

TESINA

“EFECTOS DE AGROQUÍMICOS (HERBICIDAS Y FERTILIZANTES) SOBRE BIOFILMS DE SISTEMAS LÓTICOS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE”

Estudiante: **MARÍA FLORENCIA BODEAN**

Director: **Dra. Magdalena Licursi**

Co-Director: **Dra. Luciana Regaldo**

Lugar de Trabajo: **Instituto Nacional de Limnología (INALI –
CONICET –UNL)**

Santa Fe, Octubre 2020

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Litoral y la Facultad de Humanidades y Ciencias por ser una gran casa de estudio proporcionándome mi formación con valiosos docentes.

A toda mi familia porque sin ellos no estaría acá. Cada uno me ha hecho un poco de todo lo que soy.

A Male y Lu, por ser hermosas personas que me brindaron enseñanzas, tiempo, cariño y aliento. Gracias por tanta paciencia y vocación.

A todo el Laboratorio de Plancton del INALI por recibirme, ayudarme y acompañarme de distintas maneras en cada etapa.

A Carlos, Eqqui y Romi, por la amistad, el estudio, los mates, juntadas, proyectos y todo. Gracias por los días y meses de estudio y aguante.

A todas las bellas personas que la residencia me hizo conocer y compartir la vida, todas de alguna forma me acompañaron.

A mis amigas y amigos que sostienen mi fidelidad a la Belleza y me ayudan a ser más yo misma.

A las tres amigas y compañeras de la cotidianeidad, Anto, Euge y Eli. Gracias por cada día en nuestra bella casa.

A Andrés, por la compañía cercana aún en la distancia, pero esencialmente por siempre devolverme una mirada tierna y llena de confianza en mí.

A Celeste Mora y Gisela Mayora por el asesoramiento y el análisis de los nutrientes y DBO₅ de la experiencia de laboratorio.

A Héctor Ortiz "Nino" (Coordinador Técnico CCT-CONICET Santa Fe) y su equipo por el excelente trabajo en la adecuación lumínica de la incubadora utilizada en los estudios experimentales.

A la Mag. Susana Gervasio, la Lic. Andrea Popielarz y la Dra. María Rosa Repetti por colaborar con las determinaciones de los plaguicidas y metales.

Al INALI por brindar las instalaciones y el equipamiento necesario para el trabajo de campo y experimental.

Al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) por otorgarme la beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC) durante la realización de la tesina, Resolución P N° 389/18.

A la Agencia Santafesina de Ciencia Tecnología e Innovación (ASACTel) por el financiamiento a través del proyecto ASACTel 2010-045-16 PI: Magdalena Licursi; a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT) por el financiamiento a través del proyecto PICT 2016-4098: Luciana Regaldo y a la Universidad Nacional del Litoral por el financiamiento a través del proyecto CAI+D 2016 PI 50120150100001LI: Luciana Regaldo - Ana María Gagnetten.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. CAPÍTULO 1: ESTUDIOS EN CAMPO.....	10
1. Metodología.....	10
1.1 Diseño metodológico y área de estudio.....	10
1.2 Obtención de muestras y registro de parámetros físico-químicos.....	13
1.2.1 <i>Parámetros físico-químicos</i>	13
A) <i>Determinaciones en campo</i>	13
B) <i>Nutrientes y demandas de oxígeno</i>	13
C) <i>Herbidas, arsénico y metales</i>	13
1.2.2 <i>Biofilm</i>	14
A) <i>Clorofila “a”</i>	15
B) <i>Densidad y Composición</i>	16
C) <i>Índice de diversidad y riqueza</i>	16
1.3 Análisis estadístico.....	17
2. Resultados.....	17
2.1 Parámetros físico-químicos.....	17
2.2 Biofilm.....	20
A) <i>Clorofila “a”</i>	20
B) <i>Densidad y Composición</i>	21
C) <i>Índice de diversidad y riqueza</i>	23
2.3 Relaciones entre las variables ambientales y del biofilm.....	24
3. Discusión.....	26
III. CAPÍTULO 2: ESTUDIOS EXPERIMENTALES.....	33
1. Metodología.....	33
1.1 Diseño experimental.....	33
1.2 Obtención de muestras y medición de parámetros físico-químicos, concentraciones de nutrientes, DBO ₅ , herbidas y metales.....	39
1.2.1 <i>Parámetros físico-químicos</i>	39
A) <i>Nutrientes y DBO₅</i>	39
B) <i>Herbidas y metales</i>	40
1.2.2 <i>Biofilm</i>	40
A) <i>Clorofila “a”</i>	40
B) <i>Densidad y Composición</i>	40
C) <i>Índice de diversidad y riqueza</i>	41
D) <i>Peso Seco Libre de Cenizas</i>	41

E) <i>Índice Autotrófico</i>	41
1.3 Análisis estadístico.....	41
1.3.1 <i>Correlaciones de Pearson</i>	41
1.3.2 <i>ANOVA de medidas repetidas</i>	42
2. Resultados	43
2.1 Etapa de colonización.....	43
2.2 Etapa de aclimatación.....	44
2.3 Etapa de exposición.....	46
2.3.1 <i>Parámetros físico-químicos</i>	46
A) <i>Variables físico-químicas</i>	46
B) <i>Nutrientes y DBO₅</i>	49
C) <i>Herbicidas y AMPA</i>	56
2.3.2 <i>Biofilm</i>	59
A) <i>Clorofila "a"</i>	59
B) <i>Densidad y Composición</i>	60
C) <i>Índice de diversidad y riqueza</i>	64
D) <i>Peso Seco Libre de Ceniza</i>	65
E) <i>Índice Autotrófico</i>	65
2.4 Efectos de los factores experimentales sobre el biofilm.....	66
3. Discusión	69
IV. CONCLUSIONES GENERALES	80
V. BIBLIOGRAFÍA	82

I. INTRODUCCIÓN

Según el Banco Mundial, Argentina es considerado un país “líder en producción de alimentos, con industrias de gran escala en los sectores de agricultura y ganadería vacuna”. Más específicamente, las estadísticas que comparan la actividad agrícola de las últimas 4 décadas (campana 1970-1971 comparada con campana 2012-2013) han reflejado un aumento en la producción de 185,3%, y un 416,4% en el rendimiento (Aparicio et al., 2015; Secretaría de Agroindustria, Ministerio de Producción y Trabajo, Presidencia de la Nación). Entre las razones de este crecimiento se pueden mencionar la aplicación de nuevas tecnologías, la siembra directa y las semillas genéticamente modificadas resistentes a herbicidas. Del total de hectáreas usadas para la agricultura, cerca de 31 millones (tres cuartas partes) son dedicadas a cultivos transgénicos (Aparicio et al., 2013; 2015). Esto conlleva a un aumento del uso de plaguicidas y fertilizantes en los últimos años, muchas veces de manera desmedida y sin tener en cuenta las precauciones necesarias en su utilización.

De la amplia gama de herbicidas sintetizados y comercializados en el mundo, dos son las moléculas más ampliamente utilizadas en los sistemas agrícolas argentinos: glifosato (N-(phosphonomethyl) glycina) y atrazina (2-cloro-4-(etilamina)-6-(isopropilamina)-1,3,5-triazina) (Pórfido, 2014; Zirena Vilca et al., 2018; Arancibia et al., 2019).

El glifosato es utilizado mayormente en sistemas de producción de soja debido a su venta como paquete tecnológico junto con la soja transgénica (Roundup Ready® - RR). Argentina es el tercer país del mundo en producción de soja resistente al glifosato según estadísticas del 2017 (Pérez et al., 2007; Aparicio et al., 2013; FAOSTAT, 2019). A pesar de presentar bajo potencial de movilidad en el suelo, el glifosato y su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA) han sido detectados en aguas superficiales, sedimentos y partículas suspendidas (Ronco et al., 2016; Regaldo et al., 2018; Primost et al., 2017; Alonso et al., 2018; Arancibia et al., 2019).

Por su parte, la atrazina es un herbicida selectivo con alta solubilidad en el agua, baja adsorción en el suelo y elevada persistencia, razón por la cual presenta un alto potencial de ser transportado por escorrentía (Hansen et al., 2013; Portocarrero et al., 2016). Es utilizada en una amplia variedad de cultivos, como caña de azúcar, maíz y sorgo.

Santa Fe es una provincia de gran actividad agrícola, representando el 21% del área total sembrada del país. La zona que presenta mejores rendimientos para uso agrícola es el sur de la provincia debido a sus condiciones favorables, dadas principalmente por la presencia de suelos de alta capacidad productiva (clases A, B1 y

B2), excelentes acuíferos subterráneos (Pampeano y Puelche, principalmente) y aguas superficiales del Río Paraná (Castignani, 2011) (Figura 1).

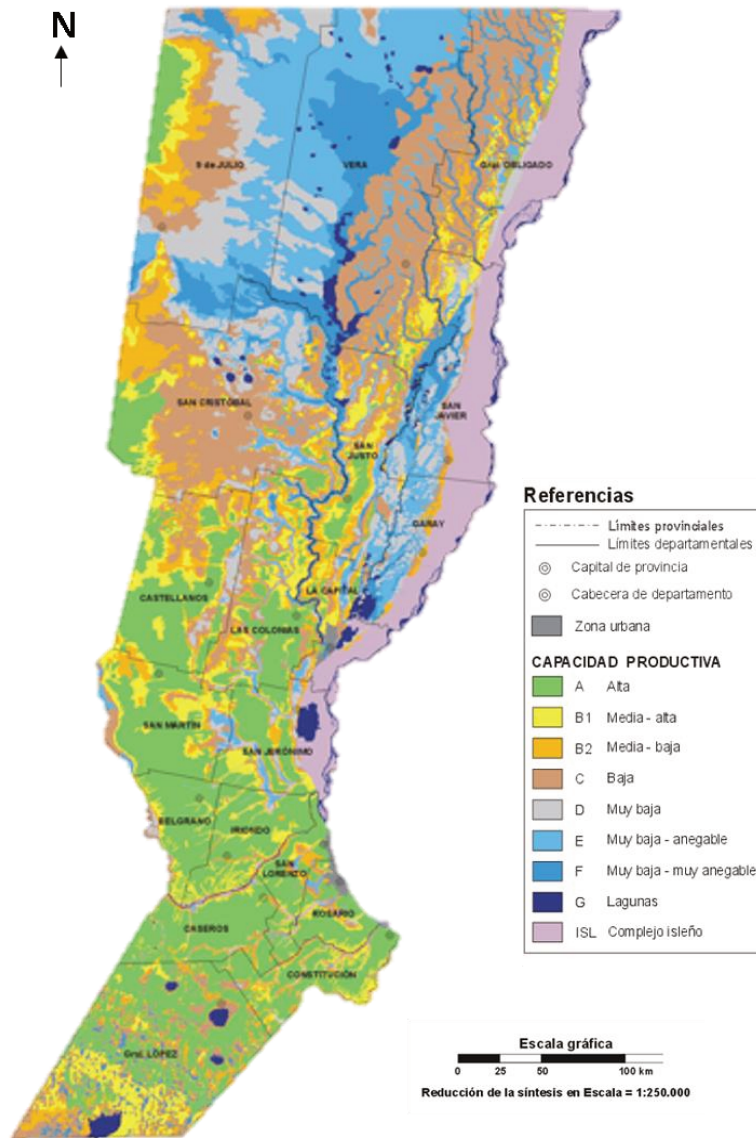


Figura 1. Mapa de la provincia de Santa Fe que representa la capacidad productiva de las tierras para uso agrícola (Fuente: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA Rafaela, Recuperado de: http://rafaela.inta.gov.ar/mapas/capacidad_productiva/_provincia_santa_fe.htm).

Los sistemas lóticos de esta región permiten un desarrollo importante de las comunidades autotróficas. Las características particulares de estos sistemas (someros y ricos en nutrientes) favorecen el desarrollo del biofilm. Esta comunidad alcanza un mayor desarrollo en arroyos de bajo orden siendo la principal responsable del procesamiento de la materia orgánica y alcanzando biomásas que pueden ser más significativas que la biomasa planctónica (Pusch et al., 1998).

El *Biofilm* es una comunidad que se compone de una matriz de mucopolisacáridos que contiene bacterias, algas, hongos, protozoos y pequeños invertebrados. En general, esta matriz puede alcanzar un grosor de entre 100 micras y

unos pocos milímetros (Figura 2). Por su actividad, el biofilm constituye un auténtico microsistema en el cual las algas absorben nutrientes inorgánicos y emplean la energía solar, mientras que los heterótrofos aprovechan la materia orgánica disuelta, así como los excedentes sintetizados por los productores primarios vecinos (Licursi, 2005). Numerosos autores han destacado el rol de esta comunidad relacionado a la absorción y retención de materia orgánica particulada y disuelta (Lock, 1981; Battin et al., 2003), concentración de nutrientes e intercambio de iones (Hamilton, 1987; Freeman & Lock, 1995), protección física contra la erosión (Lock, 1993), estabilización del sedimento (Yallop et al., 2000), adsorción de químicos y contaminantes como metales (Shorer & Eisele, 1997) y fuente de alimento para una gran cantidad de organismos (Stevenson, 1996).

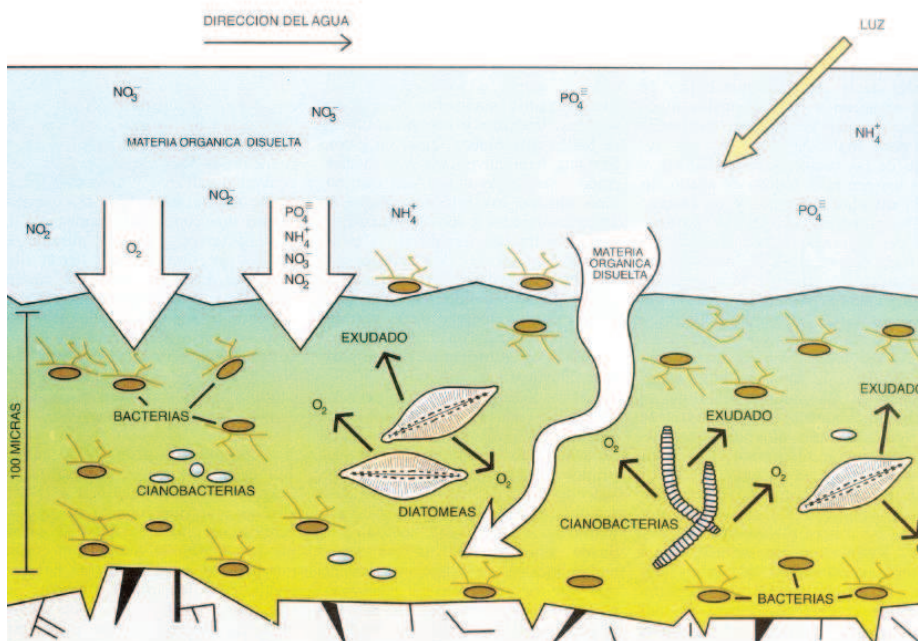


Figura 2. Esquema representativo de la estructura del biofilm (Extraído de Sabater et al., 1993).

Por sus propiedades y su inmediata interacción con los componentes disueltos, el biofilm es utilizado como bioindicador en ríos y arroyos, respondiendo tempranamente a perturbaciones como incremento de nutrientes, materia orgánica y tóxicos. A su vez, integra los efectos de las condiciones ambientales durante largos períodos de tiempo, principalmente debido a su pequeño tamaño y rápido crecimiento, la riqueza de especies y la variación fisiológica de los organismos que lo componen. Por estas razones el biofilm es frecuentemente utilizado como una herramienta de monitoreo rutinario y “sistema de alarma temprana” (Sabater et al., 2007).

En los sistemas lóticos del sur de la provincia de Santa Fe, el biofilm representa una comunidad de gran relevancia con un aporte significativo en la producción primaria, constituyendo el soporte energético de las redes tróficas. Su importancia como recurso

alimenticio está relacionado con el predominio de algas que son fácilmente asimilables por consumidores primarios y que constituyen un alimento de mejor calidad que los detritos al presentar una menor relación carbono-nitrógeno (C:N) (Bojorge-García & Cantoral Uriza, 2016).

En este contexto, los sistemas lóticos que rodean los campos de siembra son frecuentemente afectados ya que reciben por escorrentía, deriva de pulverización o rociado directo, distintos agroquímicos como fertilizantes, insecticidas, herbicidas y sus metabolitos (Etchegoyen et al., 2017; Gagneten et al., 2020). Entre los efectos que habitualmente se evidencian se pueden mencionar aumentos de nutrientes, sedimentos y herbicidas, principalmente luego de un período de aplicación y posteriores lluvias fuertes y torrenciales, afectando a las comunidades acuáticas, organismos no blanco de estos agroquímicos (Magbanua, 2012; Iturburu et al., 2019; Frau et al., 2020).

Existen diversos antecedentes que documentan los efectos de los herbicidas sobre organismos acuáticos no blanco como anfibios (Lajmanovich et al., 2011; Lajmanovich et al., 2019), microalgas de río (Dorigo et al., 2004), microalgas de estuario (DeLorenzo et al., 2004), microalgas y animales (Relyea, 2005), comunidad microbiana (Pérez et al., 2007; Vera et al., 2012), comunidad planctónica (Reno et al., 2014), algas del fitoplancton y/o perifiton (Kish, 2006; Qian et al., 2008; Debenest et al., 2009; Larras et al., 2013; Esperanza et al., 2016; Reno et al., 2016; Lozano et al., 2018), microalgas y microcrustáceos (Reno et al., 2015; Reno, 2017) y diversos organismos acuáticos (Zirena Vilca et al., 2018).

En la provincia de Santa Fe son aún incipientes los estudios sobre organismos no blanco, particularmente sobre las comunidades algales. En este contexto, cobra relevancia el estudio de la comunidad del biofilm y su potencial como bioindicador del impacto de agroquímicos en los sistemas lóticos de la región.

Hipótesis:

La presencia de agroquímicos (herbicidas y fertilizantes) en los sistemas acuáticos, relacionada a la actividad agrícola, afectan negativamente al biofilm desarrollado sobre el lecho de estos cuerpos de agua. Estos efectos se ven reflejados en cambios a nivel comunitario (empobrecimiento de la diversidad, cambios en la proporción de grupos predominantes, cambios en la biomasa y productividad del biofilm) conduciendo a la simplificación de la estructura de la comunidad.

La adición individual o simultánea de herbicidas y nutrientes produce respuestas diferenciales en el biofilm.

Objetivo general:

El objetivo de esta tesina fue evaluar el impacto de agroquímicos (fertilizantes y herbicidas) que alcanzan los cuerpos de agua de zonas de actividad agrícola, utilizando el biofilm epipélico como bioindicador.

Objetivos específicos:

1) Identificar los principales factores de estrés sobre el biofilm epipélico de sistemas lóticos de la provincia de Santa Fe sometidos a la actividad agrícola (Capítulo 1).

2) Evaluar experimentalmente las relaciones causa-efecto de la adición individual y simultánea de glifosato y atrazina (herbicidas ampliamente utilizados en la región) y nutrientes sobre la comunidad del biofilm (Capítulo 2).

Cabe destacar que, si bien el objetivo general de este trabajo se enfocó en evaluar el impacto de los agroquímicos sobre el biofilm de sistemas lóticos de la provincia de Santa Fe, en el capítulo 1 se incluye un análisis de las concentraciones de metales y arsénico registradas en estos sistemas. Fundamenta dicha inclusión, la necesidad de ampliar la información sobre la presencia de otros tóxicos de origen natural (arsénico) y antrópico (metales) que posiblemente impactan en las distintas comunidades acuáticas.

II. CAPÍTULO 1: ESTUDIOS EN CAMPO

1. Metodología

1.1 Diseño metodológico y área de estudio

Se analizaron muestras de biofilm epipélico (sobre sedimento) colectadas en 7 sistemas lóticos (S1 – S7) localizados en el centro sur de la provincia de Santa Fe, entre las localidades de Santa Fe y Rosario (Figura 3 y 4, Tabla 1), sometidos a actividad agrícola intensiva.

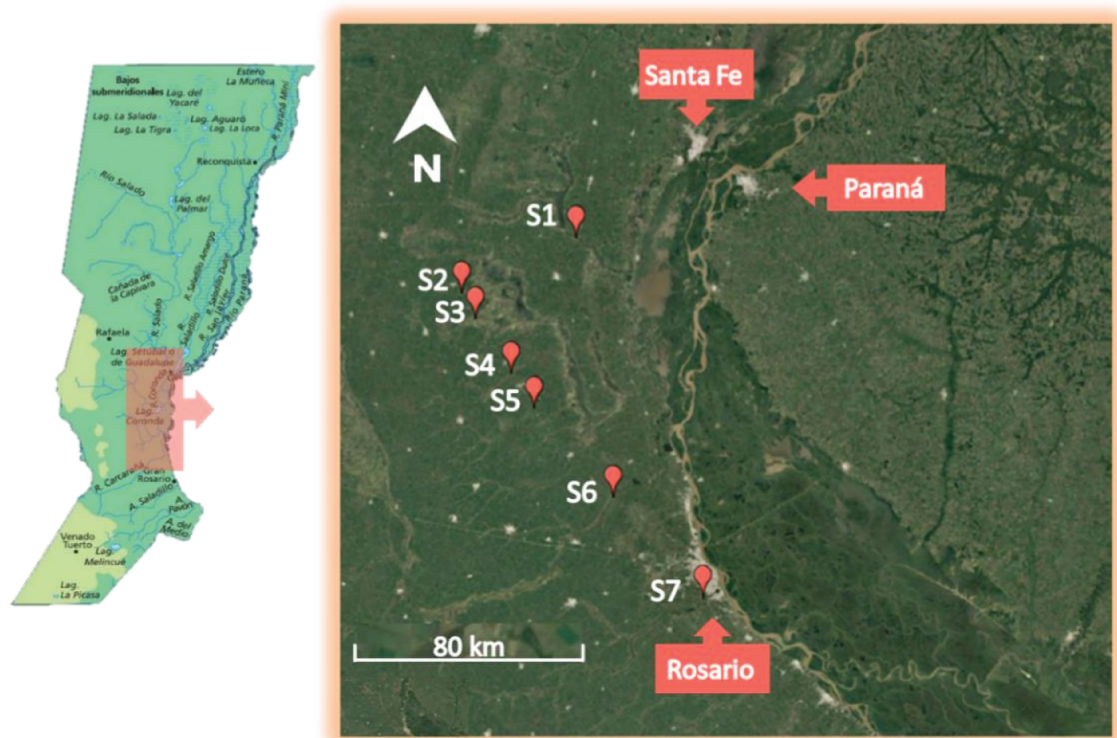


Figura 3. Ubicación de los sitios de muestreo (S1-S7) seleccionados en los estudios realizados a campo.

Se realizaron dos muestreos en cada sistema acuático, uno en el mes de noviembre de 2016 (período de alta aplicación de herbicidas y fertilizantes) y otro en el mes de abril de 2017 (período de baja aplicación) en el marco del Proyecto ASACTEI 2010-045-16. Los períodos de alta y baja aplicación se determinaron teniendo en cuenta las fases de pre-siembra, post-siembra y cosecha, utilizando información del calendario agrícola de la provincia de Santa Fe (INTA) y otorgada por ingenieros agrónomos que realizan actividades en la zona de estudio. Los campos que rodean los sitios seleccionados para el muestreo presentan diversos cultivos, entre ellos podemos nombrar soja, como el principal, seguido por trigo, cebada, sorgo, girasol, maíz, entre otros. La planificación de cada año estima que entre los meses de junio y julio se realiza la siembra de los cultivos invernales (entre ellos trigo y cebada) con aplicaciones pre-siembra de glifosato, 2-4 D, entre otros, y refertilización nitrogenada post-siembra con urea (dosis aproximada: 140-190 kg/ha). En estos meses también se realizan los

trabajos de barbechos químicos para preparar los lotes a emplear en los cultivos estivales donde están previstas las aplicaciones de glifosato, coadyuvantes, cipermetrina, atrazina, entre otros. Luego, en los meses de noviembre y diciembre se realiza la cosecha de los cultivos invernales y se procede a sembrar la soja de primera (en los lotes libres barbechados en invierno) y de segunda (sobre el rastrojo del trigo o la cebada). Entre la siembra y cosecha de la soja se llevan a cabo dos aplicaciones planificadas de glifosato junto con coadyuvantes, la primera a fines de noviembre o fines de diciembre con la soja ya emergida (dosis aproximada: 2,5 l/ha de glifosato y 100 cm³/ha de coadyuvantes), y la segunda, a fines de enero, principio de febrero (dosis aproximada: 2 l/ha de glifosato y 150 cm³/ha de coadyuvantes). También, en este período entre la siembra y la cosecha se pueden llevar a cabo ocasionales aplicaciones de fertilizantes foliares. Estos cultivos de soja se cosechan en los meses de marzo, abril y mayo. Según la información obtenida en dichos meses de cosecha no suelen realizarse aplicaciones de glifosato y atrazina. Esta información nos permite definir los meses de noviembre-diciembre como período de alta aplicación de dichos agroquímicos (herbicidas y fertilizantes), esperando registrarse concentraciones mayores al período contrastante, marzo-abril-mayo, período de baja aplicación.

En dichas oportunidades, se midieron parámetros físico-químicos *in situ* y se colectaron muestras por triplicado de biofilm epipélico, de agua para la determinación de nutrientes, demanda biológica de oxígeno (DBO₅) y demanda química de oxígeno (DQO) y de muestras de agua y sedimento para la determinación de arsénico (As), metales, herbicidas y sus metabolitos de degradación.

Tabla 1. Sitios de muestreos (S1–S7) con sus coordenadas y referencias correspondientes.

Sitio	Coordenadas	Referencia en Google Earth
S1	31°54'36.9"S 61°08'48.1"O	Arroyo Colastiné y RP 6
S2	32°04'52.2"S 61°34'10.6"O	RN 34 km 126, Cañada Rosquín
S3	32°09'37.8"S 61°31'10.3"O	RN 34 km 115, Las Bandurrias
S4	32°19'55.4"S 61°23'18.9"O	Río Bajo Las Turbias y RN 34
S5	32°26'27.5"S 61°18'14.4"O	Río Bajo Las Estacas y RN 34
S6	32°43'05.5"S 61°00'46.5"O	Río Carcarañá y RN 34
S7	33°01'47.3"S 60°40'51.6"O	Río Saladillo y RN 18

Sitios de muestreo



Sitio 1 - A. Colastiné



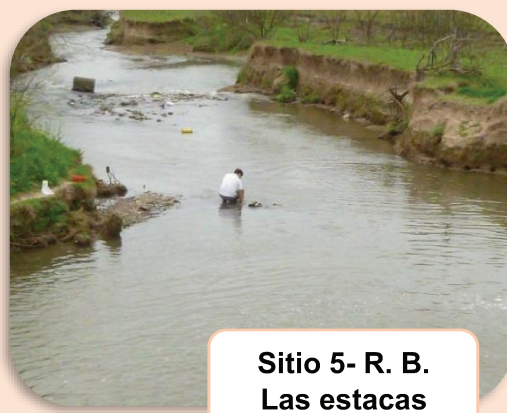
**Sitio 3 - Las
Bandurrias**



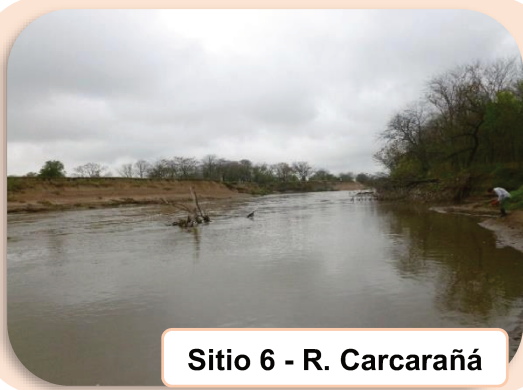
**Sitio 2 - Cañada
Rosquín**



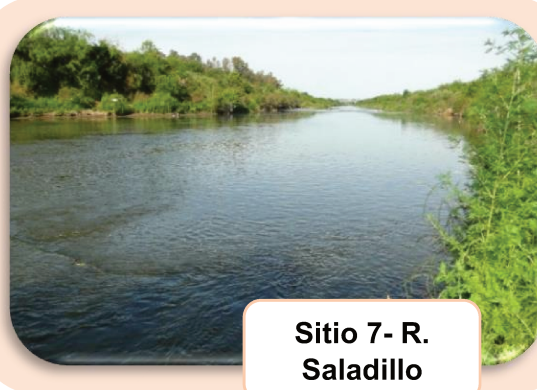
**Sitio 4 - R. B.
Las Turbias**



**Sitio 5- R. B.
Las estacas**



Sitio 6 - R. Carcarañá



**Sitio 7- R.
Saladillo**

Figura 4. Imágenes relevadas de cada sitio de muestreo (S1–S7). Provincia de Santa Fe, Argentina.

1.2 Obtención de muestras y registro de parámetros físico-químicos

1.2.1 *Parámetros físico-químicos*

A) *Determinaciones en campo*

Para la medición de parámetros físico-químicos *in situ* se empleó una sonda multiparamétrica HACH, modelo HQ40D. Se midió la temperatura del agua (°C), el pH, la conductividad (mS/cm) y el oxígeno disuelto (%). También se determinó la transparencia con el disco de Secchi (cm). Finalmente, se midió la velocidad de la corriente (cm/s) mediante un correntómetro en tres puntos de distintas profundidades. Con la medida de la anchura húmeda del cauce y la velocidad de la corriente se calculó el caudal de cada arroyo (m³/s).

B) *Nutrientes y demandas de oxígeno*

Se tomaron muestras de agua para la estimación de la concentración de fósforo reactivo soluble (PRS), nitritos-nitratos (N-NO₂⁻+ N-NO₃⁻) y amonio (N-NH₄⁺); las formas de nitrógeno inorgánico disuelto fueron sumadas y expresadas como NID. Se colectaron también muestras de agua para la estimación de la DBO₅ y DQO.

Las determinaciones de estos parámetros fueron realizadas por personal del Instituto Nacional de Limnología 'INALI' en el laboratorio de química de dicha institución.

Para la determinación de nutrientes se emplearon los siguientes métodos: el PRS se analizó siguiendo el método del ácido ascórbico (Murphy & Riley, 1962), nitrito + nitrato (NO₂⁻+ NO₃⁻) mediante la reducción de N- NO₃⁻ con sulfato de hidrazina y la posterior determinación colorimétrica de N-NO₂⁻ (Hilton & Rigg, 1983), y amonio (N-NH₄⁺) por el método del azul de indofenol (Koroleff, 1970).

La medición de la DBO₅ se realizó utilizando una sonda HACH, modelo LBOD 10101, midiendo el consumo de oxígeno durante la incubación (5 días a 20 °C) calculando la diferencia entre los valores iniciales y finales, diluyendo la muestra cuando fuera necesario. Para la DQO las muestras fueron digeridas por dos horas a 150 °C con dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) en medio ácido. La determinación colorimétrica fue llevada a cabo a 420 nm.

C) *Herbicidas, arsénico y metales*

Se tomaron muestras de agua y sedimento para la realización de screening de plaguicidas (en recipientes de vidrio color ámbar), determinación de glifosato y AMPA (en recipientes de plástico opacos), determinación de As y metales: cobre (Cu), plomo (Pb) y cromo (Cr) (en recipientes plásticos).

El screening de plaguicidas en agua se realizó mediante SPE C18, Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masa y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa en tándem (LC-MS/MS + GC-MS/MS). Por su parte el screening en sedimento se llevó a cabo por medio de Extracción en Fase Sólida QuEChERS y, también, LC-MS/MS + GC-MS/MS. Ambos screenings se realizaron en el laboratorio del PRINARC (Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral).

Las determinaciones analíticas del glifosato y su producto de degradación (AMPA) fueron realizadas en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC I CONICET-UNL, Santa Fe), mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), empleando un cromatógrafo Dionex (DX-100 ion). El límite de cuantificación y detección del equipo utilizado fue de 12 µg/l y 4 µg/l, respectivamente para el glifosato y de 6 µg/l y 2 µg/l para el AMPA.

Las muestras para la estimación de la concentración de metales en agua (sin filtrar) y sedimentos, fueron digeridas en el INTEC I (CONICET-UNL) y analizadas por espectrofotometría de absorción atómica de acuerdo con las indicaciones de EPA (1994), usando técnicas estandarizadas para la calibración (Equipo Perkin Elmer, modelo PE 8000, equipado con horno de grafito).

