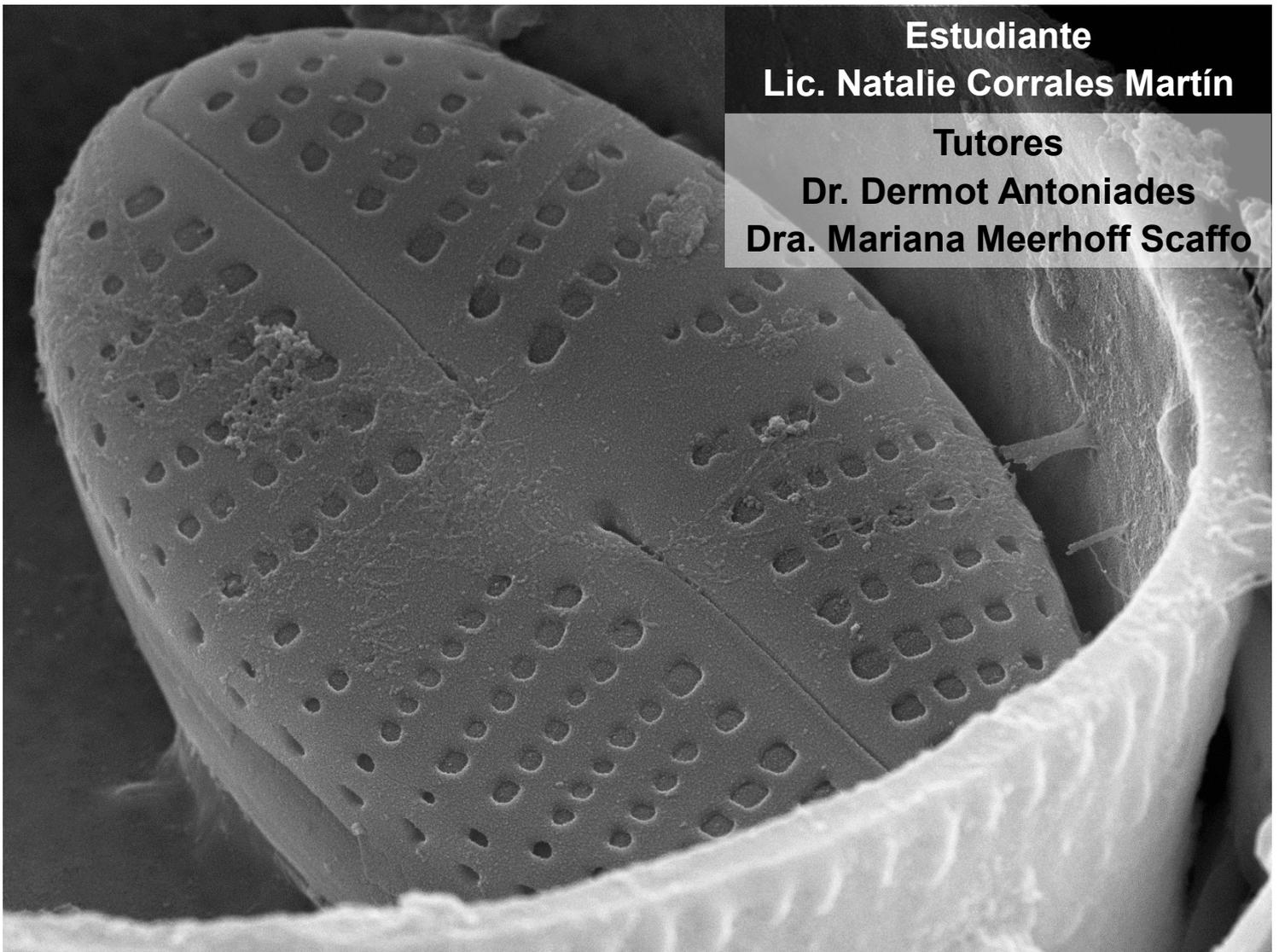


Universidad de la República, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Tesis de Maestría

Programa Pedeciba Geociencias

# **Efectos del glifosato en ecosistemas acuáticos: análisis experimental de las respuestas de la comunidad de diatomeas perifíticas (Laguna del Cisne, Canelones)**



**Estudiante**

**Lic. Natalie Corrales Martín**

**Tutores**

**Dr. Dermot Antoniades**

**Dra. Mariana Meerhoff Scaffo**

Página de aprobación

Director: Dr. Dermot Antoniades

Co-directora: Dra. Mariana Meerhoff Scaffo

Tribunal:

Dr. Javier García Alonso, presidente

Dra. Carla Kruk, vocal

Dra. Haydée Pizarro, vocal

Fecha: 20/11/18

Calificación: aprobada con mención

Autora: Lic. Natalie Corrales Martín

## **Agradecimientos**

Agradezco mucho el acompañamiento durante todo el desarrollo de esta tesis de maestría a mis tutores Dermot Antoniades y Mariana Meerhoff. El período de gestación del diseño experimental, el acompañamiento en el trabajo de campo, el apoyo en momentos de cansancio durante el desarrollo de los experimentos siempre presentes ante consultas, el respaldo necesario en mi crecimiento académico, en la identificación de diatomeas y durante el armado y múltiples correcciones de este manuscrito.

Gracias totales por el apoyo en salidas de campo (Dermot A., Mari M., Carme Carballo, Franco Teixeira de Mello, Dani Prina) y en la caza sigilosa de macroinvertebrados en los sustratos previo al inicio del experimento de primavera (Marianita Illarze., Signe Haakonsson, Fati Martigani, Fede Hirsch, Carme C.)!!!

Fue sumamente importante el apoyo con equipos y botes de los compañeros de la sección de Limnología de Facultad de Ciencias (Luis Aubriot, Guillermo Chalar) y del grupo de Ecología y Rehabilitación de Sistemas Acuáticos del Cure Maldonado, Gracias!!

Agradezco a las colegas de la sección Limnología de Facultad de Ciencias (Andre Piccardo, Fede H.) y del grupo de Ecología y Rehabilitación de Sistemas Acuáticos del Cure Maldonado (Claudia Fosalba, Paula Levrini), por su colaboración en el procesamiento de nutrientes en distintas instancias, unas genias!!!

Gracias a la familia por siempre estar, cuando tantas veces se perdió de mi presencia total en pos de la tesis ;).

Gracias por el apoyo incondicional mi mol. Desde salir al campo conmigo en bote inflable con riesgo importante a chapuzón, hasta verme llegar a cualquier hora durante los experimentos,irme meses de pasantía, fines de semana de compu total. Gracias por todo este compartir y ser soporte en las opciones tomadas. Gracias queda corto.

Grupete tesis, por ser red de apoyo solidísimo en todo momento (Claudi Simón, Noe Espinosa, Analía Marrero alias Lady, Anita Pita) y Alfo López y Marianita I. por el aguante en el último tirón del manuscrito. GRACIAS!!!

Gracias al tribunal Dra. Haydée Pizarro, Dra. Carla Kruk y Dr. Javier García por aceptar destinar de su tiempo a la corrección e importantes aportes a este manuscrito final!!

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), tanto por la beca de maestría que me permitió desarrollar este trabajo, como por los fondos de movilidad que me permitieron profundizar en la identificación de las especies de diatomeas de la tesis con la Dra. Nora Irene Maidana en la Universidad de Buenos Aires.

Gracias al gobierno de Canadá por la beca que me otorgó mediante el programa ELAP que me permitió realizar los conteos del experimento de primavera y a los fondos de Pedeciba Geociencias que me permitieron realizar los conteos de invierno en la Universidad de Laval, con una disponibilidad absoluta de microscopios de altísima calidad y una biblioteca completísima de taxonomía.

Por último, gracias a la ISDR (International Society for Diatom research) por financiar mi participación en el 24<sup>th</sup> International Diatom Symposium que me permitió mostrar los resultados preliminares de esta tesis.

**Mucho hecho y mucho que agradecer en este camino recorrido**

## **Tabla de contenido**

Resumen.....	7
Abstract.....	10
1. Marco teórico.....	13
1.1. Herbicidas basados en glifosato .....	17
1.2. Perifiton en biomonitoreos .....	24
1.3. Antecedentes en Uruguay .....	28
1.4. Aproximación de la tesis .....	30
1.5. Hipótesis General .....	31
1.6. Objetivo general.....	32
1.7. Objetivos específicos .....	32
1.8. Hipótesis específicas .....	33
2. Metodología.....	34
2.1. Área de estudio.....	34
2.1.1. Caracterización del área de estudio .....	35
2.2. Aproximación experimental.....	37
2.2.1. Trabajo de campo.....	37
2.2.2. Manipulación experimental en laboratorio .....	39
2.2.3. Procesamiento y análisis taxonómico de las diatomeas.....	45
2.3. Análisis estadístico .....	47
2.3.1. Análisis estadísticos asociados al Objetivo Específico 1 ....	48
2.3.2. Análisis estadísticos asociados a los Objetivos Específicos 2 y 3 .....	50
3 Resultados .....	54
3.1 Objetivo Específico 0 .....	54
3.1.1 Usos del suelo.....	54
3.1.2 Concentración de nutrientes en el cuerpo de agua .....	56
3.1.3 Precipitaciones en la región.....	58
3.2 Objetivo Específico 1 .....	59
3.2.2 Análisis de la comunidad de especies de diatomeas .....	62
3.3 Objetivos Específicos 2 y 3 .....	69
3.3.1 Análisis de especies indicadoras.....	69
4 Discusión.....	75
4.1 Procesos a distintas escalas espaciales y temporales .....	75

4.2	Efectos del HBG sobre la composición comunitaria de diatomeas perifíticas .....	79
4.3	Detección de especies indicadoras y de umbrales de reacción..	83
5	Conclusiones.....	90
6	Perspectivas.....	91
7	Anexo .....	94
8	Bibliografía .....	104

## Resumen

Los ecosistemas acuáticos continentales son esenciales para el funcionamiento de la biósfera y el desarrollo de las sociedades, y a la vez son muy sensibles a los impactos antrópicos. La expansión e intensificación de las prácticas agrícolas es un fenómeno global que implica un elevado uso de agroquímicos, que luego de su aplicación pueden ingresar a los sistemas acuáticos a través de escorrentía aérea, superficial y subterránea. El herbicida más utilizado a nivel mundial en la actualidad es el glifosato, que constituye el ingrediente activo de diversos formulados comerciales. A pesar de ser catalogado como seguro para la biota, varios estudios han encontrado efectos adversos del glifosato sobre diferentes organismos terrestres y acuáticos, incluso sobre varios que no serían blanco de acción de la sustancia. También ha sido recientemente clasificado como posiblemente cancerígeno por la Organización Mundial de la Salud, lo que aumentó el debate sobre este herbicida a nivel académico, de gestión y del público en general.

Esta tesis se centró en la Laguna del Cisne (Canelones, Uruguay), sistema que ha sido utilizado desde 1971 por OSE (Obras Sanitarias del Estado) como fuente de agua potable. En su cuenca se ha practicado agricultura intensiva en las últimas dos décadas, actividad que podría poner en riesgo los servicios ecosistémicos que provee.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la exposición a un herbicida comercial en base a glifosato (en adelante, HBG, i.e. sal de isopropilamina de glifosato) sobre la estructura de una comunidad natural de diatomeas perifíticas proveniente de la Laguna del Cisne. Se eligió la comunidad de diatomeas perifíticas como modelo de trabajo por no ser la comunidad objetivo del herbicida a pesar de ser potencialmente blanco por poseer la ruta metabólica del ácido shíkimico, además de por su importancia ecosistémica y por sus buenas características como grupo indicador de impactos ambientales. Por ser un aspecto muy poco tratado

aún en la literatura especializada, se eligió trabajar con una comunidad natural evaluando cambios en su estructura. A fin de contextualizar la estructura de esta comunidad se analizaron los cambios históricos en el uso del suelo de la cuenca, la concentración de nutrientes en el agua y el régimen de precipitaciones de la zona previo a las colectas. Se generó una comunidad natural de perifiton a partir de la colonización de sustratos artificiales introducidos en la laguna durante 15 días. La misma fue posteriormente expuesta en laboratorio a cuatro concentraciones del principio activo del HBG (1.0, 3.0, 5.0, y 10.0 mg L<sup>-1</sup>), además del control (ausencia del HBG), para evaluar un posible efecto concentración-dependiente. Se tomaron muestras cada cinco días por un período de 15 días, las que fueron procesadas de forma estándar para el análisis taxonómico de diatomeas. Para evaluar las respuestas de distintos ensamblajes comunitarios el experimento fue ejecutado en invierno 2014 y primavera 2015.

La composición taxonómica de la comunidad de diatomeas fue similar para las dos estaciones; sin embargo, la abundancia relativa de las especies dominantes fue muy distinta. En invierno la riqueza fue de 99 especies y *Melosira varians* fue la especie más abundante, mientras que en primavera se identificaron 115 especies y la composición de especies fue más equitativa. Se encontró un claro cambio en la composición de especies según la concentración del principio activo del HBG. En particular, varias especies de diatomeas resultaron sensibles, es decir, tendieron a disminuir su abundancia relativa a concentraciones más elevadas del HBG (i.e. *Nitzschia subacicularis*, *Ulnaria ulna*, *Ulnaria acus*, *Nitzschia paleacea* y *Fragilaria* sp.1), mientras que otro conjunto de especies fue tolerante y tendieron a prevalecer (i.e. *Sellaphora nigri*, *Craticula molestiformis*, *Craticula subminuscula*, cf. *Mayamaea permitis*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula erifuga*).

