pampeano es habitual y persistente. La variación observada en la frecuencia de detección del glifosato, estaría determinada por factores que actúan a escala regional (orientación productiva de la cuenca) y local (momentos de aplicación elegido por los productores), también se ha reportado que eventos de lluvias cercanos al momento de muestreo, aumentarían la probabilidad de detectar estos compuestos en el ambiente, debido una mayor transporte desde los sistemas terrestres a los acuáticos por escorrentía (Aparicio y colaboradores, 2013).

A pesar de este comportamiento variable, y algunas veces efímero, el glifosato podría tener un efecto a crónico (a baja dosis) sobre estos ecosistemas y los organismos que lo componen. La exposición a los pesticidas podrían promover cambios en la biodiversidad, en la adquisición de mecanismos de tolerancia al herbicida y cambios funcionales en las comunidades (Whitacre, 2015). Particularmente, en esta tesis, hemos discutido el papel que tiene el glifosato como promotor del crecimiento de organismos que le son tolerantes, como las de poblaciones de Pcy en las lagunas pampeanas.

El enriquecimiento de los sistemas acuáticos causados por la contaminación de glifosato, podría acelerar los procesos de eutrofización y simplificación de estos sistemas. Por un lado, la biodiversidad microbiana podría verse alterada por el efecto tóxico que el glifosato tendría sobre las capacidades competitivas y el desarrollo de las

## Capítulo 5: Efecto del glifosato sobre la estructura comunitaria de Pcy

especies sensibles. Es probable que las características fisiológicas de las microalgas las conviertan en los objetivos principales del herbicida en aguas contaminadas. Por otro lado, esto generaría una liberación competitiva y la expansión de los nichos de las especies que son tolerantes al herbicida, como las cianobacterias. Más aún, estos organismos podría verse estimulados por la presencia ambiental del glifosato como una novedosa fuente de recursos, lo que podría generar una alta competencia intraespecífica promoviendo así procesos de microevolución y adaptación (como la resistencia a pesticidas) a los cambios ambientales (Becker and Liess, 2015; Liess y colaboradores, 2019).

Se ha reportado la toxicidad del glifosato en estudios sobre especies modelo, tanto de algas (Peterson y colaboradores, 1994; Tsui and Chu, 2003) como de bacterias (Bonnet y colaboradores, 2007). Sin embargo, y dada la necesidad de mejorar la integración de la ecología y la ecotoxicología, el nivel de estudio de la comunidad microbiana es un modelo más adecuado que el nivel de una sola especie, para evaluar el efecto de los pesticidas en los microorganismos. Los cambios en la diversidad microbiana acuática seguidos a la exposición a pesticidas, han sido reportados tanto en condiciones experimentales (Pesce y colaboradores, 2008; Stachowski-Haberkorn y colaboradores, 2008; Tlili y colaboradores, 2011; Widenfalk y colaboradores, 2008) como en investigaciones a campo (Dorigo y colaboradores, 2007). En este sentido, en un experimento a escala de microcosmos, Stachowski-Haberkorn y colaboradores (2008), reportaron que la diversidad de las comunidades microbianas se vio afectada por la exposición durante 7 días a concentraciones de Roundup® similares a las reportadas en esta tesis ( $<10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Estudiando la respuesta de las comunidades microbianas de sedimentos a los agregados de glifosato, Widenfalk y colaboradores (2008) encontraron que las diferencias entre grupos (controles y tratamientos), se debían a que ciertos grupos bacterianos se beneficiaban de los agregados de glifosato.

En este capítulo, se presentan resultados sobre la estructura comunitaria de las Pcy de agua dulce en las regiones pampeanas y patagónicas. El objetivo principal es identificar si existe evidencia suficiente sobre el poder estructurador de los indicadores de impacto de glifosato sobre la comunidad de Pcy.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y SECUENCIACIÓN

La extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en apartado de métodos del *capítulo 4*. El ADN extraído de cada muestra se analizó por secuenciación masiva por la plataforma Illumina MiSeq (iTags). La secuencia de trabajo incluye cuatro pasos básicos (Figura 29):



FIGURA 29 RESUMEN DEL EXPERIMENTO DE SECUENCIACIÓN

- 1) *Preparación de la muestra*. Para la construcción de las librerías, se extrae el ADN. Luego de realizar un control de calidad, aquellas muestras calificadas proceden a la construcción de las librerías.

- 2) *Construcción de librerías.* La librería de secuenciación es preparada por fragmentación aleatoria del cADN, seguido por la ligación de adaptadores en sentido 5' - 3'. Alternativamente, la "tagmentación" combina la fragmentación y la ligación en un solo paso que mejora sustancialmente la eficiencia en la preparación de las librerías. Estos fragmentos son posteriormente amplificados por PCR y purificados.
- 3) *Secuenciación.* Para la generación de los clústeres, la librería se carga a una celda flujo (*flowcell*) donde los fragmentos son capturados por oligonucleótidos complementarios a los adaptadores de las librerías. Cada fragmento es amplificado en distintos grupos a través de una amplificación tipo puente. Cuando se completa la generación del clúster, se comienza con la secuenciación.
- 4) *Datos crudos.* Los datos generados en la secuenciación son convertidos a datos crudos para su análisis.

## **DIVERSIDAD MOLECULAR DE PCY**

Para analizar la biodiversidad de las lagunas muestreadas, se utilizó la técnica de *amplicon sequencing* con marcadores para la región hipervariable V5-V7 del gen 16S rRNA. Se utilizaron oligonucleótidos específicos de Pcy (Cya-771F y Cya-1294R) diseñados por la Dr. Huber, quien demostró su especificidad y utilidad tanto para ambientes continentales como oceánicos (Huber y colaboradores, 2019).

## **ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

Los errores de secuenciación propios de la plataforma de secuenciación se corrigieron mediante la herramienta Bayer-Hammer. La cual emplea el algoritmo de agrupamiento HAMMER. Luego las secuencias fueron ensambladas (*forward* y *reverse*) y se les asignó su respectivo valor de calidad, por el cual fueron filtradas, se eliminaron las secuencias con una longitud menor a 150 pb y aquellas con un error esperado mayor a 3,5 (Qscore). Posteriormente, se simplificó el set de datos agrupando las secuencias 100% idénticas en tamaño y composición nucleotídica (de replicación). Las Unidades Taxonómicas Operacionales sin clúster (OTUS de radio cero [zOTUs]) fueron agrupadas de acuerdo a un criterio de 99% de similitud y las quimeras eliminadas. Finalmente, se conformó la tabla de zOTUs y se le realizó la asignación taxonómica correspondiente mediante el análisis *blastn* empleando la base de datos SILVA119 utilizando el programa BLAST. Para el análisis fueron descartadas las zOTU con menos de 10 *reads* (lecturas) totales y las muestras con menos del 10% *reads* totales correspondientes a zOTU de Pcy.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Con el objetivo de explorar visualmente la similitud entre sitios y regiones según la identidad de los ensamblados de Pcy se realizó un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). Para poner a prueba la significación de los grupos generados a partir del escalamiento multidimensional, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM). Se estimó la relación entre las principales zOTU de Pcy y las variables ambientales y de glifosato mediante la aplicación del índice de correlación no paramétrico de Spearman. Los análisis de redundancia, los análisis de eigenvectores de autocorrelación espacial y de partición de varianza se realizaron de acuerdo a lo detallado en el apartado de

métodos del *capítulo 4*. Finalmente, se realizaron comparaciones entre lagunas impactadas y no impactadas por medio de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Todos estos análisis fueron realizados en el entorno R.

## RESULTADOS

### DIVERSIDAD OBSERVADA

Luego de la limpieza de la tabla de especies, los análisis se realizaron sobre un total de 51 muestras. En las cuales la agrupación de las 1.670.297 secuencias obtenidas al 97, 90 y 80 % de similitud resultaron en 273, 53 y 19 zOTUs, respectivamente.

Entre las zOTUs clasificadas, las cianobacterias representaron el phylum más abundante (94,34 % de todas las secuencias, figura 30), con la mayoría relacionadas a Synechoccales (74,23%), Nostocales (17,15%), Phormidesmiales (0,76%), Oxiphotobacterales (0,19%), Leptolingbiales (0,13%), sepB-3 (0,07%), y grupos menores (Caenarcaniphilales (<0,01%), Vampirovibrionales (<0,01%)). Por otro lado, las secuencias correspondientes a los ARNr del gen 16s de cloroplastos de cianobacterias representaron el 1.78%. Otros phyla importantes, fueron las Verrucomicrobia (4,61%), seguido de otros menos representados (por ejemplo, Patescibacteria (0,19%), Firmicutes (0,12%), Planctomycetes (0,08%), etc.).

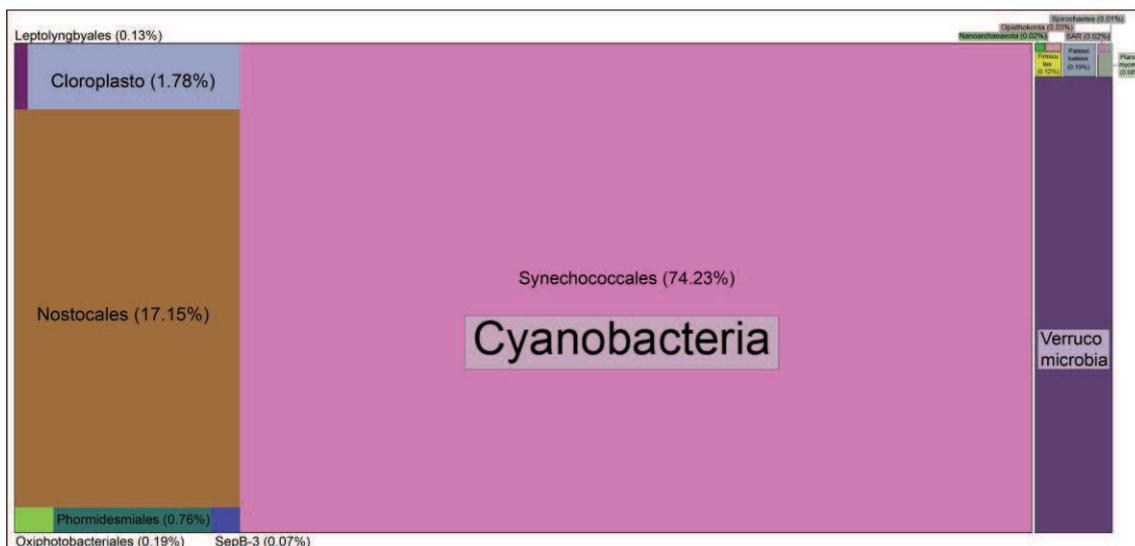


FIGURA 30 PHYLA MÁS ABUNDANTES SECUENCIADOS.

## ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS

Los primers utilizados reportaron una alta especificidad para los géneros de Pcy (*Synechococcus*, *Cyanobium* y *Prochlorococcus*) los cuales correspondieron al 74,23% de las lecturas. En promedio se registraron 38 zOTUs por muestras (máx.=72, min. =7).

## PATRONES DE DIVERSIDAD MOLECULAR DE PCY

Para los análisis de diversidad molecular de Pcy, del total de 58 lagunas secuenciadas (11 Patagónicas y 47 Pampeanas), se eliminaron 6 muestras con menos de 3.000 reads para evitar efectos de baja profundidad de secuenciación. Adicionalmente, se eliminaron 31 zOTUs por tener menos de 10 reads en el total de muestras. Por lo tanto, la diversidad de Pcy fue descrita sobre un total de 51 muestras

## Capítulo 5: Efecto del glifosato sobre la estructura comunitaria de Pcy

agrupadas en 98 zOTUs, con un promedio de 24.257 reads por muestra (máx.= 39.029, min. = 4.434).

La riqueza de especies de Pcy para nuestro conjunto de muestras varió de 17 (ES, Patagonia) a 65 (VI, Pampa). ES (Lago Escondido) fue una de las muestras con mayor profundidad de secuencia (30.006) aunque con el menor número de especies (17 zOTUs). Por otro lado, VI (Vitel) fue la laguna con mayor número de especies (65) pero no en la que se observó la mayor abundancia de reads (23.653). La mayoría de las curvas de rarefacción se aproximaron a su asíntota (Figura 31).