1.2.2 Biofilm

Para la colecta de muestras de biofilm se seleccionaron zonas poco profundas (aprox. 20 cm) del margen de los sistemas acuáticos, en las que no se evidenciaron disturbios recientes y que presentaran condiciones de penetración de la luz hasta el fondo. Las muestras se colectaron empleando un aspirador con una superficie muestral de aproximadamente 1 cm² (Figura 5), extrayendo los primeros 5-10 mm de la capa superficial del sedimento fino, considerada como la porción fotosintéticamente activa (3 réplicas por sitio). Cada réplica estuvo integrada por 5 unidades muestrales de 1 cm² de superficie del sedimento del sitio.



Figura 5. Detalle del aspirador utilizado para coleccionar biofilm desarrollado sobre sedimentos finos.

Las muestras destinadas al análisis de la composición de biofilm fueron fijadas con fórmol al 4%. El resto de las muestras fueron conservadas en frío hasta su procesamiento en laboratorio.

A) Clorofila "a"

Para la determinación de clorofila "a" en las muestras de biofilm se siguió la metodología de APHA (2017). Ésta consistió en sonicar las muestras en un lavador ultrasónico (Testlab TB02TACA) durante 2 minutos para facilitar el desprendimiento de los especímenes adheridos a los mismos, repitiendo este procedimiento tres veces. El sobrenadante fue filtrado con un filtro Whatman GF/F (Gómez et al., 2009)

Los filtros fueron almacenados en sobres de papel aluminio en freezer hasta su posterior procesamiento. La extracción de la clorofila se realizó utilizando acetona (90%) a través de maceración leve y posterior almacenamiento en oscuridad a 4 °C durante un máximo de 24h. Posteriormente, los extractos fueron clarificados y medidos con un espectrofotómetro en 664 nm y 750 nm y a 665 nm y 750 nm después de la acidificación con HCl 0.1N (APHA, 2017).

Para el cálculo de la clorofila "a" (expresada en mg/m²) se utilizó la siguiente ecuación (Gómez et al., 2009):

$$Chl a \left(\frac{mg}{m^2} \right) = \frac{11,4 (DO_{664} AA - DO_{750} AA) \times V}{L \times S}$$

donde

DO: la densidad óptica obtenida para la longitud de onda señalada,

AA: antes de acidificar,

- V:** volumen del extracto (ml),
- L:** longitud de la cubeta del espectrofotómetro (m), y
- S:** superficie de sustrato muestreado (m²).

B) Densidad y Composición

Para el recuento de grandes grupos del biofilm, se utilizó una cámara de Sedgwick-Rafter y se realizó la observación a 400X en un microscopio invertido Nikon (Eclipse TS100). Para realizar el recuento las muestras fueron diluidas teniendo en cuenta la concentración de organismos y sedimentos presentes en cada una.

Las abundancias absolutas obtenidas de los recuentos de la composición del biofilm fueron volcadas en planillas de Excel. A partir de la abundancia absoluta de cada organismo se estimó su densidad por cm² de sustrato muestreado, aplicando la siguiente fórmula:

$$Densidad\ organismo\ x\ (cm^2) = \frac{N_{orgx} \times FD \times V_t}{V_c \times Sup.}$$

donde

- N_{orgx}:** número contado del organismo x,
- FD:** factor de dilución de la muestra utilizado,
- V_t:** volumen total de la muestra (ml),
- V_c:** volumen de la cámara contado (ml), y
- Sup.:** área de sustrato muestreado (cm²).

Para la identificación taxonómica de los organismos se utilizó la siguiente bibliografía: Bourrelly (1966, 1968); Pestalozzi (1983); Streble & Krauter (1987); Cox (1996); Komárek & Anagnostidis (1999, 2005); Biggs (2000); Komárek (2013).

C) Índice de diversidad y riqueza

Con los datos obtenidos de la composición del biofilm se calcularon los valores de riqueza específica y el índice de diversidad de Shannon- Wiener (H'). La riqueza específica es el número de especies observado en cada muestra. El índice de diversidad de Shannon (Shannon & Weaver, 1949) expresa la riqueza de especies y cómo se distribuyen las abundancias entre las especies. Ambos valores se calcularon utilizando el software Past v. 3.26b. La fórmula utilizada para calcular la diversidad de Shannon es:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

donde

S: riqueza de especies,

p_i : abundancia relativa de la especie *i*.

1.3 Análisis estadístico

Los datos analizados fueron de carácter cuantitativo. Se establecieron relaciones entre las variables de ambos muestreos utilizando correlaciones múltiples. Para ello se realizó una matriz de correlación utilizando el coeficiente de Pearson. En dicha matriz se obtiene el Coeficiente de Correlación (*r*) entre una variable X y una variable Y (correlación lineal). El valor de *r* varía desde -1 a 1, éste nos indica la intensidad y dirección de la relación. Cuanto más cercano a 1 o -1, más fuerte es la relación, pudiendo ser directa (+) o inversa (-). Para aplicar estos análisis, primero se comprobó si la distribución de los datos era normal mediante el test de Shapiro-Wilk y se aplicó la transformación $\log(x+1)$ en los casos que no cumplían este requisito.

Luego se aplicó el test de correlación de Pearson para conocer si las relaciones eran estadísticamente significativas. Hipótesis nula (H0): el coeficiente de correlación poblacional (ρ) es igual a cero (lo que implica que NO hay correlación significativa). Mediante el valor de *p* evaluamos si se rechaza o no H0. Los diferentes análisis se llevaron a cabo en el software IBM® SPSS® Statistics v. 25.

2. Resultados

2.1 Parámetros físico-químicos

En las tablas 2 y 3 se presentan las variables físico-químicas y las concentraciones de plaguicidas, metales y As registradas en los dos muestreos. En el muestreo realizado en noviembre de 2016 (muestreo 1) se observaron las mayores temperaturas, los mayores valores de conductividad, de oxígeno disuelto, de pH, así como las mayores concentraciones de amonio, atrazina, As, Pb y Cu en agua y en sedimento. En tanto que durante el muestreo realizado en abril de 2017 (muestreo 2) se registraron los mayores valores de DBO₅, DQO y PRS y las mayores concentraciones de Cr en agua.

Cabe destacar que las condiciones climáticas para ambos muestreos fueron de distinta índole. La zona de muestreo presentó en el mes de noviembre de 2016 (muestreo 1) un nivel de precipitaciones acumuladas de 19 mm, mientras que el mes de abril de 2017 (muestreo 2) de 58,87 mm (INTA).

Tabla 2. Parámetros físico-químicos.

	M1							M2						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Temp.	21,6	26,5	27,9	28,3**	27,5	27,1	27	17,9	17,9	18,9	20,2	19,3	19	12,8*
Cond.	3,7	2,9	9,3**	2,8	3,1	2,4	4,2	1,9	1*	3,4	2,5	1,7	3,3	1,5
OD	48,6*	174	223	261,5**	132	116,1	171,9	82,4	117,7	107,4	109,3	101,9	108,6	89,2
DBO₅	3,7*	8	5,4	10,6	6,4	6,4	7,1	16	4	10	4	5	10	17**
DQO	32	13	40	9*	11	51**	18	41	27	29	16	34	25	40
pH	7,7	8	8,5	8,6	8,3	8,5	8,7**	6,5*	6,5*	6,9	6,8	6,8	6,7	8,3
Secchi	11*	54	49	61**	37	14	25	20	36	20	33,66	20	11,33	20
Caudal	9,1	0,3*	0,6	0,8	1,1	2,4	5,9	12,5**	1,0	0,9	2,3	6,4	0,9	SD
Velocidad	42,4	14,1*	21,0	31,5	32,8	96,1**	42,2	35,7	31,4	21,2	47,4	69,4	53,7	35
PRS	697**	46,2	148,4	10,1*	176,6	291,8	254,4	313	211,4	150,8	228,1	292,4	261,2	437,4
NID	1040,1	298,9	860,8	36,3*	2320,6**	597,2	1774,5	333,1	850,3	1081,9	385,2	708,5	538,9	1163,6
Nitrato	887,9	258,5	810,5	12*	2151,1**	521,6	1734	333,1	401,4	895	373,7	679,2	512,5	1130
Amonio	152,1	40,3	50,3	24,3	169,5	75,6	40,6	0*	448,9**	186,9	11,5	29,3	26,4	33,6

M1: muestreo 1 (noviembre 2016), M2: muestreo 2 (abril 2017). S1– S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7. Temp. (°C): temperatura, Cond. (mS/cm): conductividad, OD (%): oxígeno disuelto, DBO₅ (mg/l): prueba de demanda bioquímica de oxígeno de 5 días, DQO (mg/l): demanda química de oxígeno, Secchi (cm), Caudal (m³/s), Velocidad (cm/s), PRS (µg/l): fósforo reactivo soluble, NID (µg/l): nitrógeno inorgánico disuelto, Nitrato (expresado como N-NO₃ µg/l), Amonio (expresado como N-NH₄⁺ µg/l). *Valores mínimos y **máximos.

Tabla 3. Concentraciones de plaguicidas, metales y As.

	M1							M2						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
AMPA-Agua	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	1,53	1,68	1,87	1,46	1,21*	1,64	2,71**
AMPA-Sed.	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	6,08	4,97	6,28	1,99*	5,75	2,18	5,19
Glifosato-Agua	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glifosato-Sed.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Atrazina-Agua	44**	3	4	3	18	12	1*	1*	1*	1*	1*	1*	2	1*
Cyproconazole-Agua	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1**	<0,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr-Agua	1,5	5,8**	0,3	0,0*	0,9	0,1	0,4	2,6	0,6	3,2	1,3	2,6	5,6	3,6
Cr-Sed.	33,3	29,8	37,7	29,6	27,1	24,3	20,9	15,0	124,5**	121,2	15,9	20,7	19,1	14,0*
As-Agua	9,9	8,6	11,2	10,7	11,8	48,2**	25,8	4,1	5,0	4,9	5,8	4,0*	18,2	11,5
As-Sed.	7,6	17,0**	14,6	11,9	11,5	11,8	11,3	3,4	3,3	4,7	4,7	4,2	3,0*	4,3
Cu-Agua	3,8**	0,8	1,0	1,4	1,3	0,7	1,1	1,1	0,4	1,1	0,2*	0,3	0,7	0,8
Cu-Sed.	3,1	4,5**	3,9	3,1	3,7	2,2	3,2	1,3	1,6	2,4	1,6	1,5	0,5*	1,6
Pb-Agua	20,1**	2,2	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	1,2	0,1	0,8	0,0*	0,0*	1,1	1,2
Pb-Sed.	21,3	100,5**	24,9	18,3	47,2	7,3	24,8	11,5	12,5	11,9	12,4	13,6	2,4*	12,4

M1: muestreo 1 (noviembre 2016), M2: muestreo 2 (abril 2017). S1– S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7. AMPA- Agua ($\mu\text{g/l}$): AMPA en agua, AMPA-Sed. ($\mu\text{g/kg}$): AMPA en sedimento, Atrazina ($\mu\text{g/l}$), Cyproconazole-Agua ($\mu\text{g/l}$): Cyproconazole en agua, Cr-Agua ($\mu\text{g/l}$): cromo en agua, Cr- Sed. ($\mu\text{g/g}$): cromo en sedimento, Pb-Agua ($\mu\text{g/l}$): plomo en agua, Pb-Sed. ($\mu\text{g/g}$): plomo en sedimento, Cu-Agua ($\mu\text{g/l}$): cobre en agua, Cu-Sed. ($\mu\text{g/g}$): cobre en sedimento, As-Agua ($\mu\text{g/l}$): arsénico en agua, As-Sed. ($\mu\text{g/g}$): arsénico en sedimento. SD: Sin Dato, ND: No Detectable. En **negrita** se señalan los valores que superan los niveles guías canadienses para la protección de la biota acuática (NGC). Límite de cuantificación: Atrazina 1 $\mu\text{g/l}$, Cyproconazole 0,1 $\mu\text{g/l}$, Glifosato: 12 $\mu\text{g/l}$, AMPA: 6 $\mu\text{g/l}$. Límite de detección: Atrazina 0,3 $\mu\text{g/l}$, Cyproconazole 0,03 $\mu\text{g/l}$, Glifosato 4 $\mu\text{g/l}$, AMPA 2 $\mu\text{g/l}$. *Valores mínimos y **máximos.

Las determinaciones de glifosato en ambas ocasiones y en todos los sitios resultaron por debajo del límite de detección del equipo utilizado (4 $\mu\text{g/L}$). Su metabolito (AMPA) fue cuantificado en el agua y en los sedimentos de todos los sitios estudiados durante el segundo muestreo. Los registros de atrazina en agua superaron los niveles guía canadienses (NGC) establecidos para la protección de la biota acuática (Canadian Water Quality Guidelines, 2008) en el 86% y 14% de las muestras durante el primer y segundo muestreo respectivamente. También el cyproconazole fue registrado en todos los sitios durante el primer muestreo (Tabla 3).

También las concentraciones de metales y el As registradas en ambos muestreos fueron comparadas con los NGC establecidos para la protección de la biota acuática (Canadian Water Quality Guidelines, 2008) (Tabla 4). En el primer muestreo, las concentraciones de As en agua y sedimento superaron los NGC en el 100% de las muestras, el 29% para el Pb en agua y sedimento, y el 14% para Cu en agua y Cr en agua y en sedimento. En ninguno de los sitios el Cu en sedimento superó el NGC. En el caso del segundo muestreo, en el 71% de las muestras las concentraciones de Cu en agua superaron los NGC, seguido por el 43% para As en agua y por el 29% para Cu en sedimento. Cabe resaltar que S1 y S2 fueron los que presentaron mayores concentraciones de metales en ambas matrices.

Tabla 4. Niveles guías canadienses propuestos para la protección de la biota acuática.

NGC		
PLAGUICIDAS	Agua (µg/l)	Sedimento (µg/g)
Glifosato	65	--
Atrazina	2	--
Cyproconazole	--	--
METALES y As	Agua (µg/l)	Sedimento (µg/g)
Cr	2	37,3
Cu	2	35,7
Pb	2	35
As	5	5,9

NGC: niveles guías canadienses propuestos para la protección de la biota acuática. Valores expresados para sedimentos y muestras de agua superficial sin filtrar para glifosato, atrazina, cyproconazole, metales y As según Canadian Water Quality Guidelines (1997, 2008).

2.2 Biofilm

A) Clorofila "a"

Las mayores concentraciones de clorofila "a" del biofilm fueron registradas en todos los sitios durante el primer muestreo (mín.: 12,5; máx.: 114,6 mg/m²), presentando en el segundo muestreo valores de un orden de magnitud inferior (mín.:1,1; máx.:11,5 mg/m²). Además, se observaron los mayores valores para ambos muestreos en los sitios S3 y S7 (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de clorofila "a" del biofilm epipélico.

Sitios	Clorofila "a" (mg/m ²)	
	M1	M2
S1	32,2	1,9
S2	25,9	3,4
S3	73,9	11,5
S4	31,1	3,5
S5	34,4	1,6
S6	12,5	1,1*
S7	114,6**	6,4

M1: muestreo 1 (noviembre 2016), M2: muestreo 2 (abril 2017). S1 – S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7. *Valores mínimos y **máximos.

B) Densidad y Composición

Coincidentemente con los valores registrados de clorofila, el análisis microscópico permitió advertir que en el primer muestreo hubo un mayor desarrollo del biofilm epipélico reflejado por mayores valores de densidad de organismos (min.: $3,10E^{+04}$; máx.: $3,40E^{+07}$ ind./cm²), presentando densidades de un orden de magnitud inferior en el segundo muestreo (min.: $3,50E^{+04}$; máx.: $2,90E^{+06}$ ind./cm²). Cabe destacar que en ambas oportunidades las mayores densidades se registraron en los sitios S3, S7 y S2, mientras que las mínimas fueron observadas en los sitios S5 y S6 (Figura 6).

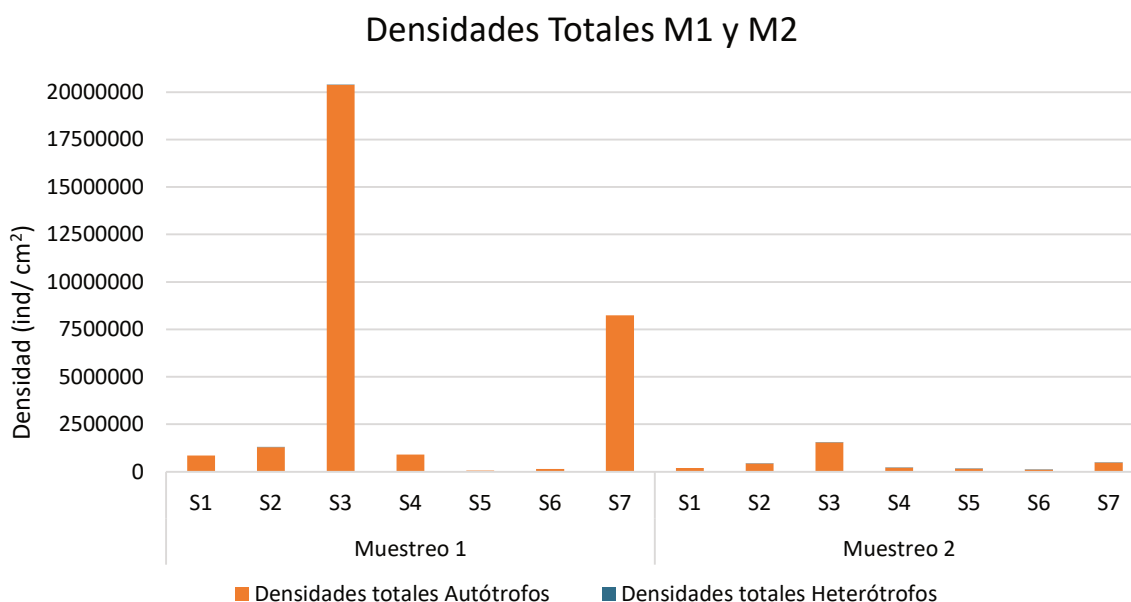


Figura 6. Densidades totales de Biofilm (ind./cm²) (incluyendo organismos autótrofos y heterótrofos) registradas en el muestreo 1 'M1' (noviembre 2016) y muestreo 2 'M2' (abril 2017). S1 – S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7.

El biofilm epipélico de todos los sitios estuvo dominado por Bacillariophyceae, representando más del 90% del ensamble en ambos muestreos. El grupo Chlorophyceae estuvo mayormente representado en los sitios S6 y S7 (muestreo 1) y

S1 y S5 (muestreo 2) pero en ningún caso superó el 5-10%. El resto de los grupos estuvieron escasamente representados, sin superar el 2,5% (Figuras 7 y 8).

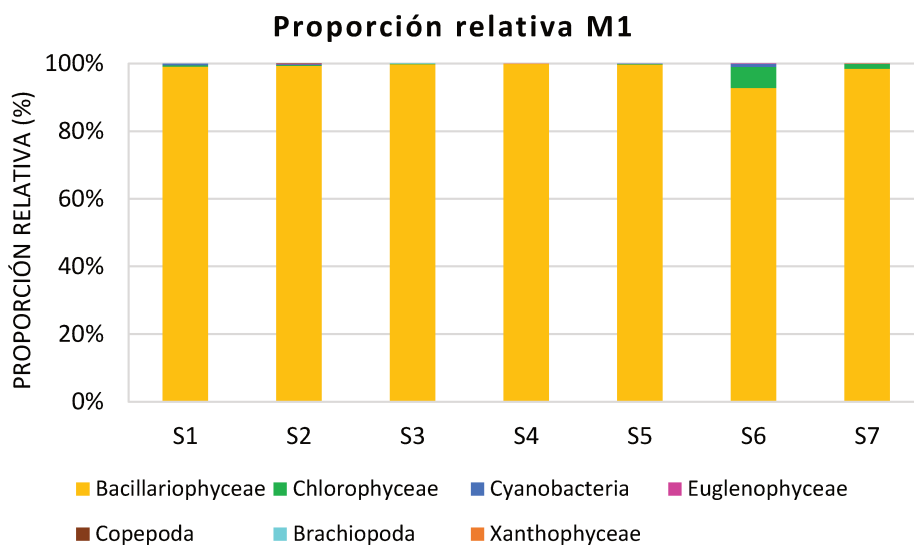


Figura 7. Proporción relativa (%) de grandes grupos en M 1: muestreo 1 (noviembre 2016). S1 – S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7.

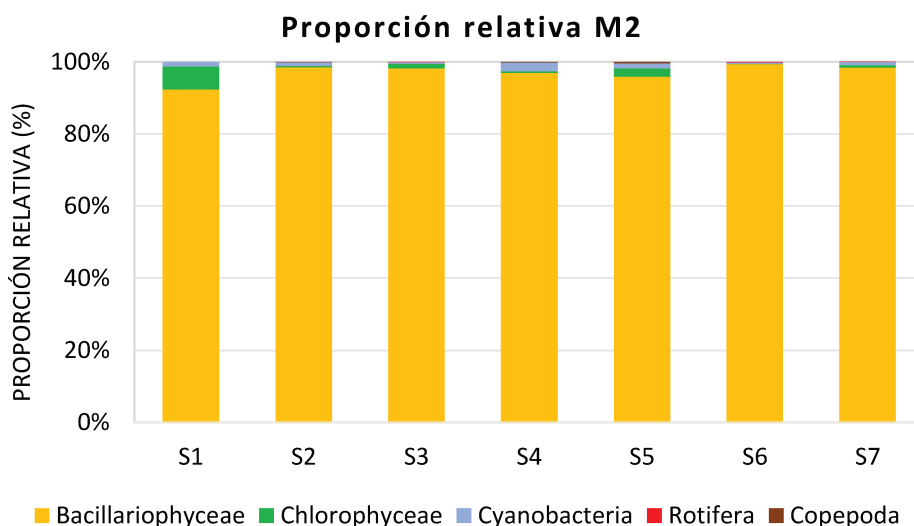


Figura 8. Proporción relativa (%) de grandes grupos en M2: muestreo 2 (abril 2017). S1 – S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7.

Dado el marcado predominio de Bacillariophyceae en el biofilm epipélico, en las figuras 9 y 10, éstas fueron excluidas para poder apreciar las densidades observadas del resto de los grupos en ambos muestreos.

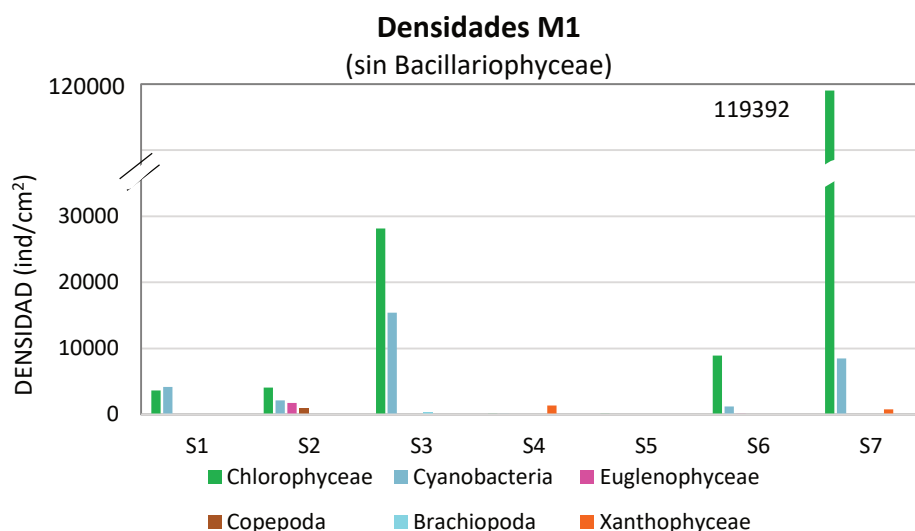


Figura 9. Densidades (ind./cm²) para los grandes grupos, exceptuando Bacillariophyceae en el muestreo 1 (noviembre 2016). S1 – S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7.

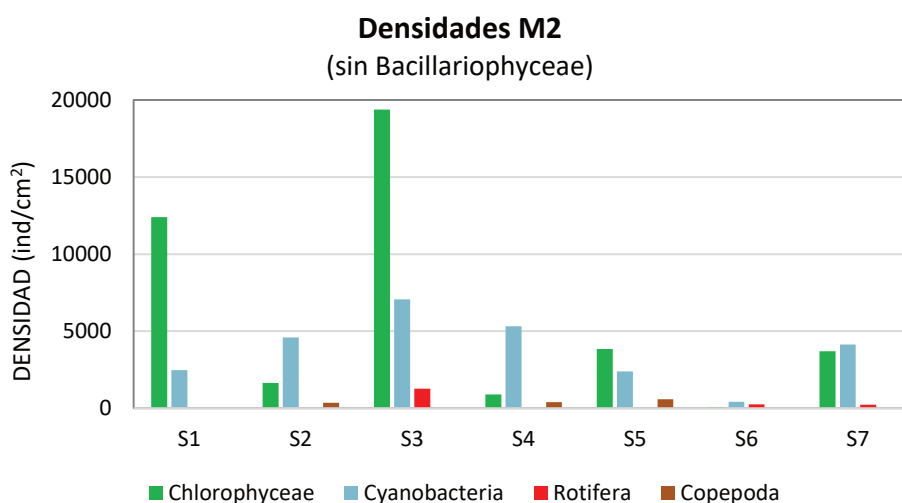


Figura 10. Densidades (ind./cm²) para todos los grandes grupos, exceptuando Bacillariophyceae en el muestreo 2 (abril 2017). S1 – S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7.

C) Índice de diversidad y riqueza

En la tabla 6 se expresa la riqueza (S) y el índice de diversidad de Shannon - Wiener (H') obtenidos para cada sitio en ambos muestreos. Se puede observar que la S fue superior en la mayoría de los sitios durante el segundo muestreo. A su vez, el H' se comportó de manera similar, tomando valores mayores en el segundo muestreo. Los valores de H' variaron entre 0,03 y 0,6 en ambos muestreos, alcanzando los valores más altos en los sitios que también presentaron valores de S altos (S6 en M1; S1 y S5 en M2).

Tabla 6. Riqueza (S) e índice de diversidad de Shannon-Wiener (H').

Muestreo	Sitios	Riqueza	Diversidad de Shannon
M 1	S1	7	0,1
	S2	9	0,1
	S3	6	0,03*
	S4	6	0,03*
	S5	5*	0,03*
	S6	17**	0,6**
	S7	9	0,2
M 2	S1	9	0,6**
	S2	7	0,2
	S3	10	0,2
	S4	12**	0,2
	S5	12**	0,5
	S6	5*	0,1*
	S7	12**	0,2

M1: muestreo 1 (noviembre 2016), M2: muestreo 2 (abril 2017). S1 – S7: sitio 1, sitio 2, sitio 3, sitio 4, sitio 5, sitio 6, sitio 7. *Valores mínimos y **máximos.

2.3 Relaciones entre las variables ambientales y del biofilm

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos en las correlaciones de Pearson con un nivel de significancia menor a 0,05. Cabe destacar que en estos análisis fueron excluidos aquellos grupos que no superaron el 1% de representación en el biofilm como Copepoda, Brachiopoda, Rotifera, Euglenophyceae y Xanthophyceae.

En las relaciones que muestra la tabla 7 se puede observar que la concentración de clorofila “a” se correlaciona significativamente y de manera positiva con la temperatura, conductividad y pH, como también de manera negativa con el índice de diversidad de Shannon-Wiener. Por su parte, la densidad de Bacillariophyceae se correlaciona positivamente con la conductividad y la concentración de clorofila “a”. A su vez, la densidad de Chlorophyceae se correlaciona de manera positiva con la densidad de Cyanobacteria.

Tabla 7. Matriz de correlaciones con los valores de r (coeficiente de Pearson) entre las variables físico-químicas registradas y parámetros del biofilm del muestreo 1 (noviembre 2016) y el muestreo 2 (abril 2017).

	Temp.	Cond.	OD	pH	Caudal	Secchi	DQO	PRS	NID	Amonio	Nitrato	AMPA-Agua	AMPA-Sed.	Atrazina	Cyproc. Agua	Cr-Agua	Cr-Sed.	Pb-Agua	Pb-Sed.	Cu-Agua	Cu-Sed.	As-Agua	As-Sed.	Chl-a	Bacillariophyceae	Chlorophyceae	Cyanobacteria	S	H'	
Temp.	—																													
Cond.		—																												
OD			—																											
pH				—																										
Caudal					—																									
Secchi			,792**			—																								
DQO							—																							
PRS			,800**			-,766**	,687**	—																						
NID								,744**	—																					
Amonio										—																				
Nitrato								,784**	,980**		—																			
AMPA-Agua	-,924**			-,731**								—																		
AMPA-Sed.	-,870**			-,779**								,947**	—																	
Atrazina														—																
Cyproc. Agua	,810**			,788**								-,903**	-,662**	,679**	—															
Cr-Agua													-,885**			—														
Cr-Sed.									,712**								—													
Pb-Agua			-,659*															—												
Pb-Sed.																			—											
Cu-Agua														,691**						—										
Cu-Sed.	,704**			,725**								-,791**			,669**					,870**	—									
As-Agua				,664**									-,717**		,733**							—								
As-Sed.	,861**			,853**								-,913**			,865**					,706**	,895**	—								
Chl-a	,715**	,683**		,840**								-,808**	-,893**		,711**						,892**	,860**	—							
Bacillariophyceae		,662**											-,801**											,688**	—					
Chlorophyceae																										—				
Cyanobacteria							,559*																			,821**	—			
S																												—		
H'					,603*		,584*																						-,758**	—

Temp. (°C): temperatura, Cond. (mS/cm): conductividad, OD (%): oxígeno disuelto, Caudal (m³/s), Secchi (cm), DQO (mg/l): demanda química de oxígeno, PRS (µg/l): fósforo reactivo soluble, NID (µg/l): nitrógeno inorgánico disuelto, Amonio (expresado como N-NH₄⁺ µg/l), Nitrato (expresado como N-NO₃ µg/l), AMPA-Agua (µg/l): AMPA en agua, AMPA-Sed. (µg/kg): AMPA en sedimento, Atrazina (µg/l), Cyproc. Agua (µg/l): Cyproconazole en agua, Cr-Agua (µg/l): cromo en agua, Cr-Sed. (µg/g): cromo en sedimento, Pb-Agua (µg/l): plomo en agua, Pb-Sed. (µg/g): plomo en sedimento, Cu-Agua (µg/l): cobre en agua, Cu-Sed. (µg/g): cobre en sedimento, As-Agua (µg/l): arsénico en agua, As-Sed. (µg/g): arsénico en sedimento, Chl-a (mg/m²): clorofila "a". Densidades de Bacillariophyceae, Chlorophyceae y Cyanobacteria: ind./cm², S: riqueza específica, H': Diversidad de Shannon- Wiener. ** para p<0,01; * para p<0,05.

3. Discusión

La frontera agropecuaria se ha expandido en gran medida en los últimos años. Argentina, en 23 años (de 1992 a 2015), perdió 77.962 m² de superficie forestal, lo que representa un 17 por ciento de áreas de bosque nativo (Arancibia et al., 2019). Este avance fue desencadenado principalmente por la aparición de semillas modificadas genéticamente y los agroquímicos que las acompañan, entre ellos herbicidas como así también fertilizantes.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha informado que Argentina es el segundo país en el mundo que más herbicidas usa por hectáreas cultivadas, y el menos eficiente en la cantidad de granos que obtiene (Regaldo et al., 2017). Adicionalmente, se sabe que entre un 20% y 30% de las dosis aplicadas de glifosato y atrazina, los herbicidas más utilizados en Argentina, no llegan a las áreas blanco como resultado de la deriva por aire, contribuyendo así a la exposición de lugares distantes de donde se aplicaron estos herbicidas (Arancibia et al., 2019). Entre las áreas afectadas se encuentran los ambientes acuáticos que reciben contaminación difusa de agroquímicos aplicados en las áreas de siembra, tanto por aire, como por escorrentía e infiltración. También podemos mencionar la contaminación puntual de agroquímicos y metales ocasionada, en el primer caso, por los envases de agroquímicos desechados directamente en los cursos de agua, y en el segundo caso por el vuelco de efluentes de origen industrial y diversos fertilizantes utilizados en campos de siembra que contaminan con metales los suelos e indirectamente los cursos de agua (Giuffré de López Camelo et al., 1997; Martí et al., 2002; Huang & Jin, 2008).