Aunque el ensamblaje de especies encontrado ha sido en su totalidad reportado en la bibliografía como característico de ambientes impactados

por contaminación orgánica y nutrientes, fue posible identificar un grupo de especies sensibles a la exposición a HBG. Este estudio constituye uno de los escasos trabajos que evalúan cambios a nivel de composición de especies en esta comunidad clave, y contribuye a la aplicación de las diatomeas como bioindicadoras de contaminación por HBG en ecosistemas someros eutróficos. Asimismo, se abre como perspectiva el evaluar por separado distintos efectos ambientales del HBG, tales como el posible aumento en la concentración de nutrientes debido a la formulación versus el efecto sólo debido al principio activo, los efectos crónicos de exposición a bajas concentraciones para evaluar posibles efectos teratogénicos sobre esta comunidad y los mecanismos fisiológicos que otorgan tolerancia HBG a nivel de especies y a nivel comunitario.

**Palabras clave:** diatomeas perifíticas, glifosato, agua potable.

## **Abstract**

Freshwater ecosystems are essential for the support and development of human societies and they are very sensitive to anthropogenic impacts. The intensification of agricultural practices is a global phenomenon which implies a great use of agrochemicals. After their application to crops, these chemicals may enter aquatic ecosystems through surface runoff and groundwater inputs. Glyphosate is the active ingredient of the most widely used herbicide around the globe. Despite being described as relatively safe for biota, several studies have found adverse effects of glyphosate, its metabolites, and surfactants on different aquatic and terrestrial organisms. It has also been recently classified as a possible carcinogen by the World Health Organization, fueling the debate in different societal sectors.

This thesis was conducted in Laguna del Cisne (Canelones, Uruguay), a reservoir used, since 1971, as a source of water by the state water utility (OSE). Intensive agriculture has been present in its basin for the past two decades, potentially jeopardizing its ecosystem services.

The objective of this study was to determine the effect of the exposure to glyphosate-based herbicide (hereafter, GBH, i.e. glyphosate isopropylamine salt) on a natural periphytic diatom community from Laguna del Cisne. Periphytic diatoms were chosen as a case study given they are a potential target of GBH due to having the shikimic acid metabolic route, despite not being the official target of the herbicide. Periphyton plays an important role in natural ecosystems and possesses good traits as a bioindicator community. Moreover, we chose to work at the natural periphytic community level because this has been little studied in the scientific literature so far. Historic changes in land use in the basin and water nutrient concentrations in the reservoir as well as precipitation patterns were analyzed to contextualize the structure of natural periphyton. A natural periphyton community was allowed to colonize artificial substrata introduced in the reservoir during 15 days. In the lab, a 15-day bioassay was

conducted, where periphytic diatoms were exposed to four concentrations of GBH (1.0, 3.0, 5.0, and 10.0 mg L<sup>-1</sup>), in addition to a control treatment without GBH added, to evaluate concentration-dependent effects. The experiment was executed in two seasons to evaluate responses of potentially different diatom assemblages: winter 2014 and spring 2015, and samples were taken every five days and processed according to standard methods for diatom analysis.

The overall species composition of the diatom community was similar for the two seasons; however, the dominant taxa differed greatly between seasons. In winter, we found 99 species, with *Melosira varians* being the most abundant species in every sample, whereas in spring 115 species were identified and the composition was more evenly distributed. We found a clear change in the community composition with increasing glyphosate concentrations. In particular, a group of species appeared to be sensitive to increasing GBH concentrations (*Nitzschia subacicularis*, *Ulnaria ulna*, *Ulnaria acus*, *Nitzschia paleacea*, *Fragilaria* sp.1), while another group of species appeared to be tolerant (*Sellaphora nigri*, *Craticula molestiformis*, *Craticula subminuscula*, cf. *Mayamaea permitis*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula erifuga*).

Even though the assemblage of species identified in Laguna del Cisne has been reported in the scientific literature as tolerant to organic contamination, a set of species were sensitive to exposure to GBH. This study represents one of the few works that evaluate changes in species composition in this key aquatic community, and contributes evidence that supports the use of diatoms as good bioindicators of GBH contamination in eutrophic shallow freshwater ecosystems. At the same time, new avenues for further research emerged, such as the evaluation of different environmental effects of GBH in freshwaters (e.g. the effects of the potential increase in nutrient concentration vs. the effect of the active ingredient; chronic exposure to low concentrations to evaluate teratogenic responses in the community) as well

as the determination of potential physiological mechanisms promoting resistance to GBH at the species and community levels.

**Keywords:** periphytic diatoms, glyphosate, drinking water.

## 1. Marco teórico

Los sistemas acuáticos continentales son responsables del sustento de una gran biodiversidad, se estima que sostienen al 10% de las especies conocidas además de un alto porcentaje de la diversidad global de peces ( $\approx 45\%$ ) (Strayer & Dudgeon, 2010; Carpenter *et al.*, 2011). Son esenciales para el sustento de la sociedad (WWDR, 2009), tanto de manera directa por proveer importantes recursos (e.g. agua y alimento), como de manera indirecta, mediante otros servicios ecosistémicos que permiten su desarrollo (e.g. servicios ecosistémicos de regulación) (Power, 2010). A su vez, son muy sensibles a impactos antrópicos tales como cambios del uso del suelo en sus cuencas de drenaje, alteraciones físicas en los cursos de agua y márgenes, contaminación, cambio climático, sobreexplotación de especies e introducción de especies invasoras (Malmqvist & Rundle, 2002; Foley *et al.*, 2005; Dudgeon *et al.*, 2006; MEA, 2005; Moss, 2008; Carpenter *et al.*, 2009; Carpenter *et al.*, 2011). Los ecosistemas acuáticos continentales han sido históricamente usados para la reserva de agua, generación de energía, riego, transporte, control de inundaciones y dilución de contaminantes (Vitousek *et al.*, 1997; Carpenter *et al.*, 2011; Dudgeon *et al.*, 2006; Foley *et al.*, 2005).

La intensificación agrícola es actualmente un fenómeno global (Matson *et al.*, 1997; Foley, 2005). El aumento demográfico humano y el aumento del consumo a nivel mundial, han sido acompañados por una mayor presión

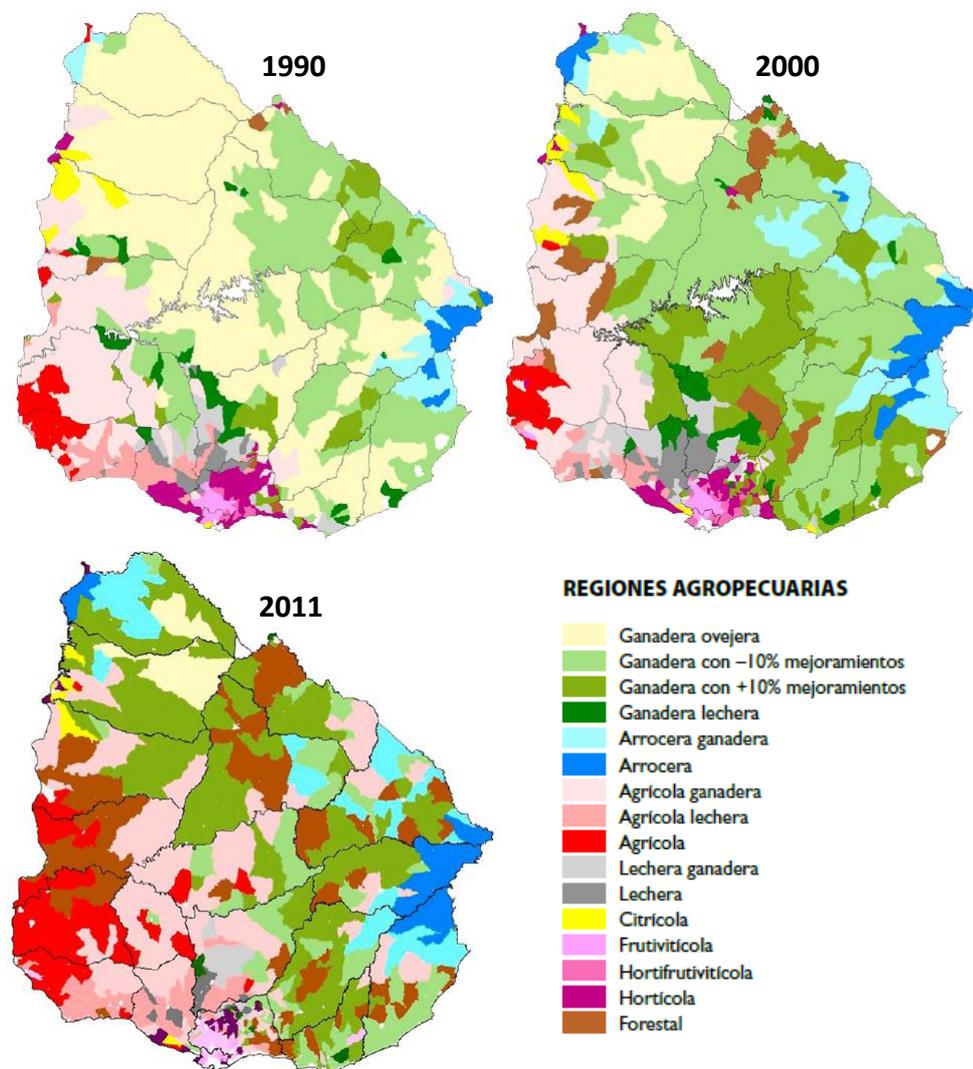
productiva sobre la industria alimenticia. El área de suelo destinado a la producción agrícola ha aumentado y su uso se ha intensificado. Actualmente los agroecosistemas compuestos por cultivos y praderas se encuentran altamente representados a nivel mundial, cubriendo más del 40% del suelo total (FAO, 2009; Foley *et al.*, 2005; Foley *et al.*, 2011) y más del 50% de las zonas aptas para la agricultura (Tilman *et al.*, 2001; Dale & Polasky, 2007; Foley *et al.*, 2011). La forma de manejo del agroecosistema puede favorecer o no el mantenimiento del servicio de provisión, aminorando impactos por pérdida de hábitats que conservan la biodiversidad, pérdida de nutrientes por escorrentía, emisiones de gases de efecto invernadero, erosión del suelo, exposición de la biota a pesticidas, entre otros (Dale & Polasky, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Power, 2010; Foley *et al.*, 2011). La intensificación de la actividad ha significado aumentar no sólo la superficie sino también la mecanización, el uso de riego, de fertilizantes y otros agroquímicos (Tilman *et al.*, 2002; Foley *et al.*, 2011).

Muchos de los grandes efectos de la agricultura intensiva sobre los ecosistemas naturales y en particular los ecosistemas acuáticos continentales, están vinculados a alteraciones hidrológicas (a partir del uso del agua para riego, canalizaciones, represas, etc.) y de los ciclos biogeoquímicos (e.g. carbono, fósforo y nitrógeno) (Vitousek *et al.*, 1997; Bonan, 2008). El 70% del agua dulce utilizada por la humanidad es destinada para el riego, siendo además este uso identificado como el factor

con mayor impacto en la escasez de agua dulce a nivel mundial (Vitousek *et al.*, 1997; Foley *et al.*, 2011; Alexandratos & Bruinsma, 2012). A su vez, los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y el fósforo también se han visto severamente impactados por el aumento de la producción agrícola debido a la producción industrial de fertilizantes (fijación del nitrógeno atmosférico y explotación del fósforo), la aplicación de estiércol y las plantaciones de leguminosas fijadoras de nitrógeno (Vitousek *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 2001). Las altas concentraciones de nutrientes que ingresan a los sistemas acuáticos debido a la intensificación agrícola contaminan el agua subterránea, aumentan los niveles de nitratos en el agua potable, aumentan la cantidad de sedimentos y sales disueltas, y causan eutrofización con consecuente aumento de la frecuencia y severidad de floraciones de algas y cianobacterias potencialmente tóxicas e indirectamente provocan eventos de hipoxia y muerte masivas de peces (Howarth *et al.*, 1996; Vitousek *et al.*, 1997; MEA, 2005; Bouwman *et al.*, 2009; Power *et al.*, 2010; Paerl & Otten, 2013).

El Uruguay sigue esta tendencia mundial. La superficie destinada a la agricultura creció 318% en el período 2000 - 2011 (DIEA, 2016) (Figura 1). Si bien en el censo del 2011 la actividad ganadera se encontró en el primer lugar, ocupando 6.467.000 ha del territorio, las actividades agrícolas en conjunto se encontraron en el segundo lugar cubriendo 4.928.000 ha (DIEA, 2016) (Figura 1). Asimismo, los mayores cambios reportados en

cobertura del suelo para el período 2000 – 2011 fueron, de campo natural hacia forestación en primer lugar y hacia la agricultura de secano en segundo lugar, aunque este último uso del suelo es el que mayor área ocupa (2.792.000 ha) (FAO, 2011; DIEA, 2016).



**Figura 1.** Cambios en el uso del suelo en el período 1990 – 2011. La región agropecuaria agrícola es la que presentó el mayor crecimiento entre el 2000 y el 2011 (DIEA, 2016).