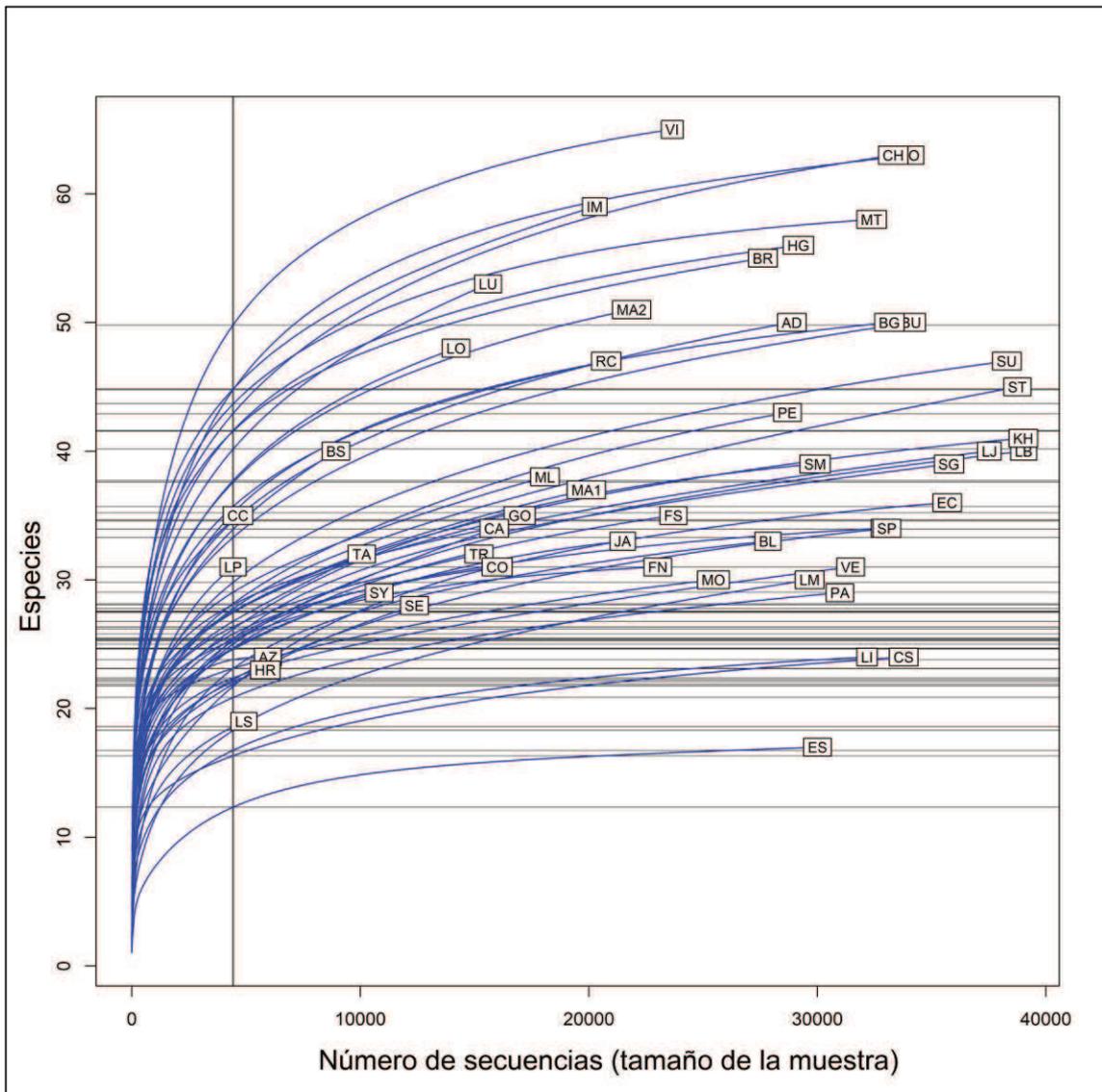


FIGURA 31 CURVAS DE RAREFACCIÓN PARA LAS MUESTRAS ANALIZADAS AQUÍ. ETIQUETAS: CÓDIGOS DE LAS LAGUNAS, VER TABLA 1. LA LÍNEA VERTICAL CORRESPONDE A 4.400 SECUENCIAS (VALOR DE LA RAREFACCIÓN). LAS LÍNEAS HORIZONTALES CORRESPONDEN AL NÚMERO DE ESPECIES PARA CADA LAGUNA A ESE VALOR DE RAREFACCIÓN.

Adicionalmente, se calculó la acumulación de la riqueza según los estimadores no paramétricos Chao, Jackknife 1, Jackknife 2 y Bootstrap para las 51 lagunas secuenciadas. La curva de riqueza para el total de muestras (S), perdió gradualmente pendiente al incrementar el número de muestras, tendiendo a una asíntota próxima a

las 98 zOTUs (Figura 32). Los estimadores no paramétricos evaluados mostraron un sesgo ligeramente positivo a lo largo de todo el muestreo, es decir, estuvieron siempre por encima de los valores de riqueza observados. Con esfuerzos de muestreo bajos, Jackknife 1 (12, ca. <25% del total) y Jackknife 2 (8, ca. < 15% del total) sobreestimaron la riqueza asintótica del área de estudio. Aunque Chao y Bootstrap también sobreestimaron, lo hicieron en menor medida y se acercaron con mayor precisión a la riqueza asintótica observada.

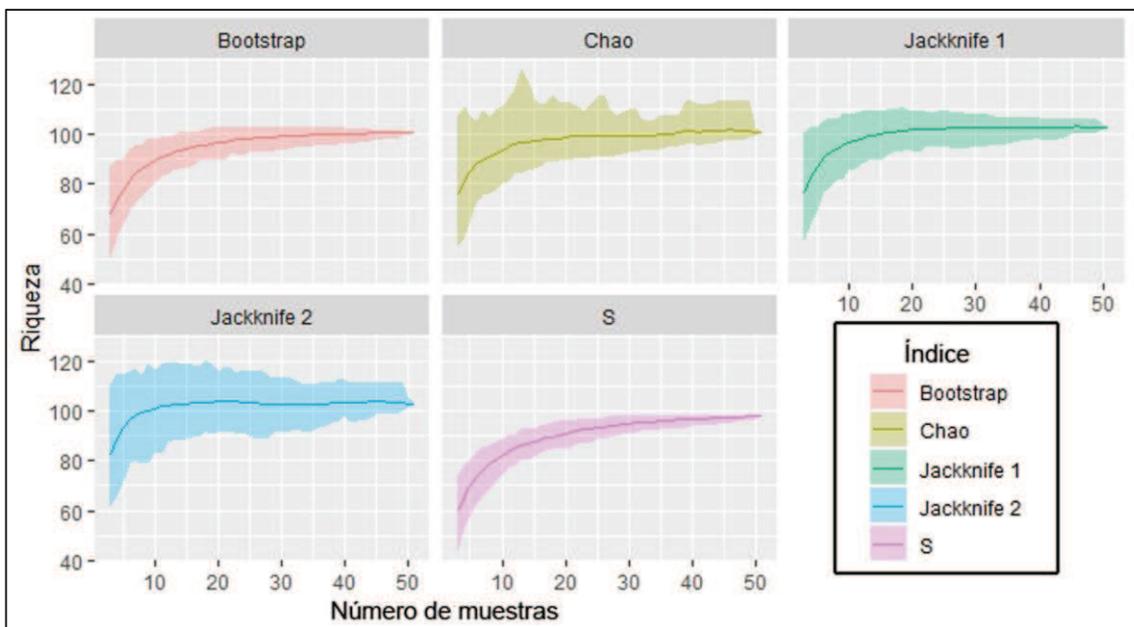


FIGURA 32 RIQUEZA ACUMULADA DE ESPECIES SEGÚN DISTINTOS ESTIMADORES PARA EL CONJUNTO DE MUESTRAS ANALIZADAS

### DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD DE PCY

La composición comunitaria de las Pcy varió entre las lagunas y entre regiones (Figura 33), sin embargo, la abundancia relativa en la región pampeana estuvo dominada por las zOTU 1 (24,1% del total), zOTU 8 (8,2%), zOTU 4 (7,4%), zOTU2

(6,3%) y zOTU 10 (6,2%), mientras que la región patagónica estuvo dominada por las zOTU 7 (49,5%), zOTU 6 (31,3%), zOTU 1 (5,6%) y zOTU 64 (3,7%) (Figura 34).

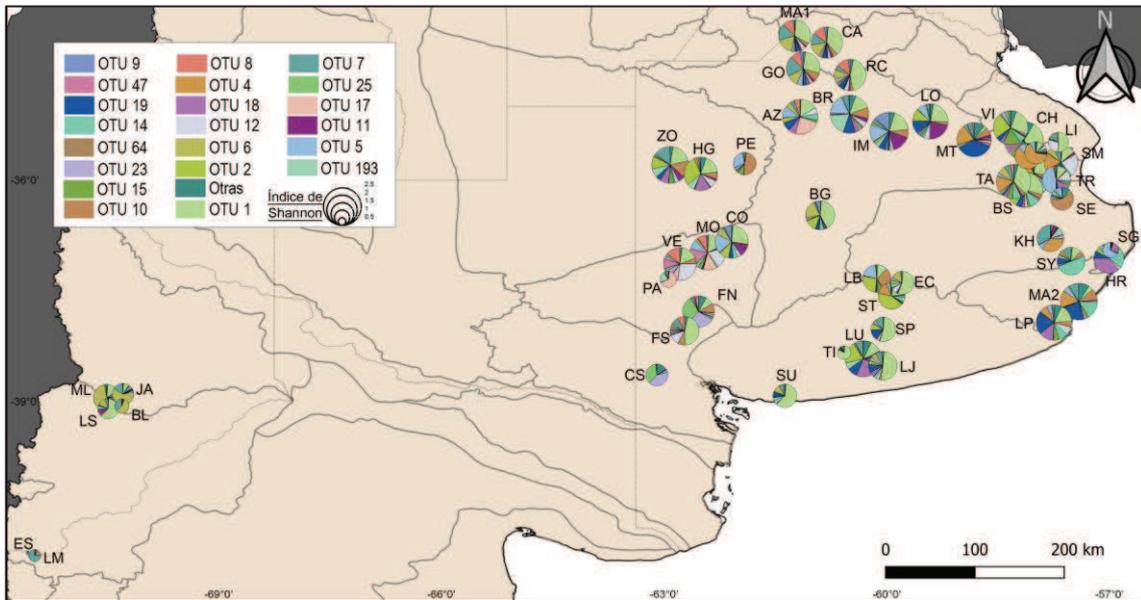


FIGURA 33 REPRESENTACIÓN ESPACIAL DE LOS SITIOS DE MUESTREO Y LA COMPOSICIÓN RELATIVA DE LA COMUNIDAD DE PCY. EL TAMAÑO DE LOS CÍRCULOS CORRESPONDE AL ÍNDICE DE SHANNON (VER LEYENDA).

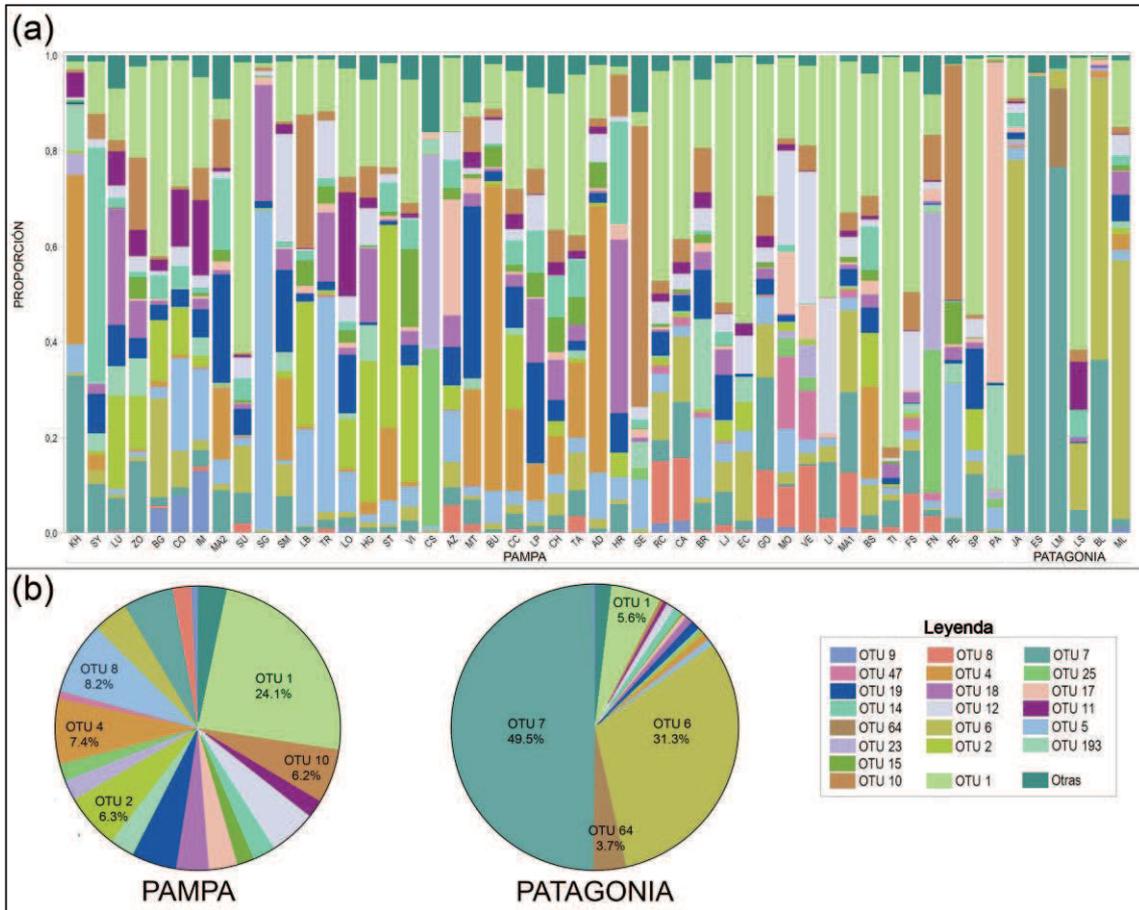
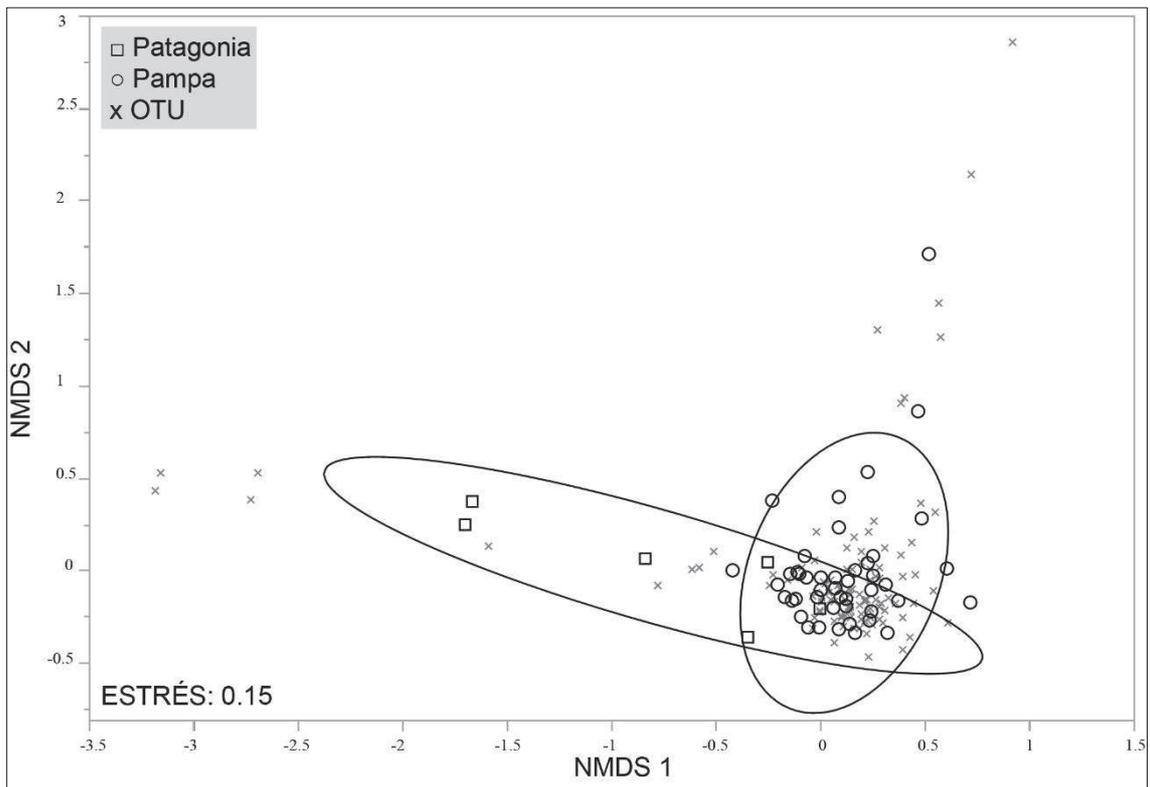


FIGURA 34 (A) GRÁFICO DE BARRAS ACUMULADO DE LAS PRINCIPALES ZOTUS POR LAGUNAS, ORDENADAS POR REGIÓN Y FT ASCENDENTE. (B) PROPORCIÓN DE LAS ZOTUS MÁS ABUNDANTES POR REGIÓN.