Las comunidades que habitan estos ambientes acuáticos se han estudiado documentando el grado en que son afectadas (Malmqvist & Rundle, 2002; Arancibia et al., 2019) entre ellas la comunidad del biofilm (Debenest et al., 2009; Tlili et al., 2011; Vera et al., 2012; Larras et al., 2013; Dalton et al., 2015) que integra los efectos de las condiciones ambientales y es catalogada como “sistema de alarma temprana” (Sabater et al., 2007).

En nuestro estudio a campo fue posible advertir que en el muestreo 1 (período de alta aplicación de agroquímicos) se registraron los mayores valores de temperatura del agua, conductividad, oxígeno disuelto, pH y concentraciones de amonio, Cu, Pb, As, atrazina y cyproconazole. Este muestreo se realizó en el mes de noviembre, con una temperatura máxima promedio de 28,5 °C, en comparación al segundo, realizado en abril, con 24,3 °C de máxima promedio (INTA), por lo que las variaciones de temperatura observadas se relacionan directamente con la estacionalidad.

Por otro lado, las diferencias en los valores de conductividad, así como las concentraciones de amonio, Pb, Cu y As estarían relacionadas con los niveles de

precipitaciones registrados en los distintos períodos. Durante el primer muestreo, en el que las precipitaciones registradas fueron un tercio de las correspondientes al segundo muestreo, se observó una mayor concentración de sustancias disueltas en agua. Esto ya ha sido reportado para sistemas acuáticos de la región, donde los mayores registros de conductividad coincidieron con períodos de escasas precipitaciones (Pecorari et al., 2006; Regaldo et al., 2017). En el caso del As, cabe señalar que se trata de un metaloide de origen natural, y que los niveles hallados en los arroyos estudiados se encuentran dentro de los valores reportados en otros estudios realizados en la región (Regaldo et al., 2017).

Por su parte, los mayores valores de oxígeno disuelto y pH registrados en el muestreo 1 coinciden con el mayor desarrollo del biofilm (máximas densidades y mayores concentraciones de clorofila "a"). El proceso de producción primaria fotosintética tanto del fitoplancton como del biofilm produce un aumento del oxígeno disuelto durante el día (Odum, 1956), y el incremento del pH del cuerpo de agua (Elosegi & Sabater, 2009). Por este motivo, las mayores densidades del biofilm observadas estarían relacionadas con los mayores valores de oxígeno disuelto y con los valores de pH alcalinos registrados.

Según Stevenson (1996), otros factores reguladores del biofilm son la velocidad de la corriente y las variaciones en los niveles de flujos del agua. En su trabajo el autor concluye que las mayores biomasa del biofilm ocurren en ambientes con velocidades intermedias. Battin et al. (2003) argumentan que bajas velocidades de la corriente estimulan la incorporación de nutrientes, así como los procesos de fotosíntesis, respiración y reproducción, mientras que a mayores velocidades de la corriente se puede producir el desprendimiento de los organismos por las fuerzas erosivas. Numerosos estudios reportaron incrementos de la biomasa y/o productividad con incrementos de la velocidad hasta 50 cm/s (Horner & Welch, 1981; Stevenson, 1983; Navarro Rodriguez, 1998; Tien et al., 2009; entre otros). De acuerdo a los antecedentes existentes, esta velocidad de la corriente pareciera ser el valor umbral ya que otros autores (Horner & Welch, 1981; Horner et al., 1983) reportan disminución en la biomasa del biofilm por encima de los 51 cm/s. En nuestro estudio la velocidad de la corriente registrada tomó valores inferiores a 50 cm/s en la mayoría de los sitios con la excepción de S6 (en ambos muestreos) y S5 (segundo muestreo). Sin embargo, cabe señalar que en líneas generales durante el segundo muestreo se registraron las mayores velocidades de la corriente, acompañadas por menores densidades en el biofilm. Nuestros resultados concuerdan con lo señalado por Stevenson (1996), quien reporta picos de biomasa algal en sustratos naturales con velocidades de la corriente entre 10 y 20 cm/s, especialmente para comunidades algales bentónicas dominadas por

Bacillariophyceae que son relativamente más susceptibles a disturbios causados por la corriente. Mientras que en sitios con sustratos estables rocosos se desarrollan algas filamentosas como *Cladophora*, que pueden persistir y verse favorecidas por el efecto de la corriente, alcanzando importantes biomásas a mayor velocidad de la corriente. En ambientes con sustratos inestables, las comunidades de algas bentónicas son frecuentemente más vulnerables a cambios de la velocidad de la corriente (Stevenson, 1996).

De acuerdo a lo reportado por Hulme & Sheard (1999), la tendencia en las precipitaciones anuales a nivel nacional ha demostrado un aumento del 10% por siglo, aunque en la Pampa húmeda se incrementó hasta un 15% por siglo. De acuerdo a esta tendencia es esperable que se produzcan en estos cuerpos de agua modificaciones de caudal o de regímenes de flujo, o la entrada de materiales por escorrentía, entre otras consecuencias. Los aumentos esperables en la temperatura y las precipitaciones relacionados al cambio climático tendrán una influencia directa en los sistemas lóticos pampeanos, incrementando la temperatura del agua y su caudal, e indirecta a través de la escorrentía, incorporando nutrientes procedentes del lavado del suelo como así también materiales en suspensión. En tal sentido, en el presente estudio durante el período de mayores precipitaciones se registraron los mayores caudales asociados a las mayores concentraciones de Cr en agua, PRS, DBO₅ y DQO. Esto estaría relacionado al efecto de la escorrentía que genera el ingreso de materia orgánica y nutrientes arrastrados hacia los cuerpos de agua. Según Elosegí & Sabater (2009), las modificaciones que introduce el hombre en los ecosistemas por medio de la agricultura, el desarrollo urbano e industrial afectan las condiciones naturales de las cuencas hidrológicas, una de ellas es la alteración del origen, composición y abundancia de materia orgánica que ingresa a las mismas.

En un análisis espacial de los distintos sitios estudiados se pueden diferenciar ciertas particularidades. El S1 se caracterizó por presentar los niveles mínimos de OD, DBO₅, transparencia, pH y amonio, y los valores máximos de caudal y concentraciones de PRS, atrazina, Cu y Pb en agua. Por otro lado, el S2 presentó los valores mínimos de conductividad, pH, caudal y velocidad de la corriente y las máximas concentraciones de amonio, Cr en agua, y As, Cu, Pb y Cr en sedimentos. El S3 se caracterizó por presentar los valores máximos de conductividad. Por su parte, en el S4 se registraron los niveles mínimos de DQO, PRS, NID, nitratos, AMPA en sedimentos, Cr y Cu en agua y los niveles máximos de temperatura, OD y transparencia. En el S5 se observaron los niveles máximos de NID y nitrato, como también los niveles mínimos de AMPA y As en agua. El S6 se caracterizó por presentar las concentraciones máximas de DQO, velocidad de la corriente, cyproconazole y As en agua, y las mínimas concentraciones

de clorofila "a", As, Cu y Pb en sedimentos. Por último, el S7 presentó los niveles máximos de pH, DBO₅, AMPA en agua y clorofila "a", como también niveles mínimos de temperatura y Cr en sedimentos. Por otro lado, las mayores densidades de biofilm se observaron en S3 y S7, al igual que las mayores concentraciones de clorofila "a". En estos sitios también se registraron altas concentraciones de nutrientes, principalmente de PRS y NID en S7. Estos datos adquieren importancia ya que según Mora-Gómez et al. (2016) los nutrientes son un recurso esencial y su disponibilidad puede determinar cambios en la estructura y funcionamiento de las comunidades microbianas y del biofilm.

A su vez, según Mora-Gómez et al. (2016), la intensidad lumínica juega un rol crucial para el desarrollo de la comunidad autotrófica del biofilm. Frecuentemente se observa una disminución de la intensidad lumínica que penetra en el cuerpo de agua a causa de la carga de materia orgánica e inorgánica que transporta, pudiendo ocasionar que el biofilm sea más delgado y con menor biomasa algal. En concordancia con lo reportado por los autores, en los arroyos estudiados se detectó una disminución de la transparencia (menores valores de Secchi) en el segundo muestreo, asociada a menores biomásas del biofilm como consecuencia del incremento del caudal. Asimismo, se observó una correlación negativa y significativa entre la transparencia y la concentración de PRS en agua. Cabe resaltar que en el análisis del ensamble fitoplanctónico, cuyos muestreos fueron realizados en simultáneo con los del presente estudio, Marchese et al. (2018) encontraron una relación positiva y significativa entre la clorofila "a" planctónica y las concentraciones de PRS. Esta relación puede indicar que la mayor disponibilidad de este nutriente favoreció el desarrollo del ensamble fitoplanctónico. Además, es reconocido que la abundancia de fitoplancton puede afectar la cantidad y calidad de la luz que llega al biofilm, lo que conlleva a la existencia de una relación inversa entre la biomasa de las algas planctónicas y bentónicas (Mora-Gómez et al., 2016). Es así que la disminución de la biomasa del biofilm observada en el segundo muestreo podría ser explicada tanto por un aumento de la carga de materia orgánica e inorgánica, como así también por un mayor desarrollo del fitoplancton, que produjeron una disminución en la penetración de la luz.

Con respecto a los registros de herbicidas, no se detectó glifosato en agua y sedimento, sin embargo, estudios realizados en la zona han reportado la presencia de este herbicida en los cuerpos de agua en concentraciones de hasta 0,7 µg/l (Ronco et al., 2016) y en aguas de lluvia por escorrentía de hasta 67,28 µg/l (Alonso et al., 2018). Cabe destacar que, en el presente trabajo, el límite de detección del equipo utilizado para el análisis de glifosato en agua fue de 4 µg/l, por lo tanto, si hubiera concentraciones inferiores a este valor en los sistemas estudiados éstas no fueron detectadas. El metabolito de degradación AMPA, sólo se midió en el segundo muestreo,

las concentraciones máximas fueron 2,71 µg/l en agua y 6,28 µg/kg en sedimento, sin embargo, en otros estudios en el centro-norte de la provincia se detectaron hasta 4 µg/l y 60,7 µg/kg, respectivamente (Méndez, 2019). Cabe mencionar que no existen niveles guías para la protección de la biota de agua dulce de este metabolito tanto en agua como en sedimento.

Las concentraciones de atrazina presentaron los valores más altos en el primer muestreo, hecho que se relaciona con un período de alta aplicación de agroquímicos en los suelos que son preparados para la siembra (INTA). El mayor valor se midió en S1 (44 µg/l), superando 22 veces los niveles guía canadienses propuestos para la protección de la biota acuática (Canadian Water Quality Guidelines, 2008). La atrazina ha sido reportada como frecuentemente detectable en aguas superficiales y subterráneas, por su uso extensivo, vida media moderada y coeficiente de sorción en el suelo (De Gerónimo et al., 2014).

Las concentraciones de cyproconazole en agua fueron detectadas sólo en el primer muestreo alcanzando el valor máximo de 0,1 µg/l en S6. En arroyos cercanos Regalado et al. (2018) ha documentado concentraciones de hasta 0,4 µg/l. Sin embargo, cabe destacar que para este fungicida no existen niveles guías nacionales e internacionales propuestos para la protección de la biota acuática, a pesar de que Aparicio et al. (2015) reportan que fue uno de los 15 productos más utilizados en el año 2013 y su detección en cuerpos de agua de la zona es frecuente. En nuestro estudio no se observaron correlaciones significativas entre las concentraciones de los plaguicidas y la biomasa del biofilm.

En cuanto a las concentraciones de metales y arsénico, los valores más altos se registraron en los sitios S1 y S2. Regalado et al. (2017) reportaron, para ambientes cercanos a los analizados en esta tesina, concentraciones más elevadas en agua que superaron los NGC; en el caso particular del Cr y Pb en sedimento, los niveles registrados en nuestro estudio fueron mayores a los reportados por estos autores. Respecto al Cu en sedimento, se observó una correlación positiva y significativa con la concentración de clorofila "a". En este sentido, Navarro et al. (2002) reportaron correlaciones positivas entre la biomasa algal del biofilm (clorofila "a") y la resistencia a la toxicidad (EC₅₀ y EC₁₀) en ambientes expuestos a Cu y atrazina. Según estos autores y Sabater et al. (2007), esta relación puede explicarse por la estructura del biofilm, ya que la absorción de metales estaría limitada por su espesor, es decir, la biomasa acumulada, siendo los polisacáridos exudados capaces de adsorber eficientemente a los metales, y así reducir su penetración en las células algales. Otros autores hallaron resultados que indican poca o nula influencia de la atrazina sobre el biofilm (Guasch et al., 1998; 2007; Andrus et al., 2013; Dalton et al., 2015) y también postulan una posible

adaptación de parte de las especies que reciben de manera continua concentraciones de atrazina en su ambiente, remarcando la capacidad de aumentar la tolerancia de las comunidades ante una exposición crónica.

Por último, observamos que el índice de diversidad de Shannon-Wiener se correlacionó de forma negativa con la clorofila "a" y que en el segundo muestreo se registraron valores más altos para la mayoría de los sitios en relación al primer muestreo, coincidiendo con los menores valores de clorofila "a". En este sentido, dicha relación podría explicarse porque, si bien la dominancia de Bacillariophyceae se presentó en ambos muestreos, en el segundo muestreo hubo una mayor representación de otros grupos que se vio reflejado en una mayor equitatividad y riqueza de especies, elevando los valores del índice a pesar de la menor biomasa de organismos. También se destaca que los mayores valores de diversidad estuvieron asociados a los mayores caudales registrados en el segundo muestreo, y que los mayores flujos pudieron provocar remoción del biofilm, generando zonas de sustratos libres para la recolonización en esta comunidad. Nuestros resultados son coincidentes con lo reportado por Begon et al. (1999) que mencionan un incremento de la diversidad durante las primeras etapas de una sucesión caracterizada por la presencia de espacios vacíos que conllevan a la coexistencia de especies pioneras y de aquellas correspondientes a fases intermedias de la sucesión. El análisis de la composición del biofilm a nivel de grandes grupos reveló una marcada dominancia de Bacillariophyceae superando el 90% en todos los sitios y en ambos muestreos, concordando con lo reportado por diversos autores que mencionan que el epipelon de arroyos de la llanura Pampeana naturalmente se encuentra dominado por este grupo (Solari & Claps, 1996; Gómez & Licursi, 2001; Giorgi et al., 2005). Diversos autores han reportado la disminución del índice de diversidad con la polución, otros han encontrado que la diversidad puede incrementarse, o que pueden existir cambios diferenciales en la diversidad dependiendo del tipo de polución (Stevenson & Pan, 1999).

En nuestro estudio, las Bacillariophyceae fueron dominantes en ambos muestreos, independientemente de las concentraciones de plaguicidas registradas. Gonzalez et al. (2019) y otros autores reportaron cambios en la composición del biofilm por la incidencia de glifosato, señalando un aumento de la densidad de Cyanobacteria, y consecuente disminución de Chlorophyceae y Bacillariophyceae. Por otro lado, de acuerdo a Symoens et al. (1998) las alteraciones que pueden ocurrir en comunidades expuestas a contaminación son diversas y no existe una relación simple entre la diversidad y la contaminación del agua.

Licursi et al. (2018) reportaron que la flora diatomológica hallada en los sitios estudiados en la presente tesina reflejó fielmente las condiciones ambientales de los

mismos, presentando dominancia de especies alcalófilas, con moderados a bajos requerimientos de oxígeno, características de ambientes salobres, mesosapróbicos y eutróficos. Los mencionados autores analizaron la calidad del agua a partir del Índice de Diatomeas Pampeano (IDP) y encontraron correlaciones significativas entre este índice con la concentración de nitratos (+) y de atrazina (-). De acuerdo a los resultados obtenidos, el IDP arrojó que la mayoría de los sitios analizados presentaron calidad de agua mala (sitios con actividad agrícola) y muy mala (sitio con actividad urbana/industrial).

Finalmente, en los sitios estudiados se pudo observar una marcada diferencia entre muestreos en los valores de biomasa del biofilm (densidad y clorofila "a"), concentraciones de plaguicidas, nutrientes y metales. Aunque no hubo relaciones directas y estadísticamente significativas entre estos parámetros, sí se identificó que el segundo muestreo presentó menor biomasa asociada a factores mayoritariamente relacionados con altas precipitaciones, lo que se evidenció con el ingreso de grandes cantidades de materia orgánica y PSR mediante escorrentías. Se puede afirmar que los arroyos estudiados están expuestos a concentraciones de plaguicidas, nutrientes y metales relacionados con las actividades antrópicas de la región y que en muchas ocasiones superaron los niveles guías propuestos para la protección de la biota acuática, poniendo en riesgo la vida de los organismos acuáticos, incluyendo la del hombre. En base a los resultados obtenidos, consideramos necesario profundizar estos estudios, comparando varios períodos sucesivos de baja y alta aplicación, lo que podría aportar más información sobre la dinámica de la estructura de la comunidad del biofilm en estos arroyos, y de ese modo, obtener mayores herramientas para comprender el impacto de los agroquímicos en los sistemas acuáticos. A su vez, resulta necesario complementar los estudios realizados a escala de campo con ensayos experimentales en laboratorio bajo condiciones controladas, con el fin de obtener información sobre las posibles relaciones causa-efecto de los agroquímicos sobre el biofilm. Esto es abordado en el capítulo 2 de la presente tesina.

III. CAPÍTULO 2: ESTUDIOS EXPERIMENTALES

1. Metodología

Con el fin de evaluar el posible efecto de sustancias tóxicas sobre una determinada comunidad u organismo suelen utilizarse estudios experimentales a escala de micro y mesocosmos. Estos estudios son una herramienta que complementan las observaciones realizadas en campo, permitiendo determinar relaciones causa-efecto. Por medio de estas instancias experimentales se puede estudiar la comunidad con una menor variabilidad ambiental y, al mismo tiempo, permite aumentar la replicación, asegurando una mayor fuerza estadística de las observaciones. Los microcosmos son experimentos de menor escala que los mesocosmos, con sistemas más simples que permiten variar algunas condiciones experimentales y controlar las condiciones ambientales (Sabater & Borrego, 2015). En este capítulo se desarrollará el estudio experimental que se llevó a cabo para alcanzar el objetivo 2 mediante la utilización de microcosmos en laboratorio.

1.1 Diseño experimental

Se planificó y llevó a cabo una experiencia para simular, bajo condiciones controladas, los factores más relevantes a los que se encuentra expuesta la comunidad del biofilm desarrollado en sistemas acuáticos impactados por la actividad agrícola intensiva (adición de nutrientes y herbicidas) y establecer las relaciones causa-efecto de la adición individual y simultánea de glifosato, atrazina (herbicidas ampliamente utilizados) y nutrientes sobre el biofilm. Las concentraciones de glifosato y atrazina utilizadas en esta experiencia corresponden a concentraciones ambientalmente relevantes, similares a las observadas en sistemas lóticos de la región afectados por la actividad agrícola (Peruzzo et al. 2008; Ronco et al. 2016) y a las concentraciones registradas en los muestreos de campo detallados en el capítulo 1 de la presente tesina y reportadas por Regaldo et al. (2018). En relación a los nutrientes, las concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) a adicionar fueron definidas de acuerdo a las concentraciones registradas en los sitios más impactados por la actividad agrícola durante los muestreos de campo (Capítulo 1) reportadas por Licursi et al. (2018) y Marchese et al. (2018).

Los resultados obtenidos complementan el análisis de los muestreos realizados en campo (Capítulo 1). El diseño experimental incluyó tres etapas: *colonización*, *aclimatación* y *exposición* del biofilm. Para la etapa de *colonización* se diseñó y montó un dispositivo con sustratos artificiales. Estos consistieron en vidrios de 3 cm de lado (9

cm² de superficie) que se dispusieron, en línea, en vainas de sujeción sucesivas dispuestas en forma paralela unas de otras (Figuras 11 y 12).

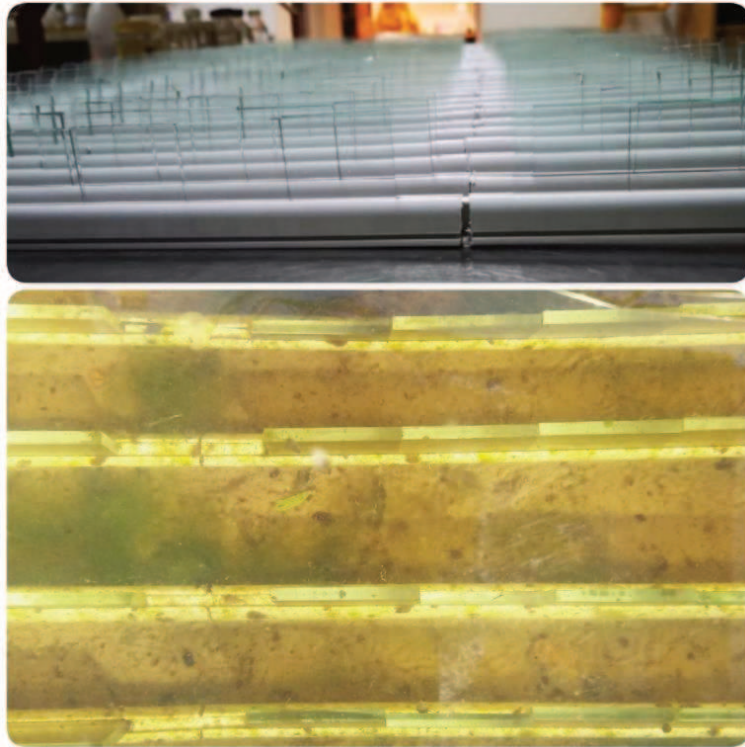


Figura 11. Dispositivo de colonización con los sustratos artificiales de vidrio (arriba) y sustratos ya colonizados (abajo)

Este dispositivo fue colocado en una batea rectangular localizada a la intemperie. En la batea de colonización (Figura 12) se colocaron 250 litros de agua filtrada con red de 25 μm y sedimento (inóculo de epipelon para la colonización) colectados en un arroyo con bajo impacto agrícola ubicado en cercanías de la localidad de Monje (32°23'34"S 60°56'28"O). Con el fin de conocer la calidad del agua y sedimento empleados en esta experiencia, se realizó un screening de metales y plaguicidas.



Figura 12. Batea de colonización con el dispositivo de colonización con inóculo de biofilm y agua del sitio.

La batea fue cubierta con una tela de tul para evitar el ingreso de materia orgánica externa. Asimismo, y con el fin de simular las condiciones naturales, se colocaron macrófitas acuáticas que fueron sectorizadas para evitar el sombreado de los sustratos artificiales (Figura 13). La etapa de *colonización* se llevó a cabo durante el verano de 2019 y tuvo una duración de más de 60 días. En esta etapa se realizó el seguimiento de los parámetros físico-químicos del agua y se adicionaron nutrientes periódicamente para mantener las concentraciones basales que permitieran el desarrollo del biofilm en los sustratos artificiales. Las concentraciones basales se establecieron en 0,5 mg/l de P y 1,5 mg/l de N.

Finalizada la etapa de *colonización*, los sustratos se trasladaron al laboratorio en atmósfera húmeda y se acondicionaron en microcosmos de vidrio de 1,5 L de capacidad, que fueron llenados con el agua de colonización previamente filtrada con red de plancton (25 μ m) (Figura 14).



Figura 13. Batea de colonización



Figura 14. Microcosmos de vidrio utilizados durante la etapa experimental con los sustratos artificiales colonizados por el biofilm.

Los microcosmos se dispusieron en una incubadora de laboratorio (SEMEDIC I-290L) previamente acondicionada con fotoperíodo (12:12) y temperatura programada

a 20 °C. La incubadora utilizada está equipada con luz blanca y luces led rojas distribuidas en bandejas que aseguran un ambiente lumínico homogéneo en los distintos estantes utilizados para localizar los microcosmos (Figura 15). El clima lumínico se determinó utilizando un luxómetro Led Light Meter ST-3309. Los microcosmos (3 réplicas por tratamiento) fueron distribuidos en los estantes de manera aleatoria contemplando la variabilidad dada por el experimento. Previo a la etapa de *exposición* se realizó la determinación de la concentración de nutrientes en el agua para ajustar la concentración de nitrógeno y fósforo a las concentraciones basales establecidas, mencionadas precedentemente, y para definir la cantidad de nutrientes a adicionar para alcanzar las concentraciones experimentales estipuladas en el diseño de la experiencia.



Figura 15. Incubadora utilizada durante la etapa de aclimatación y exposición. Se pueden observar los microcosmos en cada estante, las luces blancas y leds rojas.

Luego de los tres días de *aclimatación* en incubadora comenzó la etapa de *exposición*. Al inicio de la etapa de *exposición* se realizó la adición de nutrientes y/o glifosato y/o atrazina en cada microcosmo (previamente rotulado) según el tratamiento correspondiente:

- **Control (C):** Sin adición de agroquímicos.
- **NP (N):** 3 mg/l de N y 1 mg/l de P.
- **GLIF (G):** 0,7 mg/l de glifosato (concentraciones reales).
- **ATRAZ (A):** 44 µg/l de atrazina (concentraciones reales).

- **NP+GLIF (NG):** Adición simultánea de nutrientes y glifosato en iguales concentraciones que los tratamientos NP y GLIF para testear el efecto conjunto de ambos factores.
- **NP+ATRAZ (NA):** Adición simultánea de nutrientes y atrazina en iguales concentraciones que los tratamientos NP y ATRAZ para testear el efecto conjunto de los factores.
- **GLIF+ATRAZ (GA):** Adición simultánea de glifosato y atrazina en iguales concentraciones que los tratamientos GLIF y ATRAZ para testear el efecto conjunto de ambos factores.
- **NP+GLIF+ATRAZ (NGA):** Adición simultánea de nutrientes, glifosato y atrazina, en iguales concentraciones que en tratamientos anteriores, para testear el efecto conjunto de los tres factores.

El suministro de nutrientes (P y N) se realizó a partir de sales de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y nitrato de sodio (NaNO_3). Los herbicidas se aplicaron a partir de los formulados Roundup® Full II y Atratop 90 WG, para glifosato y atrazina respectivamente.

El periodo de *exposición* tuvo una duración de 7 días (Tabla 8). Durante el mismo se realizó el seguimiento de los parámetros físico-químicos y la toma de muestras para la determinación de las concentraciones de herbicidas, nutrientes y el seguimiento de la comunidad del biofilm, analizando diferentes parámetros biológicos contemplados en la experiencia (Peso seco 'PS', Peso seco libre de cenizas 'PSLC', clorofila "a", densidad de los distintos grupos presentes en el biofilm).

Los muestreos se realizaron en los siguientes tiempos: T_i , T_0 , T_1 , T_3 , T_5 y T_7 .

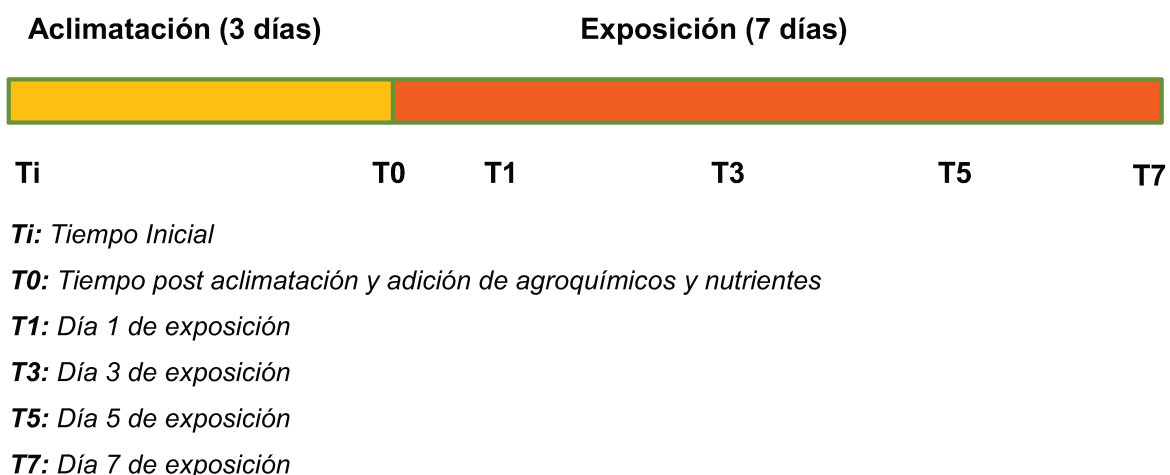


Tabla 78. Tareas realizadas en cada tiempo durante la instancia experimental.

Tareas	Ti	T0	T1	T3	T5	T7
Adición de herbicidas y nutrientes		X				
Registro de parámetros físico-químicos	X	X	X	X	X	X
Análisis de nutrientes disueltos y totales	X		X	X		X
Análisis de herbicidas		X			X	X
Registro de biofilm	X	X	X	X	X	X
Determinación de la DBO ₅	X					X

Ti: Tiempo inicial, T0: Tiempo 0, T1: Tiempo 1, T3: Tiempo 3, T5: Tiempo 5, T7: Tiempo 7.

1.2 Obtención de muestras y medición de parámetros físico-químicos, concentraciones de nutrientes, DBO₅, herbicidas y metales

1.2.1 Parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos se midieron mediante una sonda multiparamétrica HACH, modelo HQ40D. Los parámetros determinados fueron: temperatura (°C), pH, conductividad (mS/cm), sólidos disueltos (SD) (mg/l) y oxígeno disuelto (OD %).

A) Nutrientes y DBO₅

Las determinaciones de nutrientes y DBO₅ fueron realizadas por el personal del laboratorio de Química del INALI.

Se tomaron muestras de agua para la estimación de la concentración de fósforo total (PT), fósforo reactivo soluble (PRS), sílice disuelto (SiD), amonio (N-NH₄⁺) y nitritos-nitratos (N-NO₂⁻ + N-NO₃⁻); las formas de nitrógeno inorgánico disuelto fueron sumadas y expresadas como NID.

En el laboratorio se llevaron a cabo los métodos descritos en el capítulo 1 (Pág. 13) para determinar los nutrientes antes mencionados. Además, se estimaron las concentraciones de SiD utilizando el método del molibdosilicato (APHA, 2017), y PT mediante digestión con ácidos nítrico y sulfúrico seguido de determinación de PRS (Koroleff, 1972). El PT fue expresado en relación a la superficie (µg/cm²), ya que se refiere a la concentración hallada en el biofilm y en relación a la masa de peso seco (mg/gPS).

Por otro lado, se colectaron muestras para la estimación de la DBO₅. La medición se realizó utilizando una sonda HACH, modelo LBOD 10101, ésta registra el consumo de oxígeno durante el período de incubación (5 días a 20 °C), luego se calculó la

diferencia entre los valores iniciales y finales, realizando diluciones en los casos en que fuera necesario.

B) *Herbicidas y metales*

Las muestras de agua y sedimento para la etapa de colonización fueron colectadas de acuerdo a la metodología detallada en el capítulo 1 (Pág. 13) y mantenidas refrigeradas hasta su posterior análisis de metales y plaguicidas. El screening de plaguicidas se llevó a cabo en el laboratorio del PRINARC y el de metales en el INTEC, siguiendo la misma metodología descrita en el capítulo 1 (Pág. 14).

Las muestras de agua colectadas en la etapa de exposición para la determinación de glifosato, AMPA y atrazina fueron colectadas de acuerdo a la metodología detallada en el capítulo 1 y refrigeradas hasta su análisis. Las determinaciones analíticas de glifosato y AMPA fueron realizadas en el INTEC y las de atrazina en el PRINARC, según la metodología descrita en el capítulo 1 (Pág. 14).

1.2.2 *Biofilm*

El muestreo consistió en seleccionar vidrios al azar de cada microcosmo y extraer el biofilm epilítico mediante el uso de un cutter y agua destilada. El material fue fraccionado para el análisis de clorofila "a", densidad, composición (proporción de grandes grupos) y PSLC.

Las muestras destinadas al análisis de la composición fueron fijadas con formol al 4%. El resto de las muestras fueron conservadas en frío hasta su procesamiento en laboratorio.