Las cuencas de drenaje de varios cuerpos de agua, incluso de sistemas clave por su rol como fuente de agua potable, han sufrido en los últimos años una fuerte intensificación en el uso del suelo (Mazzeo *et al.*, 2003; Teixeira de Mello, 2007; Steffen & Inda, 2010; Goyenola *et al.*, 2011; Chalar, *et al.*, 2013; Bonilla & Meerhoff, 2014; Aubriot *et al.*, 2018), involucrando la aplicación de diversos agroquímicos (e.g. fertilizantes, insecticidas y herbicidas como glifosato) (INIA, 2017; Stabile, 2018). Las consecuencias sobre el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos de estos cambios en el uso de la tierra comienzan a evidenciarse, tanto por el aumento de las concentraciones de nutrientes como por el aumento de los síntomas de eutrofización y presencia de agroquímicos y sus derivados de degradación en diversas matrices ambientales (Bonilla *et al.*, 2015; Goyenola *et al.*, 2015; Griffero *et al.*, 2018; Ernst *et al.*, 2018).

### **1.1. Herbicidas basados en glifosato**

Además de nutrientes, la agricultura intensiva actual utiliza un amplio paquete de otros agroquímicos. En el rubro de los herbicidas, el glifosato (N-(fosfonometil) glicina), de acción post-emergente y de amplio espectro, ha sido el más utilizado desde la década del 1970 a nivel mundial (Goldsborough & Brown, 1988; Woodburn, 2000; Székács & Darvas, 2012). La composición del producto herbicida en base a glifosato (de ahora en adelante, HBG) que llega al consumidor final, contiene, además de la

formulación particular de sal de glifosato, uno o varios surfactantes no iónicos (e.g. POEA es el más utilizado en la formulación Round up) que facilitan el ingreso del ingrediente activo a la planta (Riechers *et al.*, 1995; Dill *et al.*, 2008). Las primeras pruebas sistemáticas de aplicación post-emergente de diferentes HBG disponibles en plaza (e.g. sales de isopropilamina, sodio y potasio) se ejecutaron entre los años 2002 – 2003 en Estados Unidos sobre cultivos resistentes de algodón y maíz (Parker *et al.*, 2005). Múltiples pruebas mostraron ausencia de efecto herbicida sobre los cultivos de interés y así creció abruptamente el uso de esta tecnología a nivel global (Pérez *et al.*, 2011). En América del Sur su rápida expansión se dio a partir del año 2005, junto al aumento de la producción de soja genéticamente modificada (Altieri & Pengue, 2006) destinada principalmente al mercado chino.

Debido a que el modo de acción del glifosato afecta la ruta del ácido shikímico involucrada en la síntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina, tirosina), un conjunto reacciones metabólicas conservadas en plantas, hongos y bacterias pero no en animales, el glifosato ha sido catalogado como inocuo para animales incluyendo a los humanos (Giesy *et al.*, 2000; Dill *et al.*, 2008; Székács & Darvas, 2012). Además, los riesgos a la exposición al glifosato se asumen acotados al corto plazo por su presumida rápida inactivación en suelos, por adsorción y degradación microbiana (US EPA, 1993; Giesy *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001;

Vereecken, 2005). Por otro lado, en las formulaciones tanto los surfactantes como otros aditivos son considerados inertes.

La literatura especializada establece que la vida media del glifosato en el suelo puede variar desde pocos días a incluso años, ya que se encuentra sujeta a su composición (e.g. contenido de cationes y de fosfato) y a su capacidad de sorción (i.e. adsorción a partículas), que no son constantes (Carlisle & Trevors, 1988; Vereecken, 2005; Laitinen *et al.*; 2008; Székács & Darvas, 2012). La principal ruta metabólica de degradación del glifosato produce ácido aminometil fosfónico (AMPA), que luego se metaboliza a dióxido de carbono (Rueppel *et al.*, 1977; Dill *et al.*, 2008). La ruta metabólica secundaria involucra el clivaje de un enlace de alta energía (C-P) que ha sido observado en bacterias del suelo aisladas, en ausencia de otras fuentes de fósforo (Shinabarger & Braymer, 1986; Pipke *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1991; Dick & Quinn, 1995). La mineralización del glifosato en suelo ha sido positivamente correlacionada con la abundancia de bacterias *Pseudomonas* spp. (Vereecken, 2005), cuya actividad metabólica es afectada por la temperatura, la acidez y la humedad del suelo (Insam, 1990). La degradación en el corto plazo del glifosato en suelo no puede ser simplemente asumida.

En este contexto, se ha reportado la presencia de glifosato en aguas superficiales en distintas regiones, siendo sus vías de entrada la deriva aérea, adsorbidos a partículas o la escorrentía superficial y subterránea

(Edwards *et al.*, 1980; Feng, *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 2011). El ingreso a los cuerpos de agua puede también darse deliberadamente, por lavado de tanques utilizados en aplicaciones (Vera *et al.*, 2010; observaciones personales) y por su uso como medida de manejo de macrófitas acuáticas no deseadas (US EPA, 1993). La disipación del glifosato en el medio acuático puede tomar desde pocos días hasta dos semanas, siendo más lenta en aguas alcalinas (Goldsborough & Brown, 1993). Mientras que la degradación del glifosato por procesos abióticos (i.e. fotólisis e hidrólisis) ha sido considerada menor y dependiente de las características de la luz y del medio acuoso (Rueppel *et al.*, 1977; Lund-Hoie & Friestad, 1986; Mallat & Barceló, 1998), la ruta metabólica secundaria de degradación del glifosato ha sido observada en cepas de cianobacterias, aunque con baja afinidad (Forlani *et al.*, 2008). En suma, la degradación del glifosato en agua dependerá de la alcalinidad, los sólidos en suspensión, la fotodegradación, las características de la comunidad microbiana y la capacidad de adsorción del sedimento (Sprankle *et al.*, 1975; Goldsborough & Brown, 1993; Vereecken, 2005).

En la bibliografía regional son variables las concentraciones de glifosato reportadas en ambientes acuáticos naturales, desde un promedio de  $0.06 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  reportados en el Río Paraná (Argentina, Paraguay, Bolivia, Uruguay, Brasil) (Ronco *et al.*, 2016) a un máximo de  $10.9 \text{ mg L}^{-1}$  en el arroyo El Sauce (Buenos Aires, Argentina) (Berkovic *et al.*, 2006 en Vera *et*

*al.*, 2010) (resumen bibliográfico de concentraciones de glifosato halladas en ambientes naturales, Tabla A en Anexo). Existen lineamientos a nivel internacional en términos de las concentraciones de glifosato aceptables en el agua potable y el ambiente. En Canadá también se encuentran reguladas las concentraciones máximas admitidas en sistemas acuáticos en el corto plazo (24 a 96 h) y en el largo plazo (96 h a 28 días), siendo estos valores 0.8 mg L<sup>-1</sup> y 27 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (CCME, 2012). La agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA por su sigla en inglés) admite una máxima concentración en el agua potable de 0.7 mg L<sup>-1</sup> de ingrediente activo (US EPA, 1993), siendo el mismo límite el que rige actualmente en Uruguay (Norma UNIT 833.2008<sup>1</sup>).

Varios estudios han detectado efectos nocivos, tanto del glifosato como de sus metabolitos y los surfactantes agregados sobre la biota terrestre y acuática. Algunos impactos sobre organismos pueden ser explicados por compartir la ruta del ácido shikímico con el blanco de aplicación de los HBG (i.e. plantas). Este es el caso de las comunidades microbianas (Fernandez *et al.*, 2005; Kremer *et al.*, 2005), el fitoplancton (Schaffer & Sebetich, 2004; Pérez *et al.*, 2007; Smedbol *et al.*, 2018), el perifiton (Goldsborough & Brown, 1988; Austin *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2007; Pesce *et al.*, 2009; Vera *et al.*, 2010, 2011, 2012, 2014; Wood, 2017) y los cultivos de algas y cianobacterias (Blanck *et al.*, 1984; Gardner *et al.*, 1997; Wong, 2000; Ma *et al.*, 2001; Tsui & Chu, 2003; Saenz & Di Marzio, 2009; Vendrell *et al.*,

---

<sup>1</sup> Reimpresión corregida julio 2010, adoptada por el Decreto 375/2011.

2009; Reno *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016; Smedbol *et al.*, 2017) (detalles metodológicos en Tabla B en Anexo). Sin embargo, también se han observado efectos negativos del glifosato, el AMPA y el POEA sobre organismos que no comparten este proceso metabólico con las plantas. Algunos de estos organismos son los invertebrados terrestres (Contardo-Jara *et al.*, 2009; Santadino *et al.*, 2014) y acuáticos (Cuhra *et al.*, 2013; Gutierrez *et al.*, 2016), los vertebrados terrestres (Dallegrave *et al.*, 2003; Paganelli *et al.*, 2010), los anfibios (Howe *et al.*, 2004; Relyea, 2005, Relyea *et al.*, 2005; Relyea, 2012) y los peces (Gluszczak *et al.*, 2007; Do Carmo Langiano & Martinez, 2008; Fiorino *et al.*, 2018). También se ha publicado evidencia, particularmente proveniente de América del Sur, que vincula la exposición a HBG con la ocurrencia de problemas reproductivos (abortos espontáneos y malformaciones congénitas) (Avila-Vazquez *et al.*, 2018), enfermedades dérmicas y respiratorias (Camacho & Mejía, 2017) y melanoma (Fortes *et al.*, 2016) en poblaciones humanas rurales. Además se ha reportado un aumento del riesgo de cáncer de mama (Thongprakaisang *et al.*, 2013) y de la actividad genotóxica y citotóxica en células humanas mediante experimentos de exposición de líneas celulares a glifosato (Benachour & Séralini, 2009; Gasnier *et al.*, 2009). Algunos de los mecanismos de afectación, sobre animales y humanos, identificados para los HBG, específicamente el Round up, comprenden la inducción de la muerte celular mediante inhibición de la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, la necrosis por daño a la membrana celular y la

apoptosis mediante actividad enzimática caspasas 3 y 7 (Benachour & Séralini, 2009). El glifosato puro también produce apoptosis, sin embargo, los coadjuvantes han demostrado actuar de manera sinérgica con el glifosato, ya que por ejemplo el POEA modifica la permeabilidad de las células humanas y amplifican la toxicidad inducida por el glifosato mediante apoptosis y necrosis. También el AMPA y el POEA han demostrado dañar las membranas celulares (Benachour & Séralini, 2009). Asimismo, varios estudios caracterizan la capacidad del glifosato como disruptor endocrino. Se ha detectado una estrogenicidad aditiva entre el glifosato y la genisteína, un fitoestrógeno presente en porotos de soja, que son usualmente utilizados como suplemento alimenticio. Esta actividad sinérgica podría aumentar el riesgo al cáncer de mama mediante el aumento de la cantidad de receptores de estrógeno y el crecimiento celular. Esta efectación ha sido observada a bajas concentraciones de glifosato, encontradas en el ambiente y muy por debajo de los niveles autorizados en los alimentos transgénicos (Gasnier, 2009; Thongprakaisang *et al.*, 2013). Otros estudios sobre la capacidad de disrupción endocrina de los HBG sugieren que la exposición crónica a una concentración baja (ambientalmente relevante) podría producir daños en hígado y riñón sobre poblaciones animales y humanas (Mesnage, 2015). Más aún, el glifosato ha sido recientemente catalogado como posiblemente cancerígeno por la Organización Mundial de la Salud (Guyton *et al.*, 2015) y por primera vez, en 2018, un juicio ha fallado a favor del demandante en el caso de una

persona con cáncer terminal asociado a la manipulación frecuente de este agroquímico (La Diaria, 2018; BBC, 2018a). No obstante, las empresas que lo comercializan han afirmado históricamente que otros estudios contradicen estos hallazgos y sostienen la inocuidad del producto, tanto para la salud humana como para el ambiente (EFSA, 2015; BBC, 2018b).

Estos resultados contrastantes, junto con la reciente detección de glifosato en el agua de lluvia en la Pampa argentina (Alonso *et al.*, 2018), han aumentado la polémica a distintos niveles sobre el uso del glifosato, generando gran preocupación social sobre su impacto en fuentes de agua potable y la salud en nuestro país (Blum *et al.*, 2008; Espectador.com, 2013) y en la región, incluyendo una iniciativa de prohibición (ya derogada) de su uso en Brasil (Asociación de Consumidores Orgánicos, 2018). La controversia generada alrededor de este agroquímico sigue vigente, lo que hace muy relevante profundizar en el estudio de sus posibles efectos ambientales.

## **1.2. Perifiton en biomonitoreos**

Existen diversas aproximaciones para evaluar los efectos de sustancias liberadas por la actividad antrópica al ambiente. Los métodos de análisis físico-químicos y biológicos son complementarios y en conjunto conforman una base sólida para la evaluación de la calidad del agua (Round ,1991, 1993). Los bioensayos permiten evaluar efectos tóxicos de contaminantes y

umbrales de tolerancia de organismos bioindicadores. Estos datos pueden utilizarse posteriormente en biomonitoreos, los cuales representan una alternativa confiable y relativamente más económica a algunas técnicas analíticas físico-químicas (Bae & Park, 2014), además de aumentar la probabilidad de detectar efectos integrados a largo plazo sobre los ecosistemas (Stevenson & Pan, 1999).