Para evaluar diferencias en la estructura comunitaria entre lagunas de la región patagónica y pampeana, se realizó un Análisis no paramétrico de similitud (ANOSIM). El gráfico de escalamiento multidimensional (NMDS) basado en la matriz de disimilitud (Bray Curtis), representó composiciones de zOTUs particulares y una agrupación diferente para las lagunas de acuerdo a su región de pertenencia (Figura 35, estrés: 0,15). De acuerdo al test de similitud realizado, las diferencias entre regiones fueron significativamente mayores a las diferencias dentro de los grupos, (ANOSIM R: 0,51, Valor de  $P < 0,005$ ).



**FIGURA 35 GRÁFICO DE ORDENACIÓN (NMDS) BASADO EN LOS VALORES DE DISIMILITUD DE BRAY-CURTIS DE LAS 98 ZOTUS CONSIDERADAS EN ESTE ESTUDIO.**

Con respecto al conjunto de muestras patagónicas, no se encontraron correlaciones significativas con ninguna de las variables consideradas. En las muestras pampeanas, se encontraron correlaciones significativas, con distinto grado de asociación, con las variables ambientales (ej. zOTU 4 correlacionó de manera fuerte y significativa con la conductividad) y con las variables de uso y cobertura de suelo (ej. zOTU 4 correlacionó de manera fuerte y significativa con la proporción de Otros Cultivos) pero no con las concentraciones de Gli o AMPA.

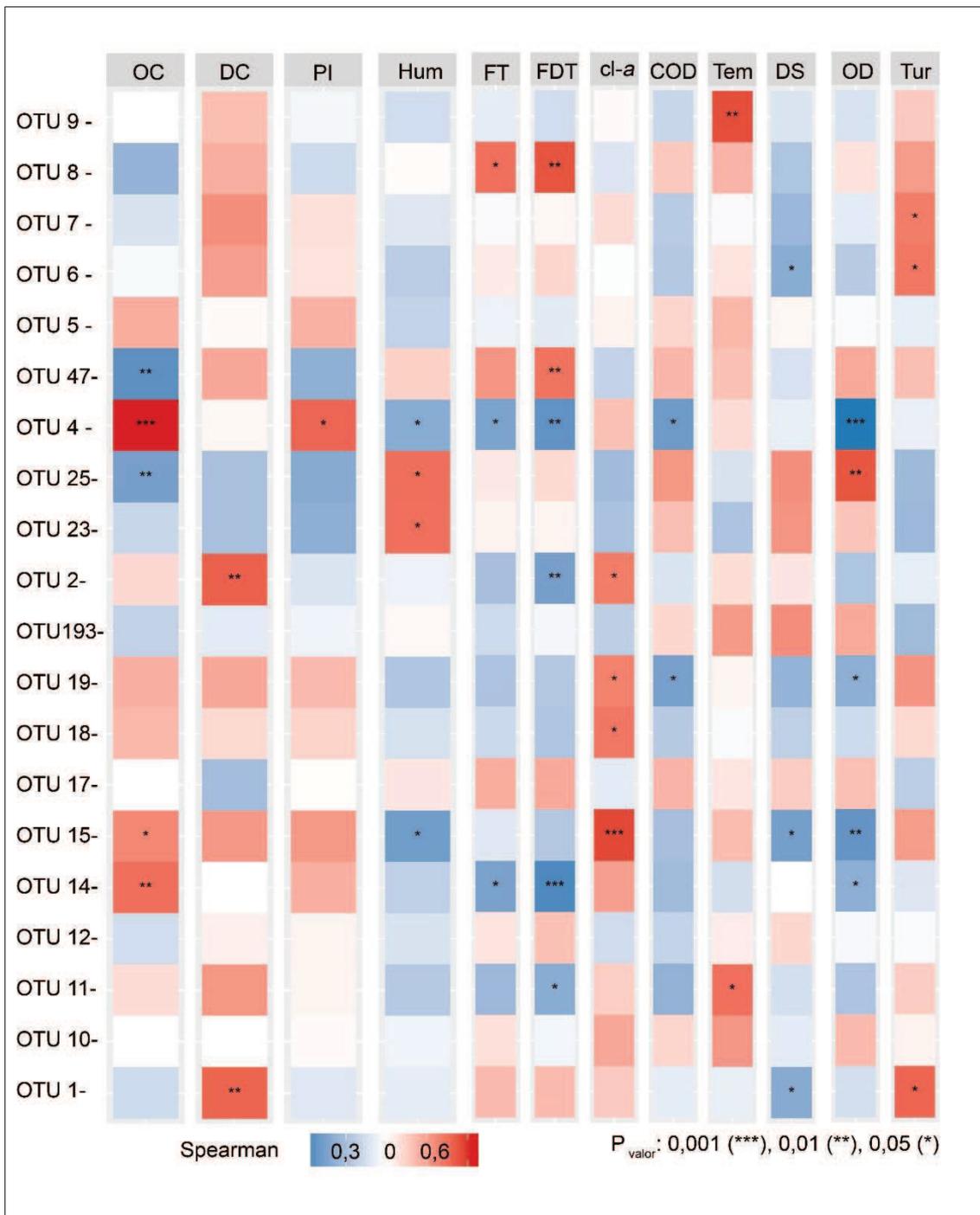


FIGURA 36 CORRELACIONES NO PARAMÉTRICAS ENTRE LAS ZOTUS MÁS ABUNDANTES Y LOS INDICADORES DE IMPACTO DE GLIFOSATO Y LAS VARIABLES AMBIENTALES. (A) OC: OTROS CULTIVOS; DC: DOBLE CULTIVO; PI: PASTURAS IMPLANTADAS; HUM: HUMEDALES; TEM: TEMPERATURA DEL AGUA; DS: PROFUNDIDAD DE DISCO DE SECCHI; OD: OXÍGENO DISUELTO; FT: FOSFORO TOTAL; FDT: FOSFORO DISUELTO TOTAL; COD: CARBONO ORGÁNICO DISUELTO; TUR: TURBIDEZ NEFELOMÉTRICA. SOLO LAS CORRELACIONES SIGNIFICATIVAS ESTÁN ILUSTRADAS.

## INDICIOS DE DIVERSIDAD DE LA COMUNIDAD DE PCY

Se calcularon los índices de diversidad y equitatividad para ambas regiones. Los valores medios (máximos) del índice de Shannon para las regiones pampeanas y patagónicas fueron de 1,97 (2,54) y 1,09 (1,78), respectivamente. Los valores medios (máximos) del índice de Simpson fueron de 0,76 (0,89) para la región pampeana y 0,48 (0,68) para la región patagónica. Los valores medios (máximos) de la equitatividad de Pielou fueron de 0,54 (0,73) para la región pampeana y 0,32 (0,49) para la región patagónica (Tabla 20). Tanto los índices de diversidad como la riqueza de especie, fueron significativamente mayores en Pampa que en Patagónica (valor de  $P < 0,05$ ), no así el número total de secuencias por muestra que fue similar para ambas regiones.

TABLA 20 VALORES ESTADÍSTICOS DE LOS PRINCIPALES ÍNDICES DE DIVERSIDAD.

	Lagunas pampeanas (n=45)				Lagunas patagónicas (n=6)			
	$\bar{x}$	DE	Max	Min	$\bar{x}$	DE	Max	Min
<b>Riqueza de especies</b>	40	12	65	23	28	8	38	17
<b>Simpson</b>	0,76	0,12	0,89	0,33	0,48	0,21	0,68	0,09
<b>Shannon-Weber</b>	1,97	0,42	2,54	0,89	1,09	0,54	1,78	0,25
<b>Equitatividad</b>	0,54	0,11	0,73	0,25	0,32	0,15	0,49	0,09
<b>N° de secuencias</b>	24.557	10.579	39.029	4.434	21.994	9.641	30.006	4.905

Estos índices fueron analizados a partir del cálculo de sus coeficientes de correlación de Spearman. De esta forma, a escala interregional (Pampa y Patagonia),

tanto el índice de Shannon como el de Simpson y la equitatividad estuvieron positivamente correlacionados con la latitud (Figura 33,  $\rho > 0,5$ , valor de  $P < 0,001$ ).

## **EFFECTO DE LAS VARIABLES SOBRE LA COMUNIDAD DE PCY**

Al observarse correlaciones entre los índices de diversidad y la latitud, se indagó sobre la estructura espacial de la estructura comunitaria de Pcy por medio del análisis de eigenvectores de autocorrelación espacial ("Moran's Eigenvectors Maps", MEMs). Asimismo, se realizaron RDA parciales de las variables ambientales y los indicadores de uso de glifosato para analizar la composición comunitaria de Pcy a escala regional (solo la región pampeana) e interregional (Pampa + Patagonia). De estos análisis, se observaron variables de los tres conjuntos de datos que explicaban significativamente parte de la variación en la composición comunitaria de Pcy.

*Variables ambientales.* El porcentaje de variación total explicado por los principales 2 ejes del RDA parcial de las variables ambientales fue de 17% a escala interregional (Figura 37 a) y de ~18% a escala regional (Figura 37 b). El primer eje a escala interregional, explicó la mayor parte de la variación representando un gradiente trófico de *Cl-a* y turbidez nefelométrica, separando principalmente los sitios con mayor grado trófico. Mientras que el segundo eje estuvo asociado a un gradiente de conductividad, separando los sitios de alta conductividad que se encuentra en el oeste y el sudoeste de la provincia de Buenos Aires (CS, FN, VE, PA, MO). A escala regional, también se evidenció un gradiente de turbidez, grado trófico y de conductividad, separándose los sitios con alta conductividad y escasa turbidez. Las variables ambientales que explicaron significativamente (valor de  $P < 0,01$ ) parte de la variación en los ensambles comunitarios de Pcy, a escala regional, fueron la conductividad, la turbidez nefelométrica, la concentración de *Cl-a* y FDT.

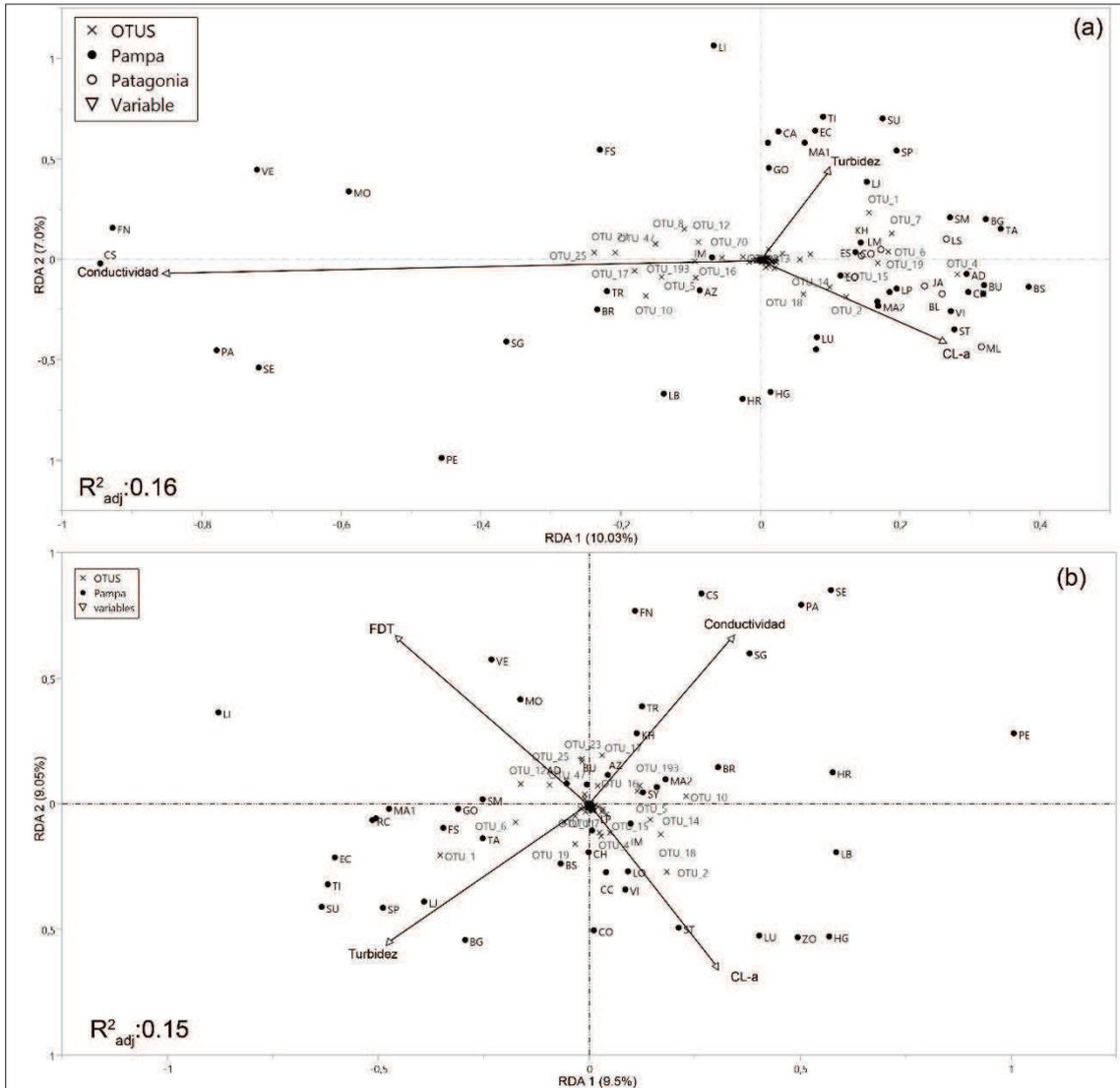


FIGURA 37 ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA) DE LAS VARIABLES AMBIENTALES A ESCALA INTERREGIONAL (A) Y REGIONAL (B). EL PORCENTAJE DE VARIACIÓN EXPLICADA POR CADA EJE ESTÁ INDICADO ENTRE PARÉNTESIS. LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS (VALOR DE P < 0,01) ESTÁN INDICADAS CON FLECHAS.