A) *Clorofila "a"*

Para la determinación de clorofila "a" se siguió la metodología de APHA (2017), descrita en el capítulo 1 (Pág. 15), aunque en este caso, las muestras del biofilm epilítico fueron filtradas directamente con filtros Whatman GF/F.

B) *Densidad y Composición*

Para el recuento de grandes grupos del biofilm, se utilizó una cámara de Sedgwick-Rafter y se realizó la observación a 400X en un microscopio invertido Nikon (Eclipse TS100). Para facilitar la identificación de los organismos las muestras fueron diluidas teniendo en cuenta la concentración de organismos y sedimentos presentes en cada una de ellas.

Las abundancias absolutas obtenidas de los recuentos de la composición del biofilm fueron volcadas en planillas de Excel. A partir de la abundancia absoluta de cada

organismo se estimó su densidad por cm² de sustrato muestreado, aplicando la fórmula ya expresada en el capítulo 1 (Pág. 16). Además, se calculó la abundancia relativa a nivel de grupo y de especies. Para la identificación taxonómica de los organismos se utilizó la misma bibliografía mencionada en el capítulo 1 (Pág. 16).

C) *Índice de diversidad y riqueza*

Con los datos obtenidos de la composición del biofilm se calcularon los valores de riqueza específica y el índice de diversidad de Shannon- Wiener (H'). Estos valores se obtuvieron siguiendo la misma fórmula utilizada en el capítulo 1 (Pág. 16).

D) *Peso seco libre de ceniza*

Para la obtención del Peso seco libre de ceniza (PSLC), que es una medida de la materia orgánica presente en las muestras, estas fueron secadas en estufa a 105 °C hasta peso constante y mufladas a 550 °C por tres horas (APHA, 2017). La diferencia entre el peso obtenido luego del secado y del muflado permite determinar la cantidad de materia orgánica presente en la muestra.

E) *Índice Autotrófico*

El PSLC y la clorofila "a" se utilizaron para determinar el Índice Autotrófico (IA). Este índice determina la naturaleza trófica del biofilm, y se calcula como el cociente de peso seco libre de cenizas (mg/m²) sobre la concentración de clorofila "a" (mg/m²). Valores mayores a 200 indican que en el biofilm predominan los heterótrofos (APHA, 2017).

Índice Autotrófico (IA):

$$IA = \frac{(PSLC/sup)}{Chl - a}$$

donde

PSLC: peso seco libre de ceniza (mg),

Sup: superficie de la muestra raspada (m²),

Chl- a: clorofila "a" (mg/m²).

1.3 Análisis estadístico

1.3.1 *Correlaciones de Pearson*

Los datos analizados fueron de carácter cuantitativo. Se realizaron correlaciones múltiples aplicando el coeficiente de Pearson, con todos los valores obtenidos por cada tratamiento y tiempo de exposición. Se analizó la distribución de los datos para comprobar si eran normales aplicando la transformación $\log(x+1)$ en los casos que no se cumpliera la normalidad.

1.3.2 ANOVA de medidas repetidas

Los valores obtenidos fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas (ANOVA MR) de dos factores (tratamiento y tiempo), con medidas repetidas en el factor tiempo (Winer, 1971). El análisis consistió en determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada variable dependiente en cada tratamiento (factor inter-sujetos, con un grupo de sujetos por cada nivel) a lo largo del tiempo (factor intra-sujetos por cuyos niveles pasan todos los sujetos).

Para que el ANOVA sea correctamente aplicado deben cumplirse tres supuestos: independencia de datos, homogeneidad de varianzas y normalidad, y, al utilizar un ANOVA MR se adiciona un cuarto supuesto, la esfericidad.

En orden de importancia se presenta, en primer lugar, el supuesto de independencia de datos. Este supuesto está dado por el diseño experimental. En segundo lugar, la homogeneidad de varianzas. Ésta se comprobó aplicando el test de Levene ($p > 0,05$ no se rechaza la hipótesis nula de igualdad de varianzas), donde las dispersiones de los datos no deben diferir entre los grupos a comparar. Luego, en tercer lugar, se presenta la normalidad. Se comprobó si la distribución de los datos era normal mediante el test de Shapiro-Wilk. En los casos que no cumplieron este requisito se aplicó la transformación $\log(x+1)$ o square root. Y, por último, se presenta el supuesto de esfericidad que asume que las varianzas de las diferencias entre todas las combinaciones de los grupos relacionados son iguales. En este caso se utilizó el test de Mauchly y se aplicó la corrección de Greenhouse-Geisser cuando no se cumplió este supuesto (Greenhouse & Geisser, 1959).

Luego de aplicar el ANOVA se requieren análisis *a posteriori* para conocer entre cuáles de los grupos que conforman el experimento hay diferencias. Para esto se utilizaron comparaciones múltiples entre los diferentes tratamientos mediante Student-Newman-Keuls (SNK).

Además, se calculó el Eta cuadrado generalizado (η_G^2) (Olejnik & Algina, 2003) que es una variación del Eta cuadrado (η^2). Ambos índices permiten conocer la medida del tamaño del efecto indicando cuánta variabilidad de la variable dependiente puede ser explicada por la variable independiente. En esta tesina se utilizó el η_G^2 porque puede ser empleado en diseños con uno o más factores medidos o manipulados (Bakeman, 2005). Su fórmula es:

$$\eta_G^2 = \frac{(SS_A)}{(SS_A) + (SS_{s/A}) + (SS_{B s/A})}$$

donde

SS: suma de cuadrados

A: factor inter-sujetos (Tratamiento),

s/A: sujetos anidados dentro de los niveles del factor A,
B: factor entre-sujetos con medidas repetidas (Tiempo).

El valor obtenido por el índice puede ser interpretado como el valor de r^2 . Por ende, un $\eta_G^2 = 0.246$ significa que el 24,6% de la variabilidad en la variable dependiente puede ser explicada por la variable independiente.

En general se utiliza la regla de Cohen (1992) para interpretar el valor de η^2 y η_G^2 . Por lo tanto, se considera un efecto pequeño cuando $\eta_G^2 \leq 0,20$; un efecto moderado cuando $0,20 > \eta_G^2 < 0,80$ y un efecto grande cuando $\eta_G^2 \geq 0,80$.

Los diferentes análisis se llevaron a cabo mediante el software especializado IBM® SPSS® Statistics v. 25.

2. Resultados

2.1 Etapa de colonización

En la tabla 9 se muestran las concentraciones de metales y plaguicidas presentes en el agua y los sedimentos colectados de un arroyo con bajo impacto agrícola, utilizados en la etapa de colonización.

Tabla 9. Concentraciones de metales y plaguicidas en el agua y el sedimento empleado en la etapa de colonización.

METALES			
AGUA	Conc.	SEDIMENTO	Conc.
Cr (mg/L)	0,22	Cr (mg/kg)	22,4
Cd (µg/l)	0,47	Cd (µg/kg)	0,2
Cu (µg/l)	0,64	Cu (µg/kg)	3,4
Pb (µg/l)	<0,25	Pb (µg/kg)	6,2
PLAGUICIDAS			
AGUA	Conc.	SEDIMENTO	Conc.
Glifosato (mg/l)	ND	Metolacloro (µg/kg)	<10
AMPA (µg/l)	11		
Atrazina (µg/l)	0,2 ± 0,1		
2,4-D (µg/l)	2 ± 1		
Clorpirifos (µg/l)	<0,1		
Cyproconazole (µg/l)	<0,1		
Metolacloro (µg/l)	0,2 ± 0,1		
S-Metolacloro (µg/l)	0,2 ± 0,1		

Conc.: concentraciones, SD: Sin Dato, ND: No Detectable. Límite de detección: Cyproconazole 0,03 µg/l, Glifosato 4 µg/l. Límite de cuantificación: Pb 0,25 µg/l, Clorpirifos 0,1 µg/l, Cyproconazole 0,1 µg/l, Metolacloro Sed. 10 µg/kg.

De los metales, sólo Cr en agua superó 110 veces los NGC propuestos para la protección de la biota acuática (Canadian Water Quality Guidelines, 2008). Se registraron concentraciones de diversos plaguicidas en agua y sedimento con valores que no superan los NGC (Tabla 10).

Tabla 10. Niveles guías canadienses propuestos para la protección de la biota acuática.

NGC		
PLAGUICIDAS	Agua (µg/l)	Sedimento (µg/g)
Glifosato	65	--
Atrazina	2	--
Cyproconazole	--	--
2,4-D	4	--
Clorpirifos	0,0035	--
Metolaclor	8	--
METALES y As	Agua (µg/l)	Sedimento (µg/g)
Cr	2	37,3
Cu	2	35,7
Pb	2	35
As	5	5,9

NGC: niveles guías canadienses propuestos para la protección de la biota acuática. Valores expresados para sedimentos y muestras de agua superficial sin filtrar para plaguicidas, metales y As según Canadian Water Quality Guidelines (1997, 2008).

2.2 Etapa de aclimatación

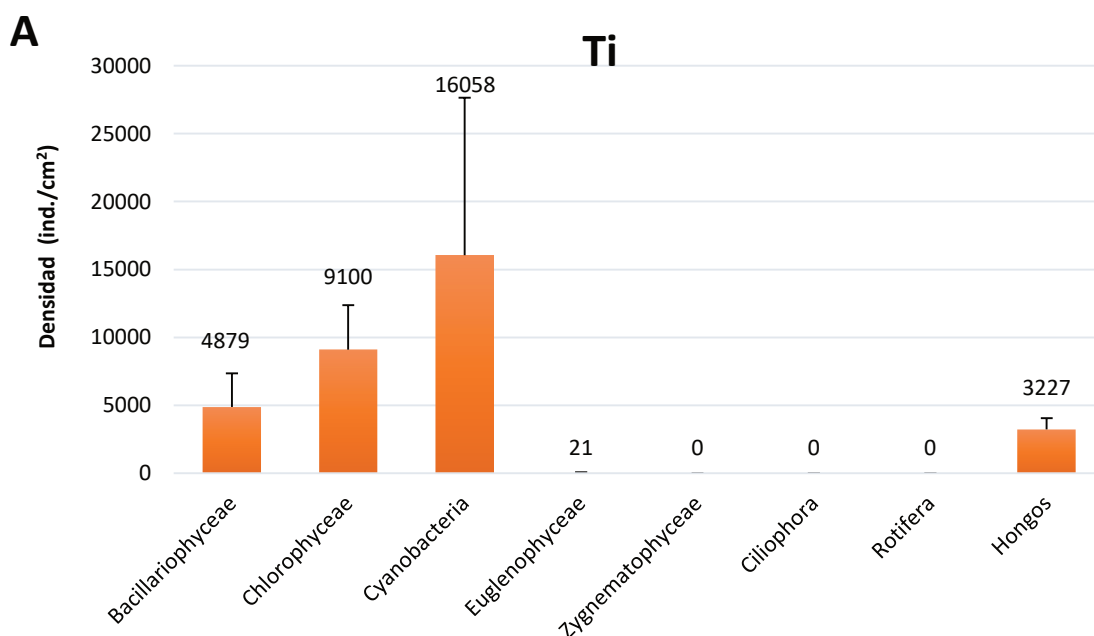
La etapa de aclimatación comenzó con el tiempo inicial (Ti). En esta instancia se registraron todos los parámetros para caracterizar el estado previo a la exposición de cada tratamiento. En la tabla 11 se pueden observar los valores registrados para cada parámetro y en la figura 16A la densidad de la composición del biofilm.

Tabla 11. Parámetros físico-químicos, nutrientes y biofilm (Media ± D.S.) obtenidos durante tiempo inicial.

Ti		Media ± D.S.
Parámetros físico-químicos	pH	9,03 ± 0,01
	OD	96,96 ± 1,78
	Temp.	20,28 ± 0,11
	Cond.	5,68 ± 0,02
	SD	3356 ± 0,01
	DBO ₅	10,53 ± 8,85
Nutrientes	Amonio	17,61 ± 0,71
	Nitratos	97 ± 82,80
	NID	114,61 ± 82,62
	PRS	337,07 ± 32,40
Biofilm	Chl- a	7,93 ± 3,17
	H'	1,5 ± 0,15
	S	11,6 ± 1,52
	PSLC	0,03 ± 0,01
	IA	72 ± 63,36

Ti: tiempo inicial, Media (N=5), D.S.: desvío standard. OD (%): oxígeno disuelto, Temp. (°C): temperatura, Cond. (mS/cm): conductividad, SD (mg/l): sólidos disueltos, DBO₅ (mg/l): prueba de demanda bioquímica de oxígeno de 5 días. Amonio (expresado como N-NH₄⁺ µg/l), Nitrato (expresado como N- NO₃⁻ µg/l), NID (µg/l): nitrógeno inorgánico disuelto, PRS (µg/l): fósforo reactivo soluble. Chl-a (mg/m²): clorofila "a", H': Diversidad de Shannon- Wiener, S: riqueza específica, PSLC (mg/cm²): peso seco libre de cenizas, IA: índice autotrófico.

En la figura 16B se observa la proporción de grandes grupos registrados en el tiempo inicial (Ti). El grupo predominante fue el de Cyanobacteria (48%), seguido por el de Chlorophyceae (27%), Bacillariophyceae (15%) y por último el de Hongos (10%). El valor promedio de Densidad total calculado para el Ti fue 3,64E⁺⁰⁴ ind./cm².



B Proporción de grandes grupos

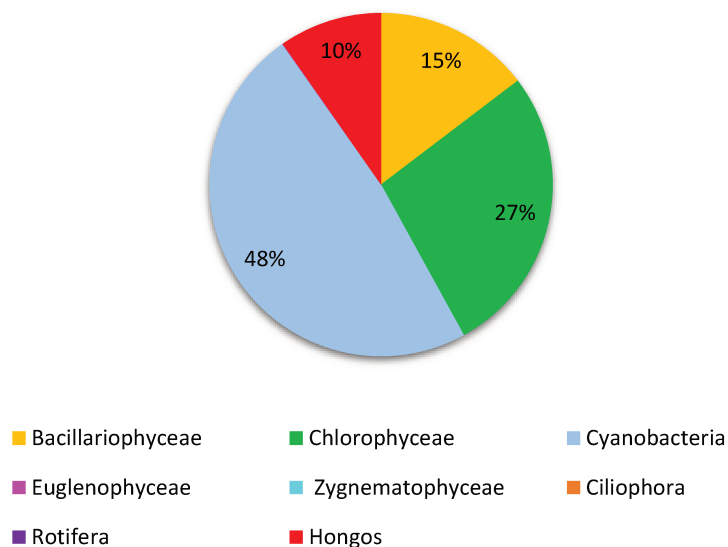


Figura 16. Densidades y proporción de los grandes grupos presentes en el biofilm al tiempo inicial (Ti). **A-** Representación de las densidad (ind./cm²) promedio (N=3) con sus respectivos desvíos standards. **B-** Representación porcentual de los grupos (%).

2.3 Etapa de exposición

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante la tercera etapa de la experiencia en laboratorio (etapa de exposición).

2.3.1 *Parámetros físico-químicos*

A) *Variables físico-químicas*

Los datos físico-químicos obtenidos en cada tiempo para cada tratamiento se presentan en la tabla 12 y los resultados de los ANOVA MR en la tabla 13. Se puede observar que los valores de pH, OD %, temperatura, conductividad y SD se mantuvieron sin mayores diferencias con respecto al Ti. Durante el transcurso de la exposición los valores registrados de pH fueron alcalinos, sin superar el valor de 10 (mín.: 8,95; máx.:9,56), con diferencias significativas entre los tiempos de exposición ($p < 0,05$). El OD % presentó un leve aumento a lo largo del tiempo ($p < 0,05$) y los mayores valores se observaron siempre en los tratamientos Control (C), Nutrientes (N) y Nutrientes-Glifosato (NG). Todos los tratamientos alcanzaron los máximos valores de este parámetro en el T5, presentando el tratamiento NG el máximo valor registrado (máx.: 199,6 %). En cambio, los valores mínimos de OD % se observaron en los tratamientos Glifosato (G), Atrazina (A), Nutrientes-Atrazina (NA), Glifosato-Atrazina (GA) y Nutrientes-Atrazina-Glifosato (NGA), alcanzando el menor valor en el tratamiento GA en el T1 (mín.: 90,7%), sin embargo, las variaciones entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,216$) (Tabla 13).

Los valores de conductividad y temperatura se mantuvieron similares entre tratamientos con diferencias significativas entre los diferentes tiempos ($p < 0,05$ en ambos casos) (Tabla 13). El rango de variación de la conductividad fue de baja magnitud (mín.: 5,1; máx.: 5,6 mS/cm), así como también el de la temperatura (mín.: 19,4; máx.: 21,1 °C). Los valores de SD de todos los tratamientos presentaron una disminución hacia el T3 y un posterior aumento hacia los siguientes tiempos ($p < 0,05$). El rango de variación de las medias de los tratamientos fue de baja magnitud (mín.: 2966,7; máx.: 3270 mg/l) y presentaron diferencias significativas entre los mismos ($p = 0,008$) (Tabla 13) (comparaciones parciales: G – NA ($p = 0,005$) y A – NA ($p = 0,02$), siendo NA el tratamiento con valores de media más altas).

Tabla 12. Parámetros físico-químicos (Media ± D.S.) obtenidos durante la etapa de exposición.

F-Q	pH	OD	Temp.	Cond.	SD
	Media ± D.S.	Media ± D.S.	Media ± D.S.	Media ± D.S.	Media ± D.S.
T0_C	9,17 ± 0,05	106,8 ± 5,2	20,8 ± 0,1	5,5 ± 0,03	3153,3 ± 11,6
T0_N	9,19 ± 0,06	105,7 ± 9,8	20,9 ± 0,2	5,5 ± 0,1	3203,3** ± 58,6
T0_G	9,04 ± 0,06	98,1 ± 7,3	21 ± 0,1	5,4 ± 0,03	3113,3 ± 30,6
T0_A	9,1 ± 0,14	97 ± 15,7	21,1** ± 0,3	5,5 ± 0,1	3130 ± 43,6
T0_NG	9,11 ± 0,14	108,9 ± 12,1	21 ± 0,3	5,5 ± 0,1	3163,3 ± 60,3
T0_NA	9,04 ± 0,12	97,4 ± 12,5	20,9 ± 0,2	5,5 ± 0,03	3173,3 ± 25,2
T0_GA	9,11 ± 0,08	98,1 ± 5,3	21,1** ± 0,2	5,5 ± 0,03	3163,3 ± 15,3
T0_NGA	9,13 ± 0,09	103,2 ± 9,8	21 ± 0,3	5,5 ± 0,1	3166,7 ± 47,3
T1_C	9,24 ± 0,13	140,6 ± 24,6	20 ± 1,3	5,5 ± 0,1	3170 ± 26,5
T1_N	9,2 ± 0,11	133,8 ± 22,1	19,7 ± 1,0	5,5 ± 0,1	3210 ± 62,5
T1_G	9,03 ± 0,1	103,7 ± 14,2	19,4* ± 0,3	5,3 ± 0,1	3123,3 ± 30,6
T1_A	9,01 ± 0,22	100,9 ± 27	20,1 ± 0,9	5,4 ± 0,02	3140 ± 34,6
T1_NG	9,21 ± 0,23	136,4 ± 37,6	20,2 ± 0,0	5,5 ± 0,03	3183,3 ± 25,2
T1_NA	8,99 ± 0,14	93,1 ± 17,9	19,5 ± 0,7	5,4 ± 0,04	3150 ± 10
T1_GA	9,04 ± 0,08	90,7* ± 12,6	19,9 ± 0,7	5,4 ± 0,1	3186,7 ± 20,8
T1_NGA	9,1 ± 0,13	96,9 ± 20,5	20,1 ± 0,4	5,4 ± 0,1	3113,3 ± 60,3
T3_C	9,31 ± 0,13	157,2 ± 36,8	20,4 ± 0,7	5,2 ± 0,02	3006,7 ± 25,2
T3_N	9,35 ± 0,16	149,1 ± 22,9	20,2 ± 0,9	5,2 ± 0,1	2990 ± 40
T3_G	9,21 ± 0,12	129 ± 15,7	19,7 ± 0,6	5,1* ± 0,04	2966,7* ± 32,2
T3_A	9,15 ± 0,22	129,3 ± 19,9	20,3 ± 0,6	5,2 ± 0,1	3013,3 ± 50,3
T3_NG	9,36 ± 0,38	161 ± 47,1	20 ± 0,4	5,2 ± 0,1	3073,3 ± 61,1
T3_NA	8,99 ± 0,22	108,5 ± 14	19,8 ± 0,2	5,2 ± 0,1	3096,7 ± 40,4
T3_GA	9,11 ± 0,19	114,3 ± 11,3	20 ± 0,7	5,1* ± 0,1	3016,7 ± 30,6
T3_NGA	9,1 ± 0,23	123 ± 32,1	19,9 ± 0,2	5,3 ± 0,1	3113,3 ± 102,6
T5_C	9,49 ± 0,08	195,9 ± 29,3	20,7 ± 0,7	5,4 ± 0,1	3053,3 ± 40,4
T5_N	9,56** ± 0,18	198,9 ± 22,1	20,5 ± 0,7	5,4 ± 0,1	3100 ± 20
T5_G	9,41 ± 0,14	165,3 ± 19,2	19,8 ± 0,6	5,3 ± 0,1	3070 ± 88,9
T5_A	9,3 ± 0,26	163 ± 31,2	20,4 ± 0,6	5,4 ± 0,1	3083,3 ± 115,9
T5_NG	9,56** ± 0,36	199,6** ± 43,9	20,1 ± 0,3	5,4 ± 0,2	3143,3 ± 61,1
T5_NA	9,18 ± 0,31	155,2 ± 34,3	19,9 ± 0,3	5,6** ± 0,1	3270 ± 65,6
T5_GA	9,26 ± 0,22	152,3 ± 18,5	20,2 ± 1,0	5,3 ± 0,2	3060 ± 43,6
T5_NGA	9,25 ± 0,31	158,4 ± 29,5	20 ± 0,2	5,4 ± 0,2	3163,3 ± 100,2
T7_C	9,19 ± 0,08	135 ± 30,8	20,4 ± 0,4	5,3 ± 0,1	3083,3 ± 64,3
T7_N	9,28 ± 0,11	134 ± 21,9	20,5 ± 0,5	5,4 ± 0,2	3083,3 ± 100,2
T7_G	9,18 ± 0,13	118,2 ± 14,9	20,1 ± 0,5	5,2 ± 0,1	3030 ± 81,9
T7_A	9,03 ± 0,2	120,2 ± 13,5	20,7 ± 0,6	5,2 ± 0,1	3010 ± 72,1
T7_NG	9,23 ± 0,36	137,4 ± 32,6	20,6 ± 0,3	5,3 ± 0,1	3060 ± 55,7
T7_NA	8,9* ± 0,34	105,3 ± 11,4	20,5 ± 0,3	5,3 ± 0,1	3096,7 ± 64,3
T7_GA	8,95 ± 0,18	111,7 ± 6,4	20,6 ± 0,8	5,4 ± 0,1	3130 ± 0
T7_NGA	9 ± 0,3	118,5 ± 19,7	20,4 ± 0,1	5,2 ± 0,1	3016,7 ± 55,1

Media (N=3), D.S.: desvío standard. OD (%): oxígeno disuelto, Temp. (°C): temperatura, Cond. (mS/cm): conductividad, SD (mg/l): sólidos disueltos. T0: Tiempo 0, T1: Tiempo 1, T3: Tiempo 3, T5: Tiempo 5, T7: Tiempo 7. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina. ** valores máximos; * valores mínimos.

Tabla 13. Resultados del ANOVA MR y el test a posteriori SNK para cada variable estudiada.

		ANOVA MR			A posteriori
		tiempo	Tratamiento	t*T	SNK
pH	p	0,000	0,448	0,111	
	η^2	0,300	0,283	0,088	
OD	p	0,000	0,216	0,182	
	η^2	0,625	0,360	0,100	
Temperatura	p	0,000	0,902	0,612	
	η^2	0,415	0,102	0,105	
Conductividad	p	0,000	0,076	0,292	
	η^2	0,636	0,250	0,250	
SD	p	0,000	0,008	0,075	G=A<C=GA=NGA=N=NG<NA
	η^2	0,556	0,286	0,375	
Amonio	p	0,192	0,087	0,356	
	η^2	0,079	0,202	0,279	
Nitrato	p	0,000	0,002	0,000	C<G=A=GA<N=NG<NA<NGA
	η^2	0,863	0,568	0,574	
NID	p	0,000	0,001	0,000	C=G=A=GA<N=NG<NA=NGA
	η^2	0,840	0,636	0,641	
SiD	p	0,000	0,354	0,098	
	η^2	0,908	0,287	0,153	
PRS	p	0,000	0,001	0,336	C=G=A<GA<N=NG<NA<NGA
	η^2	0,889	0,608	0,213	
PT ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	p	0,000	0,015	0,077	C<A=NG=NGA=N<GA=NA=G
	η^2	0,590	0,349	0,348	
PT (mg/g PS)	p	0,000	0,090	0,150	
	η^2	0,324	0,238	0,314	
Glifosato	p	0,009	0,000	0,160	C=N<NGA<G=NG=GA
	η^2	0,247	0,984	0,284	
AMPA	p	0,000	0,000	0,000	GA=NGA=NG=G<N<C
	η^2	0,966	0,744	0,806	
Atrazina	p	0,000	0,000	0,000	C=N<A=NA=GA=NGA
	η^2	0,844	0,998	0,732	

ANOVA MR: ANOVA de Medidas Repetidas. SNK: Student-Newman-Keuls. OD: oxígeno disuelto, SD: sólidos disueltos, NID: nitrógeno inorgánico disuelto, SiD: sílice disuelto, PRS: fósforo reactivo disuelto, PT: fósforo total. t*T: tiempo * Tratamiento. η^2 : eta cuadrado generalizado. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina. En negrita se resaltan los valores de $p < 0,05$.

B) Nutrientes y DBO₅

La adición de concentraciones basales de nutrientes efectuada en todos los microcosmos al comienzo de la etapa de exposición explica el incremento inicial de la concentración de todos los nutrientes (PRS, Si y formas del N) entre el Ti y el T1. La diferencia de magnitud en este incremento inicial en las concentraciones de PRS y las formas del N se relaciona directamente con el tipo de tratamiento que recibió cada microcosmo de acuerdo al diseño experimental detallado anteriormente. Para la interpretación de las figuras que se presentan a continuación se recuerda que los tratamientos N, NG, NA y NGA incluyeron como factor experimental la adición de nitrógeno y fósforo (simulando efecto de fertilizantes en el ambiente) a diferencia del

resto de los tratamientos cuyos niveles de nutrientes iniciales correspondieron a las concentraciones basales establecidas.

En la figura 17 se observa la evolución de las concentraciones de SiD (mg/l) registradas en cada tratamiento durante la etapa de exposición. Se observa la misma tendencia en todos los tratamientos con un incremento en el T3 y una disminución en el T7 ($p < 0,05$), presentando el factor tiempo una magnitud del efecto grande ($\eta_G^2 = 0,908$) (Tabla 13). En el T3 la máxima concentración se observó en el tratamiento G y la mínima en N (máx.: 40,17; mín.: 33,24 mg/l). En todos los casos en el T7 los valores registrados fueron menores que en el T1 (Figura 17).

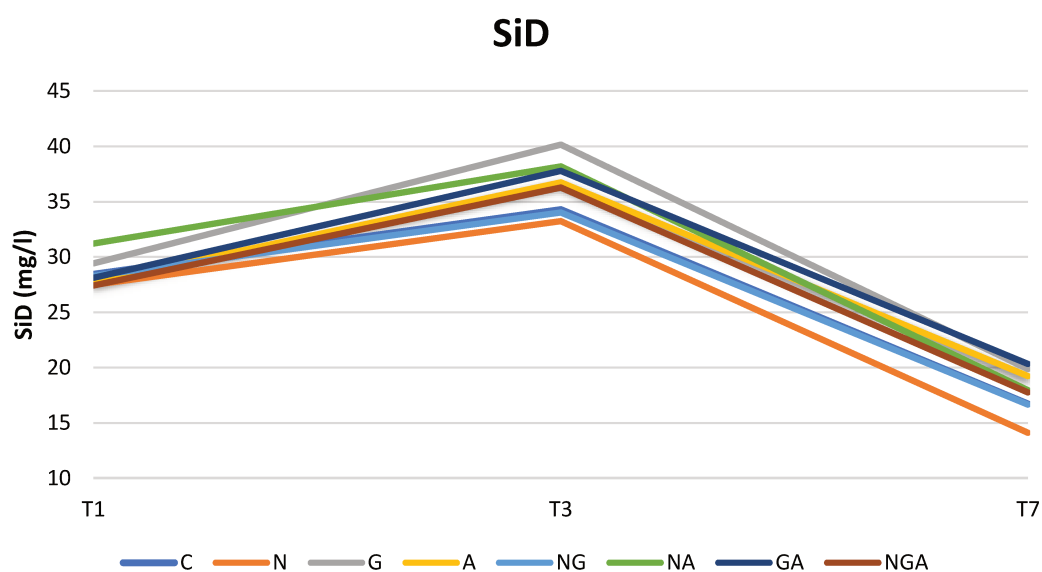


Figura 17. Concentración de sílice disuelto (SiD) (mg/l) registrada en cada tratamiento durante tres tiempos de exposición (T1, T3 y T7). Se representan los valores promedio de las réplicas (N=3) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

En la figura 18 se observan los valores de amonio (expresado como $N-NH_4^+$ $\mu g/l$) registrados para el T1 y tres tiempos distintos durante la experiencia. El máximo valor lo alcanzó el tratamiento Nutrientes-Atrazina (NA) con un valor de 60,86 $\mu gN/l$ en el T7. El mínimo valor se observó en los tratamientos C y N para el tiempo 3 (T3) (29,23 y 29,61 $\mu gN/l$ respectivamente). Se observaron tres tipos de tendencias: por un lado, los tratamientos C y N disminuyeron en sus concentraciones en T3 e incrementaron en T7; por otro lado, los tratamientos restantes mostraron un aumento hasta el T3 y en el T7 disminuyeron (G, A y GA) o aumentaron (NG, NA, NGA), alcanzando la máxima concentración en NA (60,85 $\mu gN/l$). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre tiempos ($p = 0,192$) ni tratamientos ($p = 0,087$) (Tabla 13).

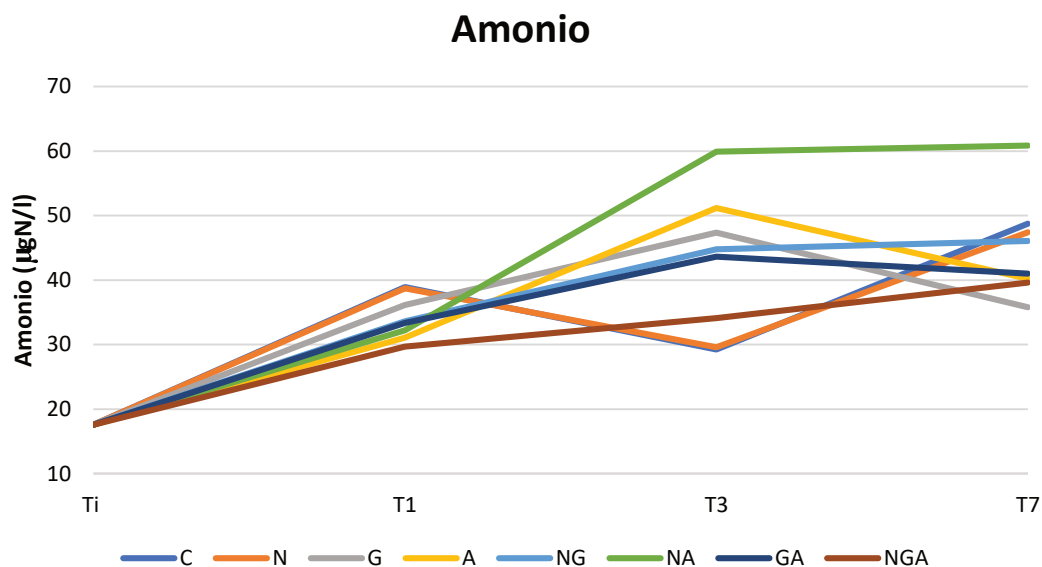


Figura 18. Concentración de amonio (expresado como $N-NH_4^+$ $\mu\text{g/l}$) registrada en cada tratamiento durante cuatro tiempos de exposición (Ti, T1, T3 y T7). Se representan los valores promedio de las réplicas ($N=3$) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

En la figura 19 se observan las concentraciones de nitrato (expresado como $N-NO_3^-$) registradas en cada tratamiento en el Ti y en la etapa de exposición. En el T1 los mayores valores se registraron en los tratamientos en los que se realizó adición de nutrientes N, NG, NA y NGA ($p=0,002$), con el valor máximo en el tratamiento NG (1448 $\mu\text{gN/l}$) (comparaciones parciales: C – NA ($p=0,046$), NGA – C ($p=0,005$), NGA - G ($p=0,014$), NGA - A ($p=0,03$) y NGA- GA ($p=0,031$)); las diferencias en la interacción tiempo y tratamiento (t^*T) fueron estadísticamente significativas ($p<0,05$) (Tabla 13). En el T3 se observó la disminución abrupta de la concentración en todos los tratamientos a valores menores que los iniciales (Ti), exceptuando en NA y NGA. En el T7 todos los tratamientos disminuyeron sus concentraciones a valores por debajo del límite de detección. Las diferencias entre tiempos fueron estadísticamente significativas ($p<0,05$) presentando una magnitud del efecto grande ($\eta^2=0,863$) (Tabla 13).