La comunidad perifítica es una eficiente indicadora de cambios ambientales, debido a que los organismos que la componen son muy sensibles y su composición taxonómica y/o funcional responde rápidamente a cambios físicos, químicos y biológicos (Stevenson y Pan, 1999; Winter y Duthie 2000). Además, por ser una comunidad sésil está expuesta permanentemente a las condiciones ambientales locales y su respuesta puede integrar cambios ambientales en el tiempo (Stevenson *et al.*, 1996; Stevenson & Pan, 1999). Los lagos someros suelen alcanzar niveles tróficos entre mesotróficos y eutróficos y se caracterizan por tener una relativa amplia zona litoral, nicho para el desarrollo de la comunidad de macrófitas que proporcionan abundantes y variados hábitat para la colonización de la comunidad perifítica asociada a plantas (i.e. epifiton) (Wetzel, 1981). Ambas comunidades en conjunto usualmente representan el mayor aporte a la producción primaria en estos cuerpos de aguas y los principales factores que determinan la tasa de producción perifítica son la disponibilidad de luz y de nutrientes, la temperatura y la herbivoría (Wetzel, 1981; Rosemon *et al.*, 1993; DeNicola, 1996; Hill, 1996; Tuji, 2000;

Rodriguez & Bicudo, 2001; Algarte, 2006; Murakami & Rodriguez, 2009; Ferragut & Bicudo 2010). En los distintos ambientes, los tipos de sustratos disponibles son muy variados y la comunidad perifítica es clasificada según el sustrato sobre el que se desarrolla (e.g. epifiton sobre plantas, epiliton sobre piedras, episamon sobre arena). Por ende, el tipo de sustrato debe ser considerado al utilizar a esta comunidad como herramienta de monitoreo, ya que este puede presentar distinta topografía así como ser una fuente de nutrientes (Domitrovic *et al.*, 2013). En este sentido, estandarizar el sustrato mediante el uso de sustratos artificiales inertes y similares entre sí (e.g. el vidrio) controla esta fuente de variabilidad. Asimismo, muchas veces no se dispone de sustratos naturales de fácil recolección, mientras que los sustratos artificiales son de fácil manipulación y aspectos como la profundidad y el tiempo de colonización pueden también ser controlados.

Las diatomeas son algas acuáticas eucariotas, microscópicas y unicelulares que pertenecen a la clase Bacillariophyceae y tienen un aspecto distintivo (a excepción de un par de especies), se encuentran cubiertas por una pared celular de sílice (frústulo) formada por dos valvas (Cox, 2011). Este grupo taxonómico es generalmente predominante dentro de la comunidad perifítica, en parte debido a un conjunto de estrategias adaptativas que le confieren ventajas sobre otros grupos taxonómicos, como la capacidad de adherirse a sustratos mediante poros, producir mucilago y pedúnculos y tener altas tasas de migración (Biggs, 1998;

Fernandes, 2005). Las diatomeas perifíticas son probablemente los organismos más utilizados a nivel mundial en biomonitoreos, debido a su hábito sésil y, entre otros factores, a su rápida respuesta comunitaria específica a perturbaciones del ambiente, lo que le permite detectar cambios en el corto y el largo plazo (Johnson *et al*, 1993; Stoermer & Smol, 1999; Cox, 2011). Además, esta comunidad ofrece varias ventajas metodológicas, pueden ser colectadas con cierta facilidad y rapidez ya que se encuentra en grandes cantidades en superficies pequeñas, el material limpio (i.e. sin materia orgánica) puede ser guardado en láminas permanentes, revisado y compartido con otros laboratorios (Lobo, 2002) y su identificación taxonómica depende totalmente de las características de los frústulos y no del estadio reproductivo o condiciones ambientales en las que el organismo se encuentre (como ocurre con las cianobacterias y las algas verdes). La investigación ecológica de muchas especies pertenecientes a este grupo taxonómico tiene larga data a nivel mundial (Round, 1993), aunque en la región es necesario profundizar en esta área de investigación (Coste & Ector, 2000).

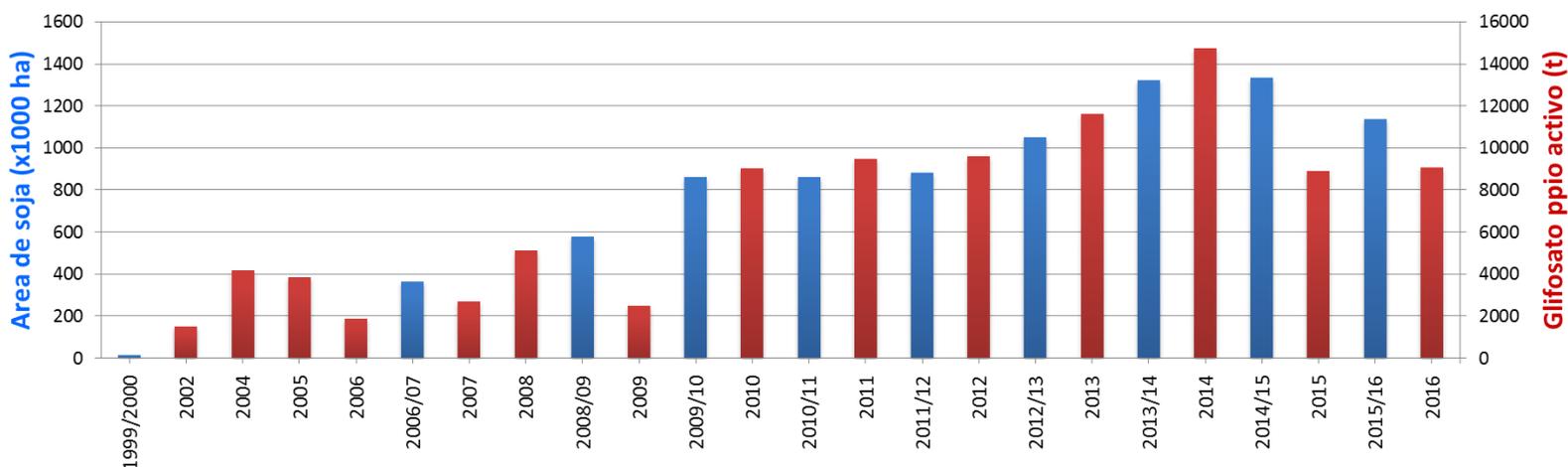
La exposición experimental de ensamblajes de diatomeas a plaguicidas provoca deformaciones de las paredes celulares, aumentos de mortalidad y cambios en su biomasa y composición específica (Debenest *et al.*, 2008, 2009, 2010; Vera *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2012; Wood, 2017), lo que también se ha visto en algunas muestras naturales (Falasco *et al.*, 2009). A pesar de las ventajas de trabajar con cultivos monoespecíficos, el abordaje

comunitario es fundamental para comprender efectos a mayores niveles de complejidad biológica (Geiszinger *et al.*, 2009).

### **1.3. Antecedentes en Uruguay**

En Uruguay, los datos disponibles muestran que el área del territorio destinado a la producción de soja (variedad genéticamente modificada, Altieri & Pengue, 2006) y las importaciones del ingrediente activo de glifosato están altamente correlacionadas (Figura 2). En el año 2014 se dio el máximo histórico de importación de ingrediente activo de glifosato (14.750 t) (DGSA, 2016), mientras que los picos de área destinada a la producción sojera también se encontraron en los años 2013-2014 (1.321.000 ha) y 2014-2015 (1.334.000 ha) (Figura 2). La importación de herbicidas en Uruguay, desde el 2002 hasta el presente, ha sido en su mayoría de cuatro formulaciones de sales de glifosato: isopropilamina, potasio y amonio, y a partir del 2010 también dimetilamina (resumen de importaciones por año y tipo de formulación, Tabla C en Anexo). Cabe destacar que en el 2014 también se encontró el pico histórico de importación en términos de cantidad de formulaciones distintas (11 formulaciones, Tabla C en Anexo). Por otro lado, existen datos de las marcas importadas sólo para el período 2009-2011 y Roundup, a pesar de ser la más conocida a nivel mundial, no fue importada para la formulación con sal de isopropilamina, sino que sólo apareció para sales de potasio y amonio, pero nunca en primer lugar (DGSA, 2016). Además de haber

distintas formulaciones de glifosato (i.e. sales), las distintas marcas tienen sus aditivos particulares, cuya información no es de dominio público.



**Figura 2.** Importación histórica al Uruguay del ingrediente activo Glifosato en toneladas en el período 2002-2016 (Rojo, eje derecho). Área del territorio nacional cubierto por plantaciones de soja en el período 2000-2016 (Azul, eje izquierdo) (Gráfico construido a partir de datos de DGSA y DIEA del 2016).

La Laguna del Cisne es el mayor sistema léntico del departamento de Canelones y desde 1971 fuente de abastecimiento de agua potable a una importante fracción de su población. Los cambios en el uso de la tierra han ocurrido aún en la zona más próxima a la laguna. Esto puede poner en riesgo el abastecimiento de agua potable, reconocido como un derecho humano fundamental tanto por las Naciones Unidas (ONU, 2010) como por nuestra constitución (Artículo 47<sup>2</sup>) (UN, 2010; Goyenola *et al.*, 2011; Dávila, 2012).

El estudio de las presiones antropogénicas ejercidas sobre este sistema es de suma relevancia teniendo en cuenta, además, que el cuidado de la

<sup>2</sup> Ley N° 17.283, año 2004

Laguna del Cisne ha sido sugerido como prioritario por no existir fuentes alternativas de agua potable para la zona (Goyenola *et al.*, 2011).

#### **1.4. Aproximación de la tesis**

El objetivo último de la tesis es aportar a comprender posibles efectos de la aplicación en las cuencas de HBG sobre comunidades acuáticas naturales. En particular, esta tesis evalúa el efecto de distintas concentraciones de un HBG, con una presentación comercial del principio activo en forma de sal de isopropilamina de glifosato, sobre sustratos artificiales colonizados por la comunidad natural de diatomeas perifíticas de la Laguna del Cisne (Canelones, Uruguay). La aproximación seguida en la tesis consiste en la combinación de experimentos controlados de laboratorio a escala temporal corta (días) y nivel biológico comunitario, y una evaluación cualitativa de los cambios en el uso productivo del suelo en la cuenca de drenaje de la Laguna del Cisne en las últimas décadas y su reflejo en la calidad del agua, que son procesos a escalas temporales y espaciales mayores (i.e. cuenca y cuerpo de agua) y ocurriendo a nivel ecosistémico. El uso de sustratos artificiales para la colonización por perifiton permite homogeneizar las características del proceso (e.g. tiempo, profundidad, tamaño, características físicas y químicas del sustrato), además de permitir una fácil colocación en campo y transporte al laboratorio. Asimismo, hace que el diseño experimental sea fácilmente replicable en otros estudios.

Los ensamblajes generados a partir de la colonización son producto de las condiciones locales del sistema, así como de la memoria del mismo (pool de especies). Para evaluar la respuesta de ensamblajes potencialmente diferentes, los experimentos se realizaron en dos estaciones del año (invierno y primavera).

Los estudios que involucran ensambles naturales de diversas especies potencialmente indicadoras de este impacto, y no cultivos monoespecíficos, son muy escasos. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer estudio en la región que se centra en explorar la capacidad bioindicadora de la comunidad de diatomeas en escenarios con distintos niveles de exposición a un HBG.

### **1.5. Hipótesis General**

La tesis se basó en la siguiente hipótesis general de trabajo:

Por compartir la ruta metabólica del ácido shikímico con las plantas terrestres (grupo objetivo de la aplicación del herbicida), la comunidad de diatomeas perifítica es sensible al HBG. Sin embargo, la variabilidad fisiológica entre las diversas especies que integran esta comunidad les otorga distinta sensibilidad al HBG y por lo tanto genera respuestas diferenciales a nivel de estructura comunitaria.

## **1.6. Objetivo general**

Determinar experimentalmente los efectos de un herbicida basado en glifosato (HBG, sal isopropilamina de glifosato, nombre comercial Glifotec) sobre comunidades naturales de diatomeas perifíticas de la Laguna del Cisne, en un contexto de cambios en el uso del suelo productivo de su cuenca y de respuestas en el estado del ecosistema.

## **1.7. Objetivos específicos**

OE0: Analizar la dinámica de los procesos que actúan a distintas escalas espaciales y temporales sobre la Laguna del Cisne y su cuenca, a fin de entender y contextualizar los factores que potencialmente estructuran a la comunidad de diatomeas y sus respuestas al HBG.

OE1: Determinar los cambios de la estructura de la comunidad de diatomeas perifíticas sobre sustratos artificiales, frente a la exposición experimental a un gradiente de concentraciones de HBG.

OE2: Determinar los umbrales de reacción de las diferentes especies de diatomeas perifíticas, es decir, identificar dentro de la comunidad a las especies sensibles y las especies tolerantes al HBG, frente a la exposición experimental a un gradiente de concentraciones de HBG.

OE3: Analizar las respuestas de distintos ensamblajes de diatomeas perifíticas a distintas concentraciones del HBG (descritas en los OE 1 y 2), contrastando comunidades de invierno y primavera.