*Estructura espacial.* El análisis de eigenvectores de autocorrelación espacial (Moran's Eigenvectors Maps", MEMs), encontró una estructura espacial significativa entre sitios, tanto a escala interregional como regional. Todos los MEMs seleccionados en el análisis

Capítulo 5: Efecto del glifosato sobre la estructura comunitaria de Pcy

interregional fueron de escala “grande”. Mientras que, para el análisis regional, fueron seleccionados 2 MEM de escala “pequeña” (MEM 25 y MEM 38) y los restantes fueron de escala “grande” (Figura 38,  $R^2_{adj}=0,12$ ).

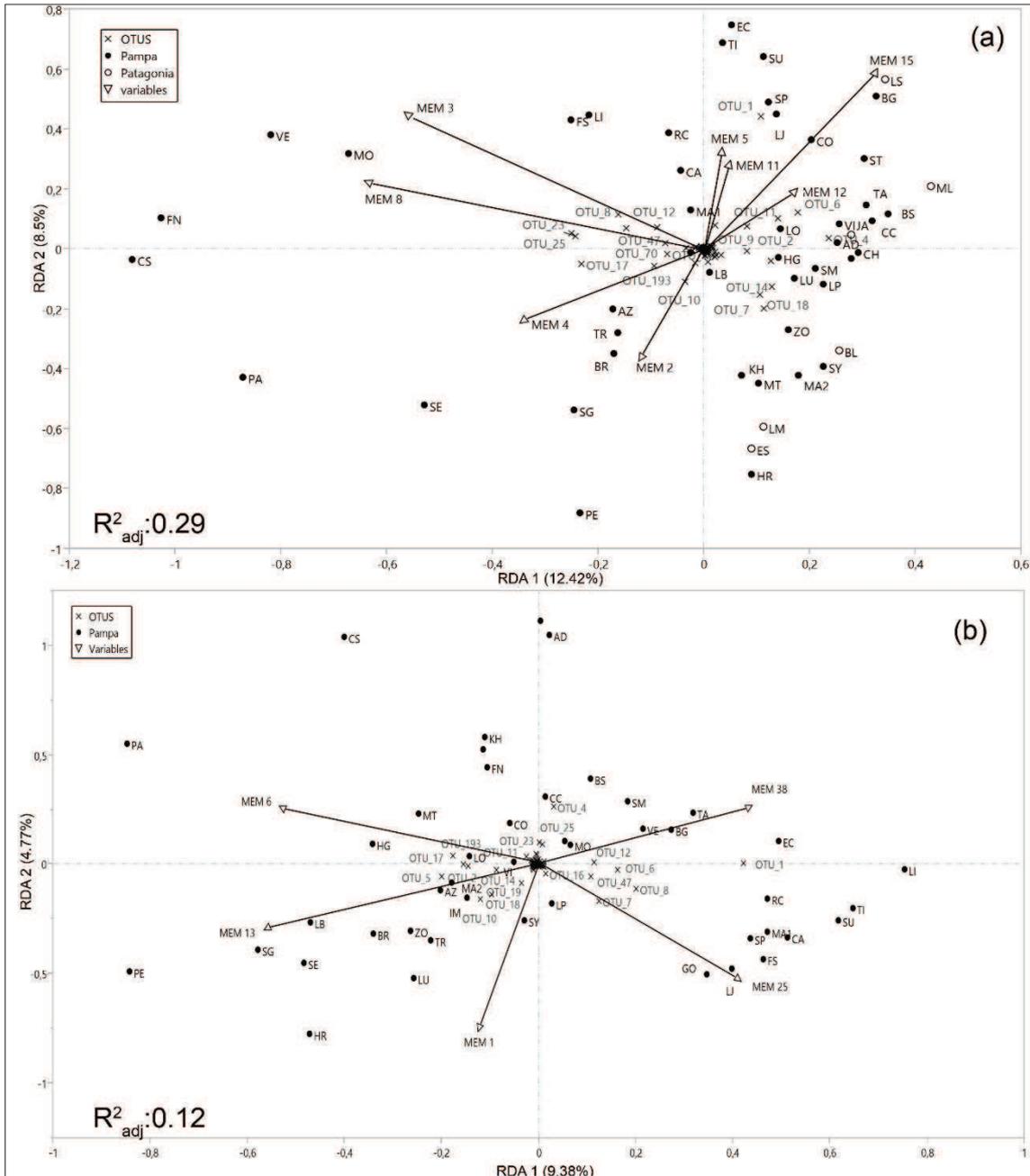
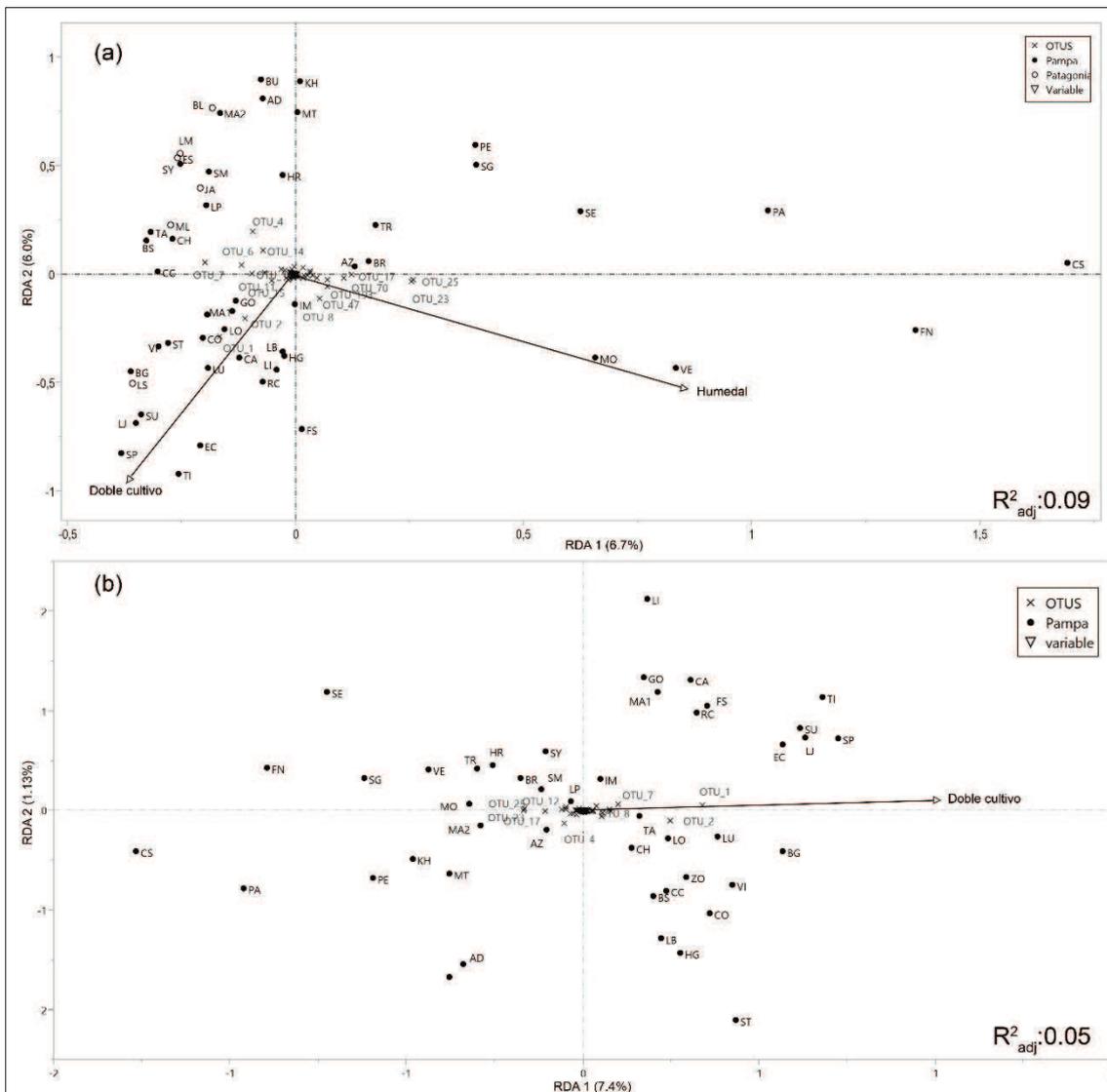


FIGURA 38 ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA) DE LOS VECTORES ESPACIALES A ESCALA INTERREGIONAL (A) Y REGIONAL (B). EL PORCENTAJE DE VARIACIÓN EXPLICADA POR CADA EJE ESTÁ INDICADO ENTRE PARÉNTESIS. LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS (VALOR DE  $P < 0,01$ ) ESTÁN INDICADAS CON FLECHAS.

*Indicadores de impacto de glifosato.* Los indicadores de impacto de glifosato doble cultivo y otros cultivos, fueron seleccionadas como variables significativas para explicar la composición comunitaria en la región pampeana (Figura 39 b,  $R^2_{adj} = 0,05$ ). Mientras que, la proporción de dobles cultivos y humedales fueron seleccionadas en el modelo de escala interregional (Figura 39 a,  $R^2_{adj} = 0,09$ ).



**FIGURA 39 ANÁLISIS DE REDUNDANCIA (RDA) DE LOS INDICADORES DE IMPACTO DE GLIFOSATO ESCALA INTERREGIONAL (A) Y REGIONAL (B). EL PORCENTAJE DE VARIACIÓN EXPLICADA POR CADA EJE ESTÁ**

INDICADO ENTRE PARÉNTESIS. LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS (VALOR DE  $P < 0,01$ ) ESTÁN INDICADAS CON FLECHAS.

El modelo de partición de varianza realizado a partir de los RDA parciales descritos, explicó satisfactoriamente el 37 % de la composición comunitaria de Pcy observada a escala interregional y el 25 % de la observada a escala regional (Figura 40). Tanto a escala interregional como a escala regional, los MEMs (incluidas aquellas otras variables espacialmente estructuradas) explicaron un 29% y 13% de la variación explicada en la composición de Pcy, respectivamente. A escala regional, las variables ambientales explicaron una gran proporción (~ 62%) de la variabilidad total, siendo menor su aporte a escala interregional. Por otro lado, los indicadores de impacto de glifosato tuvieron aportes similares a la variabilidad total explicada, tanto a escala regional (9%) como interregional (7%), las cuales estuvieron principalmente espacialmente estructuradas.

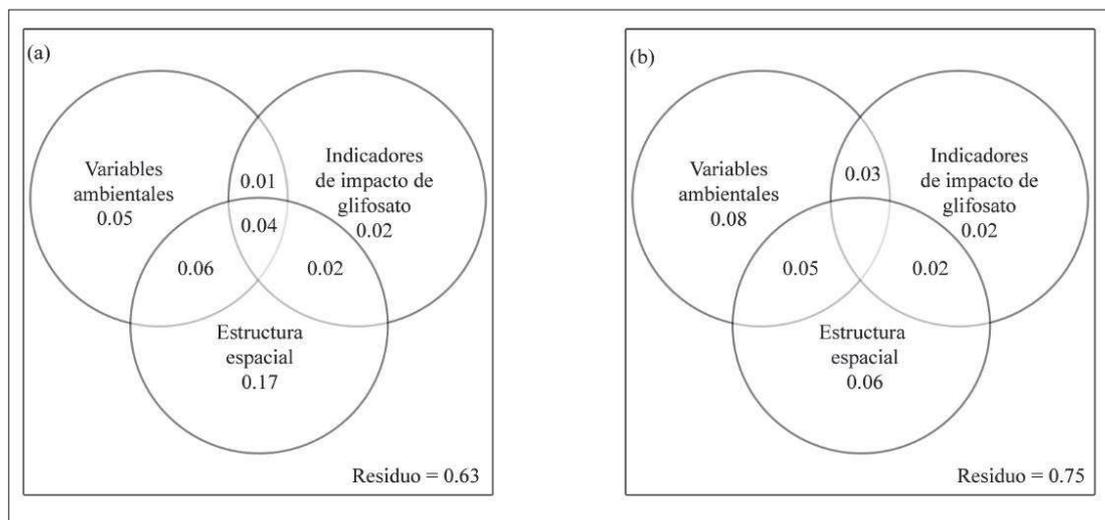


FIGURA 40 DIAGRAMAS DEL ANÁLISIS DE PARTICIÓN DE VARIANZA REPRESENTANDO LAS FRACCIONES DEL R CUADRADO AJUSTADO (R<sup>2</sup>ADJ) EXPLICADA POR LAS VARIABLES AMBIENTALES, LA ESTRUCTURA ESPACIAL Y LOS INDICADORES DE IMPACTO DE GLIFOSATO. (A) ESCALA INTERREGIONAL (PAMPA + PATAGONIA) Y (B) ESCALA REGIONAL (PAMPA).

Las variables seleccionadas por los distintos modelos, fueron analizadas a partir del cálculo de sus coeficientes de correlación de Spearman. A escala interregional, el MEM 4 correlacionó con la conductividad ( $\rho = -0,52$ , valor de  $P < 0,0001$ ) y con la proporción de humedales en los alrededores de la laguna ( $\rho = -0.43$ , valor de  $P < 0,0001$ ). A escala regional, no se detectaron correlaciones significativas entre las variables seleccionadas.

Se realizaron comparaciones entre lagunas impactadas de acuerdo a los indicadores de impacto de glifosato planteados en el *Capítulo 4* (*phnD* [+]) y (*phnD* [-]). De este análisis, se observó que la riqueza de especies fue significativamente mayor en las lagunas donde el indicador de glifosato *phnD* fue detectado que en aquellas donde estuvo por debajo del límite de detección instrumental (Figura 41, Valor de  $P < 0,001$ ). Asimismo, la equitatividad fue menor en las lagunas donde el gen *phnD* fue detectado (Figura 42, Valor de  $P < 0,001$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los índices de diversidad entre las lagunas en las cuales detectado glifosato y en las que no.