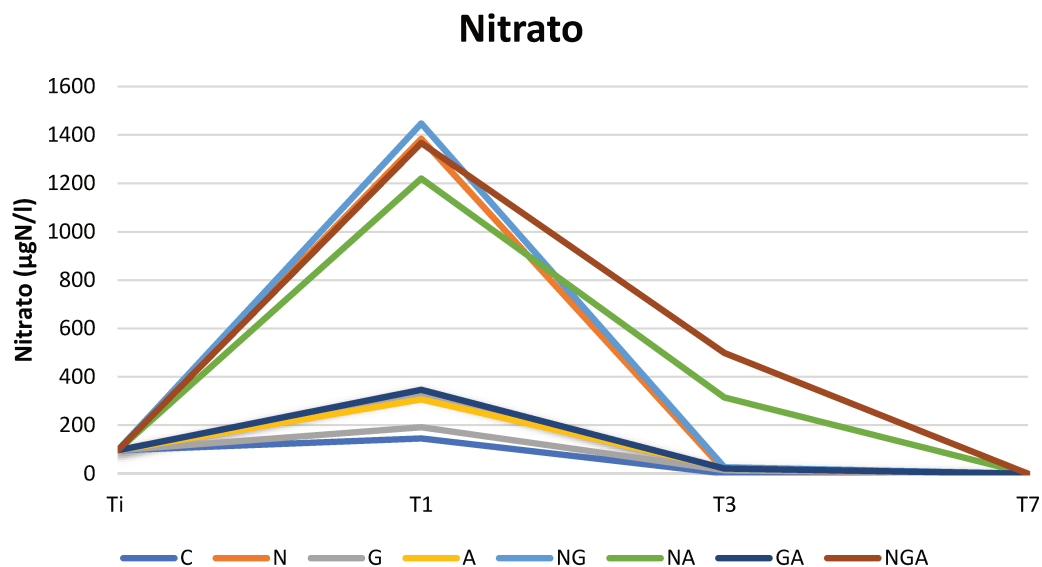


Figura 19. Concentración de nitrato (expresado como $N-NO_3^-$ $\mu\text{g/l}$) registrada en cada tratamiento durante cuatro tiempos de exposición (Ti, T1, T3 y T7). Se representan los valores promedio de las réplicas ($N=3$) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

Respecto a las concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto (NID), se observó un comportamiento similar a la evolución de las concentraciones de nitrato. El valor máximo alcanzado se observó en el T1 en el tratamiento NG (máx.: 1481,6 $\mu\text{g/l}$) y las concentraciones registradas en el T7 disminuyeron abruptamente (Figura 20). Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre tiempos ($p < 0,05$), entre tratamientos ($p = 0,001$) y en la interacción t^*T ($p < 0,05$); el factor tiempo presentó un magnitud del efecto grande ($\eta_G^2 = 0,840$) (Tabla 13) (comparaciones parciales: C – NA ($p = 0,008$), C – NGA ($p = 0,008$), G – NA ($p = 0,014$), G – NGA ($p = 0,014$), A – NA ($p = 0,038$), A – NGA ($p = 0,037$), GA – NA ($p = 0,041$) y GA – NGA ($p = 0,04$)).

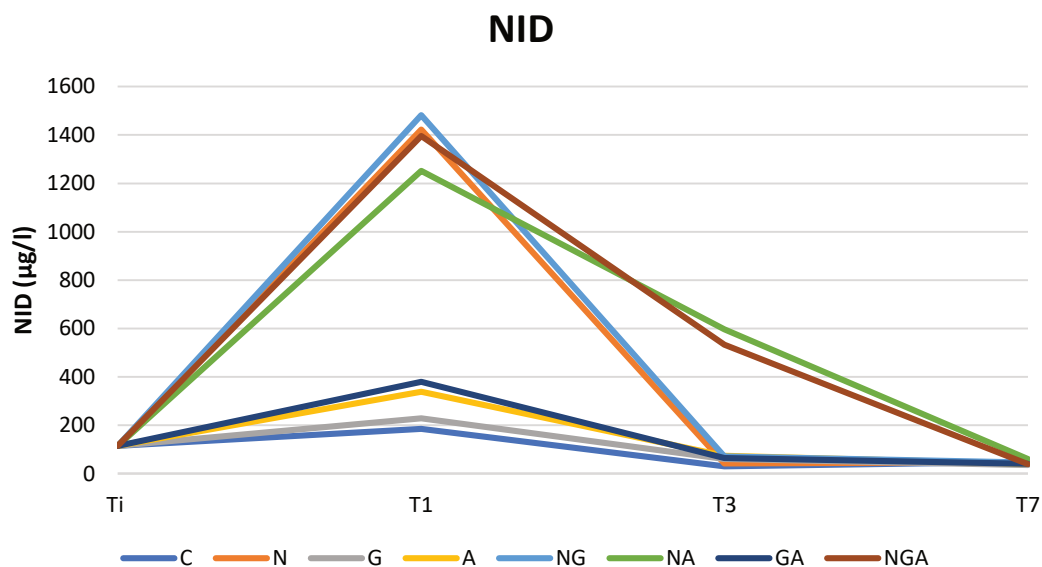


Figura 20. Concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) ($\mu\text{g/l}$) registrada en cada tratamiento durante cuatro tiempos de exposición (T_i , T_1 , T_3 y T_7). Se representan los valores promedio de las réplicas ($N=3$) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

En la figura 21 se presentan los valores de las concentraciones de fósforo reactivo soluble (PRS). En dicho gráfico se evidencian las mayores concentraciones en el T_1 y luego una disminución hacia el T_7 , presentando diferencias significativas en el tiempo ($p < 0,05$) con una magnitud del efecto grande ($\eta^2 = 0,889$) (Tabla 13). A su vez, los valores más altos en el T_1 se registraron en los tratamientos que recibieron adición de nutrientes (N, NG, NA, NGA), presentando el máximo valor el tratamiento NA (máx.: $1068 \mu\text{g/l}$); en cambio valores menores se registraron en los tratamientos que no fueron fertilizados (C, G, A, GA), esto se traduce en diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,001$) (comparaciones parciales: C – NA ($p = 0,015$), C – NGA ($p = 0,002$), G – NA ($p = 0,017$), G – NGA ($p = 0,003$) y A – NGA ($p = 0,009$)). En los tiempos 3 y 7, los mayores valores también correspondieron al primer grupo de tratamientos (N, NG, NA y NGA). El mínimo valor de PRS se registró en el tratamiento G en el T_7 (mín.: $19,12 \mu\text{g/l}$). Los tratamientos NGA y NA presentaron los mayores valores de media, como también NGA presentó una disminución menos pronunciada del PRS que el resto de los tratamientos en los tiempos 3 y 7.

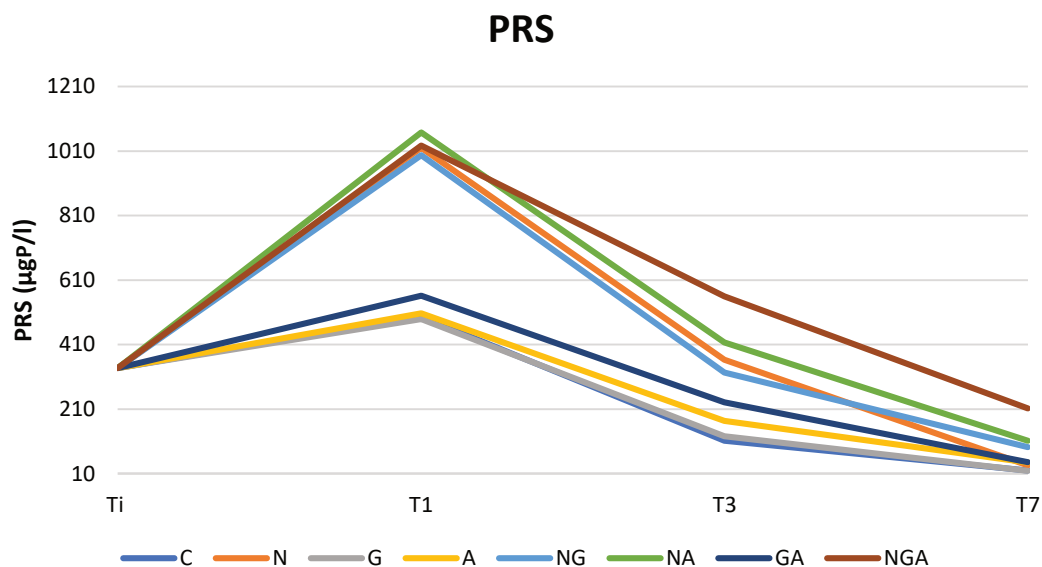


Figura 21. Concentración de fósforo reactivo soluble 'PRS', ($\mu\text{g/l}$) registrada en cada tratamiento durante cuatro tiempos de exposición (Ti, T1, T3 y T7). Se representan los valores promedio de las réplicas ($N=3$) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

En la figura 22 se observan las concentraciones de fósforo total (PT) registradas en el biofilm. En todos los tratamientos el biofilm presentó concentraciones similares de PT al T0. Luego de la fertilización, en T3 se evidenció un aumento de este nutriente en todos los tratamientos ($p < 0,05$) (Tabla 13). El mayor valor registrado correspondió al tratamiento GA en T3 ($0,89 \mu\text{g/cm}^2$), seguido por NA y N. Sin embargo, al tiempo final el mayor valor se registró en el tratamiento G ($0,84 \mu\text{g/cm}^2$), seguido por A y NA. El tratamiento C presentó los menores valores en T0 ($0,18 \mu\text{g/cm}^2$) y T7 ($0,31 \mu\text{g/cm}^2$), en cambio en T3 la menor concentración de PT se registró en el tratamiento A ($0,42 \mu\text{g/cm}^2$). Las diferencias entre tratamientos fueron estadísticamente significativas ($p = 0,015$) (comparaciones parciales: C – G ($p = 0,023$), C – NA ($p = 0,027$) y C – GA ($p = 0,028$)).

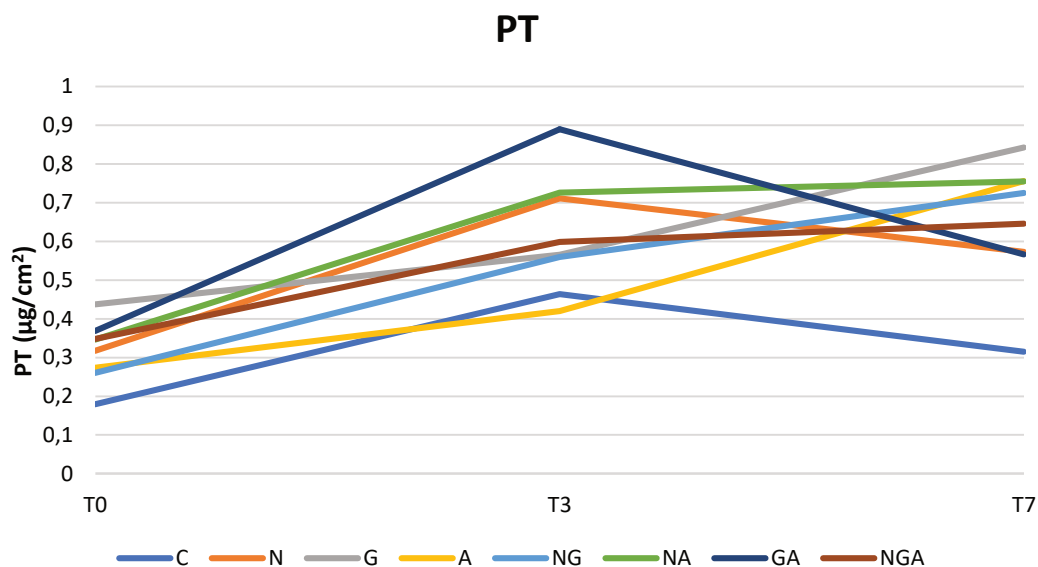


Figura 22. Concentración de fósforo total (PT) registrada en el biofilm durante tres tiempos de exposición (T0, T3 y T7), expresada en relación a la superficie ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Se representan los valores promedio de las réplicas ($N=3$) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

En la figura 23 también se pueden observar las concentraciones registradas de fósforo total en relación al peso seco, PT (PS). Se evidencia que todos los valores presentaron un aumento en el T3 con una posterior disminución hacia el T7, exceptuando el tratamiento A en que el aumento fue mínimo en el T3; el tratamiento NG en que los valores se mantuvieron similares durante el transcurso del tiempo, y también el tratamiento NGA en que se registró una disminución de sus concentraciones en T3 y un leve aumento en T7 ($p < 0,05$) (Tabla 13). El valor máximo se registró en el T3 en el tratamiento N (5,8 mg/gPS) y el mínimo en el T0 en el tratamiento C que no fue fertilizado (1,3 mg/gPS). Cabe señalar que los tratamientos C, N, G, NA y GA presentaron la misma tendencia de variación en sus valores, siendo mayores los valores en los tratamientos que se fertilizaron, N y NA, seguidos por G, GA y por último C.

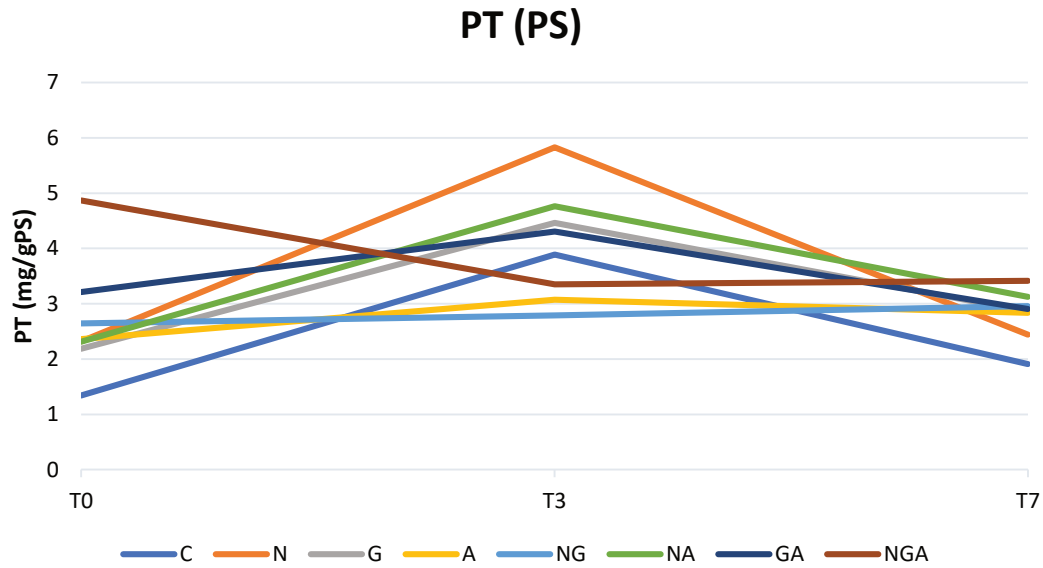


Figura 23. Concentración de fósforo total (PT) registrada en el biofilm durante tres tiempos de exposición (T0, T3 y T7), expresada en relación al peso seco (PS) (mg/gPS). Se representan los valores promedio de las réplicas (N=3) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

Por último, la figura 24 muestra los valores de DBO₅ registrados al inicio y final de la etapa experimental. En el Ti los tratamientos presentaron un valor promedio de 3,4 mg/l. A lo largo de la experiencia se registró un aumento en todos los tratamientos, con el mayor valor observado en el C y el menor en NG (máx.: 18,4; mín.: 11,7 mg/l).

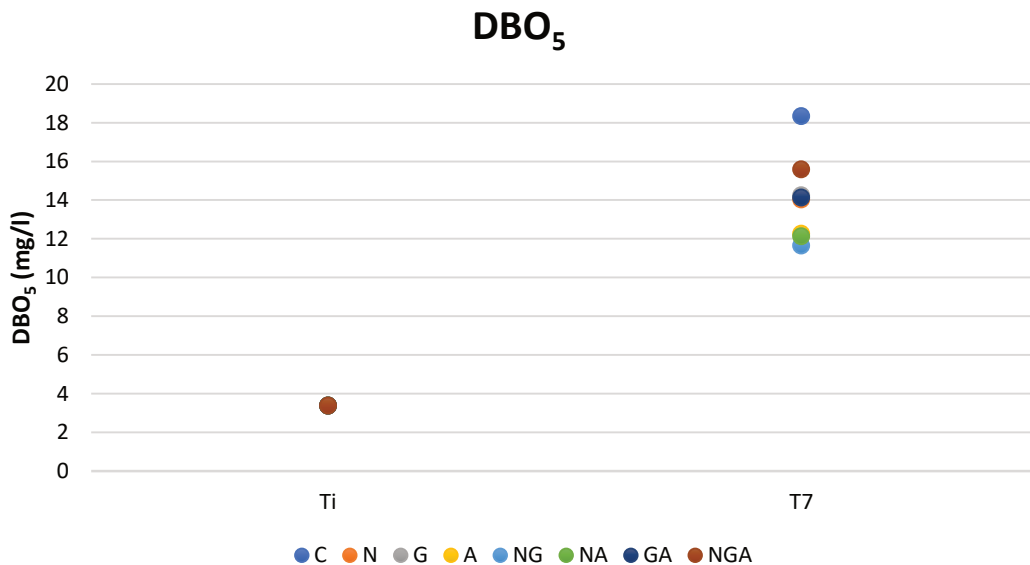


Figura 24. Concentración de DBO₅ (mg/l) registrada en cada tratamiento en el tiempo inicial y final de exposición (Ti y T7). Se representan los valores promedio de las réplicas (N=3) de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

C) *Herbicidas y AMPA*

En la tabla 14 se presentan las concentraciones de herbicidas y AMPA registradas durante la etapa de exposición. En cuanto al glifosato, las concentraciones estuvieron por debajo del límite de detección del equipo en los tratamientos C y N, en los que no se adicionó este herbicida. En los tratamientos en los que se adicionó glifosato se registraron concentraciones promedio de 0,6 a 0,7 mg/l (T0) y una muy leve disminución a lo largo de la experiencia con concentraciones promedio de 0,5 a 0,6 mg/l en el tiempo final (T7), estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre tiempos ($p=0,009$) y tratamientos ($p<0,05$) (Tabla 13), siendo G, NG y GA los tratamientos con mayores valores de medias (comparaciones parciales: C – G, C – GA, C – NG, C – NGA, G – N y N – GA, $p<0,05$ para todos los casos). El factor tratamiento presentó una magnitud del efecto grande en las concentraciones de glifosato ($\eta^2=0,984$) (Tabla 13). El análisis de estos resultados permitió advertir que en los 7 días de duración de la experiencia la degradación de este compuesto fue muy baja. El metabolito de degradación del glifosato, AMPA, detectado previamente en el agua de colonización en concentraciones de 0,011 mg/l (Tabla 9), fue registrado en concentraciones superiores en el T0 en todos los tratamientos (máx.: 0,11; mín.: 0,08 mg/l). En el T5 se observa una disminución de las concentraciones de AMPA en todos los tratamientos, a excepción del C y N en que este metabolito persiste. En el T7 en todos los tratamientos, independientemente de cual hubiera sido el factor experimental aplicado, las concentraciones de AMPA estuvieron por debajo del límite de detección. Estas variaciones en el tiempo, como también entre tratamientos y en la interacción t*T fueron estadísticamente significativas ($p<0,05$), siendo el factor tiempo un efecto de magnitud grande sobre las concentraciones ($\eta^2=0,966$) (Tabla 13) (comparaciones parciales: C – N ($p=0,049$), C – G ($p<0,05$), C – NG ($p<0,05$), C – GA ($p<0,05$), C – NGA ($p<0,05$), N – NG ($p=0,004$), N – NGA ($p=0,003$), G – N ($p=0,004$) y GA – N ($p=0,002$)).

En relación a la atrazina, en los tratamientos C y N las concentraciones registradas fueron mínimas (promedio 0,33 y 0,34 $\mu\text{g/l}$ respectivamente) y disminuyeron levemente a lo largo del tiempo hasta alcanzar el valor mínimo en el tratamiento C del T7 (0,31 $\mu\text{g/l}$). Cabe recordar que el agua extraída del sistema natural, empleada en la etapa de colonización y posteriormente en la de exposición, presentaba una carga mínima de atrazina ($0,2 \pm 0,1$), motivo por el cual sigue registrándose en los tratamientos en que no se agregó este compuesto (C y N), aunque en bajas concentraciones. En los tratamientos en los que se realizó la adición de atrazina se registraron concentraciones entre 43 y 46 $\mu\text{g/l}$ en el tiempo T0, concentraciones entre 36 y 38 $\mu\text{g/l}$ en el tiempo T5 y concentraciones entre 32 y 34 $\mu\text{g/l}$ en el tiempo T7 ($p<0,05$) (Tabla 13), lo que estaría evidenciando una alta persistencia de este herbicida en el agua. Los tratamientos en los

que se adicionó este herbicida (NGA, GA, NA y A) presentaron diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos C y N ($p < 0,05$) (comparaciones parciales: C – A, C – NA, C – GA, C – NGA, N – A, N – NA, N – GA y N – NGA, $p < 0,05$ para todos los casos). En cuanto al valor del η_G^2 , los factores tiempo y tratamiento presentaron una magnitud del efecto grande en las concentraciones de este herbicida ($\eta_G^2 = 0,844$ y $\eta_G^2 = 0,998$, respectivamente) (Tabla 13).

Tabla 14. Concentraciones de los herbicidas y AMPA (Media \pm D.S.) registradas en cada tratamiento y tiempo de exposición.

Muestra	Glifosato (mg/l)	AMPA (mg/l)	Atrazina (μ g/l)
	Media \pm D.S.	Media \pm D.S.	Media \pm D.S.
T0_C	ND	0,11 \pm 0,01	0,33 \pm 0,02
T0_N	ND	0,1 \pm 0	0,34 \pm 0,02
T0_G	0,73 \pm 0,01	0,08 \pm 0,04	SD
T0_A	SD	SD	43,7 \pm 1,75
T0_NG	0,64 \pm 0,21	0,09 \pm 0,03	SD
T0_NA	SD	SD	44,11 \pm 4,01
T0_GA	0,75** \pm 0,11	0,08 \pm 0,02	45,28 \pm 1,02
T0_NGA	0,56 \pm 0,08	0,08 \pm 0,01	46,43** \pm 2,65
<hr/>			
T5_C	ND	0,24** \pm 0,07	0,33 \pm 0,02
T5_N	ND	0,14 \pm 0,03	0,31* \pm 0,03
T5_G	0,58 \pm 0,08	0,05 \pm 0	SD
T5_A	SD	SD	37,26 \pm 0,67
T5_NG	0,67 \pm 0,08	0,03* \pm 0,01	SD
T5_NA	SD	SD	37,73 \pm 1,33
T5_GA	0,54 \pm 0,14	0,03* \pm 0	36,09 \pm 2,13
T5_NGA	0,42* \pm 0,08	0,04 \pm 0,01	37,9 \pm 1,18
<hr/>			
T7_C	ND	ND	0,31* \pm 0,03
T7_N	ND	ND	0,32 \pm 0,02
T7_G	0,53 \pm 0,04	ND	SD
T7_A	SD	SD	33,14 \pm 0,03
T7_NG	0,54 \pm 0,13	ND	SD
T7_NA	SD	SD	32,57 \pm 3,89
T7_GA	0,59 \pm 0,01	ND	33,82 \pm 0,48
T7_NGA	0,44 \pm 0,11	ND	33,07 \pm 1,17

Media (N=3), D.S.: desvío standard. T0: tiempo 0, T5: tiempo 5, T7: tiempo 7. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina. SD: Sin Dato, ND: No Detectable. Límite de cuantificación: Atrazina 1 μ g/l, Glifosato: 12 μ g/l, AMPA: 6 μ g/l. Límite de detección: Glifosato 4 μ g/l, AMPA 2 μ g/l. ** valores máximos; * valores mínimos.

2.3.2 Biofilm

A) Clorofila "a"

En la tabla 15 se presentan los datos promedio de Clorofila "a" para todos los tratamientos y tiempos de exposición. Se puede observar una disminución en el tiempo en el C, presentando el valor mínimo en T7 (mín.: 3,93 mg/m²). Contrariamente, se observó un incremento en la concentración de clorofila en el tratamiento NGA. En el resto de los tratamientos, las concentraciones aumentaron en el T3, disminuyeron en el T5 y volvieron a aumentar en el T7, presentando diferencias estadísticamente significativas entre tiempos, tratamientos y t*T (p=0,003, p=0,026 y p=0,034, respectivamente) (Tabla 16). El valor máximo se observó en el tratamiento A en el T7 (máx.: 17,08 mg/m²). Cabe señalar que los tratamientos A, NA y G presentaron una gran variabilidad entre réplicas en el T7.

Tabla 15. Concentraciones de clorofila "a" (Media ± D.S.) registradas en cada tratamiento y tiempo de exposición.

Clorofila "a" (mg/m ²)	T0	T1	T3	T5	T7
	Media ± D.S.	Media ± D.S.	Media ± D.S.	Media ± D.S.	Media ± D.S.
C	9,35 ± 2,17	8,02 ± 1,64	7,76 ± 2,29	5,85 ± 1,36	3,93* ± 0,32
N	6,89 ± 0,08	8,85 ± 0,78	9,1 ± 1,19	7,93 ± 0,73	6,55 ± 1,68
G	7,74 ± 2,03	9,1 ± 0,42	10,62 ± 0,96	8,31 ± 0,38	13,27 ± 4,12
A	5,77 ± 0,9	6,59 ± 0,95	7,01 ± 1,28	6,3 ± 1,51	17,08** ± 9,45
NG	8,15 ± 3,19	8,44 ± 0,81	8,56 ± 1,47	6,95 ± 0,96	6,98 ± 0,75
NA	7,38 ± 1,95	9,91 ± 1,25	8,63 ± 1	8,54 ± 0,49	12,74 ± 5,45
GA	8,85 ± 3,34	7,66 ± 1,05	9,9 ± 1,58	7,87 ± 1,62	9,9 ± 2,92
NGA	4,73 ± 0,83	7,66 ± 0,74	9,06 ± 0,62	11,23 ± 3,45	16,42 ± 2,86

Media (N=3) D.S.: desvío standard. T0: Tiempo 0, T1: Tiempo 1, T3: Tiempo 3, T5: Tiempo 5, T7: Tiempo 7. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina. ** valores máximos; * valores mínimos.

Tabla 16. Resultados del ANOVA MR y el test a posteriori SNK para cada variable estudiada.

		ANOVA MR			A posteriori
		tiempo	Tratamiento	t*T	SNK
Clorofila "a"	p	0,003	0,026	0,034	NG=C=N=A=GA=NA=NGA=G
	η^2	0,260	0,206	0,431	
Densidad Total	p	0,000	0,522	0,042	
	η^2	0,624	0,179	0,285	
Bacillariophyceae	p	0,000	0,693	0,05	
	η^2	0,801	0,150	0,248	
Cyanobacteria	p	0,000	0,186	0,147	
	η^2	0,315	0,226	0,266	
Zygnematophyceae	p	0,341	0,642	0,865	
	η^2	0,043	0,107	0,159	
Chlorophyceae	p	0,000	0,331	0,106	
	η^2	0,626	0,194	0,281	
Euglenophyceae	p	0,691	0,624	0,687	
	η^2	0,028	0,059	0,230	
Ciliophora	p	0,247	0,016	0,21	NGA=C<A=N=NG=NA=G<GA
	η^2	0,069	0,190	0,322	
Rotifera	p	0,031	0,603	0,01	
	η^2	0,138	0,081	0,439	
Hongos	p	0,000	0,494	0,019	
	η^2	0,638	0,069	0,482	
Diversidad de Shannon	p	0,000	0,572	0,193	
	η^2	0,308	0,108	0,275	
Riqueza	p	0,061	0,143	0,008	
	η^2	0,100	0,172	0,406	
PSLC	p	0,000	0,704	0,006	
	η^2	0,338	0,115	0,338	
IA	p	0,000	0,427	0,000	
	η^2	0,298	0,150	0,462	

ANOVA MR: ANOVA de Medidas Repetidas. SNK: Student-Newman-Keuls. PSLC: peso seco libre de cenizas, IA: índice autotrófico. t*T: tiempo * Tratamiento. η^2 : eta cuadrado generalizado. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina. En negrita se resaltan los valores de $p < 0,05$.

B) Densidad y Composición

La figura 25 presenta las densidades totales del biofilm observadas en cada tratamiento a lo largo del tiempo, expresadas en ind./cm². Del análisis de esta figura se puede advertir que el tratamiento C presentó las menores densidades en la mayoría de los tiempos estudiados, así como NGA las mayores, siendo en T0 estadísticamente significativa la diferencia entre los mismos ($p = 0,042$) (Tabla 16). El tratamiento N, cuyo factor experimental fue la adición de nutrientes, muestra un incremento progresivo en el tiempo de la densidad, alcanzando en el T7 los mayores valores. El tratamiento G, mostró una evolución similar al tratamiento N, llegando también a las máximas densidades en el T7. En cuanto al tratamiento A, la densidad mostró una evolución menos clara, disminuyendo inicialmente (T1) para luego incrementar hacia el final de la experiencia, alcanzando valores levemente inferiores a los tratamientos N y G. Por su parte el tratamiento NG presentó densidades prácticamente constantes hasta el T3

evidenciando un crecimiento muy marcado en el T5 y una disminución también marcada en el T7, alcanzando densidades finales similares a las registradas en el C. En el tratamiento NA la densidad se fue incrementando progresivamente hasta el T5 y disminuyó marcadamente en el T7. El tratamiento GA mostró un incremento progresivo hasta el T5 y una abrupta disminución en el T7 presentando los menores valores de densidad respecto a los otros tratamientos. Por último, el tratamiento NGA presentó mayor densidad inicial, se mantuvo en el tiempo, aumentando marcadamente en el T5 y disminuyendo abruptamente en el T7; también los valores de densidad en este tratamiento presentaron una alta variabilidad entre réplicas. Cabe destacar que en líneas generales analizando la evolución de las densidades se pueden distinguir 2 grupos de tratamientos: aquellos cuya densidad se fue incrementando en el tiempo (C, N, G y A) y el resto en que, luego de un marcado incremento en el T5 se observa una disminución abrupta en el T7 como es el caso de NG, NA, GA y NGA; estas diferencias en el tiempo fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), siendo de magnitud moderada el efecto del factor tiempo sobre las densidades totales ($\eta_G^2 = 0,624$) (Tabla 16).