### **1.8. Hipótesis específicas**

Hp 1 (asociada al objetivo específico 1): El HBG afecta a las diatomeas perifíticas (grupo fuera de las especies objetivo de su aplicación, i.e. plantas terrestres) por tener la ruta del ácido shikímico; sin embargo, las distintas sensibilidades al HBG por parte de las distintas especies generan cambios en la composición taxonómica, abundancia, equitatividad y diversidad de la comunidad. Por ello se espera que las diatomeas perifíticas sean buenas indicadoras de este impacto a nivel comunitario.

Hp 2 (asociada al objetivo específico 2): El grado de sensibilidad al HBG de las distintas especies depende de la concentración del principio activo (y de los componentes agregados, e.g. surfactante) actuando sobre la comunidad perifítica. Por ello se espera observar cambios en la estructura comunitaria asociables al gradiente de concentración de HBG usado experimentalmente.

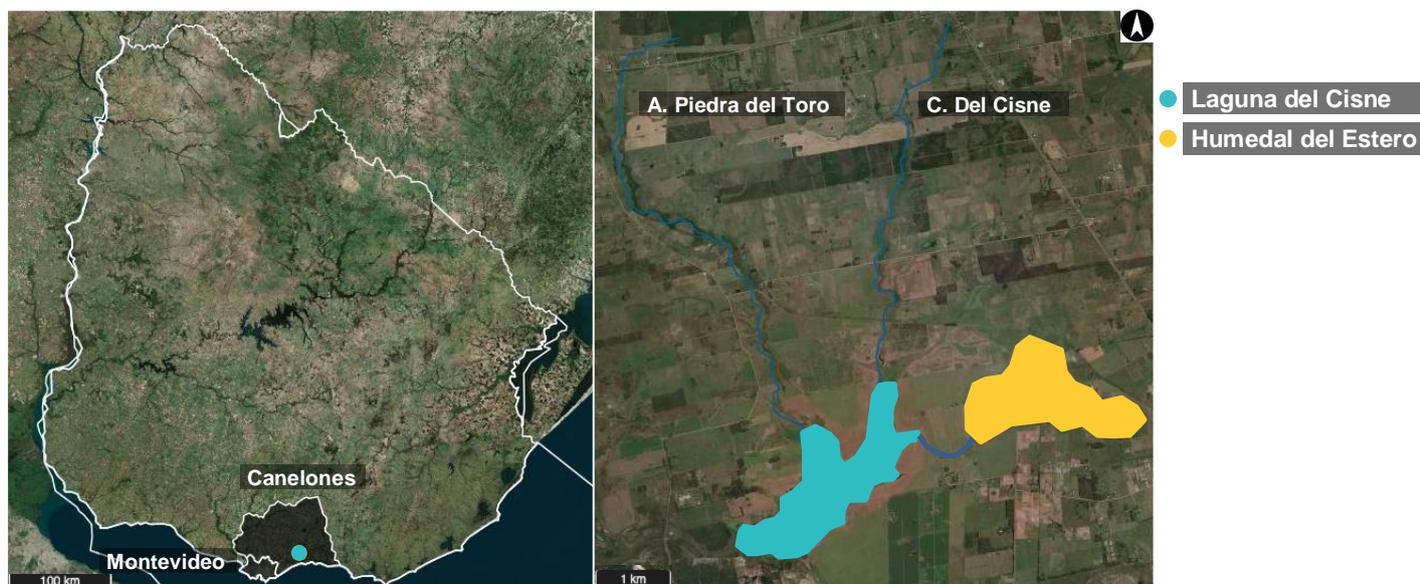
Hp 3 (asociada al objetivo específico 3): La sensibilidad o tolerancia al HBG es especie-específica. Por ello se espera que a pesar de posibles diferencias en la composición de la comunidad de diatomeas perifíticas de

la Laguna del Cisne asociados a la estacionalidad, los patrones de respuesta a la exposición al HBG sean comunes.

## 2. Metodología

### 2.1. Área de estudio

La Laguna del Cisne es un cuerpo de agua somero con alrededor de cuatro metros de profundidad máxima, un espejo de agua con un área media de 1.4 km<sup>2</sup> (*Google Earth*) y una cuenca de drenaje de aproximadamente 50 km<sup>2</sup>. Su ubicación es contigua a la ciudad costera de Salinas en el Departamento de Canelones (34°45'06.28" S, 55°49'52.24" O). Desde el norte conectan sus principales tributarios, el Arroyo Piedra del Toro y la Cañada del Cisne, mientras que desde el este recibe aportes del humedal del Estero (Goyenola *et al.*, 2011) (Figura 3).



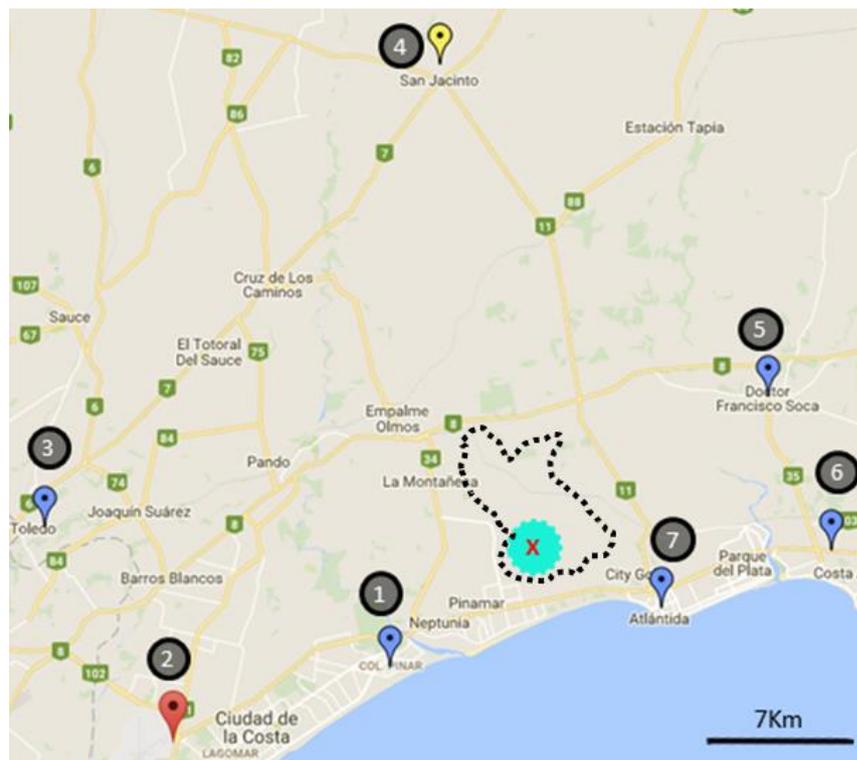
**Figura 3.** Ubicación geográfica de la Laguna del Cisne y sus principales tributarios (Imagen construida en base al visualizador del OAN).

## **2.2. Caracterización del área de estudio**

Mediante herramientas de información geográfica (ArcGIS) se analizó el uso del suelo en la cuenca de la Laguna del Cisne durante el verano, estación en la que la soja está plantada, para dos años contrastantes. El objetivo fue determinar su grado de intensificación de uso antes (2001) y después (2015) de la intensificación de la actividad sojera en el país. Las imágenes satelitales se obtuvieron a partir de los satélites Landsat 5 y Landsat 8 de la página del Servicio Geológico de Estados Unidos (USGS), con fechas 31/01/2001 y 07/02/2015, respectivamente. Para la clasificación de usos del suelo en la cuenca se seleccionaron seis categorías que permitieran observar cambios en las actividades de uso intensivo: Cuerpos de Agua, Humedal, Cultivos (plantaciones y suelo desnudo por cosecha), Forestación, Zona urbana y Otros (tierra en barbecho, vegetación ribereña, caminos y suelo descubierto por erosión). En base al porcentaje de suelo cubierto por cada uso, se estableció la magnitud del cambio de uso del suelo entre los dos años analizados.

Asimismo, se exploró el régimen de precipitación en la zona para los períodos en los que se realizaron trabajos de campo. La conexión entre las actividades que se desarrollan en la cuenca de drenaje y el cuerpo de agua que ese territorio abastece, está mediada por la acción de la escorrentía superficial y subsuperficial que se produce por las precipitaciones. Por lo tanto, el objetivo fue conocer las condiciones hidrológicas a las que probablemente estuvieron expuestos los sustratos durante su colonización.

Los datos fueron solicitados al Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET) para las siete estaciones meteorológicas, pertenecientes a la Red Pluviométrica Nacional y a la Red Meteorológica Nacional, más cercanas a la cuenca de la Laguna del Cisne (Figura 4). Se requirieron datos diarios de precipitación por un período de dos meses para cada año en el que se realizaron aproximaciones experimentales. Los períodos solicitados fueron: para el 2014 desde el 18/06 al 18/08 y para el 2015 desde el 13/08 al 13/10.



**Figura 4.** Los datos meteorológicos corresponden a las siete estaciones meteorológicas que rodean a la cuenca de la Laguna del Cisne cuyo límite se muestra en línea negra punteada. La Laguna del Cisne se encuentra dónde está el círculo turquesa con la cruz. Las estaciones fueron numeradas en sentido horario: 1. El Pinar, 2. Aeropuerto de Carrasco, 3. Toledo, 4. San Jacinto, 5. Soca, 6. La Floresta, 7. Atlántida. (Mapa extraído de <http://www.meteorologia.com.uy/ServCli/mapasEstaciones>)

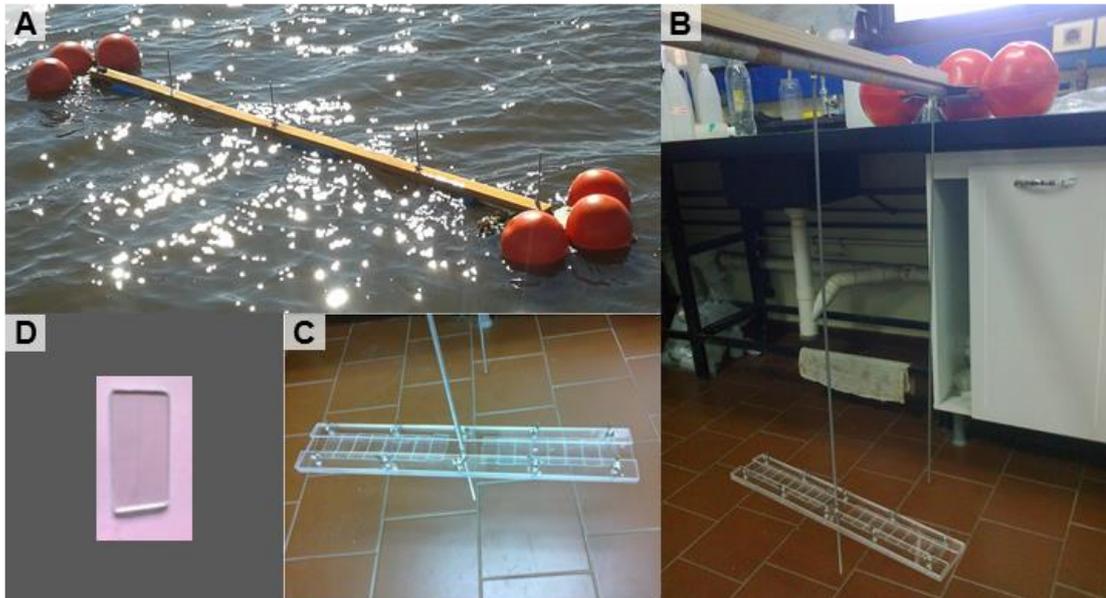
Además, se realizó una revisión bibliográfica con el fin de evaluar la dinámica histórica de la concentración de nutrientes en la columna de agua de la Laguna del Cisne (Mazzeo *et al.*, 1995; Kruk *et al.*, 2009; Gelós *et al.*, 2010; Goyenola *et al.*, 2011; Goyenola *et al.*, 2017) y de contextualizar los datos de nutrientes obtenidos en este estudio (2014 y 2015).

## **2.3. Aproximación experimental**

### **2.3.1. Trabajo de campo**

En la columna de agua de la Laguna del Cisne se dejaron colonizar por la comunidad natural de perifiton 80 sustratos de vidrio de dimensiones 2,5 cm x 5,0 cm (Figura 5). Debido a la baja transparencia del agua del sistema (25 cm de disco de Secchi), los sustratos fueron colocados a 50 cm de la superficie del espejo de agua, mediante un solo sistema de flotación con cinco soportes de acrílico, que mantuvieron los sustratos en orientación horizontal (i.e. sólo una cara del sustrato fue colonizada), sostenidos por dos barras y dos boyas (Figura 5). Cada soporte sujetó 16 sustratos, alcanzando así un total de 80 unidades. La colonización ocurrió en un sitio (34°45'6.84"S, 55°50'5.03"O) de la laguna que fue de aguas abiertas y pelágico, a su vez es un punto cercano al efluente (i.e. arroyo Tropa Vieja) donde se encuentra el dique que mantiene el nivel del cuerpo de agua. El período de colonización se concretó siempre en el mismo sitio, fue de 15 días y se llevó a cabo en tres estaciones del año: invierno (2014), verano

(2015) y primavera (2015). El experimento de verano fracasó, las razones se explicitan al final de esta sección.



**Figura 5.** A. Barras (una de metal y una de madera) sostenidas por boyas (naranjas) en los extremos para su flotación en el espejo de agua de la Laguna del Cisne. B. C. Sistema de sostención de los soportes de acrílico donde se colocaron los sustratos de vidrio para su colonización por perifiton. D. Ejemplo de los sustratos de vidrio rectangulares con dimensiones 2,5 cm x 5,0 cm.