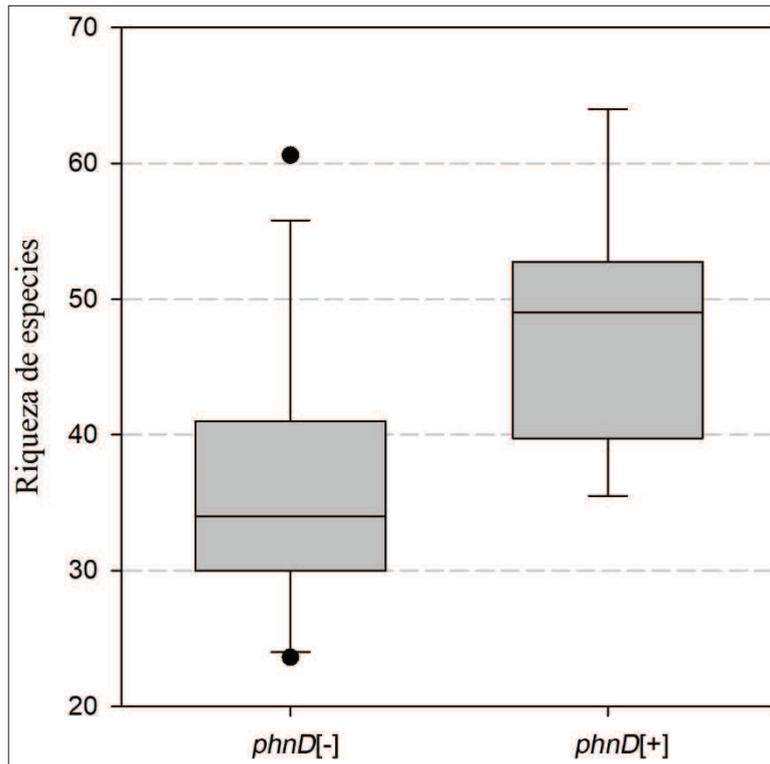


FIGURA 41 DIAGRAMA DE CAJAS COMPARANDO LA RIQUEZA DE ESPECIES ENTRE LAGUNAS PHND+ Y PHND-.

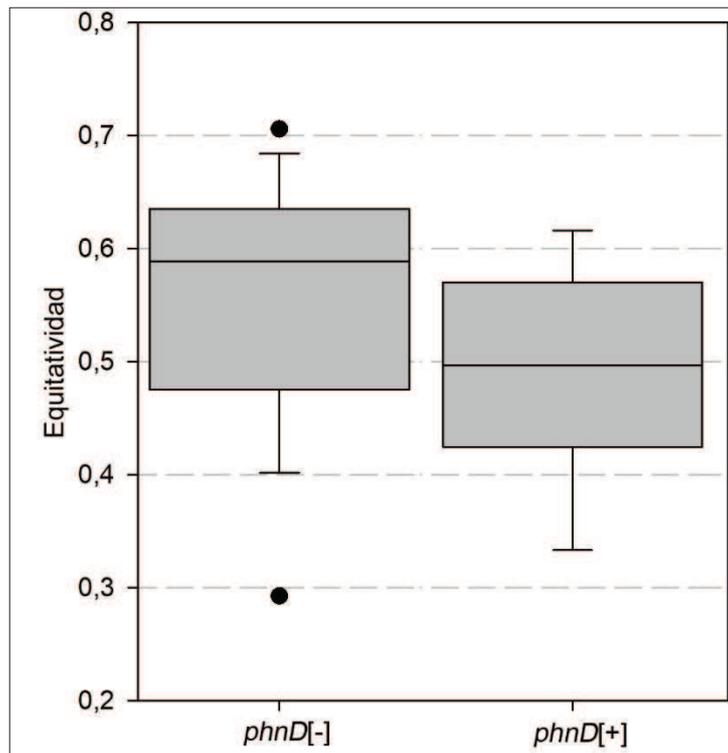


FIGURA 42 DIAGRAMA DE CAJAS COMPARANDO LA EQUITATIVIDAD DE PIELOU ENTRE LAGUNAS PHND+ Y PHND-.

## DISCUSIÓN

Las lagunas aquí analizadas, abarcaron una amplia distribución geográfica con usos y coberturas de suelo contrastantes, incluyendo, además, gran parte del espectro de estado trófico y de características limnológicas. A pesar de estas diferencias, se observó una elevada especificidad de los primers para estas muestras ambientales. Casi el 75 % de las secuencias correspondieron a los géneros de *Synechococcus*, *Prochlorococcus* y *Cyanobium*. De acuerdo a las curvas de rarefacción, la mayoría de las muestras alcanzaron la asíntota de las curvas indicando que una mayor profundidad de secuenciación no habría revelado un mayor número de especies. De igual manera, los estimadores no paramétricos revelaron que un esfuerzo de muestreo mayor, es decir

## Capítulo 5: Efecto del glifosato sobre la estructura comunitaria de Pcy

incluir más lagunas al muestreo, no habría revelado una mayor riqueza específica. Los valores de riqueza de especies para Pcy, oscilaron entre 7 y 72 zOTUs por muestra (valor promedio: 34 zOTUs). El valor promedio estuvo por encima a los reportados para otros sistemas de agua dulce (Huang y colaboradores, 2014; Jasser y colaboradores, 2013) y marinos (Haverkamp y colaboradores, 2009). Esto era esperable dado que los primers utilizados fueron diseñados para amplificar regiones hipervariables del gen 16S, que captan una gran diversidad en Pcy, tanto de las especies más abundantes como de las menos abundantes, lo que se conoce como la “biosfera rara” de una comunidad (Pedrós-Alió, 2012).

La comunidad de Pcy estuvo representada por grupos dominantes, de aproximadamente 20 zOTUs, que coexistieron con un gran número de OTUs poco abundantes. En las lagunas pampeanas, zOTU 1 estuvo presente y dominó en la mayoría de estos ambientes. Sin embargo, otras zOTUs fueron dominantes en algunas lagunas, como por ejemplo zOTU 4 (KH, AD, BU), zOTU 17 (PA, AZ) y zOTU 8 (SG y TR). En las lagunas patagónicas, la dominancia de algunas zOTUs fue más marcada que para las lagunas pampeanas, zOTU 7, por ejemplo, representó casi la mitad de las secuencias de esta región. Si bien las diferencias entre regiones (Pampa y Patagonia) fueron significativas, algunas zOTUs fueron compartidas y comprendieron una fracción importante de la estructura comunitaria. Por ejemplo, zOTU 1, muy abundante en Pampa, fue la especie predominante en LS de la región patagónica (La Seca, PN Laguna Blanca, Neuquén). De la misma forma que se observaron diferencias entre regiones en la composición de Pcy, también las se observaron en los distintos índices de diversidad observados (significativamente menores en Patagonia), los cuales estuvieron positivamente correlacionados con la latitud, lo que permitiría inferir sobre la posible existencia de un gradiente espacial estructurador de la comunidad de Pcy.

Las comunidades microbianas catalizan importantes procesos que sustentan la vida en el planeta. Además, contendrían la mayor biodiversidad de la tierra, por lo que entender los mecanismos que determinan su estructura comunitaria es uno de los mayores objetivos en la ecología microbiana (Langenheder and Székely, 2011). Existe un vívido debate sobre la importancia relativa de los factores locales y regionales y las variables que actúan a esas escalas en moldear la estructura comunitaria en bacterias. En este capítulo, se indagó sobre el efecto que tendrían las variables ambientales, los indicadores de impacto de glifosato y la estructura espacial sobre la estructura comunitaria de Pcy. En este sentido, los modelos de partición de varianza explicaron una proporción menor que los modelos propuestos para explicar la variación observada en la abundancia. Aunque la variación explicada fue similar a la variación explicada por otros autores (ver Van Der Gucht y colaboradores, 2007). Nuestros resultados indican que la composición y riqueza de los ensamblajes de Pcy estarían siendo modelados por un componente espacial, trófico (turbidez, Cl-a y FDT), fisicoquímico (conductividad) y antrópico (indicadores de impacto de glifosato), poniendo de manifiesto la naturaleza multiescala en la respuesta de las Pcy a estos factores.

Los análisis de redundancia y de correlación fueron coincidentes en identificar variables de uso de suelo (doble cultivo, otros cultivos, pasturas implantadas) como importantes estructuradores de la comunidad de Pcy. Los indicadores de impacto de glifosato, explicaron un cuarto de la variación total captada por los modelos. La proporción de dobles cultivos resultó, al igual que en los modelos desarrollados para la abundancia, seleccionada como una variable significativa y estructuradora de esta comunidad.

Según estos resultados, la presencia del gen *phnD* se asocia con el aumento de la riqueza específica de Pcy en las lagunas. La información disponible sugiere que la regulación y presencia de los genes responsables de la asimilación de P varía entre

## Capítulo 5: Efecto del glifosato sobre la estructura comunitaria de Pcy

géneros y cepas, pero que están sujetas a los nichos ambientales que ocupan (Ilikchyan, 2009b; Martiny y colaboradores, 2006). Por lo que la presencia del gen *phnD* señalaría la existencia de fosfonatos en el ambiente (como el glifosato), que estarían disponibles como recurso para las Pcy. Si bien los estudios teóricos en ecosistemas generalmente coinciden en que un alto número de especies no podrían coexistir de manera estable si todas compiten por un mismo recurso limitado, recientemente se han propuesto modelos de competencia en los cuales la diversidad de especies aumentaría exponencialmente con el número de recursos disponibles (Laan and De Polavieja, 2018). Por otro lado, la menor equitatividad reportada en las lagunas donde se detectó el gen *phnD* indicaría que las comunidades *phnD* [+] estarían dominadas por un menor número de especies. Desde una perspectiva ecológica, bajos valores de equitatividad están asociados a condiciones ambientales menos favorables (Caron and Jackson, 2008). Una disminución en la equitatividad (como respuesta a un estrés ambiental) puede afectar la productividad del sistema de manera directa (disminuyendo la productividad primaria) o de manera indirecta, afectando la riqueza y la equitatividad de otros componentes de la trama trófica de la laguna como los consumidores primarios (zooplancton). Por otro lado, cuando los ecosistemas presentan bajos valores de equitatividad, la estabilidad funcional del sistema frente a las perturbaciones ambientales reside en las capacidades de adaptación y respuesta de la especie dominante (Wittebolle y colaboradores, 2009), en este caso, las Pcy.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

El objetivo general de la presente tesis fue relacionar la abundancia y composición de las Pcy de lagos someros con la utilización del herbicida N-fosfonometilglicina (glifosato) en los ecosistemas terrestres circundantes. Documentar el efecto del glifosato sobre las comunidades microbianas, requirió de la combinación de distintas técnicas metodológicas: i) mediciones a campo, ii) técnicas analíticas limnológicas, iii) espectrometría de masas, iv) análisis de imagen satelital, v) microscopía de epifluorescencia, y vi) secuenciación masiva. El conjunto de los resultados aportados por las diferentes técnicas fue analizado también desde distintos enfoques estadísticos (PCA, RDA, comparaciones y correlaciones paramétricas y no paramétricas, MEMs, análisis de partición de varianza, regresiones lineales, etc.). Los resultados obtenidos aquí constituyen, por un lado, la primera caracterización espacial y temporal del glifosato y AMPA en lagunas de Sudamérica. Por el otro, este es el primer trabajo que aborda, a escala de campo, poner a prueba las hipótesis basadas en resultados experimentales sobre el crecimiento poblacional de Pcy como respuesta al agregado de glifosato. Estos resultados no solo constituyen un aporte para avanzar en la comprensión de la ocurrencia y dinámica de estos compuestos en el ambiente, sino que, además, aportan evidencias de los efectos de la utilización de glifosato sobre los organismos que habitan las lagunas pampeanas y proporcionan herramientas para evaluar dichos efectos en el ambiente natural.

Las Pcy son organismos con una distribución cosmopolita que habitan en una gran variedad de hábitats. Es sabido, que las Pcy junto con las bacterias heterótrofas constituyen una parte importante del bucle microbiano (F. Azam y colaboradores, 1983). Incorporan materia orgánica disuelta a la trama trófica y pueden constituir cerca del 98% del plancton y de la producción primaria (Stockner and Shortreed, 1991b). Las altas abundancias y actividad metabólica de estos organismos pueden influenciar la estabilidad del ecosistema acuático. Comprender este grupo resulta aún más importante considerando que algunas especies son miembros de grupos potencialmente tóxicos,

que pueden desarrollar floraciones y librear cianotoxinas peligrosas para la salud pública (Jakubowska and Szelağ-Wasielewska, 2015). Por otro lado, es predecible que la utilización de herbicidas a base de glifosato se intensificará y expandirá en los próximos años en la Argentina con la incorporación definitiva del riego y la fertilización al modelo agrícola. La intensificación y expansión de la agricultura no se limita solo a la Argentina y a la región pampeana, sino que es un proceso global que incluye a los grandes pastizales templados, pero también a otras ecorregiones como la del Cerrado en Brasil, el chaco húmedo, la selva paranaense, etc. Por lo que es esperable que los resultados obtenidos en esta tesis sean relevantes por sus implicancias ecológicas y sanitarias a una escala regional pero también global.

Las hipótesis de trabajo planteada en la parte introductoria de esta tesis pueden enunciarse de la siguiente forma. Dado que algunas Pcy son tolerantes al glifosato y pueden utilizarlo como fuente de fósforo, la exposición continuada a este herbicida por más de dos décadas ha producido en las lagunas de la región pampeana:

1. *Un aumento de la densidad y biomasa de la Pcy.*

Los resultados expuestos en el *capítulo 4* demuestran que las prácticas agrícolas basadas en el uso intensivo de glifosato tienen consecuencias sobre la comunidad microbiana, específicamente promueven el aumento de la abundancia de Pcy. En concordancia con las predicciones planteadas, se observaron altas abundancias de Pcy en las lagunas de la región pampeana comparado con cuerpos de agua de similar estado trófico de las otras regiones analizadas; asimismo, las frecuencias de detección de glifosato, AMPA y *phnD* fueron mayores en la región pampeana que en la región Patagónica. Dentro de la región Pampeana, los indicadores de impacto de glifosato

tuvieron un efecto promotor de las abundancias de Pcy y fueron seleccionadas como variables significativas para explicar la variabilidad observada en la abundancia de estos organismos.