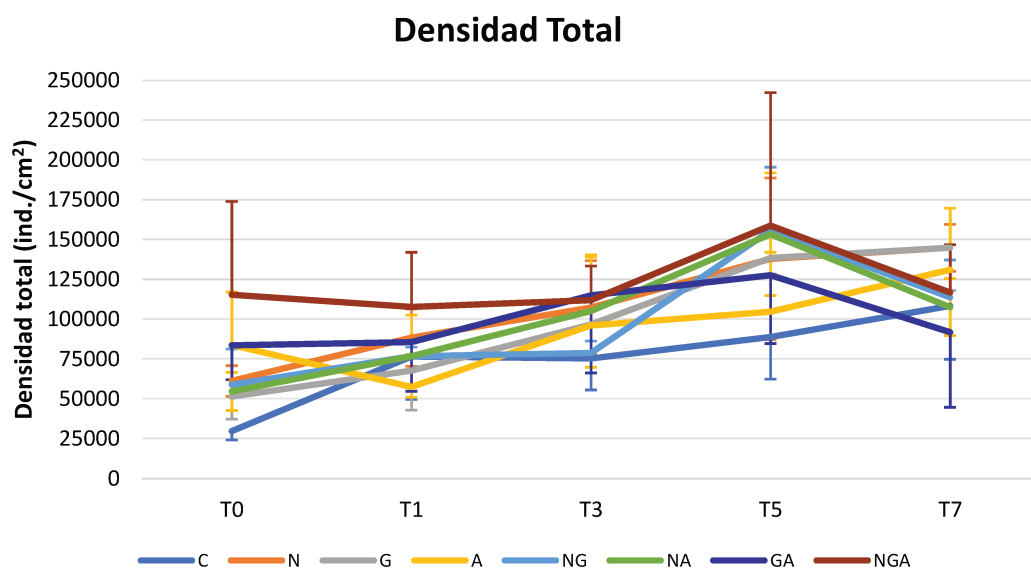


Figura 25. Densidades totales (ind./cm²) registradas en cada tratamiento a lo largo del tiempo. Se representan las medias (N=3) y desvíos standards de las réplicas de cada tratamiento. T0: Tiempo 0, T1: Tiempo 1, T3: Tiempo 3, T5: Tiempo 5, T7: Tiempo 7. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

La composición del biofilm mostró cambios a lo largo de la experiencia. En las figuras 26 (A – H), se presenta la densidad (ind./cm²) del biofilm y su composición a nivel de grandes grupos observadas en cada tratamiento en los distintos tiempos de la etapa de exposición. Se observa en líneas generales, el reemplazo progresivo de Cyanobacteria por Bacillariophyceae como grupo dominante. En T0 todos los tratamientos presentaron una composición dominada por Cyanobacteria, la densidad alcanzada por este grupo duplicó en casi todos los tratamientos a la de los grupos

subdominantes (Bacillariophyceae y Chlorophyceae). En T1 la composición se mantuvo similar a la observada en T0. En T3 Bacillariophyceae alcanzó valores cercanos a Cyanobacteria, convirtiéndose incluso en el grupo dominante en algunos tratamientos (C y N). En T5 se observa una marcada dominancia de Bacillariophyceae en los tratamientos C, N y NG mientras que en el resto de los tratamientos la importante representación de los grupos subdominantes hace que no exista un predominio marcado de Bacillariophyceae. En el T7 el grupo dominante fue el de las Bacillariophyceae en todos los tratamientos. Los grupos que presentaron las mayores densidades con variaciones entre tiempos fueron Bacillariophyceae ($p < 0,05$), Cyanobacteria ($p < 0,05$) y Chlorophyceae ($p < 0,05$), siendo el tiempo un factor con magnitud de efecto grande en los valores de densidades de Bacillariophyceae ($\eta_G^2 = 0,801$) (Tabla 16). Por otro lado, los grupos que estuvieron menos representados a lo largo de la experiencia presentaron variaciones en sus densidades entre tiempos, como es el caso de Hongos ($p < 0,05$), o entre tratamientos, como es el caso de Ciliophora ($p = 0,016$) (Tabla 16) (comparaciones parciales: C – GA ($p = 0,014$) y GA – NGA ($p = 0,009$)).

Como mencionamos anteriormente, en los tratamientos C y N (Figura 26 A), el reemplazo de Cyanobacteria por Bacillariophyceae como grupo dominante se evidencia desde el T3 y aumenta hacia el T5. Sin embargo, el reemplazo de Cyanobacteria por Bacillariophyceae en los tratamientos restantes (Figuras 26 C – H) fue más lento, predominando Bacillariophyceae recién a partir del T5 en G, A, NG, NA, GA y a partir del T7 en NGA (Figura 26 H). También se puede observar que en todos los tratamientos a partir del T5 los Hongos estuvieron representados en un porcentaje superior (alcanzando el 20% en el tratamiento NGA) con una disminución en el T7 en la mayoría de los casos. Asimismo, se puede observar que el tratamiento NGA (Figura 26 H) presentó los mayores valores de densidad para el grupo Cyanobacteria en los tiempos iniciales de la experiencia: T0 ($7,7E^{+04}$ ind./cm²), T1 ($7,5E^{+04}$ ind./cm²) y en T3 ($6E^{+04}$ ind./cm²). Sin embargo, en T5 y T7 los valores máximos se observaron en el tratamiento N (Figura 26 B) en el grupo Bacillariophyceae ($7,9E^{+04}$ y $8,3E^{+04}$ ind./cm²).

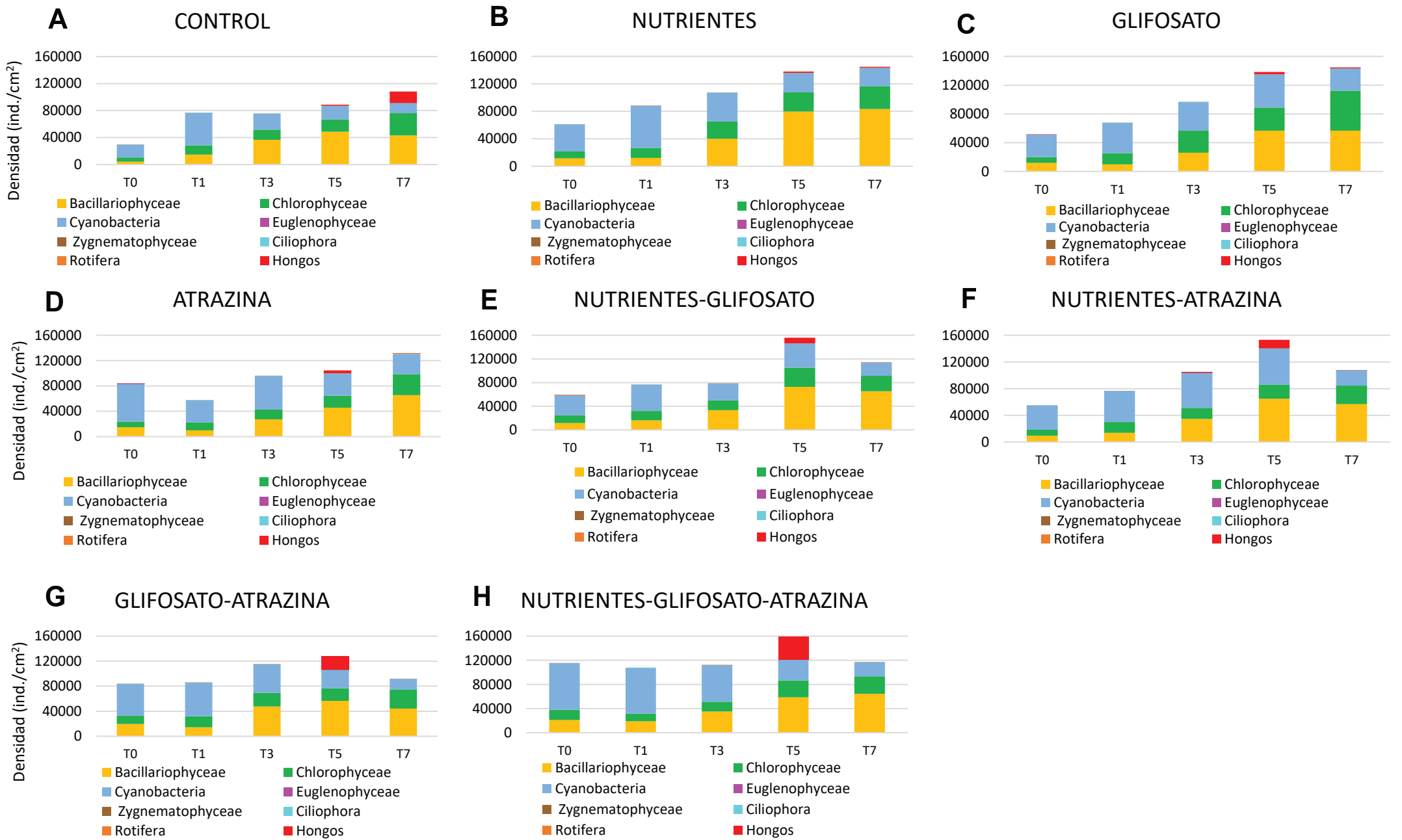


Figura 26. Gráficas de barras apiladas representando las densidades (ind./cm²) de los grandes grupos del biofilm registradas en cada tratamiento (A-H) a lo largo de la etapa de exposición. T0: tiempo 0, T1: tiempo 1, T3: tiempo 3, T5: tiempo 5, T7: tiempo 7.

C) Índice de diversidad y riqueza

En la tabla 17 se presentan los valores de diversidad y riqueza de especies. Se puede observar que la riqueza específica varió de manera muy diversa entre tratamientos, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,143$) (Tabla 16). Los tratamientos NG y NGA fueron los que más variación presentaron a lo largo del tiempo, a su vez mostraron una evolución de este parámetro completamente inversa. La riqueza de especies en el tratamiento NG fue de 21 en el T0 y disminuyó a 13 en el T7; en cambio, en el tratamiento NGA la riqueza se incrementó de 11 (T0) a 17 (T7). El mínimo valor de riqueza se observó en el C en el T0, en cambio el máximo fue observado en NG en el T0 y en A en el T7. En el tiempo final, T7, C y NG presentaron el mínimo valor de riqueza (13), en cambio el tratamiento A el máximo (21), estas diferencias entre tratamientos en T7 fueron estadísticamente significativas ($p=0,008$) (Tabla 16). Por otro lado, el índice de diversidad de Shannon-Wiener presentó valores entre 1,08 y 1,58, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 16). Se puede destacar que en el tratamiento C el índice fue en aumento a lo largo del tiempo, similar a lo observado en el tratamiento A. En el tratamiento N el índice presentó valores similares entre los tiempos, exceptuando un marcado aumento en T3. En líneas generales, todos los tratamientos presentaron los menores valores (entre 1,08 y 1,2) en los dos primeros tiempos analizados, T0 y T1, excepto en los tratamientos G y NG que sus valores iniciales fueron superiores (1,27 y 1,41, respectivamente en el T0). En cuanto a los valores registrados en el T5 y el T7, se observó que el índice de diversidad fue superior en el T5, disminuyendo en el T7 en todos los tratamientos, excepto en el control, donde se registró el valor más alto al finalizar el ensayo. Las diferencias entre tiempos fueron estadísticamente significativas ($p<0,05$) (Tabla 16).

Tabla 847. Valores de riqueza (S) y del índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') registrado en cada tratamiento y tiempo de exposición.

	T0		T1		T3		T5		T7	
	S	H'	S	H'	S	H'	S	H'	S	H'
C	10*	1,14	14	1,19	13*	1,2*	19**	1,42	13*	1,47**
N	15	1,17	18**	1,19	15	1,57**	15	1,19*	17	1,18*
G	19	1,32	16	1,27	15	1,48	18	1,52	20	1,35
A	18	1,08*	15	1,25	13	1,27	14	1,4	21**	1,39
NG	21**	1,41**	16	1,3	15	1,35	13*	1,37	13*	1,22
NA	16	1,14	14	1,33**	19**	1,36	14	1,43	17	1,25
GA	13	1,19	14	1,13	18	1,37	18	1,58**	13*	1,2
NGA	11	1,09	13*	1,09*	16	1,27	15	1,57	17	1,23

T0: Tiempo 0, T1: Tiempo 1, T3: Tiempo 3, T5: Tiempo 5, T7: Tiempo 7. S: riqueza específica, H': diversidad de Shannon-Wiener. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina. ** valores máximos; * valores mínimos.

D) Peso Seco Libre de Ceniza

En la figura 27 se presentan los datos promedio de PSLC (expresados en relación a la superficie muestreada). Se observa que, en la mayoría de los casos, exceptuando los tratamientos NG, NA y NGA, el PSLC aumenta en el T1, siendo este incremento muy marcado en el tratamiento N. En el T3 disminuyen los valores de PSLC en todos los tratamientos de manera evidente y vuelven a incrementarse en el T5 y T7. Los menores valores se observaron en el T3 (mín.: 0,04; máx.:0,12 mg/cm²) y los mayores en el T7 (mín.: 0,13; máx.: 0,24 mg/cm²) ($p < 0,05$) (Tabla 16). Se puede observar además que entre los tratamientos no se evidenciaron diferencias significativas (Tabla 16). En T1 en el tratamiento N se diferenció del resto de los tratamientos, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,006$) registrando el máximo valor (0,26 mg/cm²), mientras que en NGA el menor valor (0,07 mg/cm²). Por otro lado, el PSLC registrado en el T7 en los tratamientos G y A fue de mayor magnitud respecto al resto de los tratamientos. Por último, cabe señalar que el tratamiento GA a diferencia de los demás, disminuyó en T7.

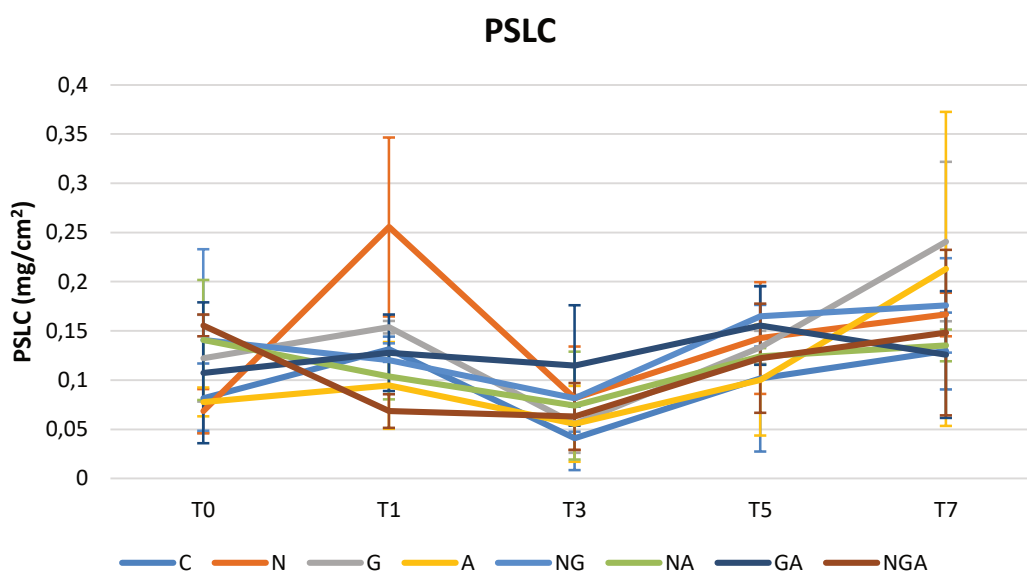


Figura 27. Valores de PSLC (mg/cm²) registrados en cada tratamiento a lo largo del tiempo (T0, T1, T3, T5 y T7). Se representan las medias (N=3) y desvíos standards de las réplicas de cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina.

E) Índice Autotrófico

Los valores obtenidos para el IA se muestran en la figura 28 en la que se observa que la mayoría de los tratamientos presentaron dominancia de autótrofos (IA < 200) a lo largo de la experiencia sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos; la dominancia de organismos heterótrofos se observó sólo en algunos tratamientos y tiempos de exposición, siendo estadísticamente significativas las diferencias entre tiempos ($p < 0,05$) (Tabla 16). En el caso del C, presentó valores menores a 200 en todos

los tiempos con la excepción del T7 que presentó predominio de heterótrofos. Por su parte, el IA en el tratamiento N reflejó el predominio de autótrofos en T0, T3 y T5, mientras que en T1 y T7 dominaron los heterótrofos. Este tratamiento en el T1 fue el único que presentó valores mayores a 200 ($p < 0,05$) (Tabla 16), lo que también se evidenció en los valores de PSLC. En el caso de los tratamientos G y A se mantuvieron con predominancia de autótrofos a lo largo de todos los tiempos, similar a lo ocurrido en el tratamiento GA. En relación al tratamiento NG los valores registrados evidenciaron predominio de heterótrofos en el T0 y luego en T5 y T7, siendo el tratamiento que en más oportunidades presentó predominio de heterótrofos. Los valores del índice en los tratamientos NA y NGA mostraron predominio de heterótrofos en el T0, pero a partir del T1 y hasta el T7 mostraron predominio de la fracción autotrófica. En T3 ningún tratamiento presentó dominancia de heterótrofos.

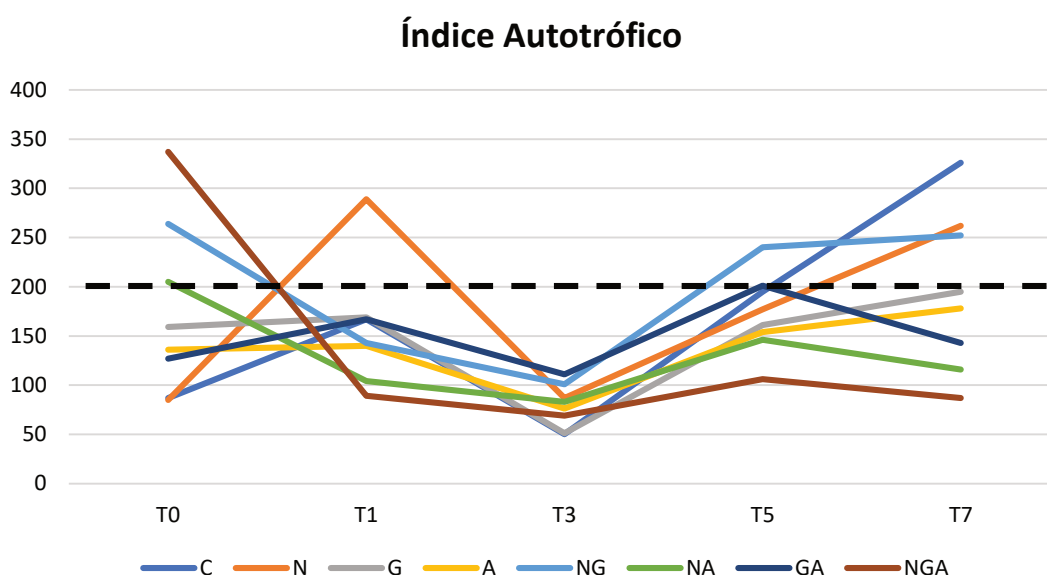


Figura 28. Variaciones en el tiempo (T0, T1, T3, T5 y T7) de los valores promedio (N=3) del Índice Autotrófico en cada tratamiento. C: control, N: nutrientes, G: glifosato, A: atrazina, NG: nutrientes-glifosato, NA: nutrientes-atrazina, GA: glifosato-atrazina, NGA: nutrientes-glifosato-atrazina. Valores mayores a 200 (señalado con línea punteada) indican que en el biofilm predominan los organismos heterótrofos.

2.4 Efectos de los factores experimentales sobre el biofilm

En la tabla 18 se presentan los resultados de las correlaciones entre las variables que resultaron estadísticamente significativas. Se destacan a continuación las relaciones más relevantes. El pH se correlacionó de manera positiva con el OD % y la densidad de Bacillariophyceae. A su vez, el OD % lo hizo positivamente con la densidad de Bacillariophyceae, Chlorophyceae y Hongos. La conductividad se correlacionó positivamente con la densidad de Chlorophyceae y negativamente con la densidad de

Bacillariophyceae y la concentración de clorofila "a". Por su parte, la concentración de SD se relacionó de manera negativa con las densidades de Bacillariophyceae y Chlorophyceae, y positivamente con la densidad de Cyanobacteria.

Por otro lado, las concentraciones de nitrato, NID, PRS y SiD se correlacionaron negativamente con las densidades de Bacillariophyceae y Chlorophyceae, y positivamente con la densidad de Cyanobacteria. Por su parte, la concentración de PT en relación a la superficie muestreada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), se correlacionó positivamente con la densidad de Bacillariophyceae y Chlorophyceae, y las concentraciones de clorofila "a", y de manera negativa con las concentraciones de nitratos, NID y PRS. El PT (mg/gPS - expresado en función al peso seco) se correlacionó de manera positiva con las concentraciones de SiD, glifosato y atrazina. La DBO_5 se correlacionó positivamente con la densidad de Hongos.

En cuanto a las concentraciones de herbicidas registradas, el AMPA se correlacionó de forma negativa con la densidad de Chlorophyceae, y por su parte la atrazina de manera positiva con la densidad de Cyanobacteria y negativa con el pH.

La densidad de Bacillariophyceae presentó correlaciones positivas con la densidad de Chlorophyceae y negativas con Cyanobacteria. En cambio, la densidad de Chlorophyceae se relacionó con la concentración de clorofila "a" positivamente y con Cyanobacteria negativamente.

El índice de diversidad Shannon-Wiener se correlacionó positivamente con las concentraciones de oxígeno disuelto y con las densidades de Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Euglenophyceae y Hongos; y negativamente con los valores de temperatura, conductividad y SD. La riqueza específica, por su parte, se correlacionó positivamente con las concentraciones de clorofila "a", PT, y con las densidades de Euglenophyceae, Ciliophora y Rotifera.

Tabla 18. Matriz de correlación con los valores de *r* (coeficiente de Pearson) entre las variables físico-químicas registradas y los parámetros del biofilm.

	pH	OD	Temp	Cond	Sólidos	Bacill.	Chloro.	Cyano.	Eugleno.	Zygnemato.	Cilioph.	Rotifera	Hongos	Chl- a	PSLC	IA	Amonio	Nitratos	NID	PRS	PT	PT	Sílice	DBO	Glifo.	AMPA	Atra.	
pH	---																											
OD	,887**	---																										
Temp			---																									
Cond			,360*	---																								
Sólidos				,913**	---																							
Bacill.	,412**	,635**		,417**	-,434**	---																						
Chloro.		,400*		,519**	-,457**	,802**	---																					
Cyano.					,342*	-,348*	-,324*	---																				
Eugleno.									---																			
Zygnemato.										---																		
Cilioph.											---																	
Rotifera												---																
Hongos	,369*	,523**					,513**	,383*					---															
Chl- a							,406**	,374*						---														
PSLC							,352*	,314*							---													
IA							,387*									---												
Amonio								,433*									---											
Nitratos																		---										
NID																			---									
PRS																				---								
PT																					---							
PT																						---						
Sílice																							---					
DBO																								---				
Glifo.																									---			
AMPA																										---		
Atra.																											---	

OD (%): oxígeno disuelto, Temp. (°C): temperatura, Cond. (mS/cm): conductividad, SD (mg/l): sólidos disueltos. Densidades de organismos (ind./cm²): Bacill.: Bacillariophyceae, Chloro.: Chlorophyceae, Cyano.: Cyanobacteria, Eugleno.: Euglenophyceae, Zygnemato.: Zygnematophyceae, Cilioph.: Ciliophora. S: riqueza específica, H: diversidad de Shannon-Wiener, Chl-a (mg/m²): clorofila "a", PSLC (mg/cm²): peso seco libre de cenizas, IA: índice autotrófico. Amonio (expresado como N-NH₄⁺ µg/l), Nitrito (expresado como N-NO₂⁻ µg/l), NID (µg/l): nitrógeno inorgánico disuelto, PRS (µg/l): fósforo reactivo soluble, PT (1) (µg/cm²): fósforo total, PT (2) (mg/gPS): fósforo total, SiD (mg/l): sílice disuelto, DBO₅ (mg/l): prueba de demanda bioquímica de oxígeno de los 5 días. Glifosato (mg/l), AMPA (mg/l), Atrazina (mg/l). ** para p<0,01; * para p<0,05.

3. Discusión

Las alteraciones en la calidad del agua de los sistemas acuáticos se deben principalmente a la influencia inmediata de actividades antrópicas como la urbanización, la industria, el cambio de uso del suelo y alteraciones de los cursos de agua (Malmqvist & Rundle, 2002). Como antes se mencionó, Argentina es un país con importante actividad agrícola-ganadera, por lo que esta actividad en sí misma, así como la eliminación de zonas de humedales y meandros a favor del desarrollo de nuevas áreas cultivables, son importantes factores de cambios en los sistemas acuáticos de nuestro país. Como consecuencia de la actividad agrícola ingresan a los cuerpos de agua altas cantidades de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) utilizados en los campos de siembra. El exceso de nutrientes, producto de la fertilización de suelos, produce la eutrofización, proceso que en el cuerpo de agua disminuye la eficiencia de captación de nutrientes, se satura y pierde gran parte de su capacidad de autodepuración, como así también conduce a un aumento de la biomasa de algas y macrófitas, generando una marcada disminución del oxígeno disuelto durante la noche incluso hasta valores letales para algunos organismos (Elosegi & Sabater, 2009).

En lo que respecta a los herbicidas, la toxicidad y persistencia varía entre los distintos formulados, pero todos causan impactos en los ecosistemas fluviales, más cuando se bioacumulan a través de la red alimentaria y llegan en ciertos casos a alterar la estructura biótica de los cuerpos de agua (Rodríguez Capítulo et al., 2010). Por otro lado, las elevadas concentraciones de metales registradas en los sistemas acuáticos, tanto en agua como en sedimentos, generan un potencial riesgo para estos ambientes. Su origen e ingreso se debe principalmente a la actividad industrial que, en la región estudiada, está representada en un 21% por la industria del curtido de cuero animal, seguida por producciones como las de acero inoxidable, vidrio, pigmentos, fungicidas y baterías. El riesgo reside en su toxicidad, persistencia y alto potencial de bioacumulación afectando la vida acuática y humana (Regaldo et al., 2017).

Frente al desafío de un abordaje integral de esta problemática, la comunidad científica busca complementar el monitoreo de los sistemas acuáticos con los estudios experimentales en laboratorio con el fin de predecir el impacto de las sustancias químicas sobre la biota, mediante estudios donde se observan respuestas ecotoxicológicas en diferentes niveles de organización biológica (biomarcadores, a nivel de individuo, población o comunidad), empleando distintas escalas de análisis. La realización de estudios ecotoxicológicos a escala de microcosmos y mesocosmos permite, entre otras cosas, evaluar el efecto de las sustancias químicas sobre el nivel de comunidades biológicas, en condiciones controladas, con mayor replicación, aportando aproximaciones complementarias a las observaciones de campo, ya que los

resultados pueden arrojar luz sobre los patrones descritos en los ecosistemas naturales (Sabater & Borrego, 2015). A diferencia de los estudios realizados a nivel de individuos o poblaciones, los efectuados a nivel de comunidades permiten integrar las respuestas de numerosas especies y su interacción (Sabater et al., 2007).

La comunidad del biofilm ha sido utilizada en estudios experimentales a escala de micro o mesocosmos para conocer efectos directos y/o indirectos de sustancias tóxicas y su dependencia con las condiciones ambientales específicas, ya que logra el compromiso necesario entre la simplificación y estandarización de los sistemas naturales y los requisitos de replicabilidad y repetibilidad (Sabater et al., 2007). Es así que son diversos los estudios experimentales realizados utilizando el biofilm para conocer los efectos tóxicos de agroquímicos que llegan a los sistemas acuáticos cercanos a los campos de siembra (por ejemplo, Muñoz et al., 2001; Pérez et al., 2007; Vera et al., 2010; 2012; Lozano et al., 2018).

En este sentido, los estudios experimentales muestran efectos agudos, como así también persistentes o crónicos que afectan diversos parámetros del biofilm, como el crecimiento, la concentración de clorofila o la composición de la comunidad. La composición de grandes grupos del biofilm revela el efecto de los tóxicos mediante el reemplazo progresivo de una comunidad con especies sensibles a una comunidad con especies tolerantes, pero no siempre refleja adecuadamente relaciones causa-efecto de las sustancias tóxicas sobre el biofilm. Es por esto que además de las observaciones de la composición del biofilm se requieren análisis a corto plazo de aspectos fisiológicos, metabólicos y estructurales (Sabater et al., 2007). En la presente tesina se planificó el estudio experimental para evaluar las relaciones causa-efecto del glifosato, la atrazina y los nutrientes sobre el biofilm.

Las concentraciones de nutrientes empleadas en los ensayos de laboratorio, fueron definidas en función de los registros de N y P obtenidos durante el trabajo de monitoreo en campo (Capítulo 1). Cabe recordar que estos sistemas presentaron características de ambientes mesotróficos a eutróficos por las concentraciones de nutrientes y el desarrollo algal que los caracteriza (Marchese et al., 2018; Licursi et al., 2018).

Dentro de la región pampeana, diversos autores han reportado la presencia de glifosato o su metabolito de degradación en aguas y/o sedimentos de los sistemas acuáticos (Peruzzo et al., 2008; Aparicio et al., 2013; Ronco et al., 2016; Castro Berman et al., 2018; Regaldo et al., 2018). Del mismo modo, existen registros de la presencia de atrazina en aguas superficiales de zonas agrícolas (De Gerónimo et al., 2014; Pérez et al., 2017; Regaldo et al., 2018).

Las concentraciones de glifosato utilizadas en el presente estudio se corresponden con concentraciones ambientales reportadas en otros sistemas del mundo (hasta 1,9 mg/L de ingrediente activo (i.a.) -Newton et al., 1984; Goldsborough & Brown, 1989; Feng et al., 1990; Thompson et al., 2004) y en la región (Peruzzo et al., 2008; Ronco et al., 2016; Regaldo et al., 2018). En relación a la atrazina las concentraciones utilizadas en la experiencia se correspondieron con las registradas en el estudio realizado a campo (Capítulo 1) reportadas por Regaldo et al. (2018) y con las concentraciones ambientales registradas en aguas superficiales de zonas predominantemente agrícolas de Norte América, Brasil y Europa (Miltner et al., 1989; Thurman et al., 1991; Solomon et al., 1996; Dores et al., 2008 y Cruzeiro et al., 2017).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio permitieron advertir que entre los microcosmos que incluyeron como factor experimental la adición de glifosato, las mayores concentraciones fueron registradas en el tratamiento GA, mientras que las menores correspondieron al tratamiento NGA. A lo largo del período de exposición no se observó una disminución significativa de las concentraciones de glifosato en ninguno de los tratamientos, indicando que no hubo evidencia de degradación en este período. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía consultada, donde se menciona que la vida media de este compuesto en agua es entre 14,1 y 208 días, mientras que en sedimento tan solo entre 1,8 y 5,4 días (USEPA, 2008) y que el 90% de su disipación en agua se produce aproximadamente en 12 semanas (Rueppel et al., 1977).

El glifosato se disuelve rápidamente en agua y pasa por tres procesos simultáneos: incorporación del herbicida en macrófitas y microorganismos como el fitoplancton y biofilm, degradación del glifosato por bacterias y hongos (Liu et al., 1991; Castro et al., 2007), e inmovilización en contacto con sedimentos, suelos y minerales arcillosos debido a la formación de complejos superficiales con iones metálicos (Passagno et al., 2005). En el accionar de bacterias y hongos, el glifosato puede degradarse en sarcosina o en AMPA. La vía de degradación a sarcosina libera P inorgánico y requiere de la enzima C-P liasa. La vía de degradación a AMPA es realizada por una enzima oxidorreductasa que da lugar al AMPA y glioxilato (Huntscha et al., 2018). A su vez, el AMPA también se degrada liberando P inorgánico y N-metilacetamida, pero su degradación es lenta, es por esto que algunos autores afirman que es más frecuente hallar AMPA en los cuerpos de agua que glifosato (Rueppel et al., 1977; Kolpin et al., 2006). En nuestro estudio, en el agua utilizada en la experiencia, proveniente de un ambiente natural, no fue detectada la presencia de glifosato, aunque si fue hallado AMPA en concentraciones detectables. Este metabolito registró un aumento de sus concentraciones en el T0 que podría indicar que, si bien el glifosato no fue detectado en el agua utilizada en la etapa de colonización, éste pudo estar presente

en una concentración menor al límite de detección del equipo utilizado y al degradarse produjo un incremento en las concentraciones de su metabolito, AMPA. Ante condiciones de alta demanda de fuentes de fósforo algunas bacterias, como las cianobacterias y proteobacterias en crecimiento, pueden preferir la vía de degradación del glifosato a sarcosina, en lugar de la del AMPA para utilizar el fosfato como fuente de fósforo (Wang et al., 2016; Huntscha et al., 2018). En nuestro estudio los tratamientos que presentaron menores densidades iniciales, particularmente de cianobacterias, mostraron mayores concentraciones de AMPA en el T5 probablemente relacionado al hecho de que no se produjo limitación de fósforo en esos microcosmos y la vía de degradación del glifosato predominante fue la del AMPA. En cambio, en los tratamientos que registraron mayores densidades y predominio de cianobacterias, pudo producirse un mayor consumo de fósforo y la prevalencia de la vía de degradación de glifosato a sarcosina, conduciendo a una disminución de las concentraciones de AMPA registradas.