En la laguna se midieron las características físico-químicas del agua (luz [Licor LI-250], pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura [sonda multiparámetro YSI 6000]) y se tomaron muestras puntuales de agua para la determinación de la concentración de nutrientes disueltos (i.e. biodisponibles para la comunidad perifítica) ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$  (Muller & Weideman, 1955; Murphy & Riley, 1962; APHA, 2005). El mismo día de colecta de los sustratos colonizados también se colectaron 90 L de agua de la laguna, que fueron utilizados en laboratorio en el transcurso del experimento.

### 2.3.2. Manipulación experimental en laboratorio

Previo al diseño experimental descrito en esta sección se realizaron dos aproximaciones piloto, con distintos sustratos (e.g. testigos de sedimento del fondo de la laguna), que sirvieron de insumo para llegar al diseño final. La mayor dificultad identificada fue en relación al uso del sedimento del fondo de la Laguna del Cisne como sustrato colonizado por la comunidad perifítica, este era blando, tenía una interfase agua-sedimento no definida y a menudo presentaba raíces de plantas que aportaban variabilidad. Además, por su alto contenido de materia orgánica el testigo, en laboratorio, se volvía anóxico, potencialmente aportando más nutrientes a la columna de agua y cuando fue oxigenado el sedimento se resuspendía. Por lo tanto, el abordaje final consistió en el uso de sustratos artificiales inertes (i.e. vidrio) que fueron de fácil manipulación tanto en campo como en el laboratorio (Figura 5). Los sustratos colonizados por el perifiton natural de la Laguna del Cisne se expusieron en laboratorio a distintos tratamientos, que consistieron en variar la concentración del ingrediente activo glifosato de un HBG. Cada tratamiento contó con cuatro réplicas.

El mercado uruguayo permite a los usuarios fácil acceso a una amplia oferta de formulaciones de HBG. Para la ejecución de los experimentos se optó por la variedad que apareció como más accesible en plaza para un usuario común en ese momento. Mediante la búsqueda por internet se observó que la formulación de sal isopropilamina de glifosato (360 g L<sup>-1</sup> de glifosato) fue la variedad más ofrecida en 2014 y 2015 y en muchos casos

la única variedad ofrecida (e.g. sitio web [www.mercadolibre.com.uy](http://www.mercadolibre.com.uy)). Esta formulación siguió siendo la más ofrecida hasta el año 2017. La marca comercial utilizada en el experimento fue Glifotec (Agritec S.A., Montevideo), que además de ser la marca más encontrada en internet, también fue la más importada para la formulación utilizada (i.e. sal isopropilamina de glifosato) en los años para los que existen registros (Tabla C en Anexo).

Se realizaron tres experimentos, cada uno de ellos brindó información relevante que permitió realizar ajustes sobre el siguiente. Mientras que los tratamientos del experimento de invierno (2014) fueron cuatro concentraciones distintas de glifosato (4 tratamientos, 4 réplicas, 16 unidades experimentales), los experimentos de verano (2015) y de primavera (2015) contaron con cinco concentraciones distintas del ingrediente activo glifosato del HBG Glifotec (Agritec S.A.) (5 tratamientos, 4 réplicas, 20 unidades experimentales) (Tabla 1). Incluir una concentración intermedia ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) en los experimentos de 2015 fue definido a partir de un análisis de ordenación preliminar del experimento de invierno (2014), donde las abundancias de especies de diatomeas mostraron diferencias marcadas entre la exposición a concentraciones de glifosato “bajas” ( $0 \text{ mg L}^{-1}$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y “altas” ( $5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Por lo tanto, con el fin de captar mejor el umbral de “afectación” de la comunidad de diatomeas frente al HBG, se tomó la decisión de agregar la concentración intermedia del i.a. glifosato de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diseño de tratamientos de los tres experimentos realizados en 2014 y 2015 según su concentración de glifosato en  $\text{mg L}^{-1}$ . El experimento de invierno 2014 fue ejecutado primero con cuatro tratamientos, mientras que los experimentos sucesivos realizados en 2015 contaron con cinco tratamientos.

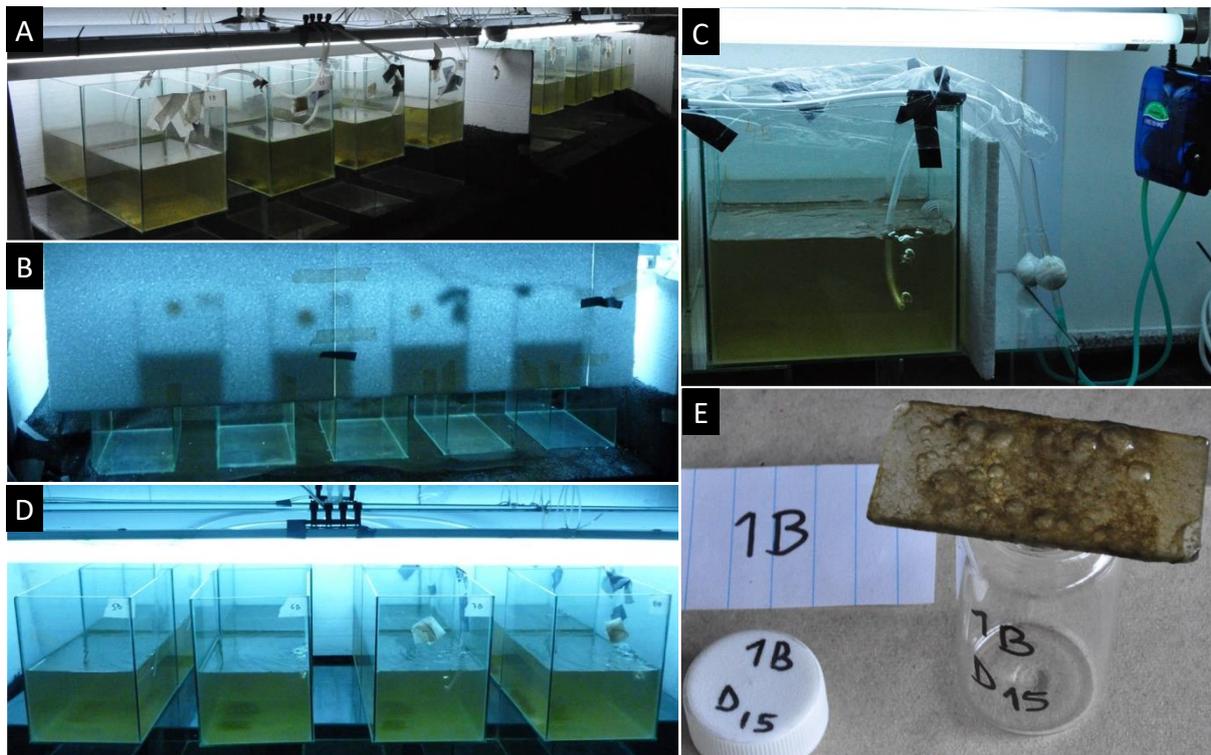
	Estación y año del experimento		
	Invierno 2014	Verano 2015	Primavera 2015
Tratamiento [Glifosato $\text{mg L}^{-1}$ ]	0	0	0
	1	1	1
	-	3	3
	5	5	5
	10	10	10

Las unidades experimentales consistieron en recipientes rectangulares de vidrio de 6 L de volumen total (dimensiones, 15 cm x 20 cm x 20 cm) con 3 L de agua de la laguna previamente filtrada por una malla de 50  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para retirar el zooplancton mayor a ese tamaño corporal (potencialmente consumidor de las diatomeas) (Figura 6). Se conservaron 45 L de agua filtrada por filtros GF/C, a una temperatura de 5 °C, para ser posteriormente utilizada durante el experimento en laboratorio (de ahora en más: agua de reserva).

Con el fin de simular el régimen natural de la Laguna del Cisne (i.e. efecto del viento sobre este sistema somero y acceso a luz) las unidades se mantuvieron oxigenadas con aereadores y fueron iluminadas por tres tubos de luz, con un período de luz-oscuridad de 11 h de luz y 13 h de oscuridad. Asimismo, las unidades experimentales fueron rodeadas por placas de

espuma plast blanca para homogeneizar la temperatura y la luz entre ellas. La intensidad de luz alcanzada en el fondo de las unidades, una vez colocados los 3 L de agua, fue de  $49,28 \pm 1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  [Licor LI-250]. La ubicación de cada tratamiento y sus respectivas réplicas en el espacio fue designada al azar (Figura 6).

Una vez en el laboratorio, se colocaron grupos de cuatro sustratos (colonizados contiguamente en el campo) por unidad experimental. Los mismos fueron asignados a las unidades al azar, con la salvedad de que sólo los grupos de sustratos que mostraron una colonización uniforme (i.e. sin signos de depredación por herbívoros) fueron utilizados (Figura 5 y 6).



**Figura 6.** A, B, C. Cada contenedor de vidrio es una unidad experimental, hay cuatro réplicas para cada tratamiento. Fueron rodeadas por placas de espuma plast para uniformizan luz y temperatura entre las unidades y cada una fue aireada. D. Cada unidad experimental contuvo, al inicio del experimento, cuatro sustratos artificiales de vidrio colonizados por perifiton. Estos fueron retirados de a uno al azar en cada evento de muestreo. E. Ejemplo de sustrato extraído de una unidad experimental el último día de muestreo (i.e. día 15).

El perifiton se dejó aclimatar por cinco días a las condiciones del laboratorio para luego dar comienzo al período experimental (día 0). La toma de muestras se realizó los días 0, 5, 10 y 15. El muestreo consistió en retirar de cada unidad experimental, al azar, una placa de vidrio colonizada, raspar el perifiton, verterlo en un vial de 40 mL y fijarlo con una solución de alcohol, formol y agua destilada (Figura 6E).

Luego de coleccionar la muestra 0 de perifiton se agregó a cada unidad, en caso de corresponder, el volumen necesario del HBG para alcanzar la concentración nominal final del i.a. glifosato según el tratamiento asignado. En este mismo día, con el agua de reserva, se prepararon ocho litros de soluciones con concentraciones finales del i.a. glifosato iguales a cada uno de los tratamientos experimentales (de ahora en más: soluciones de reserva).

Por lo tanto, en invierno 2014 se prepararon cuatro soluciones de reserva, mientras que en verano y primavera 2015 se prepararon cinco. Las soluciones se mantuvieron refrigeradas en recipientes con hielo para minimizar la transformación de los nutrientes por acción de microorganismos. Además, el régimen de aireación y lumínico, en términos de intensidad de luz y de período luz-oscuridad, fue el mismo para las soluciones y para las unidades experimentales. De esta manera se previno la anoxia y se expuso a las soluciones de reserva y a las unidades

experimentales a las mismas condiciones de fotodegradación potencial (Mallat & Barcelo, 1998).

Al día siguiente de cada muestreo (i.e. días 1, 6 y 11) se reemplazó el 20% (600 mL) del agua de cada unidad con la solución de reserva de cada tratamiento, es decir, se simularon las condiciones naturales de circulación de agua buscando no alterar la concentración final del pulso inicial del HBG. Parte del agua reemplazada se guardó para determinar la disponibilidad de nutrientes disueltos (días 1, 6, 11 y 16).

Los experimentos se realizaron en tres estaciones del año (invierno 2014, verano 2015 y primavera 2015), aunque sólo fueron analizadas las muestras resultantes de invierno 2014 y de primavera 2015. Esto se debió a que en la laguna durante el verano tanto la comunidad perifítica como la de macroinvertebrados colonizaron los sustratos. De modo que durante el experimento en el laboratorio la comunidad perifítica fue fuertemente depredada por los macroinvertebrados. Esto no sucedió en el experimento de invierno probablemente debido a que durante el verano el metabolismo de los organismos ectotermos se ve acelerado por la elevada temperatura, lo que implica mayores tasas de crecimiento y de consumo. Además, una cosechadora de plantas se encontraba trabajando en la zona litoral de la laguna durante el periodo de colonización de verano. Esta actividad provoca un disturbio sobre la comunidad litoral y los organismos macroinvertebrados asociados a las macrófitas son liberados a la columna

de agua, pudiendo aumentar la probabilidad de colonización de los sustratos por parte de esta comunidad (Meerhoff *et al.*, datos no publicados).

Ante el riesgo de que esta actividad afectara cualitativa y cuantitativamente los resultados, se decidió terminar el experimento pero finalmente, no analizar las muestras. Además, previo a dar comienzo al período de aclimatación en el experimento de primavera (2015), se tomó la precaución de observar los sustratos en la lupa. De este modo se constató la presencia o ausencia de macroinvertebrados y en los casos donde estos organismos se detectaron, se removieron. Vale destacar que no se encontraron muchos invertebrados antes de dar comienzo a este experimento ni en el transcurso del mismo.