2. *Una selección de poblaciones de Pcy capaces de utilizar fosfonatos, tales como el glifosato y AMPA, como fuente de fósforo.*

La crisis en la biodiversidad es relativamente bien conocida para vertebrados terrestres y otros grupos (Agostini et al., 2020; Woodruff, 2001), pero la información disponible sobre microorganismos es limitada. En particular sobre aquellos que pueden tolerar ambientes contaminados, como las cianobacterias y algunas microalgas (López-Rodas et al., 2007). En la sección introductoria se planteó que se observaría una menor diversidad en las lagunas impactadas que en las no impactadas. Sin embargo, se observó que todos los índices de diversidad de Pcy estimados (riqueza específica, equitatividad, Shannon y Simpson) fueron superiores en las lagunas pampeanas pertenecientes a cuencas agrícolas que en las lagunas sin historial de uso de glifosato de la región patagónica. La estructura comunitaria de Pcy también presentó diferencias significativas entre estas regiones. Por otro lado, de acuerdo a los indicadores de impacto de glifosato planteados en el *capítulo 4*, se observó una mayor riqueza de especies en las lagunas en las que se detectó el gen *phnD*. El cual podría estar indicando que la presencia de fosfonatos (como el glifosato) disponibles como recurso tendría un efecto promotor sobre la abundancia, pero también sobre la riqueza de Pcy. Finalmente, los bajos de valores de equitatividad observados podrían estar indicando que algunos grupos de Pcy estarían mejor adaptados en las lagunas *phnD* [+] al aprovechamiento de este nuevo recurso.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adrian, R., O'Reilly, C.M., Zagarese, H., Baines, S.B., Hessen, D.O., Keller, W., Livingstone, D.M., Sommaruga, R., Straile, D., Van Donk, E., Weyhenmeyer, G.A., Winder, M., 2009. Lakes as sentinels of climate change. *Limnol. Oceanogr.* 54, 2283–2297. [https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.6\\_part\\_2.2283](https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.6_part_2.2283)
- Agostini, M.G., Roesler, I., Bonetto, C., Ronco, A.E., Bilenca, D., 2020. Pesticides in the real world : The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biol. Conserv.* 241, 108355. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>
- Aiba, H., Nagaya, M., Mizuno, T., 1993. Sensor and regulator proteins from the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942 that belong to the bacterial signal-transduction protein families: implication in the adaptive response to phosphate limitation. *Mol. Microbiol.* 8, 81–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01205.x>
- Aizaki, M., Otsuki, A., Fukushima, T., Hosomi, M., Muraoka, K., Otsuki, A., Fukushima, T., Hosomi, M., Muraoka, K., 1981. Application of Carlson's trophic state index to Japanese lakes and relationships between the index and other parameters. *Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Verhandlungen* 0770. <https://doi.org/10.1080/03680770.1980.11897067>
- Alexandratos, N., Bruinsma, J., 2012. WORLD AGRICULTURE TOWARDS 2030/2050. *FAO Agric. Dev. Econ. Div.* [https://doi.org/10.1016/S0264-8377\(03\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0264-8377(03)00047-4)
- Allende, L., Tell, G., Zagarese, H., Torremorell, A.M., Pérez, G., Bustingorry, J., Escaray, R., Izaguirre, I., 2009. Phytoplankton and primary production in clear-

- vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia* 624, 45–60. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9665-9>
- Allinson, G., Zhang, P., Bui, A., Allinson, M., Rose, G., Marshall, S., 2015. Pesticide and trace metal occurrence and aquatic benchmark exceedances in surface waters and sediments of urban wetlands and retention ponds in Melbourne , Australia. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4206-3>
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Agustina Etchegoyen, M., Marino, D.J., Etchegoyen, M.A., Marino, D.J., 2018. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Sci. Total Environ.* 645, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.134>
- Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H., Nakata, A., 1986. Nucleotide sequence of the *phoM* region of *Escherichia coli*: Four open reading frames may constitute an operon. *J. Bacteriol.* 168, 294–302. <https://doi.org/10.1128/jb.168.1.294-302.1986>
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866–1873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.041>
- APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541. <https://doi.org/ISBN 9780875532356>

- Aragón, R., Jobbágy, E.G., Viglizzo, E.F., 2011. Surface and groundwater dynamics in the sedimentary plains of the Western Pampas (Argentina). *Ecohydrology* 4, 433–447. <https://doi.org/10.1002/eco.149>
- Austin, a. P., Harris, G.E., Lucey, W.P., 1991. Impact of an organophosphate herbicide (GlyphosateR) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 29–35. <https://doi.org/10.1007/BF01689449>
- Baier, F., Gruber, E., Hein, T., Bondar-Kunze, E., Ivanković, M., Mentler, A., Brühl, C.A., Spangl, B., Zaller, J.G., 2016. Non-target effects of a glyphosate-based herbicide on Common toad larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and associated algae are altered by temperature. *PeerJ* 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.2641>
- Ball, G.H., Hall, D.J., 1967. A clustering technique for summarizing multivariate data. *Behav. Sci.* 12, 153–155. <https://doi.org/10.1002/bs.3830120210>
- Battaglin, W. a., Meyer, M.T., Kuivila, K.M., Dietze, J.E., 2014. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 50, 275–290. <https://doi.org/10.1111/jawr.12159>
- Baylis, A.D., 2000. Why glyphosate is a global herbicide: Strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag. Sci.* 56, 299–308. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4<299::AID-PS144>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<299::AID-PS144>3.0.CO;2-K)
- Becker, J.M., Liess, M., 2015. Biotic interactions govern genetic adaptation to toxicants. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0071>
- Belykh, O.I., Sorokovikova, E.G., Tikhonova, I. V, Fedotov, A.F., 2005. Abundance , morphological diversity , and spatial distribution of autotrophic picoplankton in Lake Hovsgol ( Mongolia ) 8, 461–473.

<https://doi.org/10.1080/14634980500362171>

Biehl, L., Landgrebe, D., 2002. MultiSpec—a tool for multispectral–hyperspectral image data analysis. *Comput. Geosci.* 28, 1153–1159. [https://doi.org/10.1016/S0098-3004\(02\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0098-3004(02)00033-X)

Bisigato, A.J., Hardtke, L.A., Valle, H.F.D., Bouza, P.J., Palacio, R.G., 2016. Regional-scale vegetation heterogeneity in northeastern Patagonia: Environmental and spatial components. *Community Ecol.* 17, 8–16.  
<https://doi.org/10.1556/168.2016.17.1.2>

Blanchet, G.F., Legendre, P., Borcard, D., 2008. FORWARD SELECTION OF EXPLANATORY VARIABLES F. *Ecology* 89, 2623–2632.  
<https://doi.org/10.1890/07-0986.1>

Bonanse, R., Filippi, I., Wunderlin, D., Marino, D., Amé, M., 2017. The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment. *Toxics* 6, 3. <https://doi.org/10.3390/toxics6010003>

Bonnet, J.-L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* 22, 78–91. <https://doi.org/10.1002/tox.20237>

Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P., 2011. Numerical Ecology with R, Numerical Ecology with R. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7976-6>

Borchers, A., Truex-Powell, E., Wallander, S., Nickerson, C., 2014. Multi-Cropping Practices: Recent Trends in Double Cropping United States Department of

Agriculture.

- Bowmer, K.H., 1982. Adsorption Characteristics of Seston In Irrigation Water: Implications for the Use of Aquatic Herbicides. *Mar. Freshw. Res.* 33, 443–458. <https://doi.org/10.1071/MF9820443>
- Callieri, C., Modenutti, B., Queimaliños, C., Bertoni, R., Balseiro, E., 2007. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: Differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquat. Ecol.* 41, 511–523. <https://doi.org/10.1007/s10452-007-9125-z>
- Camacho, A., Miracle, M.R., Vicente, E., 2003. Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Arch. für Hydrobiol.* 157, 321–338. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2003/0157-0321>
- Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., MacE, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., Kinzig, A.P., Daily, G.C., Loreau, M., Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D.S., Naeem, S., 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486, 59–67. <https://doi.org/10.1038/nature11148>
- Carlson, R.E., 1977. A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.* 22, 361–369. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.2.0361>
- Caron, J., Jackson, D.A., 2008. Paleoecology of the Greater Phyllopod Bed community , Burgess Shale 258. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2007.05.023>
- CASAFE, 2012. Informe del Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios 9.
- Casal, L.M., 2009. El desarrollo tecnológico y la evolución de la frontera agrícola en el

período 1961-2009.

- Castro Berman, M., Llamas, M.E., Minotti, P., Fermani, P., Quiroga, M. V, Zagarese, H., 2020. Field evidence supports former experimental claims on the stimulatory effect of glyphosate on picocyanobacteria communities. *Sci. Total Environ.* 701, 134601. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134601>
- Castro Berman, M., Marino, D.J.G., Quiroga, M.V., Zagarese, H., 2018. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 200, 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.103>
- Caviglia, O.P., Sadras, V.O., Andrade, F.H., 2004. Intensification of agriculture in the south-eastern Pampas: I. Capture and efficiency in the use of water and radiation in double-cropped wheat-soybean. *F. Crop. Res.* 87, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2003.10.002>
- Collos, Y., Bec, B., Jauzein, C., Abadie, E., Laugier, T., Lautier, J., Pastoureaud, A., Souchu, P., Vaquer, A., 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea Res.* 61, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.05.008>
- Coupe, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D., Gregoire, C., 2012. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Manag. Sci.* 68, 16–30. <https://doi.org/10.1002/ps.2212>
- Crist, E., Mora, C., Engelman, R., 2017. The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Nature* 264, 410–446. <https://doi.org/10.1017/9781139044202.013>

- Cuhra, M., Bøhn, T., Cuhra, P., 2016. Glyphosate: Too Much of a Good Thing? *Front. Environ. Sci.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00028>
- Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Manag. Sci.* 56, 516–520. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200006\)56:6<516::AID-PS163>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200006)56:6<516::AID-PS163>3.0.CO;2-0)
- Diovisalvi, N., Bohn, V.Y., Piccolo, M.C., Perillo, G.M.E.E., Baigún, C., Zagarese, H.E., 2015. Shallow lakes from the Central Plains of Argentina: an overview and worldwide comparative analysis of their basic limnological features. *Hydrobiologia* 752, 5–20. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1946-x>
- Dittrich, M., Kurz, P., Wehrli, B., 2004. The Role of Autotrophic Picocyanobacteria in Calcite Precipitation in an Oligotrophic Lake 1992, 45–53. <https://doi.org/10.1080/01490450490253455>
- Dolan, T., Howsam, P., Parsons, D.J., Whelan, M.J., 2013. Is the EU Drinking Water Directive Standard for Pesticides in Drinking Water Consistent with the Precautionary Principle ?
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Bérard, A., Bouchez, A., Humbert, J., Montuelle, B., 2007. Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area 50, 91–102. <https://doi.org/10.3354/ame01133>
- Dray, S., Legendre, P., Peres-Neto, P.R., 2006. Spatial modelling: a comprehensive framework for principal coordinate analysis of neighbour matrices (PCNM). *Ecol. Modell.* 196, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.02.015>
- Dussart, B.M., 1965. Les differentes categories de planktion. *Hydrobiologia* 26, 72–74.
- Environmental Protection Agency, 1993. Reregistration Eligibility Decision (RED):

Glyphosate.

- Epele, L.B., Manzo, L.M., Grech, M.G., Macchi, P., Claverie, A., Lagomarsino, L., Miserendino, M.L., 2018. Disentangling natural and anthropogenic influences on Patagonian pond water quality. *Sci. Total Environ.* 613–614, 866–876.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.147>
- F. Azam', T., Field, J.G., Graf, J.S., Meyer-Rei, L.A., Thingstad, F., 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol.* 81, 5606–5622.  
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00938>
- Fahnenstiel, G.L., Carrick, H.J., 1992. Phototrophic Picoplankton in Lakes Huron and Michigan: Abundance, Distribution, Composition, and Contribution to Biomass and Production. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 379–388. <https://doi.org/10.1139/f92-043>
- Farrell, I.O., Motta, C., Forastier, M., Polla, W., Otaño, S., Meichtry, N., Devercelli, M., Lombardo, R., 2019. Ecological meta-analysis of bloom-forming planktonic Cyanobacteria in Argentina. *Harmful Algae* 83, 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.01.004>
- Felföldi, T., Somogyi, B., Márialigeti, K., Vörös, L., 2009. Characterization of photoautotrophic picoplankton assemblages in turbid, alkaline lakes of the Carpathian Basin (Central Europe). *J. Limnol.* 68, 385–395.  
<https://doi.org/10.3274/JL09-68-2-21>
- Feng, J.C., Thompson, D.G., 1990. Fate of Glyphosate in a Canadian Forest Watershed. 2. Persistence in Foliage and Soils. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1118–1125. <https://doi.org/10.1021/jf00094a046>

- Fermani, P., Torremorell, A.M., Lagomarsino, L., Escaray, R., Unrein, F., Pérez, G., 2015. Microbial abundance patterns along a transparency gradient suggest a weak coupling between heterotrophic bacteria and flagellates in eutrophic shallow Pampean lakes. *Hydrobiologia* 752, 103–123. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2019-x>
- Fernández Zenoff, V., Siñeriz, F., Farías, M.E., 2006. Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7857–7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
- Forlani, G., Pavan, M., Gramek, M., Kafarski, P., Lipok, J., 2008. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant Cell Physiol.* 49, 443–456. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn021>
- Gabellone, N.A., Claps, M.C., Solari, L.C., Neschuk, N.C., Gabellone, N.S.A., Claps, M.A.R.A.C., Solari, L.A.C., 2005. Nutrients , Conductivity and Plankton in a Landscape Approach to a Pampean Saline Lowland River ( Salado River , Argentina ) content in a trusted digital archive . We use information technology and tools to increase productivity and facilitate new forms N 75, 455–477. <https://doi.org/10.1007/sl0533-005-3273-9>
- Gaitán, J.J., Ayesa, J. a, Umaña, F., Raffo, F., Bran, D.B., 2011. Cartografía del área afectada por cenizas volcánicas en las provincias de Río Negro y Neuquén. *Inta EEA Bariloche* 1–8.
- 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. *Environ.*