Por su parte, las concentraciones de atrazina en los tratamientos analizados no presentaron variaciones significativas a lo largo de la experiencia, lo que deja en evidencia la alta persistencia de este herbicida en agua. La literatura consultada indica una vida media de 742 días en aguas superficiales (Canadian Water Quality Guidelines, 2008). Este hecho reviste particular importancia si consideramos lo mencionado por Pratt et al. (1997) en relación a que la atrazina es lo suficientemente persistente en los ecosistemas acuáticos a concentraciones biológicamente activas como para producir cambios significativos en la estructura y función de las comunidades nativas (especialmente las algas y otros microorganismos).

En este estudio, el biofilm desarrollado en los sustratos artificiales durante el período de colonización presentó una densidad inicial promedio de $3,64E^{+04}$ con un claro predominio de Cyanobacteria (48%), siendo Chlorophyceae (27%) y Bacillariophyceae (15%) los grupos subdominantes. Como especies dominantes dentro de estos grupos se registraron *Chamaesiphon* sp., *Protodema frequens* y *Cocconeis placentula* var. *euglypta*, respectivamente. Esta asociación de especies ha sido reportada como comunidad climax de ríos por Butcher (1947). Analizando las preferencias ecológicas de estos taxa podemos mencionar que el alga verde *P. frequens* es una especie que crece en sistemas de agua dulce adhiriéndose a rocas, macrófitas y en diversas superficies artificiales, con mayor abundancia en los meses de verano (Guiry & Guiry, 2020). En cuanto a la especie más dominante de Bacillariophyceae, *C. placentula* var. *euglypta*, presenta preferencias alcalófilas, de cuerpos de agua dulces a salobres, b-mesosapróbicos y eutróficos, con moderados requerimientos de oxígeno (Van Dam, 1994). Y, por último, el género *Chamaesiphon* es predominante en sistemas

lóticos, pudiendo crecer sobre superficies vivas o inanimadas, o ciertas veces en ambas; pueden tolerar amplios rangos de temperaturas y condiciones químicas del agua. La información disponible indica que el género crece mejor en aguas no contaminadas, aunque algunas especies pueden tolerar aguas poluidas (Kann, 1973; Gutowski et al., 2015).

Tal como se mencionaba en el capítulo 1, es frecuente hallar altas concentraciones de algunos metales y As en muchos de los sistemas acuáticos de la región (como en el caso de los sitios S1 y S2 de los estudios realizados a campo). No escapa a esta realidad el sitio en el que se colectó el agua utilizada para la colonización de los sustratos y la realización de la experiencia en la que la concentración de Cr fue 110 veces superior a los NGC propuestos para la protección de la biota acuática (Canadian Water Quality Guidelines, 2008). Altas concentraciones de este metal ya han sido reportadas por Regaldo et al. (2017) en arroyos de la región, en los que registraron valores máximos entre 352 y 363 mg/l, superando en mayor medida los NGC (176 y 181,5 veces, respectivamente). Según los autores, esto denota una contaminación histórica de Cr en los cuerpos de agua de la zona, como así también la ausencia de controles en las actividades industriales para evitarla.

En relación a la toxicidad de este metal cabe señalar que los estados trivalente (III) y hexavalente (VI) de Cr son los más estables y frecuentes, y se diferencian en términos de movilidad, biodisponibilidad y toxicidad (Panda y Parta, 1997). El Cr (III) es aproximadamente 300 veces menos tóxico que el Cr (VI) y debido al hecho de que tiene una solubilidad limitada, es menos móvil y muchas veces se encuentra menos biodisponible. Generalmente se absorbe a partículas orgánicas, no puede pasar fácilmente a través de las membranas celulares y no tiene el mismo potencial oxidativo que el Cr (VI). El Cr (III) es esencial para los animales y las plantas y juega un papel importante en el metabolismo del azúcar y las grasas (Miretzky y Fernández Cirelli, 2010).

Cabe destacar que el pH del agua influye de manera importante en la especiación del Cr y la disociación de grupos funcionales activos. Según lo expresado por algunos autores, la adsorción de Cr (VI) a ciertas matrices biológicas no es significativa cuando los valores de pH son superiores a 6. En este sentido, se dice que la adsorción del Cr (VI) a materiales de origen biológico aumenta con la disminución del pH, contrariamente la eficacia de retención de Cr (III) aumenta con el incremento del pH. La adsorción de Cr total es máxima a pH 4–5, dependiendo del tiempo de contacto (Park et al., 2008). Considerando que los valores de pH registrados en el agua de colonización y exposición fueron ≥ 9 , podría decirse entonces que no estaban dadas las

condiciones para que el Cr se adsorba de manera significativa a la superficie del biofilms y genere efectos potencialmente tóxicos sobre esta comunidad.

Por otra parte, y en lo que respecta específicamente a la comunidad del biofilm, diversos autores (Navarro et al., 2002; Sabater et al., 2007; Duong et al., 2010) hacen referencia al rol relevante que cumple la matriz de polisacáridos exudados en su resistencia a la toxicidad de metales. Estos compuestos son los que aportan en gran medida a la estructura tridimensional de los biofilms y son capaces de adsorber eficientemente los metales y así reducir su toxicidad sobre las células algales. El hecho de que la madurez y/o grosor del biofilm puede reducir la susceptibilidad a la toxicidad es una regla general que se ha demostrado para metales (Duong et al., 2010) y herbicidas (Franz et al., 2008), como lo señalaron Guasch et al. (2012). Así, los biofilms en una etapa temprana de colonización resultan más vulnerables a la exposición a metales que los biofilms maduros (Ivorra et al., 2000). Licursi & Gómez (2013) en una experiencia de exposición corta (96 hs.) a Cr (VI) de biofilms maduros reportaron que la biomasa algal y la densidad no se modificaron significativamente ante la presencia del metal, sin embargo, se produjeron cambios en la composición específica de la taxocenosis de diatomeas. Según las teorías de adaptación al estrés de las comunidades de algas (Stevenson, 1997), la biomasa debería ser menos sensible al estrés ambiental que la composición de especies, porque las comunidades pueden compensar el estrés cambiando la composición (Stevenson & Pan, 1999).

A lo largo de la experiencia realizada en el presente trabajo de tesina, la densidad (ind./cm²) mostró un incremento significativo en el tiempo, aunque las diferencias no fueron significativas entre los tratamientos. Sin embargo, fue posible advertir que las mayores densidades correspondieron a los tratamientos que incluyeron como factor experimental la adición de nutrientes alcanzando valores de $1,70E^{+06}$. Estos valores de densidad fueron de magnitud similar a los registrados en los sitios con mayores concentraciones de nutrientes de los sistemas acuáticos del sur de la provincia de Santa Fe durante el segundo muestreo (Capítulo 1). Coincidentemente las mayores concentraciones de clorofila "a" fueron registradas en los tratamientos con adición de nutrientes. Numerosos autores mencionan que las concentraciones de N y P constituyen el factor principal que determina la biomasa algal (Chételat et al., 1999; Biggs et al., 2000; Dodds et al., 2003; Stevenson et al., 2006; Dalton et al., 2015), siempre que no existan otros factores que limiten el crecimiento (Pan et al., 1999).

Entre los factores que pueden condicionar el desarrollo algal se pueden mencionar la presencia de herbicidas. Sin embargo, en nuestro estudio los tratamientos que incluyeron como único factor experimental la adición de herbicidas (G, A y GA) presentaron mayores densidades que el control (aunque estas diferencias no fueron

significativas) así como las mayores concentraciones de clorofila "a". Las respuestas de estas variables ante la presencia de herbicidas han sido diversas de acuerdo a lo reportado por distintos autores. Así, Klátyik et al. (2017) hallaron una disminución significativa de la biomasa del biofilm (entre el 1,3% hasta 33%) en los tratamientos expuestos a 100 µg/L de glifosato. También Detenbeck et al. (1996) reportaron que la productividad del perifiton fue significativamente reducida al ser expuesto a 25 µg/L de atrazina. Por su parte, Pérez et al. (2007) no hallaron diferencias significativas en la concentración de clorofila y en el PSLC en mesocosmos tratados con 6 y 12 mg/L de glifosato. Del mismo modo, Lozano et al. (2018) mencionan que la exposición a 3 mg/L de glifosato no tuvo impacto significativo sobre el perifiton en las variables medidas (PSLC, Índice Autotrófico y proporción Live:Dead). Vera & Trinelli (2018) reportaron un aumento en el peso seco y en la clorofila "a" en el perifiton expuesto a 0,3 y 3 mg i.a./L de glifosato. Finalmente, Goldsborough & Brown (1988) reportaron que la concentración umbral por debajo de la cual no se observaron diferencias significativas en la fotosíntesis entre el control y los tratamientos fue 0,89 mg/L de glifosato.

El análisis de la sucesión en la composición del biofilm permitió advertir un reemplazo de Cyanobacteria por Bacillariophyceae como grupos dominantes en los microcosmos control, este reemplazo se vio afectado en los tratamientos con herbicidas. En este sentido, en los tratamientos C y N el reemplazo ocurrió de forma más rápida que en los demás tratamientos, observándose el predominio de Bacillariophyceae en el T3 mientras que en el caso de los tratamientos con herbicidas este predominio recién se observó a partir del T5 o T7. Estos resultados coinciden con lo reportado por Tsui & Chu (2003) quienes señalaron que Bacillariophyceae fue de 7-10 veces más sensibles al glifosato (Roundup) que otros grupos del biofilm, pudiendo atribuirlo a la variación filogenética entre los diferentes grupos, donde los organismos procariotas presentan mayor tolerancia que los eucariotas. También Vera et al. (2010) reportaron que el grupo más afectado por la exposición a 8 mg/L de glifosato fue el de las diatomeas y observaron la proliferación de cianobacterias. Algo similar fue reportado por Pérez et al. (2007) quienes registraron un incremento de cianobacterias a expensas de Bacillariophyceae en biofilms expuestos a glifosato (Roundup). El grupo Cyanobacteria puede resistir en condiciones de extremo estrés utilizando diferentes estrategias, como por ejemplo producir enzimas tolerantes al glifosato (Vera et al., 2010) o degradar este herbicida y utilizarlo como fuente de fósforo (P) (Lipok et al., 2007; Forlani et al., 2008). Wang et al. (2016) hallaron especies de diferentes grupos algales que se vieron favorecidas ante la presencia de glifosato ya que pudieron utilizarlo como fuente de P en situaciones de carencia de este elemento, mientras que para otras especies este herbicida resultó ser tóxico. Estas respuestas diferenciales al glifosato de distintas

especies en función de la disponibilidad de P en el ambiente tendrían implicancias ecológicas muy importantes en los sistemas acuáticos.

En el presente estudio, las densidades de Cyanobacteria se correlacionaron de manera positiva con la concentración de atrazina, siendo el grupo dominante durante gran parte de la experiencia en los tratamientos con herbicidas, particularmente con atrazina, en los que el reemplazo por Bacillariophyceae fue más lento que en el resto de los tratamientos. Al respecto, se han descrito distintos tipos de respuestas que pueden resultar contrapuestas: Jüttner et al. (1995) en estudios en mesocosmos observaron que las diatomeas fueron los taxones menos sensibles a la atrazina (318 µg/L) dominando el fitoplancton. Coincidentemente, Seguin et al. (2001) mencionan que la atrazina inhibió más a las clorofitas que a las diatomeas, atribuyéndolo a que los inhibidores del PS II son menos tóxicos para las algas adaptadas a bajas condiciones lumínicas como las diatomeas. Por su parte Guasch et al. (1998) reportaron que las diferencias en la sensibilidad están relacionadas con variables ambientales y que las comunidades perifíticas dominadas por diatomeas resultaron más tolerantes que las comunidades dominadas por clorofíceas o crisofíceas. Sin embargo, Kish (2006) reportó que la atrazina favoreció el desarrollo de un perifiton procariota (cambiando la dominancia de Bacillariophyceae hacia Cyanobacteria), mientras que el glifosato favoreció la fracción eucariota. Otras respuestas que han sido reportadas en algas del fitoplancton afirman que Cyanobacteria junto con Bacillariophyceae parecen ser más tolerantes a la atrazina que las Chlorophyceae (Pannard et al., 2008). Tang et al (1997) resalta que diferentes especies y quizás divisiones de algas de agua dulce exhiben diferentes respuestas a la exposición a la atrazina. Por lo tanto, la toxicidad selectiva de los pesticidas u otros contaminantes orgánicos de los sistemas acuáticos podría alterar la composición de las especies, disminuir la diversidad, interferir con los patrones de sucesión normales y alterar las redes alimentarias en su conjunto. Asimismo, Nelson et al. (1999) señalan que la exposición crónica del perifiton a concentraciones de atrazina como las halladas frecuentemente en los sistemas acuáticos, pueden inhibir el crecimiento del perifiton durante períodos de pulsos con mayor concentración de atrazina característicos de los eventos de escorrentía.

Al igual que se observó en el estudio a campo, el oxígeno disuelto y pH se correlacionaron de manera positiva con la densidad de Bacillariophyceae, como también el oxígeno disuelto con la densidad de Chlorophyceae y Hongos. Estas relaciones se explican por el proceso de producción primaria fotosintética de los autótrofos que produce un aumento del oxígeno disuelto durante el día (Odum, 1956), y el incremento del pH del cuerpo de agua (Elosegi & Sabater, 2009). Contrariamente, los microorganismos saprofitos, como hongos y bacterias, consumen oxígeno durante el

proceso de descomposición de la materia orgánica (Andreo, s.f.). En este sentido, Mora-Gómez et al. (2016) advierten que una reducción de la concentración de oxígeno en el agua puede afectar el desarrollo de hongos (lento crecimiento y baja tasa de esporulación) y disminuir la diversidad fúngica reduciendo la velocidad de degradación microbiana de la materia orgánica. En nuestro estudio, la mayor disponibilidad de oxígeno disuelto se relacionó positivamente con la densidad de hongos, lo que pudo generar un beneficio en el desarrollo de la actividad descomponedora de estos microorganismos. Esta mayor actividad de descomposición también se ve sustentada por la correlación positiva y significativa entre la densidad de hongos y la demanda biológica de oxígeno (DBO₅) que es una variable indicadora de la cantidad de materia orgánica biodegradable.

En relación al fósforo total (PT), fracción del P contenida en el biofilm, las mayores concentraciones correspondieron a los tratamientos con glifosato (G). Las correlaciones realizadas revelaron que el PT ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en el biofilm se correlacionó negativamente con las concentraciones de PRS en agua, y el PT (mg/gPS- expresado en función del peso seco) se correlacionó positivamente con las concentraciones de glifosato, indicando que el P disuelto en agua es captado por el biofilm y que posiblemente la presencia de este herbicida se relaciona con la disponibilidad de P en agua. A su vez, el PT se relacionó positivamente con las densidades de Chlorophyceae y Bacillariophyceae, mostrando una mayor acumulación de este nutriente en biofilms dominados por estos grupos. El enriquecimiento de los sistemas acuáticos relacionados con la adición de glifosato ha sido reportado en la bibliografía (Austin et al. 1991). Autores como Pérez et al. (2007) y Vera et al. (2010) reportaron un aumento significativo del PT en agua en mesocosmos tratados con glifosato (Roundup). Estos trabajos destacan el riesgo que trae aparejado el incremento de herbicidas e indirectamente de nutrientes disponibles en agua (eutrofización), favoreciendo el desarrollo de Cyanobacteria, que además de afectar el natural desarrollo de los sistemas lóticos, puede conducir a la proliferación de especies potencialmente tóxicas. En particular, el desarrollo de las floraciones de cianobacterias en aguas dulces se ha reconocido como eventos significativos que pueden afectar negativamente la calidad del agua y afectar la salud humana y animal (Carmichael, 1994; Bell & Codd, 1996). Por estos motivos se advierte sobre la posibilidad de la aceleración del proceso de eutrofización y sus graves consecuencias para los entornos naturales (Vera et al., 2010).

Diversos autores han documentado la capacidad del biofilm en el ciclado y retención de los nutrientes en los sistemas lóticos (Leff et al., 2016; Bojorge-García & Cantoral Uriza, 2016). Bojorge-García & Cantoral Uriza (2016) afirman que las algas bentónicas son las principales responsables de la captura de N y P (orgánico e

inorgánico) presente en la columna de agua, captando entre 5-35% del PT que se incorpora al sistema. Al poseer un alto nivel de captura de nutrientes, son un importante elemento en los ambientes acuáticos en la transferencia de nutrientes hacia otros organismos de la trama trófica. También se ha estudiado su aplicación para el tratado de aguas residuales municipales (Boelee et al., 2011) y eutrofizadas (Dodds, 2003; Ko et al., 2019). Además, dentro del fitobentos, las diatomeas han sido reportadas como aptas para reducir la liberación de nutrientes desde el sedimento hacia la columna de agua (Van Luijn et al., 1995).

Krieger et al. (1988) reportan que el crecimiento de perifiton y las tasas de absorción de nutrientes pueden reducirse temporalmente por la exposición a herbicidas en los cursos de agua de zonas agrícolas. Lozano et al. (2018) en un estudio comparativo del fitoplancton y el perifiton, reportan que la comunidad del perifiton fue más resistente a los efectos de herbicidas y que esto estaría relacionado con su estructura más compleja y a la matriz de sustancias poliméricas hidratadas que secreta (Flemming & Wingender, 2010), lo que puede limitar el contacto de los organismos con los contaminantes reduciendo la exposición.

De acuerdo a Pratt et al. (1997) los cambios en la estructura de la comunidad (especialmente de los grupos no blanco) y los cambios en las variables que reflejan los procesos del ecosistema tienen importancia técnica y en general no se valoran en los paradigmas actuales de evaluación de riesgos ambiental. Los autores resaltan que en una evaluación de riesgo ecológico es imprescindible que el entorno natural sea apreciado por el valor intrínseco de los procesos que en él ocurren y por sus especies naturales. Retomando estos conceptos, y en función de los resultados obtenidos en el presente estudio, alentamos la incorporación de la comunidad del biofilm (desarrollada en ambientes acuáticos de la región) en la evaluación de riesgos de pesticidas, incluyendo el análisis tanto estructural como funcional de manera de poder establecer los efectos de los xenobióticos en el rol que cumple esta comunidad en los ambientes naturales amenazados y estimar riesgos socialmente aceptables.

De este modo, podemos concluir que en el análisis de la etapa experimental de la presente tesina se reflejaron los cambios sobre la comunidad del biofilm expuesto a concentraciones ambientalmente significativas de los herbicidas, glifosato y atrazina, como de los nutrientes, P y N, que habían sido planteados en la hipótesis. Por una parte, se observaron cambios en la composición de los grandes grupos del biofilm. Estos cambios difirieron entre los distintos tratamientos y el control, registrándose un retraso en el reemplazo progresivo de Cyanobacteria por Bacillariophyceae como grupo dominante y en la dominancia del grupo de las cianobacterias respecto al de las diatomeas, esto se evidenció con mayor consistencia en el tratamiento NGA. Por otra

parte, se detectaron modificaciones en la biomasa del biofilm, siendo la adición de N y P el factor de cambio, reflejado tanto en los valores de densidad como en las concentraciones de clorofila "a". La densidad y las concentraciones de clorofila "a" fueron mayores en los tratamientos fertilizados, como así también se diferenciaron ciertos tratamientos con una evidente disminución en su densidad total y en el valor del índice de diversidad de Shannon-Wiener en el tiempo final (T7).

CONCLUSIONES GENERALES

Ante el objetivo general planteado en la presente tesina -evaluar el impacto de agroquímicos (fertilizantes y herbicidas) que alcanzan los cuerpos de agua de zonas de actividad agrícola utilizando el biofilm epipélico como bioindicador-, se establecieron dos objetivos específicos que fueron llevados a cabo mediante dos aproximaciones: estudios en campo y estudios experimentales. En el estudio en campo, el análisis de los ensambles del biofilm epipélico de los arroyos del sur de la provincia de Santa Fe permitió observar una marcada influencia de la actividad agrícola como también de otras actividades antrópicas. Se evidenciaron diferencias tanto a escala espacial (sitios mayormente expuestos a altas concentraciones de herbicidas, y/o nutrientes, y/o metales), así como diferencias a escala temporal (entre muestreos). Por un lado, los sitios muestreados reflejaron el ingreso de materia orgánica por escorrentía a los sistemas alterando las condiciones naturales de las cuencas, registrándose aumentos de materia orgánica, con incrementos en las concentraciones de nutrientes y Cr en el agua en coincidencia con períodos de mayores precipitaciones. Por otro lado, no se observaron correlaciones significativas en este estudio entre las concentraciones de herbicidas y la biomasa del biofilm, pero sí se registraron mayores concentraciones de herbicidas en los cuerpos de agua durante el primer muestreo, en concordancia con el período de alta aplicación de agroquímicos de acuerdo al calendario agrícola, y su permanencia en los cuerpos de agua evidenciada por las concentraciones registradas en el segundo muestreo (período de baja aplicación). En cuanto a las concentraciones de metales y As registradas, tanto en el primer como en el segundo muestreo se registraron valores que superaron los NGC. Esto fue reflejado también por el Índice de Diatomeas Pampeano (IDP) que asignó calidad del agua mala y muy mala a estos sitios a partir del análisis de la taxocenosis de diatomeas bentónicas (Licursi et al., 2018).

Por otro lado, el estudio experimental permitió registrar modificaciones en el biofilm ante la presencia de concentraciones ambientalmente significativas de herbicidas (glifosato y atrazina) como de los principales nutrientes (P y N). Por una parte, los cambios en la composición a nivel de grandes grupos reflejaron los efectos de estos herbicidas sobre el biofilm, favoreciendo el predominio del grupo Cyanobacteria sobre el de Bacillariophyceae. En este sentido, los resultados coinciden con los reportados en estudios previos de exposición a glifosato, e indican una mayor tolerancia de organismos procariotas a dicho herbicida. El efecto diferencial de la atrazina favoreciendo al grupo Cyanobacteria por sobre los demás grupos algales ha sido también reportado por algunos autores de la literatura consultada. Este efecto es un importante factor de

cambio en el funcionamiento e integridad del cuerpo de agua tratándose de un grupo en el que existen especies potencialmente tóxicas.

Asimismo, los resultados de las correlaciones realizadas sugieren que el fósforo disuelto en agua (PRS) fue captado por el biofilm (PT) y que posiblemente la presencia del glifosato promovió la disponibilidad de este nutriente en agua, comportándose como fuente de P. También se identificó una mayor acumulación de este nutriente en el biofilm dominado por Chlorophyceae y Bacillariophyceae. De este modo, se evidencia el ingreso de glifosato en los sistemas lóticos como potencial causante de un enriquecimiento acelerado de los mismos que ha sido reportado por diversos autores. Dicho enriquecimiento acelerado (eutrofización) con causa antrópica tiene consecuencias negativas sobre el sistema y sus servicios ecosistémicos. Frente a dichos escenarios, el biofilm ha sido estudiado por numerosos autores por su gran capacidad de captura de nutrientes, posiblemente relacionado con su estructura más compleja y a la matriz de sustancias poliméricas hidratadas que secreta.

Elosegi & Sabater (2009) afirman que la modificación de las concentraciones de carbono, N y P como consecuencia de la actividad humana tiene implicaciones socioeconómicas y sanitarias que van más allá de las estrictamente ecológicas. Asimismo, diversos autores reportan efectos sobre la salud de personas que están expuestas, directa o indirectamente, a la presencia en su entorno de diversos agroquímicos (Simoniello et al., 2008; Mañas et al., 2009; Gentile et al., 2012; Koller et al., 2012; Arancibia et al., 2019). El hombre altera diversas estructuras y procesos naturales en su afán de satisfacer sus necesidades y mejorar su calidad de vida, desestimando los daños que genera sobre el ecosistema y la salud humana.

Lo expuesto anteriormente, permite concluir que la información recabada en el presente estudio denota el importante rol que cumple el biofilm en los sistemas acuáticos de la región, así como también su eficacia como indicador en estudios de contaminación antrópica de cuerpos de agua. De esta manera, se sugiere integrar a la comunidad del biofilm como bioindicador para los monitoreos regulares en los sistemas lóticos de la región, tanto por la polución directa e indirecta que reciben de la actividad agrícola e industrial, así como también por los cambios que trae aparejado el calentamiento global (Rodrigues Capítulo et al., 2010). Más aún, dichos monitoreos deben ser acompañados por acciones relacionadas con la concientización y educación del impacto que socialmente estamos ocasionado en los sistemas lóticos, con el fin de fomentar acciones que permitan revertirlos en un futuro cercano. Finalmente, otra herramienta fundamental son las instancias de capacitación y control en el cumplimiento de las formas adecuadas de utilización y manipulación de los agroquímicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Etchegoyen, M. A., & Marino, D. J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of The Total Environment*, 645, 89-96. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.134.
- American Public Health Association (APHA) American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (23rd edition) Washington, D.C: APHA-AWWA-WEF.
- Andreo, M. (s.f.). Demanda Biológica de Oxígeno (D.B.O.). Recuperado de <https://www.mendoza.conicet.gov.ar/portal/enciclopedia/terminos/DBO.htm>
- Andrus, J.M., Winter, D., Scanlan, M., Sullivan, S., Bollman, W., Waggoner, J.B., Hosmer, A.J., Brain, R.A. (2013). Seasonal synchronicity of algal assemblages in three Midwestern agricultural streams having varying concentrations of atrazine, nutrients, and sediment. *Sci. Total Environ.* 458–460, 125–139.
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Hernández Gujarro, K., Pérez, D., Portocarrero, R. & Vidal, C. (Comp.). (2015). *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente*. 1a ed. Balcarce, Buenos Aires; Famaillá, Tucumán; Reconquista, Santa Fe. Ediciones INTA, 73 pp. ISBN 978-987-521-665-5.
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P. & Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93(9), 1866-1873. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.06.041
- Arancibia, F., Motta, R. C., & Clausing, P. (2019). The neglected burden of agricultural intensification: a contribution to the debate on land-use change. *Journal of Land Use Science*, 1-17. doi:10.1080/1747423x.2019.1659431
- Austin, A. P., Harris, G. E. & Lucey, W. P. (1991). Impact of an organophosphate herbicide (GlyphosateR) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(1), 29-35. doi:10.1007/bf01689449
- Bakeman, R. (2005). Recommended effect size statistics for repeated measures designs. *Behavior Research Methods*, 37(3), 379-384. doi:10.3758/bf03192707
- Battin T. J, Kaplan L. A, Newbold J. D., Hansen C. M. E. (2003). Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426: 439-442.
- Begon M., Harper J. L. & Townsend C. R. (1999). *ECOLOGÍA: Individuos, poblaciones y comunidades*. Ediciones Omega. 865 p.
- Bell, S.G. & Codd, G.A. (1996) The Occurrence And fate of Blue-Green Algal Toxins in Freshwaters. *R & D Report 29*, National Rivers Authority, London.
- Biggs, B. J. (2000). Identification guide to common periphyton in New Zealand streams and rivers. En *New Zealand Periphyton Guideline: Detecting, Monitoring and Managing Enrichment of Streams*. Christchurch: Ministry for the Environment.
- Boelee, N., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C., & Wijffels, R. (2011). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water Research*, 45(18), 5925-5933. doi:10.1016/j.watres.2011.08.044
- Bojorge-García, M. & Cantoral Uriza, E. (2016). The ecological importance of algae in rivers. *Hidrobiológica*, 26(1), 1-8. doi: 10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2016v26n1/cantoral
- Bourrelly, P. (1966). *Les Algues d'eau douce. I. Les algues vertes*. Paris: N. Boubée y Cie.
- Bourrelly, P. (1968). *Les algues d'eau douce. II. Les algues jaunes et brunes*. Paris: N. Boubée y Cie.

- Butcher, R. W. (1947). Studies in the ecology of rivers: VII. The algae of organically enriched waters. *The Journal of Ecology*, 186-191.
- Canadian Water Quality Guidelines (2008) *Water quality guidelines of the Canadian Council of Ministers of the environment*. Ottawa, Ontario
- Carmichael, W. W. (1994). The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, 270, 78-86.
- Castignani, H. (2011). *Zonas Agroecológicas Homogéneas Santa Fe*. Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. ISSN 1851-6955.
- Castro Berman, M., Marino, D. J. G., Quiroga, M. V., Zagarese, H. (2018) Ocurrencia y niveles de Glifosato y AMPA en lagunas de la región pampeana y patagónica de Argentina. *Libro de Resúmenes VIII Congreso Argentino de Limnología*, p. 129. Luján, Buenos Aires.
- Castro Jr, J. V., Peralba, M. C., & Ayub, M. A. (2007). Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42(8), 883-886.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) (1997). Appendix XXIII— Canadian water quality guidelines: Updates (June 1997), arsenic, bromacil, carbaryl, chlorpyrifos, deltamethin, and glycols. En: *Canadian water quality guidelines, Canadian Council of Resource and Environment Ministers* (1987). Prepared by the Task Force on Water Quality Guidelines.
- Chételat, J., Pick, F. R., Morin, A., & Hamilton, P. B. (1999). Periphyton biomass and community composition in rivers of different nutrient status. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(4), 560-569.
- Clesceri, L.S., Greenberg A.E. & Eaton, A.D. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA, American Public Health Association, Washington, DC.
- Cochran, W. G. (1947). Some Consequences When the Assumptions for the Analysis of Variance are not Satisfied. *Biometrics*, 3(1), 22. doi:10.2307/3001535
- Cohen, J. (1992). Statistical power analysis. *Current directions in psychological science*, 1(3), 98-101.
- Cox, E. (1996). *Identification of Freshwater Diatoms from Live Material*. Basingstoke, England: Springer.
- Cruzeiro, C., Amaral, S., Rocha, E., & Rocha, M. J. (2017). Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro river Estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 126-134. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.010
- Dalton, R. L., Boutin, C., & Pick, F. R. (2015). Determining in situ periphyton community responses to nutrient and atrazine gradients via pigment analysis. *Science of The Total Environment*, 515-516, 70-82. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.01.023
- De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., & Costa, J. L. (2014). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423-431. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.039
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C. & Delmas, F. (2009). Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquatic Toxicology*, 93(1), 11-17. doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.014.
- DeLorenzox, M. E., Leatherbury, M., Weiner, J. A., Lewitus, A. J. & Fulton, M. H. (2004). Physiological factors contributing to the species-specific sensitivity of four estuarine microalgal species exposed to the herbicide atrazine. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 7(1), 137-146. doi:10.1080/14634980490281551
- Detenbeck E. N, Hermanutz R., Allen K., Schwift M. C. (1996) Fate and effects of the herbicide atrazine in flow-through wetland mesocosms. *Envir. Toxicol. Chem.* 15: 937–946.