### 2.3.3. Procesamiento y análisis taxonómico de las diatomeas

Una adecuada identificación taxonómica de las especies de diatomeas está sujeta a que sea posible observar en detalle la ornamentación de sus valvas de sílice. Para lograrlo, es fundamental, además de contar con el equipo óptico y contraste adecuado, que la muestra se encuentre libre de materia orgánica (Nagy, 2011). Se eliminó la materia orgánica de la mitad de la muestra mediante su digestión a baño de María con una solución 50:50 de ácido sulfúrico y ácido nítrico, durante un período de entre 4 y 6 h. Esta reacción resulta en una acidificación de las muestras ( $\text{pH} < 1$ ), razón por la que fueron lavadas con agua destilada hasta llegar a un pH próximo

a la neutralidad. Los lavados consecutivos se realizaron dejando las muestras sedimentar 24 h entre uno y otro, retirando el sobrenadante y completando el volumen del vial con agua destilada. Esta etapa fue fundamental para que la fijación de las muestras con medio de montaje (Naphrax) resultara aceptable para su observación al microscopio óptico, ya que si el pH es bajo la resina se oscurece, dificultando la observación de las valvas y por ende su identificación.

La identificación taxonómica se realizó mediante la observación al microscopio óptico con contraste de interferencia diferencial de Nomarski. La observación fue inicialmente cualitativa, se tomaron fotos de los ejemplares encontrados en todos los tratamientos y se organizaron por género. Esta etapa tuvo como principal objetivo registrar a los organismos, clasificarlos y capturar la variación de tamaño intra-específico. Según el género, se midió el largo, el ancho y la densidad de estrías y fíbulas de las valvas. Una vez organizada esta información se consultó la literatura científica y se realizó la identificación taxonómica hasta la mayor resolución posible (Patrick & Reimer, 1975; Krammer & Lange - Bertalot, 1986, 1988, 1991a, 1991b; Rumrich *et al.*, 2000; Krammer, 2000, 2002; Metzeltin *et al.*, 2005; Metzeltin, 2007; Levkov, 2009; Hofmann *et al.*, 2011; Lange-Bertalot, 2011; Levkov *et al.*, 2013; Lange-Bertalot & Ulrich 2014; Wetzel *et al.*, 2015; [algaebase.org](http://algaebase.org)). La abundancia relativa de especies se determinó mediante el conteo de bandas al azar de entre 260 y 400 frústulos (o valvas) por muestra y el orden del conteo de las muestras fue también al

azar. El número de frústulos que se contó se determinó mediante conteos de prueba, donde se observó que el número de especies registradas no aumentaba significativamente a partir de las 250 valvas. Las especies pequeñas ( $< 12 \mu\text{m}$ ) que resultaron abundantes en las muestras fueron observadas, medidas e identificadas a partir de imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB - Zeiss Supra 40). Para la observación al MEB se seleccionaron las muestras con mayor abundancia relativa de las especies de interés y se prepararon dejando secar una fracción de la muestra sobre soportes que fueron bañados con oro paladio.

#### **2.4. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los cambios en la composición específica relativa de la comunidad de diatomeas se realizó mediante una batería de análisis estadísticos. Mediante análisis multivariados (Análisis de componentes principales (PCA) y Análisis de permutaciones y análisis de varianza múltiple (Permanova)) se analizó el Objetivo Específico 1, ya que se exploraron cambios en la composición específica de especies según su exposición a distintas concentraciones del HBG. El análisis de especies indicadoras y las pruebas de ANOVA permitieron explorar qué especies resultaron sensibles (i.e. no se reprodujeron o lo hicieron poco) y cuáles tolerantes (i.e. fueron exitosas y se reprodujeron más) a crecientes

concentraciones del HBG, cumpliendo así con los Objetivos Específicos 2 y 3.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa R (R Development Core Team, 2016), con los paquetes utilizados para cada análisis especificados a continuación.

#### 2.4.1. Análisis estadísticos asociados al Objetivo Específico 1

- Estructura de la comunidad inicial de diatomeas

Se determinó la composición y estructura de la comunidad de diatomeas con la que se partió en cada experimento (Día 0 - D0). Para ello se calculó la dominancia y la sub-dominancia de las especies, utilizando como referencia el valor medio  $[(\text{máx.} - \text{min})/2]$  de su frecuencia relativa y su abundancia relativa. De modo que las especies dominantes presentaron una frecuencia y una abundancia relativa mayor que sus respectivos valores medios, mientras que las especies subdominantes presentaron una frecuencia y una abundancia relativa menor que sus respectivos valores medios (Pinzón & Spence, 2010). Además, se determinó la riqueza y diversidad específica (índice de Shannon).

- Análisis de componentes principales (PCA)

Mediante este análisis se observan tendencias en la similitud entre muestras en función de su composición específica (i.e. abundancia relativa)

(Kindt & Coe, 2005; Legendre & Legendre, 1998) y en relación a los tratamientos experimentales. Dado que el gradiente de los datos (determinado por DCA) fue menor a 4, se analizaron los datos mediante PCA, usando la transformación de Hellinger debido a la cantidad de ceros, frecuente en datos de abundancias de especies (Legendre & Legendre, 1998; Legendre & Gallagher, 2001; Leps & Smilauer, 2003). Siendo esperable que la composición y estructura comunitaria varíe con la estación del año, el PCA se realizó para cada uno de los experimentos por separado (paquetes: “vegan”, “lattice”, “permute”; función: “rda”) (Sarkar, 2008; Oksanen *et al.*, 2016; Simpson, 2016).

Se calculó la posición promedio de las réplicas de cada tratamiento en el PCA y a cada posición promedio se le restó la ubicación promedio de los tratamientos control para cada día. Esto permitió evaluar la desviación de la ubicación promedio de cada tratamiento de su control correspondiente, sin adición del HBG.

- Análisis de permutaciones y análisis de varianza múltiple (PERMANOVA)

Para poner a prueba la hipótesis nula de ausencia de diferencias entre muestras expuestas a distintas concentraciones del HBG, en términos de su composición específica, se realizaron pruebas de PERMANOVA. Este análisis es similar al ANOVA y se ejecuta a partir de una matriz de disimilaridad entre muestras, obteniéndose el valor  $p$  a través de

permutaciones al azar (Clarke *et al.*, 2006; Anderson & Walsh, 2013). En primer lugar, el análisis se ejecutó para el día cero, buscando verificar que se haya partido en todas las unidades experimentales con una composición comunitaria sin diferencias significativas. Posteriormente, se realizó el análisis del resto de los días de muestreo (días 5, 10 y 15), para los distintos tratamientos. Este acercamiento analítico no cuenta con un análisis *post hoc* asociado, por lo que se procedió a realizar comparaciones entre pares de concentraciones y para cada valor de  $p$  resultante se realizó la corrección de Bonferroni (Quinn & Keough, 2002; Pinzón *et al.*, 2012).

El PERMANOVA (paquete: “vegan”; función: “adonis”) es sensible a la heterogeneidad de varianza multivariada, por lo que se verificó este supuesto previo a su ejecución (paquete: “vegan”; función: “betadisper”) (Anderson & Walsh, 2013). Al igual que para el PCA, previo a realizar el PERMANOVA se aplicó la transformación de Hellinger sobre la matriz de datos. Asimismo, en el análisis se utilizó la distancia Euclidiana, la cual aporta un fuerte enfoque en la abundancia por especie al momento de detectar diferencias entre grupos (Legendre & Gallagher, 2001).

#### 2.4.2. Análisis estadísticos asociados a los Objetivos Específicos 2 y 3

- Análisis de especies indicadoras

Para identificar aquellas especies de diatomeas que pudieran ser particularmente tolerantes o sensibles al HBG se realizó un análisis de

especies indicadoras (paquetes: “indicpecies”, “labdsv”, “MVPARTwrap”, “mvpart”) (Cáceres & Legendre, 2009; Cáceres, 2013; Ouellette & Legendre, 2013; Roberts, 2016). En este análisis las especies con baja abundancia por lo general no son seleccionadas (Potapova & Charles, 2007; Pinzón *et al.*, 2012; Bachand *et al.*, 2014), por lo que se removieron de la matriz de datos aquellas especies que fueron representadas por cinco o menos individuos (i.e. entre 1.70% y 1.25%, ya que los conteos fueron entre 300 y 400 valvas).

El uso tradicional del análisis de especie indicadoras implica la asociación de una especie con un grupo (tratamiento) pre-establecido o una combinación de grupos (tratamientos). El cálculo del valor de indicación (Sqrt) es el producto de dos componentes (A y B) que describen la relación entre las especies y los tratamientos con los que se correlacionan (Dufrêne & Legendre, 1997; Cáceres & Legendre, 2009). El componente A es la “Especificidad”, que refiere a la probabilidad de que una muestra pertenezca a un tratamiento, dado que la especie se encuentra en esa muestra. Y el componente B es la “fidelidad”, es decir, la probabilidad de encontrar a la especie en muestras pertenecientes a un tratamiento específico. Tanto los componentes como el valor de indicación tienen un intervalo de confianza de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) asociado, que se determinó mediante un test con 10.0000 permutaciones al azar (nboot= 10.000). Vale mencionar que se reporta la asociación más elevada entre especie y tratamiento, de modo que la especie puede hallarse a su vez positivamente

correlacionada en menor medida con otro tratamiento (Cáceres *et al.*, 2013). El uso tradicional del análisis de especie indicadoras implica la asociación de una especie con un tratamiento pre-establecido o una combinación de tratamientos.

En este análisis se estableció un valor mínimo aceptable para A, B y Sqrt, con el fin de registrar sólo aquellas especies con los mayores valores de indicación. En la sección de resultados se detallan las restricciones aplicadas. El análisis se realizó para cada tratamiento individual y para combinaciones de tratamientos consecutivos (e.g. combinaciones de concentraciones del i.a. glifosato en  $\text{mg L}^{-1}$ ; 0+1, 1+3, 3+5, 5+10, 0+1+3, 3+5+10).

- Análisis de varianza

Se realizaron pruebas de ANOVA para analizar si hubo diferencias significativas en la abundancia relativa de las especies indicadoras de altas (tolerantes) y bajas (sensibles) concentraciones del HBG, en los distintos tratamientos. El ANOVA fue de una vía (factor: concentración del i.a. glifosato, con cuatro o cinco niveles, dependiendo del experimento). En primer lugar, el análisis se ejecutó para el día cero para verificar similitud entre todas las unidades experimentales al comienzo del experimento. Luego, se realizó el análisis para los distintos tratamientos en el día 15. Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza

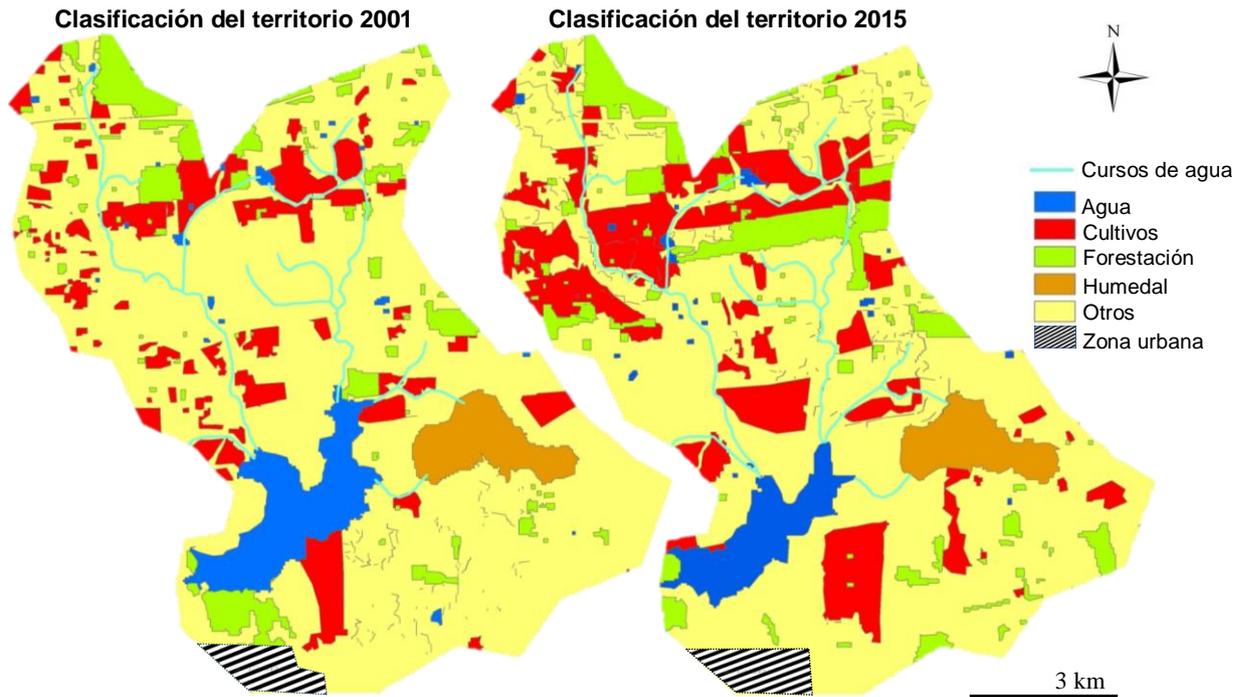
previo a realizar el análisis, así como la distribución de los residuos y para los casos donde la prueba de ANOVA detectó diferencias significativas se realizó análisis *post hoc*, por medio de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Zar, 1999; Quinn & Kough, 2002).