- Sci. Pollut. Res. 23, 18869–18882. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7005-6>
- Geyer, R.L., Smith, G.R., Rettig, J.E., 2016. Effects of Roundup formulations, nutrient addition, and Western mosquitofish (*Gambusia affinis*) on aquatic communities. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 11729–11739. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6381-2>
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide 35–36.
- Gleick, P.H., 2003. Water use. Annu. Rev. Environ. Resour. 28, 275–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.28.040202.122849>
- Goldsborough, L.G., Brown, D.J., 1988. Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41, 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF01705439>
- Gonzalez, M., Miglioranza, K.S.B., Aizpún, J.E., Isla, F.I., Peña, A., 2010. Chemosphere Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina ( Pampa and Patagonia ). Chemosphere 81, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.021>
- Hamilton, D.J., Ambrus, Á., Dieterle, R.M., Felsot, A.S., Harris, C.A., Holland, P.T., Katayama, A., Kurihara, N., Linders, J., Unsworth, J., Wong, S.-S., 2003. Regulatory limits for pesticide residues in water (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 75, 1123–1155. <https://doi.org/10.1351/pac200375081123>
- Hance, R.J., 1976. Adsorption of glyphosate by soils. Pestic. Sci. 7, 363–366. <https://doi.org/10.1002/ps.2780070407>

- Haro, M.A., De Lorenzo, V., 2001. Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: Construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene. *J. Biotechnol.* 85, 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00367-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00367-9)
- Haverkamp, T.H.A., Schouten, D., Doeleman, M., Wollenzien, U., Huisman, J., Stal, L.J., 2009. Colorful microdiversity of *Synechococcus* strains (picocyanobacteria) isolated from the Baltic Sea. *ISME J.* 3, 397–408. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.118>
- Hébert, M.P., Fugère, V., Gonzalez, A., 2019. The overlooked impact of rising glyphosate use on phosphorus loading in agricultural watersheds. *Front. Ecol. Environ.* 17, 48–56. <https://doi.org/10.1002/fee.1985>
- Held, A., Hudson, J., Martin, L., Reeves, W., 2016. Benefits and Safety of Glyphosate. Monsanto 33.
- Hepperle, D., Krienitz, L., 2001. Systematics and Ecology of Chlorophyte Picoplankton in German Inland Waters along a Nutrient Gradient 269–284.
- Hoekstra, J.M., Boucher, T.M., Ricketts, T.H., Roberts, C., 2005. Confronting a biome crisis: Global disparities of habitat loss and protection. *Ecol. Lett.* 8, 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00686.x>
- Hothorn, T., Hornik, K., van de Wiel, M.A., Zeileis, A., 2006. A Lego System for Conditional Inference. *Am. Stat.* 60, 257–263. <https://doi.org/10.1198/000313006X118430>
- 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, 176–197.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-13>

Huang, S., Liu, Y., Hu, A., Liu, X., Chen, F., Yao, T., Jiao, N., 2014. Genetic diversity of picocyanobacteria in Tibetan lakes: Assessing the endemic and universal distributions. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7640–7650.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02611-14>

Huber, P., Gasol, J.M., Cornejo-Castillo, F.M., Acinas, S.G., Ferrera, I., Metz, S., Logares, R., Sánchez, P., Balagué, V., Unrein, F., 2019. Primer design for an accurate view of picocyanobacterial community structure using high-throughput sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.02659-18>

Huete, A., Didan, K., Leeuwen, W. Van, Miura, T., Glenn, E., 2011. Land Remote Sensing and Global Environmental Change: NASA's Earth Observing System and the Science of ASTER and MODIS 894. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6749-7>

Huntscha, S., Stravs, M.A., Bu, A., Ahrens, C.H., Frey, J.E., Pomati, F., Hollender, J., Buerge, I.J., Balmer, M.E., Poiger, T., 2018. Seasonal Dynamics of Glyphosate and AMPA in Lake Greifensee: Rapid Microbial Degradation in the Epilimnion During Summer. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00314>

Ibáñez, M., Pozo, Ó.J., Sancho, J. V., López, F.J., Hernández, F., 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1081, 145–155.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.041>

Ich, 2005. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and

Methodology. Int. Conf. Harmon. 1994, 17.

[https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)

Ilikchyan, I.N., 2009a. Phosphonates utilization in marine and freshwater picocyanobacteria CA151:567075 151.

Ilikchyan, I.N., 2009b. Phosphonates utilization in marine and freshwater picocyanobacteria 151.

Ilikchyan, I.N., McKay, R.M.L., Kutovaya, O.A., Condon, R., Bullerjahn, G.S., 2010. Seasonal expression of the picocyanobacterial phosphonate transporter gene *phnD* in the Sargasso sea. *Front. Microbiol.* 1, 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00135>

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. *Environ. Microbiol.* 11, 1314–1324.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01869.x>

Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria, 1997. Guía práctica para el cultivo de maíz. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 189.

INTA, 1997. Guía práctica para el cultivo de girasol. INTA Ediciones 1–163.

Iriondo, M., 2004. Large wetlands of South America: A model for Quaternary humid environments. *Quat. Int.* 114, 3–9. [https://doi.org/10.1016/S1040-6182\(03\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S1040-6182(03)00037-5)

Iwatsubo, R.T., Groat, C.G., n.d. Techniques of Water-Resources Investigations National Field Manual for the Collection of COLLECTION OF Edited by.

- Jakubowska, N., Szeląg-Wasielewska, E., 2015. Toxic picoplanktonic cyanobacteria - Review. *Mar. Drugs* 13, 1497–1518. <https://doi.org/10.3390/md13031497>
- Jasser, I., Arvola, L., 2003. Potential effects of abiotic factors on the abundance of autotrophic picoplankton in four boreal lakes. *J. Plankton Res.* 25, 873–883. <https://doi.org/10.1093/plankt/25.8.873>
- Jasser, I., Królicka, A., Jakubiec, K., Chróst, R.J., 2013. Seasonal and spatial diversity of picocyanobacteria community in the Great Mazurian Lakes derived from DGGE analyses of 16S rDNA and cpcBA-IGS markers. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 739–749. <https://doi.org/10.4014/jmb.1208.08002>
- Johnson, E.N., Kirkland, K.J., Stevenson, F.C., 2002. Timing of pre-seeding glyphosate application in direct-seeding systems 0.
- Keasling, J.D., Van Dien, S.J., Pramanik, J., 1998. Engineering polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*: Implications for bioremediation of inorganic contaminants. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 231–239. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980420\)58:2/3<231::AID-BIT16>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980420)58:2/3<231::AID-BIT16>3.0.CO;2-F)
- Kirchman, D.L., 2000. Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria.
- Kogan, M., Alister, C., 2010. Glyphosate Use in Forest Plantations. *Chil. J. Agric. Res.* 70, 652–666.
- Kromrey, J. d., Hines, constance v., 1995. Use of Empirical Estimates of Shrinkage in Multiple Regression: A Caution. *Educ. Psychol. Meas.* 55, 901–925.

<https://doi.org/10.1177/0013164495055006001>

Kutovaya, O.A., McKay, R.M.L., Bullerjahn, G.S., 2013. Detection and expression of genes for phosphorus metabolism in picocyanobacteria from the Laurentian Great Lakes. *J. Great Lakes Res.* 39, 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2013.09.009>

Laan, A., De Polavieja, G.G., 2018. Species diversity rises exponentially with the number of available resources in a multi-trait competition model. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1273>

Lamarche, M.G., Wanner, B.L., 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence : a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>

Langenheder, S., Székely, A.J., 2011. Species sorting and neutral processes are both important during the initial assembly of bacterial communities. *ISME J.* 5, 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.207>

Lavallée, B.F., Pick, F.R., 2002. Picocyanobacteria abundance in relation to growth and loss rates in oligotrophic to mesotrophic lakes. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 37–46. <https://doi.org/10.3354/ame027037>

Liess, M., Henz, S., Knillmann, S., 2019. Predicting low-concentration effects of pesticides. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51645-4>

Lipok, J., Owsiak, T., Młynarz, P., Forlani, G., Kafarski, P., 2007. Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates-The ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.004>

Llames, M.E., del Giorgio, P.A., Zagarese, H., Ferraro, M., Izaguirre, I., 2013.

Alternative states drive the patterns in the bacterioplankton composition in shallow Pampean lakes (Argentina). *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 310–321.

<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12020>

López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marva, F., García, M.E., Costas, E., 2007. Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. *Evol. Ecol.* 21, 535–547. <https://doi.org/10.1007/s10682-006-9134-8>

Lumley, T., Miller, A., 2017. Package 'leaps.'

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

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.090>

Mac Loughlin, T.M., Peluso, L., Marino, D.J.G., 2017. Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci. Total Environ.* 598, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.116>

Malinsky-Rushanksy, N., Berman, T., 1991. Picocyanobacteria and Bacteria in Lake Kinneret. *Int. Rev. der gesamten Hydrobiol. und Hydrogr.* 76, 555–564.

<https://doi.org/10.1002/iroh.19910760408>

Maria J Barla, Vera, M.S., O' Brien, E.D., 2003. Relative abundance and autecology of three piscivorous fishes in lakes of the upper basin of Salado River ( Buenos Aires Province , Argentina ) 384, 205–214.

Martiny, J.B.H., Bohannon, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green,

J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Øvreås, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., Staley, J.T., 2006. Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>

Mazzoni, E., Rabassa, J.O., 2007. Volcanic landscapes of patagonia: A geomorphological map of the piedra del águila volcanic plateau, province of Neuquén, Argentina. *J. Maps* 3, 311–322. <https://doi.org/10.1080/jom.2007.9710847>

McGrath, J.W., Chin, J.P., Quinn, J.P., 2013. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 412–9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3011>

Mcmurry, S.T., Belden, J.B., Smith, L.M., Morrison, S.A., Daniel, D.W., Euliss, B.R., Euliss, N.H., Kensinger, B.J., Tangen, B.A., 2016. Land use effects on pesticides in sediments of prairie pothole wetlands in North and South Dakota. *Sci. Total Environ.* 565, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.209>

Metcalf, W.W., Wanner, B.L., 1993. Evidence for a fourteen-gene, *phnC* to *phnP* locus for phosphonate metabolism in *Escherichia coli*. *Gene* 129, 27–32. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90692-V](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90692-V)

Metz, S., Dos Santos, A.L.A.L., Castro Berman, M., Bigeard, E., Licursi, M., Not, F., Lara, E., Unrein, F., Berman, M.C., 2019. Diversity of photosynthetic picoeukaryotes in eutrophic shallow lakes as assessed by combining flow cytometry cell-sorting and high throughput sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz038>

Miles, C.J., Anson Moye, H., 1988. Extraction of Glyphosate Herbicide from Soil and

Clay Minerals and Determination of Residues in Soils. *J. Agric. Food Chem.* 36, 486–491. <https://doi.org/10.1021/jf00081a020>

Monsanto, n.d. Preharvest staging guide [WWW Document]. URL

[http://www.roundup.ca/\\_uploads/documents/MON-Preharvest Staging Guide.pdf](http://www.roundup.ca/_uploads/documents/MON-Preharvest Staging Guide.pdf)

Montiel-León, J.M., Munoz, G., Vo Duy, S., Do, D.T., Vaudreuil, M.A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., Sauvé, S., 2019. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ. Pollut.* 29–39.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>

Moore, L.R., Ostrowski, M., Scanlan, D.J., Feren, K., Sweetsir, T., 2005. Ecotypic variation in phosphorus-acquisition mechanisms within marine picocyanobacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 39, 257–269. <https://doi.org/10.3354/ame039257>

Muda, M., Rao, N.N., Torriani, A., 1992. Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. *J. Bacteriol.* 174, 8057–8064.

<https://doi.org/10.1128/jb.174.24.8057-8064.1992>

Nagata, T., Takai, K., Kawanobe, K., Kim, D.S., Nakazato, R., Guselnikova, N., Bondarenko, N., Mologawaya, O., Kostrova, T., Drucker, V., Satoh, Y., Watanabe, Y., 1994. Autotrophic picoplankton in southern Lake Baikal: Abundance, growth and grazing mortality during summer. *J. Plankton Res.* 16, 945–959. <https://doi.org/10.1093/plankt/16.8.945>

Nagaya, M., Aiba, H., Mizuno, T., 1994. The sphR product, a two-component system response regulator protein, regulates phosphate assimilation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 by binding to two sites upstream from the phoA promoter. *J.*

Bacteriol. 176, 2210–2215. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2210-2215.1994>

Neumann, M., Schulz, R., Schäfer, K., Müller, W., Mannheller, W., Liess, M., 2002. The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Water Res.* 36, 835–842. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00310-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00310-4)

Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., 2013. Package 'vegan' 0–291.

Pac, S.N., 2015. Estimación de superficie en siembra directa Campaña 2014-2015  
Estimación de superficie en siembra directa. *Bol. Digit. Aapresid.*

Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E.E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E.A., Waterbury, J., 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* 424, 1037–1042. <https://doi.org/10.1038/nature01943>

Patricia, S., Miretzky, P.S., 2001. Procesos geoquímicos en la cuenca baja del Río Salado , Provincia de Buenos Aires.

Patuelli, R., Griffith, D. a, Tiefelsdorf, M., Nijkamp, P., 2006. The Use Of Spatial Filtering Techniques. <https://doi.org/10.2139/ssrn.893540>

Pedrós-Alió, C., 2012. The Rare Bacterial Biosphere. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 449–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100948>

Peres-Neto, P.R., Legendre, P., Stéphane, D., Borcard, D., 2006. VARIATION PARTITIONING OF SPECIES DATA MATRICES : ESTIMATION AND COMPARISON OF FRACTIONS. *Ecology* 87, 2614–2625.

[https://doi.org/doi:10.1890/0012-9658\(2006\)87](https://doi.org/doi:10.1890/0012-9658(2006)87) [2614:VPOSDM]2.0.CO;2

Pérez, A.G.L., Torremorell, a, Mugni, H., Rodríguez, P., Vera, M.S., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M., Izaguirre, I., Pizarro, H., Morris, D.P., Zagarese, H., 2010. Effects of the Herbicide Roundup on Freshwater Microbial Communities : A Mesocosm Study Published by : Ecological Society of America  
EFFECTS OF THE HERBICIDE ROUNDUP ON FRESHWATER MICROBIAL COMMUNITIES : A MESOCOSM STUDY 17, 2310–2322.