- Dodds, W. K. (2003). The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. *Journal of Phycology*, 39(5), 840-849. doi:10.1046/j.1529-8817.2003.02081.x
- Dores, E. F., Carbo, L., Ribeiro, M. L., & De-Lamonica-Freire, E. M. (2008). Pesticide levels in ground and surface waters of Primavera do Leste region, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Chromatographic Science*, 46(7), 585-590. doi:10.1093/chromsci/46.7.585
- Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A. & Leboulanger, C. (2004). Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Science of The Total Environment*, 318(1-3), 101-114. doi:10.1016/s0048-9697(03)00398-x
- Duong, T.T., Morin, S., Coste, M., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Boudou, A. (2010) Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic diatoms in relation with biofilm maturity. *Science of the Total Environment* 408(3), 552–562.
- Elozegi, A. & Sabater, S. (Eds.) (2009) *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA. Bilbao. 472 p.
- EPA (Environmental Protection Agency) (1994) Methods for the determination of metals in environmental samples - Supplement I - EPA/ 600/R-94-111 - T.D. Martin et. al. - Method 200.2 - Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements. - J.T. Creed et. al - Method 200.9, Revision 2.2 - Determination of trace elements by stabilized temperature graphite furnace atomic absorption. Cincinnati, Ohio. EEUU
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2016). Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. *Science of The Total Environment*, 554-555, 237-245. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.02.175
- Etchegoyen, M., Ronco, A., Almada, P., Abelando, M., & Marino, D. J. (2017). Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(2). doi:10.1007/s10661-017-5773-1
- FAOSTAT 2019. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estadísticas. (6 de mayo de 2019) Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/GL>
- Feng, J. C., Thompson, D. G., & Reynolds, P. E. (1990). Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 1. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 1110-1118. doi:10.1021/jf00094a045.
- Flemming, H.C. & Wingender, J. (2010) The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. (FAO) (2015) <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Forlani, G., Pavan, M., Gramek, M., Kafarski, P., & Lipok, J. (2008). Biochemical Bases for a Widespread Tolerance of Cyanobacteria to the Phosphonate Herbicide Glyphosate. *Plant and Cell Physiology*, 49(3), 443-456. doi:10.1093/pcp/pcn021
- Franz, S., Altenburger, R., Heilmeyer, H., Schmitt-Jansen, M. (2008). What contributes to the sensitivity of microalgae to triclosan? *Aquatic Toxicology* 90, 102–108.
- Frau, D., M.F. Gutierrez, L. Regaldo, M. Saigo & M. Licursi (2020). Plankton community responses in Pampean lowland streams linked to intensive agricultural pollution. *Ecological Indicators* 120: 106934. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106934>.
- Freeman, C. & Lock, M. A. (1995). The biofilm polysaccharide matrix: A buffer against changing organic substrate supply? *Limnology and Oceanography* 40(2): 273–278.
- Gagnetten, A. M., Regaldo, L., Romero, N., Van Opstal, N., Licursi, M., Reno, U., ... Gervasio, S. (2020). Impacto de la actividad agrícola en sistemas acuáticos de las

provincias de Santa Fe y Entre Ríos. En Universidad Nacional del Litoral (Ed.), *Contribuciones al estudio latinoamericano del Rururbano* (pp. 488-504).

- Giorgi, A., Feijoó, C., & Tell, G. (2005). Primary producers in a Pampean stream: temporal variation and structuring role. *Biodiversity and Conservation*, 14(7), 1699-1718. doi:10.1007/s10531-004-0694-z
- Giuffréde López Carnelo, L., De Miguez, S. R., & Marbán, L. (1997). Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of The Total Environment*, 204(3), 245-250. doi:10.1016/s0048-9697(97)00187-3
- Goldsborough, L. G. & Brown, D. J. (1988). Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), 253-260. doi:10.1007/bf01705439
- Gómez N. & Licursi, M. (2001). The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology (C)*: 173–181.
- Gómez, N., Donato, J. C., Giorgi, A., Guasch, H., Mateo, P. y Sabater, S. La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. (2009). En A. Elosegi & S. Sabater (Eds.), *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA.
- Gonzalez, D., Juárez, Á. B., Krug, C. P., Santos, M., & Vera, M. S. (2019). Freshwater periphyton response to technical-grade and two commercial formulations of glyphosate. *Ecología Austral*, 29(01), 020-027.
- Greenhouse, S. W. & Geisser, S. (1959). On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika*, 24(2), 95-112. doi:10.1007/bf02289823
- Guasch, H., Bonet, B., Bonnineau, Ch., Corcoll, N., Lopez-Doval, J.C., Muñoz, I., Ricart, M., Serra, A., Clements, W. (2012) How to link field observations with causality? Field and experimental approaches linking chemical pollution with ecological alterations. En: Guasch, H., Ginebreda, A., Geiszinger, A. (Eds.), *Emerging and Priority Pollutants in Rivers: Bringing Science into River Management Plans. The Handbook of Environmental Chemistry*, 19. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 181–218.
- Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Paulsson, M., Real, M., Sabater, S. (1998) Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *J. Appl. Phycol.* 10, 203–213.
- Guasch, H., Lehmann, V., van Beusekom, B., Sabater, S., Admiraal, W. (2007) Influence of phosphate on the response of periphyton to atrazine exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 32–37. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-005-0186-5>.
- Guiry, M.D., & Guiry, G.M. (2020). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. (25 de marzo de 2020). Recuperado de <http://www.algaebase.org>
- Gutowski, A., Foerster, J., Doege, A., & Paul, M. (2015). Chamaesiphon species in soft-water streams in Germany: occurrence, ecology and use for bioindication. *Algological Studies*, 148(1), 33-56.
- Hamilton, W. A. (1987). Biofilm: microbial interaction and metabolic activities. En Fletcher M, Gray TRG, Jones JG (Eds). 1987. Ecology of microbial communities. Society for general microbiology symposium 41. *Cambridge University Press*, Cambridge, pp 361–387
- Hammer, Ø; Harper, D.A. & Ryan, P.D. (2013). PAST-Palaeontological Statistics, version 3. University of Oslo, Oslo.
- Hansen, A. M.; Treviño-Quintanilla, L. G.; Márquez-Pacheco, H.; Villadacanela, M.; González-Márquez, L. C.; Guillén-Garcés, R. A. & Hernández-Antonio, A. (2013). Atrazina: Un Herbicida Polémico. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 29(9): 65-84.
- Hilton, J., & Rigg, E. (1983). Determination of nitrate in lake water by the adaptation of the hydrazine-copper reduction method for use on a discrete analyser: Performance

- statistics and an instrument-induced difference from segmented flow conditions. *The Analyst*, 108(1289), 1026. doi:10.1039/an9830801026
- Horner, R. R. & Welch, E. B. (1981). Stream Periphyton Development in Relation to Current Velocity and Nutrients. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(4), 449-457. doi:10.1139/f81-062.
 - Horner, R. R., Welch, E. B., & Veenstra, R. B. (1983). Development of nuisance periphytic algae in laboratory streams in relation to enrichment and velocity. *Periphyton of Freshwater Ecosystems*, 121-134. doi:10.1007/978-94-009-7293-3_18
 - Huang, S., & Jin, J. (2008). Status of heavy metals in agricultural soils as affected by different patterns of land use. *Environmental Monitoring and Assessment*, 139(1-3), 317-327. doi:10.1007/s10661-007-9838-4
 - Hulme M. & Sheard N. (1999). Climate Change Scenarios for Argentina. *Climatic Research Unit*, Norwich, UK. 6 p.
 - Huntscha, S., Stravs, M. A., Bühlmann, A., Ahrens, C. H., Frey, J. E., Pomati, F., ... Poiger, T. (2018). Seasonal dynamics of glyphosate and AMPA in lake Greifensee: Rapid microbial degradation in the epilimnion during summer. *Environmental Science & Technology*, 52(8), 4641-4649. doi:10.1021/acs.est.8b00314
 - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. (24 de abril de 2019) Recuperado de: http://rafaela.inta.gov.ar/mapas/capacidad_productiva/_provincia_santa_fe.htm.
 - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. (12 de febrero de 2020) Recuperado de: <https://inta.gob.ar/documentos/boletin-agrometeorologico-mensual-inta-rafaela>.
 - Iturburu, F. G., Calderon, G., Amé, M. V., y Menone, M. L. (2019). Ecological risk assessment (ERA) of pesticides from freshwater ecosystems in the pampas region of Argentina: Legacy and current use chemicals contribution. *Science of The Total Environment*, 691, 476-482. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.044
 - Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M.H.S., Admiraal, W. (2000) Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(5), 1332–1339.
 - Jüttner, I., Peither, A., Lay, J. P., Kettrup, A., & Ormerod, S. J. (1995). An outdoor mesocosm study to assess ecotoxicological effects of atrazine on a natural plankton community. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(4), 435-441.
 - Kann, E. (1973). Zur Systematik Und Ökologie Der Gattung Chamaesiphon (Cyanophyceae). II. Ökologie.
 - Kish, P. A. (2006). Evaluation of Herbicide Impact on Periphyton Community Structure Using the Matlock Periphytometer. *Journal of Freshwater Ecology*, 21(2), 341-348. doi:10.1080/02705060.2006.9665004.
 - Klátyik, S., Takács, E., Mörtl, M., Földi, A., Trábert, Z., Ács, É., ... & Székács, A. (2017). Dissipation of the herbicide active ingredient glyphosate in natural water samples in the presence of biofilms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(10), 901-921.
 - Ko, S., Srivastava, A., Lee, N., Jin, L., Oh, H., & Ahn, C. (2019). Bioremediation of eutrophic water and control of cyanobacterial bloom by attached periphyton. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(8), 4173-4180. doi:10.1007/s13762-019-02320-8.
 - Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Lee, E. A., Meyer, M. T., Furlong, E. T., & Glassmeyer, S. T. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment*, 354(2-3), 191-197.
 - Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1999). Cyanoprokaryota, Part 1: Chroococcales. En: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. y Mollenhauer, D., (Eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa Bd 19/1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005). Cyanoprokaryota, Part 2: Oscillatoriales. En: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. y Schagerl, M., (Eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa Bd 19/2. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Komárek, J. (2013). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota: 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera. Springer Spektrum.
- Koroleff, F. (1970). Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Cons. Int. Explor. Mer., Information on techniques and methods for sea water analysis (and laboratory report)*, (3):19-22.
- Koroleff, F. (1972) Determination of total nitrogen in natural waters by means of persulfate oxidation. *New Baltic Manual with Methods for Sampling and Analysis of Physical, Chemical and Biological Parameters, International Council for Exploration of the Sea, Charlottenlund*, pp 73–78.
- Krieger, K. A., Baker, D. B., & Kramer, J. W. (1988). Effects of herbicides on streamAufwuchs productivity and nutrient uptake. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 17(3), 299-306.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Junges, C. M., & Cabagna, M. C. (2010). Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 681-689. doi:10.1007/s00244-010-9578-2
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C. S., Simoniello, M. F., Colussi, C. L., ... Sigrist, M. (2019). First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5(10), e02601. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02601
- Larras, F., Lambert, A., Pesce, S., Rimet, F., Bouchez, A. & Montuelle, B. (2013). The effect of temperature and a herbicide mixture on freshwater periphytic algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 162-170. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.09.007.
- Leff, L., Gray, J. B., Martí, E., Merbt, S. N., & Romani, A. M. (2016). Aquatic Biofilms and Biogeochemical Processes. *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*, 89-108. doi:10.21775/9781910190173.05.
- Licursi, M., & Gómez, N. (2013). Short-term toxicity of hexavalent-chromium to epipsammic diatoms of a microtidal Estuary (Rio de La Plata): Responses from the individual cell to the community structure. *Aquatic Toxicology*, 134-135, 82-91. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.007
- Licursi, M.; Bodean, M. F.; Saigo, M.; Regaldo, L. & Popielarz, A. (2018) Calidad del agua de arroyos sometidos a actividad agrícola, urbana/industrial (Pcia. Santa Fe) a partir de diatomeas epipelicas. *Libro de Resúmenes VIII Congreso Argentino de Limnología*, p. 118. Luján, Buenos Aires.
- Licursi, M. (2005). *Efectos de las perturbaciones antropogénicas sobre la taxocenosis de diatomeas bentónicas en sistemas lóticos pampeanos* (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina). Recuperado de http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/repositorio/_documentos/tesis/tesis_859.pdf
- Lipok, J., Owsiak, T., Mlynarz, P., Forlani, G., & Kafarski, P. (2007). Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates—The ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 286-291. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.02.004.
- Liu, C. M., McLean, P. A., Sookdeo, C. C., & Cannon, F. C. (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(6), 1799-1804.
- Lock, M. A. (1981). River epilithon. A light and organic energy reducer. En Lock M. A. & Williams D. D. (Eds). 1981. Perspectives in running water ecology. *Plenum Press*. Pp: 1-40.

- Lock, M. A. (1993). Attached microbial communities in rivers. En Lock M. A. (Ed). 1993. Aquatic microbiology: an ecological approach. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford. Pp:113-138.
- Lozano, V., Vinocur, A., Sabio y García, C., Allende, L., Cristos, D., Rojas, D., ... Pizarro, H. (2018). Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1010-1019. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.006.
- Mackereth, F. J., Heron, J. & Talling, J. F. (1978). *Water analysis: some revised methods for limnologists*. *Freshwater Biological Association, Scientific Publication* 36, 120 p.
- Magbanua, F. S. (2012). *Agricultural intensification and stream health: combined impacts of pesticide and sediment* (Doctoral dissertation, University of Otago, Dunedin, New Zealand). Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/d1e5/0aa4756eafe97bc58380b6bf68057884af1f.pdf>
- Malmqvist, B., & Rundle, S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation*, 29(2), 134-153. doi:10.1017/s0376892902000097.
- Mann, R. M. & Bidwell, J. R. (1999). The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of Southwestern Australian Frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(2), 193-199. doi:10.1007/s002449900460.
- Marchese, M., Frau, D., Licursi, M., Gutiérrez, F., Saigo, M., Gagneten, A. & Gervasio, S. (2018). Forzantes ambientales de la productividad primaria en arroyos pampeanos sometidos a impacto antrópico (Provincia de Santa Fe, Argentina). *Libro de Resúmenes VIII Congreso Argentino de Limnología*, p. 139. Luján, Buenos Aires.
- Martí, L., Burba, J. N. & Cavagnaro, M. (2002). Metales pesados en fertilizantes fosfatados, nitrogenados y mixtos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo*, 34: 43-48.
- Méndez, M. E. (2019). Dinámica de la comunidad zooplanctónica en humedales periurbanos de San Justo (Santa Fe) impactados por la actividad agrícola. Tesis de grado. Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
- Miltner, R. J., Baker, D. B., Speth, T. F., & Fronk, C. A. (1989). Treatment of seasonal pesticides in surface waters. *Journal - American Water Works Association*, 81(1), 43-52. doi:10.1002/j.1551-8833.1989.tb03321.x
- Ministerio de Educación. Presidencia de la Nación. (2019). [mapa]. Recuperado de http://mapoteca.educ.ar/files/wp-content/mapas/santa-fe/fisico-mudo/impresion/santa-fe_fisico-mudo.jpg?dl
- Miretzky, P. & Fernández Cirelli, A. (2010). Cr (VI) and Cr (III) removal from aqueous solution by raw and modified lignocellulosic materials: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 180: 1–19.
- Mora-Gómez, J., Freixa, A., Perujo, N., & Barral-Fraga, L. (2016). Limits of the biofilm concept and types of aquatic biofilms. *Aquatic Biofilms. Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*, 229.
- Muñoz, I., Real, M., Guasch, H., Navarro, E., & Sabater, S. (2001). Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. *Aquatic toxicology*, 55(3-4), 239-249.
- Murphy, J., & Riley, J. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36. doi:10.1016/s0003-2670(00)88444-5
- Navarro Rodríguez E. (1998). Respuesta ecotoxicológica de comunidades microbentónicas de ríos mediterráneos. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España.

- Navarro, E., Guasch, H., & Sabater, S. (2002). Use of microbenthic algal communities in ecotoxicological tests for the assessment of water quality: the Ter river case study. *Journal of Applied Phycology*, 14(1), 41-48. doi:10.1023/a:1015242301451.
- Newton, M., Howard, K. M., Kelpsas, B. R., Danhaus, R., Lottman, C. M., & Dubelman, S. (1984). Fate of glyphosate in an Oregon forest ecosystem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(5), 1144-1151. doi:10.1021/jf00125a054
- Odum, H. T. (1956). Primary Production in Flowing Waters. *Limnology and Oceanography*, 1(2), 102-117. doi:10.4319/lo.1956.1.2.0102.
- Olejnik, S., & Algina, J. (2003). Generalized Eta and Omega Squared Statistics: Measures of Effect Size for Some Common Research Designs. *Psychological Methods*, 8(4), 434-447. doi:10.1037/1082-989x.8.4.434.
- Pan, Y., Stevenson, R. J., Hill, B. H., Kaufmann, P. R., & Herlihy, A. T. (1999). Spatial patterns and ecological determinants of benthic algal assemblages in Mid-Atlantic streams, USA. *Journal of Phycology*, 35(3), 460-468. doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3530460.x
- Panda, S. K., & Parta, H. K. (1997). Fisiología de la toxicidad del cromo en plantas: una revisión. *Plant Physiol. Biochem*, 24, 10-17.
- Pannard, A., Le Rouzic, B., & Binet, F. (2008). Response of phytoplankton community to low-dose atrazine exposure combined with phosphorus fluctuations. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 57(1), 50-59.
- Park, D., Lim, S.L., Yun, Y.S., Park, J.M. (2008). Development of a new Cr (VI)-biosorbent from agricultural biowaste, *Bioresour. Technol.*, 99, 8810–8818.
- Pechlaner, R. (2002). Glyphosate in herbicides: an overlooked threat to microbial bottom—up processes in freshwater systems. *SIL Proceedings, 1922-2010*, 28(4), 1831-1835. doi:10.1080/03680770.2001.11901944.
- Pecorari, S., José de Paggi, S., & Paggi, J. C. (2006). Assessment of the urbanization effect on a lake by zooplankton. *Water Resources*, 33(6), 677-685. doi:10.1134/s0097807806060091.
- Pérez, D. J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M. L., Aparicio, V. C., & Costa, J. L. (2017). Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(12), 3206-3216. doi:10.1002/etc.3897
- Pérez, G. L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodríguez, P., Vera, M. S., Nascimento, M. D., ... Zagarese, H. (2007). Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*, 17(8), 2310-2322. doi:10.1890/07-0499.1.
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A. & Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156(1), 61-66. doi:10.1016/j.envpol.2008.01.015.
- Pessagno, R. C., Dos Santos Afonso, M., & Torres Sanchez, R. M. (2005). N-(Phosphonomethyl) glycine interactions with soils. En *Anales de la Asociación Química Argentina*, 93(4-6), 97-108. Asociación Química Argentina.
- Pestalozzi, G. H. (1983). Das Phytoplankton des Süßwassers: Systematik und Biologie. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller).
- Pórfido, O. D. (2014). *Los plaguicidas en la República Argentina*. Recuperado de Ministerio de Salud de la Nación: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000341cnt-14-Plaguicidas_Argentina.pdf.
- Portocarrero, R., Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Morales, C., Lizondo, M. & Costa, J. L. (2016). *Presencia de ametrina y atrazina en los sistemas hídricos superficiales y subterráneos del este cañero de la provincia de Tucumán*.

Recuperado de <https://inta.gov.ar/documentos/presencia-de-ametrina-y-atrazina-en-los-sistemas-hidricos-superficiales>.

- Pratt, J. R., Melendez, A. E., Barreiro, R., & Bowers, N. J. (1997). Predicting the ecological effects of herbicides. *Ecological Applications*, 7(4), 1117-1124. doi:10.1890/1051-0761(1997)007[1117:pteeoh]2.0.co;2.
- Primost, J. E., Marino, D. J., Aparicio, V. C., Costa, J. L., & Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic pampas agroecosystem, Argentina. *Environmental Pollution*, 229, 771-779. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.006
- Pusch, M., Fiebig, D., Brettar, I., Eisenmann, H., Ellis, B. K., Kaplan, L. A., ... Traunspurger, W. (1998). The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology*, 40(3), 453-495. doi:10.1046/j.1365-2427.1998.00372.x
- Qian, H., Daniel Sheng, G., Liu, W., Lu, Y., Liu, Z. & Fu, Z. (2008). Inhibitory effects of atrazine on *Chlorella vulgaris* as assessed by Real-time Polymerase Chain Reaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(1), 182. doi:10.1897/07-163.1
- Regaldo, L.; Gagneten, A. M.; Gervasio, S.; Popielarz, A.; Licursi, M.; Repetti, M. R.; Reno, U. & Marchese, M. (2018) Relevamiento de agroquímicos, metales y arsénico en sistemas lóticos del sur de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Libro de Resúmenes VIII Congreso Argentino de Limnología*, p. 140. Luján, Buenos Aires.
- Regaldo, L., Gutierrez, M. F., Reno, U., Fernández, V., Gervasio, S., Repetti, M. R. & Gagneten, A. M. (2017). Water and sediment quality assessment in the Colastiné-Corralito stream system (Santa Fe, Argentina): impact of industry and agriculture on aquatic ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6951-6968. doi:10.1007/s11356-017-0911-4.
- Relyea, R. A. (2005). The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15(4), 1118-1124. doi:10.1890/04-1291.
- Reno, U. (2017). *Contaminación acuática por glifosato: efecto sobre especies nativas y eficiencia de procesos de remediación* (Tesis Doctoral, Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina). Recuperado de <http://hdl.handle.net/11185/957>.
- Reno, U., Gutierrez, M. F., Longo, M., Vidal, E., Regaldo, L., Negro, A., ... Gagneten, A. M. (2015). Microcrustaceans: biological models to evaluate a remediation process of glyphosate-based formulations. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(10). doi:10.1007/s11270-015-2616-y.
- Reno, U., Gutierrez, M., Regaldo, L. & Gagneten, A. (2014). The Impact of Eskoba®, a Glyphosate Formulation, on the Freshwater Plankton Community. *Water Environment Research*, 86(12), 2294-2300. doi:10.2175/106143014x13896437493580.
- Reno, U., Regaldo, L., Vidal, E., Mariani, M., Zalazar, C. & Gagneten, A. M. (2016). Water polluted with glyphosate formulations: effectiveness of a decontamination process using *Chlorella vulgaris* growing as bioindicator. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2279-2286. doi:10.1007/s10811-015-0755-6.
- Rodrigues Capítulo, A., Gómez, N., Giorgi, A., & Feijoó, C. (2010). Global changes in pampean lowland streams (Argentina): implications for biodiversity and functioning. *Global Change and River Ecosystems—Implications for Structure, Function and Ecosystem Services*, 53-70. doi:10.1007/978-94-007-0608-8_5.
- Romani, H. G., Guasch, H. & Balaguer, M. D. (2016). Limits of the Biofilm Concept and Types of Aquatic Biofilms. En *Aquatic Biofilms* (pp. 3- 27). Poole, England: Caister Academic Press.
- Ronco, A. E., Marino, D. J., Abelando, M., Almada, P. & Apartin, C. D. (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface

- water and bottom sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(8). doi:10.1007/s10661-016-5467-0.
- Rueppel, M. L., Brightwell, B. B., Schaefer, J., & Marvel, J. T. (1977). Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of agricultural and food chemistry*, 25(3), 517-528.
 - Sabater, S., Sabater, F., & Armengol, J. (1993). Ecología de los ríos mediterráneos. *Investigación y Ciencia*, 203, 72-79.
 - Sabater, S. & Borrego, C. (2015). Application of Microcosm and Mesocosm Experiments to Pollutant Effects in Biofilms. *Springer Protocols Handbooks*, 135-151. doi:10.1007/8623_2015_170.
 - Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C. & Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1425-1434. doi:10.1007/s00216-006-1051-8.
 - Schindler, D. W. (1987). Detecting Ecosystem Responses to Anthropogenic Stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(S1), s6-s25. doi:10.1139/f87-276.
 - Secretaría de Agroindustria, Ministerio de Producción y Trabajo, Presidencia de la Nación. (7 de mayo de 2019) Estimaciones Agrícolas y Delegaciones. Recuperado de: <https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/>
 - Seguin, F., Druart, J. & Le Cohu, R. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 37(1), 3-8. doi:10.1051/limn/2001004
 - Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication*, 117 pp. Urbana: University of Illinois Press.
 - Shorer, M. & Eisele, M. (1997). Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. *Water, Air, and Soil Pollution* 99: 651-659.
 - Solari, L. C., & Claps, M. C. (1996). Planktonic and benthic algae of a pampean river (Argentina): comparative analysis. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 32(2), 89-95. doi:10.1051/limn/1996011.
 - Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, K. R., Klaine, S. J., La Point, T. W., ... Williams, W. M. (1996). Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(1), 31-76. doi:10.1002/etc.5620150105
 - Stevenson R. J. & Pan Y. (1999). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. En: Stoermer E. F. & Smol J. P. (eds.). *The diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. Cambridge University Press. 469 p.
 - Stevenson R.J. (1983). Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. *Ecology* 64(6): 1514-1524.
 - Stevenson, R. J. (1996). An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. En Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L., & Thorp, J. H. (1996). *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystem*. Cambridge, MA: Academic Press. 753 p.
 - Stevenson, R.J. (1997). Resource thresholds and stream ecosystem sustainability. *Journal of the North American Benthological Society* 16, 410-424.
 - Stevenson, R. J., Rier, S. T., Riseng, C. M., Schultz, R. E., & Wiley, M. J. (2006). Comparing effects of nutrients on algal biomass in streams in two regions with different disturbance regimes and with applications for developing nutrient criteria. *Hydrobiologia*, 149-165. doi:10.1007/1-4020-5070-4_11
 - Streble, H., & Krauter, D. (1987). *Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce. La vida en una gota de agua* (2da ed.). Barcelona: Ediciones Omega, S. A.

- Symoens J. J., Kusel-Fetzmann E. & Descy J. P. (1988) Algal communities of continental waters. En: Symoens J. J. (ed.) *Vegetation of inland water*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Printed in the Netherlands. 400 p.
- Tang, J., Hoagland, K. D. & Siegfried, B. D. (1997). Differential Toxicity of Atrazine to Selected Freshwater Algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(4), 631-637. doi:10.1007/s001289900526
- Tell, G., & Conforti, V. (1986). Euglenophyta pigmentadas de la Argentina. Stuttgart: Gebruder Borntraeger Verlagsbuchhandlung.
- Thompson, D. G., Wojtaszek, B. F., Staznik, B., Chartrand, D. T., & Stephenson, G. R. (2004). Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of vision® herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 843. doi:10.1897/02-280.
- Thurman, E. M., Goolsby, D. A., Meyer, M. T., & Kolpin, D. W. (1991). Herbicides in surface waters of the midwestern United States: The effect of spring flush. *Environmental Science & Technology*, 25(10), 1794-1796. doi:10.1021/es00022a018
- Tien C. H. J, Wub W. H, Chuang T. L, Chen C. S. (2009). Development of river biofilms on artificial substrates and their potential for biomonitoring water quality. *Chemosphere* 76: 1288–95.
- Tiili, A., Montuelle, B., Bérard, A., & Bouchez, A. (2011). Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Science of The Total Environment*, 409(11), 2102-2113. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.056.
- Tsui, M. T., & Chu, L. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189-1197. doi:10.1016/s0045-6535(03)00306-0.
- USEPA, 2008. Risks of glyphosate use to federally threatened California Red-legged Frog (*Rana aurora draytonii*), United States Environmental Protection Agency, Environmental Fate and Effects Division, Office of Pesticide Programs, Washington, D.C. 20460.
- Van Dam, H., Mertens, A., & Sinkeldam, J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28(1), 117-133. doi:10.1007/bf02334251
- Van Luijn, F., Van der Molen, D. T., Luttmmer, W. J., & Boers, P. C. M. (1995). Influence of benthic diatoms on the nutrient release from sediments of shallow lakes recovering from eutrophication. *Water Science and Technology*, 32(4), 89.
- Vera, M. S. & Trinelli M. A. (2018). ¿Es posible la recuperación del perifiton luego de la exposición al glifosato? *Libro de Resúmenes VIII Congreso Argentino de Limnología*, p. 134. Luján, Buenos Aires.
- Vera, M. S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M. M., ... Pizarro, H. (2012). Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21(7), 1805-1816. doi:10.1007/s10646-012-0915-2.
- Vera, M. S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M. M., ... Pizarro, H. (2012). Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21(7), 1805-1816. doi:10.1007/s10646-012-0915-2
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., ... Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), 710-721. doi:10.1007/s10646-009-0446-7.
- Wang, C., Lin, X., Li, L. & Lin, S. (2016). Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate. *PLOS ONE*, 11(3), doi:10.1371/journal.pone.0151633

- Wang, S., Seiwert, B., Kästner, M., Miltner, A., Schäffer, A., Reemtsma, T., ... Nowak, K. M. (2016). (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – A stable isotope Co-labeling approach. *Water Research*, 99, 91-100. doi:10.1016/j.watres.2016.04.041
- Winer, B. J. (1971). *Statistical principles in experimental design*. New York, NY: McGraw-Hill Companies.
- Yallop, M. L.; Paterson, D. M. & Wellsbury, P. (2000). Interrelationships between rates of microbial production, exopolymer production, microbial biomass, and sediment stability in biofilms of intertidal sediments. *Microbial Ecology* 39: 116–127.
- Zirena Vilca, F.; Wildor Gosgot, A.; Campos Quiróz & Zamalloa Cuba, W. A. (2018). Glifosato en cuerpos hídricos: problema ambiental. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 20(3), 325-332. doi:10.18271/ria.2018.396.

Bibliografía consultada:

- Bérard, A., Leboulanger, C. & Pelte, T. (1999). Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to Atrazine in Natural Phytoplankton Populations and in Pure Culture: Influence of Season and Temperature. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(4), 472-479. doi:10.1007/s002449900541
- Brain, R. A., Arnie, J. R., Porch, J. R. & Hosmer, A. J. (2012). Recovery of photosynthesis and growth rate in green, blue-green, and diatom algae after exposure to atrazine. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11), 2572-2581. doi:10.1002/etc.1988
- Bricheux, G., Le Moal, G., Hennequin, C., Coffe, G., Donnadiou, F., Portelli, C., ... Forestier, C. (2013). Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 126-134. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.003
- Carder, J. P. & Hoagland, K. D. (1998). Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(7), 1415. doi:10.1897/1551-5028(1998)017<1415:ceoaaa>2.3.co;2
- Cavalcante, D., Martinez, C. & Sofia, S. (2008). Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 655(1-2), 41-46. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.010
- CONICET (2009) Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Comisión Nacional de Investigación sobre agroquímicos, decreto 21/2009. Bs. As. pp 129.
- Edwards, W. M., Triplett, G. B. & Kramer, R. M. (1980). A Watershed Study of Glyphosate Transport in Runoff1. *Journal of Environment Quality*, 9(4), 661. doi:10.2134/jeq1980.00472425000900040024x
- Franz, J. E., Mao, M. K. & Sikorski, J. A. (1997). *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. Amer Chemical Society.
- Lopretto, E. & Tell, G. (1995). *Ecosistemas de aguas continentales: metodologías para su estudio*. La Plata: Ediciones Sur.
- Miranda, C.; Lozano, V.; Vera, M. S.; Sabio y García, C; Cataldo, D. & Pizarro, H. (2018) Efecto del glifosato, 2,4-D y la mezcla de ambos sobre la concentración de oxígeno disuelto en el agua y la mortalidad de *Limnoperna fortunei*. *Libro de Resúmenes VIII Congreso Argentino de Limnología*, p. 133. Luján, Buenos Aires.
- Nelson, K. J., Hoagland, K. D. & Siegfried, B. D. (1999). Chronic effects of atrazine on tolerance of a benthic diatom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(5), 1038. doi:10.1897/1551-5028(1999)018<1038:ceooot>2.3.co;2
- Pérez, G. L.; Vera, M. S. & Miranda, L. (2011). Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In Kortekamp, A. *Herbicides and Environment* (pp. 343- 368). Norderstedt, Germany: BoD – Books on Demand.

- Pip, E. (1978). A survey of the ecology and composition of submerged aquatic snail-plant communities. *Can. J. Zool.* 56, 2263-2279.
- Rohr, J. R. & Crumrine, P. W. (2005). Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications*, 15(4), 1135-1147. doi:10.1890/03-5353
- Roy, D. N. & Konar, S. K. (1989). Development of an analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils by nitrogen-selective gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(2), 441-443. doi:10.1021/jf00086a038
- Sabio y García, C.A., Vera, M.S., Miranda, C.E., Izaguirre, I., Pizarro, N.H. (2018) El efecto del glifosato sobre organismos no-blanco difiere entre formulados comerciales. *Libro de Resúmenes VIII Congreso Argentino de Limnología*, p. 133. Luján, Buenos Aires.
- UNL. 2010. Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato. Servicio altamente especializado a terceros, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. pp 271.
- Valk, A. V. (1989). The basis for food chains in prairie wetlands. En *Northern Prairie Wetlands* (pp. 316- 339). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Wan, M., Kuo, J., McPherson, B. & Pasternak, J. (2006). Agricultural Pesticide Residues in Farm Ditches of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 41(5), 647-669. doi:10.1080/0360123060070