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. *Environ. Toxicol. Chem.*  
<https://doi.org/10.1002/etc.3897>

Pérez, G.L., Vera, M.S., Miranda, L.A., Conicet, U.B. a, 2011. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. *Herbic. Environ.* 343–368. [https://doi.org/ISBN: 978-953-307-476-4](https://doi.org/ISBN:978-953-307-476-4)

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. *Environ. Pollut.* 156, 61–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>

Pesce, S., Bardot, C., Lehours, A.C., Batisson, I., Bohatier, J., Fajon, C., 2008. Effects of diuron in microcosms on natural riverine bacterial community composition: New insight into phylogenetic approaches using PCR-TTGE analysis. *Aquat. Sci.* 70, 410–418. <https://doi.org/10.1007/s00027-008-8073-6>

Peterson, H.G., Boutin, C., Martin, P.A., Freemark, K.E., Ruecker, N.J., Moody, M.J.,

1994. Aquatic phytotoxicity of 23 pesticides applied at Expected Environmental Concentrations. *Environ. Prot.* 28, 275–292. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90038-8](https://doi.org/doi.org/10.1016/0166-445X(94)90038-8)
- Pick, F.R., 1991. The abundance and composition of freshwater picocyanobacteria in relation to light penetratio 36, 1457–1462.
- Pick, F.R., Berube, C., 1992. SHORT COMMUNICATION Diel cycles in the frequency of dividing cells of freshwater picocyanobacteria 14, 1193–1198.
- Pipke, R., Schulz, A., Amrhein, N., 1987. Uptake of Glyphosate by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 974–978.
- Pizarro, H., Vera, M.S., Vinocur, A., Pérez, G., Ferraro, M., Menéndez Helman, R.J., dos Santos Afonso, M., 2016. Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5143–5153. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5748-0>
- Poiger, T., Buerge, I.J., Bächli, A., Müller, M.D., Balmer, M.E., 2017. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 1588–1596. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7835-2>
- Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying aquatic microfloral. *Limnol. Oceanogr.* 943–948. <https://doi.org/https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943>
- POWELL, H.A., Kerbby, N.W.N., ROWELL, P., 1991. Natural Tolerance of Cyanobacteria to the Herbicide Glyphosate. *New Phytol.* 119, 421–426. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00042.x>

- Primost, J.E., 2013. FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Licenciatura en Química y Tecnología Ambiental “ Estudio de niveles ambientales de glifosato y AMPA en una zona modelo de intensa actividad agrícola en los alrededores de Urdirarrain , Entre Ríos .”
- Primost, J.E., Marino, D.J.G., 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. *Environ. Pollut.* 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.006>
- 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. *J. Hazard. Mater.* 248–249, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.12.033>
- Quirós, R., 2005. La ecología de las lagunas de las Pampas. *Investig. Cienc.* 1–13.
- Quirós, R., Boveri, M., Petracchi, C., Renella, A., Rosso, J., Sosnovsky, A., von Bernard, H., 2006. Los efectos de la agriculturización del humedal Pampeano sobre la eutrofización de sus lagunas. *Eutrofização na América do Sul Causas, conseqüências e Tecnol. gerenciamento e Control.* 1–16.
- Reca, L.G., 2006. Aspectos del desarrollo agropecuario argentino 1875-2005.
- Richards, R.P., Baker, D.B., 1993. Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the lake Erie Basin. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 13–26. <https://doi.org/10.1002/etc.5620120104>
- Rodhe, W., 1953. Productivity: Can plankton production proceed during winter

darkness in subarctic lakes? SIL Proceedings, 1922-2010 12, 117–122.

<https://doi.org/10.1080/03680770.1950.11895275>

Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Aparicio, V., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.* 188.

<https://doi.org/10.1007/s10661-016-5467-0>

Sancho, J. V., Hernández, F., López, F.J., Hogendoorn, E.A., Dijkman, E., Van Zoonen, P., 1996. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 737, 75–83. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00071-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00071-4)

SANTE/EU, 2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.

SANTE/11945/2015. Leg. Depos. 11945, 1–42.

Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbisho, M., Stenuite, S., Gasol, J.M., Descy, J.-P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical , oligotrophic Lake Kivu , eastern Africa 756–771. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01939.x>

Savicky, P., 2015. pspearman: Spearman's rank correlation test. R package version 0.3-0. <https://CRAN.R-project.org/package=pspearman> 20–23.

Saxton, M., Morrow, E.A., Bourbonniere, R.A., Wilhelm, S.W., 2011. Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. *J. Great Lakes Res.* 37, 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2011.07.004>

Scheffer, M., Hosper, S.H., Meijer, M.-L., Moss, B., Jeppesen, E., 1993. Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends Ecol. Evol.* 8, 275–279.

[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90254-M](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90254-M)

Schiaffino, M.R., Gasol, J.M., Izaguirre, I., Unrein, F., 2013. Picoplankton abundance and cytometric group diversity along a trophic and latitudinal lake gradient. *Aquat. Microb. Ecol.* 68, 231–250. <https://doi.org/10.3354/ame01612>

Sherr, E.B., Sherr, B.F., 2000. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek* · 22, 255–267. <https://doi.org/10.1023/A:1020591307260>

Sieburth JM, Smetacek V, L.J., 1978. Pelagic ecosystem structure : Heterotrophic compartments of the plankton and their relationships to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1256–1263.

Siehl, D.L., 1997. Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. *Rev. Toxicol.* 1, 37–67.

Silvoso, J., Izaguirre, I., Allende, L., 2011. Picoplankton structure in clear and turbid eutrophic shallow lakes: A seasonal study. *Limnologica* 41, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2010.10.001>

Simek, K., Macek, M., Pern, J., Straskrabova, V., Psenner, R., 1996. Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton ? 18, 597–613.

Singh, D., Khattar, J., Kaur, G., Singh, Y., 2016. Toxicological Impact of Herbicides on Cyanobacteria. *Annu. Res. Rev. Biol.* 9, 1–39. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/22614>

Sly, M.J.H., 2017. The Argentine portion of the soybean commodity chain. *Palgrave Commun.* 3, 1–11. <https://doi.org/10.1057/palcomms.2017.95>

- Smith, M.W., Payne, J.W., 1992. Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli* 100, 183–190.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F., Penner, D., 1975a. Absorption, Action, and Translocation of Glyphosate. *Weed Sci.* 23, 235–240.  
<https://doi.org/10.1017/s0043174500052930>
- Sprankle, P., Meggitt, W.F., Penner, D., 1975b. Rapid Inactivation of Glyphosate in the Soil. *Weed Sci.* 23, 224–228. <https://doi.org/10.1017/s0043174500052917>
- Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., de la Broise, D., 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquat. Toxicol.* 89, 232–241.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.004>
- Stanley, J., Preetha, G., 2016. Pesticide toxicity to non-target organisms: Exposure, toxicity and risk assessment methodologies, *Pesticide Toxicity to Non-target Organisms: Exposure, Toxicity and Risk Assessment Methodologies*.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-7752-0>
- Stefano, L.G. De, Gattás, F., Vinocur, A., Cristos, D., Rojas, D., Cataldo, D., Pizarro, H., 2018. Comparative impact of two glyphosate-based formulations in interaction with *Limnoperla fortunei* on freshwater phytoplankton. *Ecol. Indic.* 85, 575–584.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.11.021>
- Stockner, J.G., 1988. Phototrophic picoplankton : freshwater ecosystems An overview from marine and 33.
- Stockner, J.G., Shortreed, K.S., 1991a. Autotrophic Picoplankton : Community Composition ,.

- Stockner, J.G., Shortreed, K.S., 1991b. Autotrophic picoplankton: community composition, abundance and distribution across a gradient of oligotrophic British Columbia and Yukon Territory lakes. *Hydrobiologia* 76, 581–601.
- Struger, J., Grabuski, J., Cagampan, S., Sverko, E., McGoldrick, D., Marvin, C.H., 2017. Factors influencing the occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface waters of southern Ontario, Canada. *Chemosphere* 169, 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.036>
- Su, Z., Oلمان, V., Xu, Y., 2007. Computational prediction of Pho regulons in cyanobacteria. *BMC Genomics* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-156>
- Tasker, R., 1995. Preventive measures. *Far East. Econ. Rev.* 158, 18.
- Team, R.C., 2014. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Tieffemberg, S., 2012. Argentina. Historia del Descubrimiento y Conquista del Río de la Plata de Ruy Díaz de Guzmán, Editorial de la Facultad de Filosofía y Letras Colección Libros de Cátedra. Facultad de Filosofía y Letras.
- Tlili, A., Montuelle, B., Bérard, A., Bouchez, A., 2011. Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Sci. Total Environ.* 409, 2102–2113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.056>
- Trigo, E.J., 2011. Ten Years of Genetically Modified Crops in Argentine Agriculture. *ArgenBio* 1–52.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors.

Chemosphere 52, 1189–1197. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)

Vadstein, O., 2000. Heterotrophic, planktonic bacteria and cycling of phosphorus phosphorus requirements, competitive ability, and food web interactions, *Advances in Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4187-5>

Van Der Gucht, K., Cottenie, K., Muylaert, K., Vloemans, N., Cousin, S., Declerck, S., Jeppesen, E., Conde-Porcuna, J.M., Schwenk, K., Zwart, G., Degans, H., Vyverman, W., De Meester, L., 2007. The power of species sorting: Local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20404–20409. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707200104>

Vazquez, P., Zulaica, L., 2013. INTENSIFICACIÓN AGRÍCOLA Y PÉRDIDA DE SERVICIOS AMBIENTALES EN EL PARTIDO DE AZUL (PROVINCIA DE BUENOS AIRES) ENTRE 2002-2011 Agricultural intensification and loss of environmental services in the Azul county, Province of Buenos Aires (Argentina) between 2002 and 2011. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75, 543–556.

Vera, M.S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., De Molina, M.D.C.R., Tell, G., Pizarro, H., 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21, 1805–1816. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0915-2>

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

710–721. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0446-7>

Victoria Quiroga, M., Unrein, F., Garraza, G.G., Küppers, G., Lombardo, R., Cristina Marinone, M., Marque, S.M., Vinocur, A., Mataloni, G., Garraza, L.E.Z., Ku, G., 2013. The plankton communities from peat bog pools: Structure, temporal variation and environmental factors. *J. Plankton Res.* 35, 1234–1253.

<https://doi.org/10.1093/plankt/fbt082>

Viglizzo, E.F., Frank, F.C., 2006. Ecological interactions , feedbacks , thresholds and collapses in the Argentine Pampas in response to climate and farming during the last century 158, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2006.05.022>

Viglizzo, E.F., Roberto, Z.E., Lértora, F., López Gay, E., Bernardos, J., 1997. Climate and land-use change in field-crop ecosystems of Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 66, 61–70. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(97\)00079-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(97)00079-0)

Volpedo, A., 2013. El Lago Chasicó : similitudes y diferencias con las lagunas pampásicas 1–18.

Vörös, L., Padisák, J., 1991. Phytoplankton biomass and chlorophyll-a in some shallow lakes in central Europe. *Hydrobiologia* 215, 111–119.

<https://doi.org/10.1007/BF00014715>

Waterbury, J.B., Valois, F.W., Franks, D., 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*, *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*

Watson, J.E.M., Jones, K.R., Fuller, R.A., Marco, M. Di, Segan, D.B., Butchart, S.H.M., Allan, J.R., McDonald-Madden, E., Venter, O., 2016. Persistent Disparities

between Recent Rates of Habitat Conversion and Protection and Implications for Future Global Conservation Targets. *Conserv. Lett.* 9, 413–421.

<https://doi.org/10.1111/conl.12295>

Weisse, T., 1988. Dynamics of autotrophic picoplankton in Lake Constance. *J.*

*Plankton Res.* 10, 1179–1188. <https://doi.org/10.1093/plankt/10.6.1179>

Weisse, T., Kenter, U., Constance, L., 1991. Ecological Characteristics of Autotrophic Picoplankton in a Prealpine Lake. *Int. Rev. der gesamten Hydrobiol. und Hydrogr.*

76, 493–504. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760403>

Wetzel, R.G., 2000. Freshwater ecology: Changes, requirements, and future demands.

*Limnology* 1, 3–9. <https://doi.org/10.1007/s102010070023>

Whitacre, D.M., 2015. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology,

Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9>

Wickham, H., 2017. The tidyverse. R Packag. ver. 1.1 1.

Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., Goedkoop, W., 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes - responses at various levels of microbial community organization. *Environ. Pollut.* 152, 576–584.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.003>

Williamson, C.E., Brentrup, J.A., Zhang, J., Renwick, W.H., Hargreaves, B.R., Knoll, L.B., Overholt, E.P., Rose, K.C., 2014. Lakes as sensors in the landscape: Optical metrics as scalable sentinel responses to climate change. *Limnol. Oceanogr.* 59,

840–850. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.3.0840>

Williamson, C.E., Saros, J.E., Vincent, W.F., Smol, J.P., 2009. Lakes and reservoirs as

sentinels, integrators, and regulators of climate change. *Limnol. Oceanogr.* 54, 2273–2282. [https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.6\\_part\\_2.2273](https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.6_part_2.2273)

Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W., Boon, N., 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458, 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature07840>

Woodruff, D.S., 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution 98.

Zagarese, H., Ferraro, M., Queimaliños, C., Dieguez, M. del C., Suarez, D., Llames, M.E., 2017. Patterns of dissolved organic matter across the Patagonian landscape: a broad-scale survey of Chilean and Argentine lakes. *Mar. Freshw. Res.* <https://doi.org/10.1071/MF17023>

Zaranyika, M.F., Nyandoro, M.G., 1993. Degradation of Glyphosate in the Aquatic Environment: An Enzymatic Kinetic Model That Takes into Account Microbial Degradation of both Free and Colloidal (or Sediment) Particle Adsorbed Glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 41, 838–842. <https://doi.org/10.1021/jf00029a030>

Zhang, Q., Zhou, H., Li, Z., Zhu, J., Zhou, C., Zhao, M., 2016. Effects of glyphosate at environmentally relevant concentrations on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Monit. Assess.* 188. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5627-2>

ESTA ES LA VERSIÓN FINAL DE LA TESIS CON LAS SUGERENCIAS DEL JURADO.  
TROY, NY, USA. 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Horacio E. Zagarese'.

Horacio E. Zagarese  
(Director)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Manuel Castro Berman'.

Manuel Castro Berman  
(Tesisista)