### **3 Resultados**

#### **3.1 Objetivo Específico 0**

##### **3.1.1 Usos del suelo**

En los veranos de los años 2001 (31/01) y 2015 (07/02) el mayor cambio de uso del suelo en la cuenca de la Laguna del Cisne ocurrió para los "Cultivos", con un aumento del 61% (345 ha), siguiéndole la "Forestación" con un aumento del 29% (108 ha) (Tabla 2, Figura 7, Tabla D en Anexo). En ambos años el mayor porcentaje de cobertura de la cuenca correspondió a la categoría "Otros" (tierra en barbecho, vegetación ribereña, caminos y suelo descubierto por erosión) (Tabla 2, Tabla D en Anexo). La zona urbana ocupó una pequeña fracción del territorio sur de la cuenca y en el período estudiado aumentó su área en un 13% (10 ha), así como la densidad poblacional de la zona (observación en *Google Earth*). Si bien la señal satelital del monte ribereño y del humedal fueron similares, el humedal fue fácilmente ubicado en el territorio y su área se redujo en un 6% (10 ha). El espejo de agua de la laguna fue un 30% (95 ha) menor en el verano 2015 que en el verano 2001 (Tabla 2, Tabla D en Anexo), aunque estas fotos no tienen por qué ser representativas de los cambios hidrológicos o medias anuales del sistema. En el historial de *Google Earth* se observa la gran variación del área del espejo de agua de la laguna con disminuciones de hasta 6 veces menos (aprox. 0.4 km<sup>2</sup> en mayo 2011) del área máxima registrada (aprox. 2.4 km<sup>2</sup> en Setiembre 2013).



**Figura 7.** Clasificación de usos del suelo en la cuenca de la Laguna del Cisne realizada mediante herramientas de sistemas de información geográfica (ArcGIS) a partir de imágenes de Landsat 5 y Landsat 8 para los veranos de los años 2001 (31/01) y 2015 (07/02). El uso del suelo referido como “Cultivos” engloba al territorio ocupado por plantaciones y suelo desnudo por cosecha, mientras que la categoría “Otros” se refiere a la tierra en barbecho, vegetación ribereña, caminos, suelo descubierto por erosión y asentamientos rurales.

**Tabla 2.** Porcentaje de la cuenca de la Laguna del Cisne cubierta por cada uso del suelo en el año 2001 y 2015.

Categorías de clasificación	Cobertura (%)	
	2001	2015
Agua	6.3	4.4
Cultivos <sup>i</sup>	11.1	17.9
Forestación	7.4	9.5
Humedal	3.4	3.2
Zona urbana	1.3	1.5
Otros <sup>ii</sup>	70.5	63.5

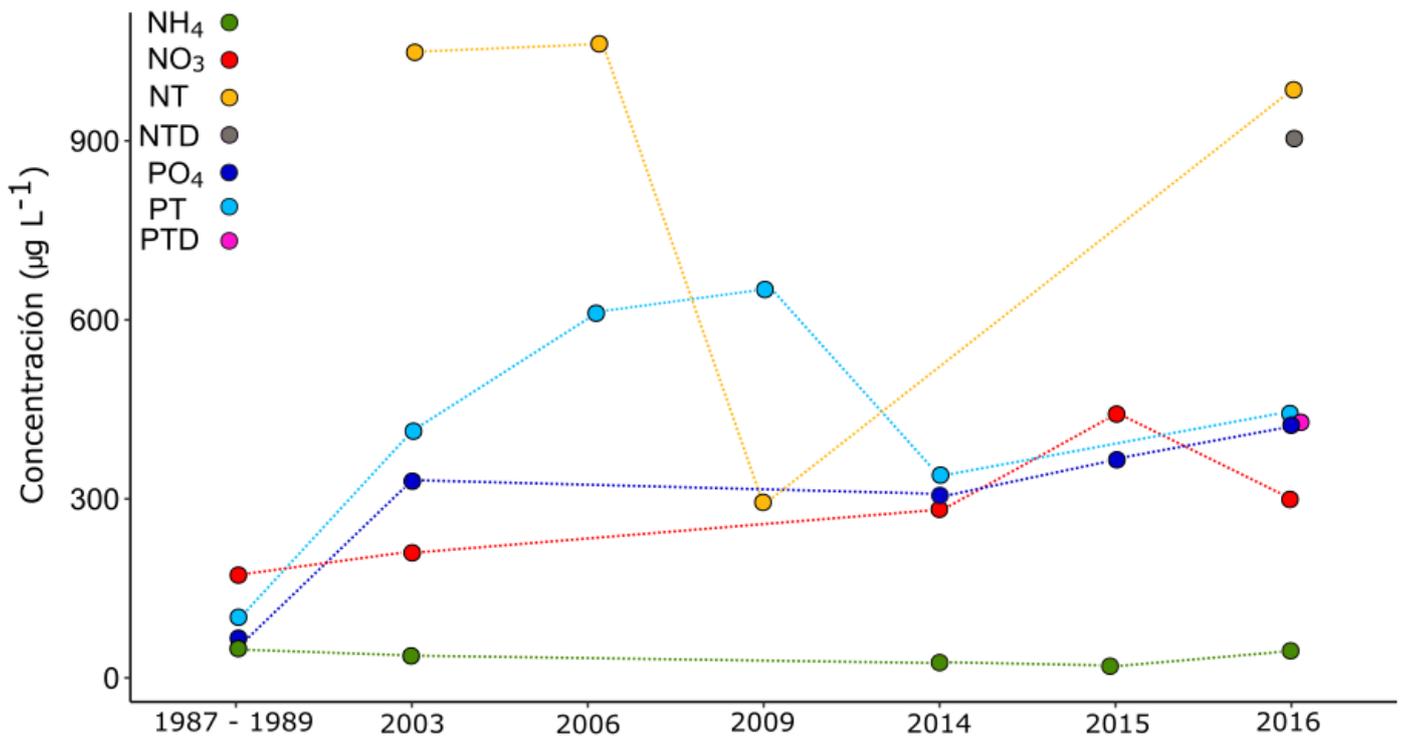
i. Cultivos: plantaciones y suelo desnudo por cosecha.

ii. Otros: tierra en barbecho, vegetación ribereña, caminos, suelo descubierto por erosión, asentamientos rurales y zonas urbanas.

### 3.1.2 Concentración de nutrientes en el cuerpo de agua

La revisión de los registros históricos de nutrientes publicados para la Laguna del Cisne reveló una tendencia a la eutrofización de este sistema entre el 1987 (Mazzeo *et al.*, 1995) y el 2017 (Kruk *et al.*, 2009; Gelós *et al.*, 2010; Goyenola *et al.*, 2011; muestreos propios 2014 y 2015; Goyenola *et al.*, 2017) (Figura 8, Tabla E y F en Anexo). Los datos de nutrientes recabados entre los años 1987 y 1989 se tomaron como referencia de un período con un desarrollo agropecuario menos intensivo en la cuenca de drenaje de la Laguna del Cisne. A excepción del amonio ( $\text{NH}_4$ ), cuya concentración se mantuvo relativamente baja en el tiempo (Figura 8, Tabla F en Anexo), el resto de las especies de nutrientes registradas, a partir del 2003, tuvieron concentraciones elevadas y tendieron a aumentar (Figura 8, Tabla F en Anexo). El nitrato ( $\text{NO}_3$ ) mostró una tendencia paulatina a la suba, mientras que el nitrógeno total (NT) se encontró siempre por encima de los  $900 \mu\text{g L}^{-1}$  (a excepción del 2011). El fósforo total (PT) tendió al aumento desde su primer registro en 1987, alcanzando valores hasta por encima de los  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 8, Tabla F en Anexo). Es interesante observar que el ortofosfato ( $\text{PO}_4$ ) siguió la misma tendencia y tuvo una concentración similar al PT. Lo mismo se observó en el 2017 para los únicos registros de fósforo total disuelto (PTD) y de nitrógeno total disuelto (NTD) en relación al PT y al NT, respectivamente. En lo que respecta a los datos de nutrientes registrados durante nuestros muestreos en la laguna,

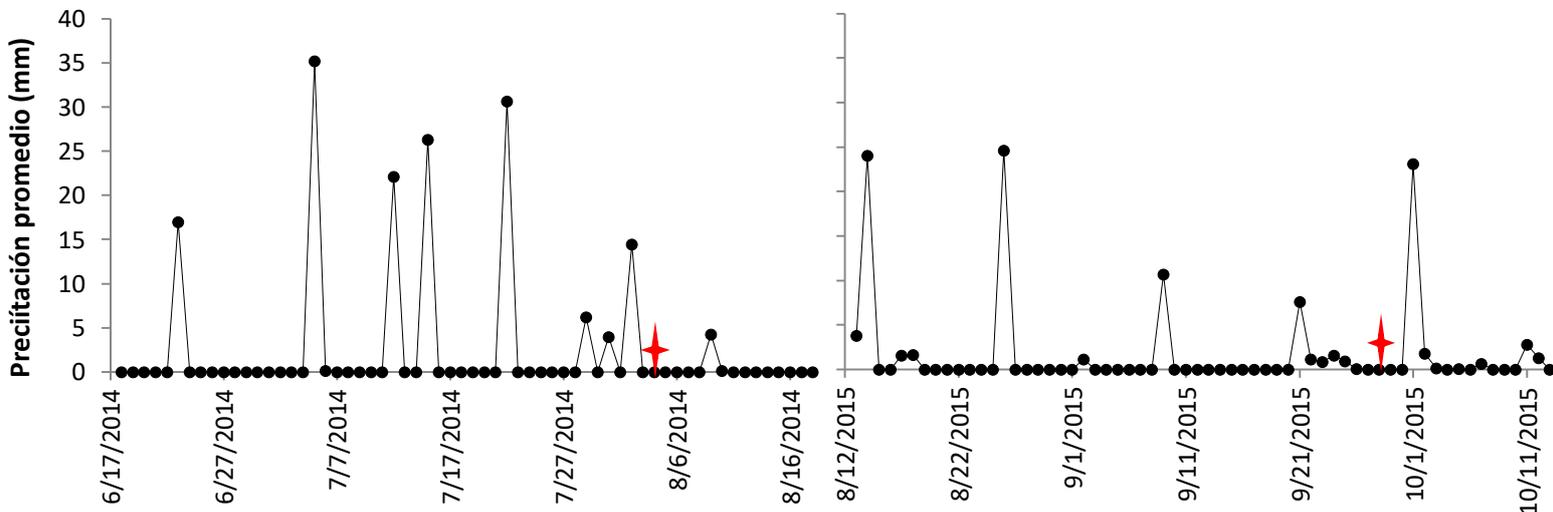
se observó una mayor concentración de ortofosfato y nitrato en primavera 2015 que en invierno 2014 (Figura 8, Tabla F en Anexo).



**Figura 8.** Evolución histórica de la concentración de nutrientes para la Laguna del Cisne. Las referencias de colores indican distintos nutrientes. En orden, de más antiguo a más reciente, las fuentes de información fueron: Mazzeo *et al.*, 1995, Kruk *et al.*, 2009, Gelós *et al.*, 2010, Goyenola *et al.*, 2011, muestreos propios 2014 y 2015, Goyenola *et al.*, 2017. Los datos de nuestros muestreos (2014 y 2015) corresponden al presente estudio y fueron promediados siempre que se registró más de un valor del mismo nutriente, para simplificar la figura (Tabla F - Anexo).

### 3.1.3 Precipitaciones en la región

Se comparó el régimen de precipitaciones regionales entre los dos períodos de colonización de los sustratos previo a los experimentos (del 18/06/14 al 18/08/14 y del 13/08/15 al 13/10/15). Los picos de precipitación mayores a 10 mm mostraron precipitaciones en al menos seis de las siete estaciones pluviométricas, lo que implica una alta probabilidad de que haya llovido también en la cuenca de la Laguna del Cisne (Figura 4 y 9). Con este criterio, fueron seis los eventos de precipitación altamente probables en la cuenca de la laguna en el invierno 2014, mientras que hubo cuatro eventos en primavera 2015 (Figura 9). Las precipitaciones promedio entre las estaciones pluviométricas, para los días con picos, fueron más altas en el 2014 ( $14.4 \pm 10.5$  mm y  $35.2 \pm 4.5$  mm) que en el 2015 ( $10.7 \pm 5.9$  mm y  $24.6 \pm 7.2$  mm). Por otro lado, fue posible comparar la magnitud de esas lluvias entre los dos períodos de interés y si sucedieron antes o después de poner los sustratos a colonizar en la laguna. En 2014 sólo el pico más bajo ocurrió cercano al período de colonización (promedio:  $14.4 \pm 10.5$  mm), precisamente dos días antes de la puesta de los sustratos en la laguna (Figura 9). Mientras que en 2015 uno de los picos promedio más altos (promedio:  $23.1 \pm 7.6$  mm) tuvo lugar tres días después de la puesta de los sustratos en la laguna (1/10/2015) (Figura 9).



**Figura 9.** Los gráficos muestran la precipitación promedio diaria de las siete estaciones meteorológicas que rodea a la cuenca de la Laguna del Cisne, para los periodos 18/06/2014 al 18/08/2014 (izquierda) y 13/08/2015 al 13/10/2015 (derecha). En cada gráfico se indica con una cruz roja el día en que se colocaron los sustratos en la Laguna del Cisne para ser colonizados. La fecha final de cada periodo de registros seleccionado corresponde al día en el que se retiraron los sustratos colonizados de la Laguna del Cisne y fueron llevados al laboratorio.

### 3.2 Objetivo Específico 1

Previo a analizar los efectos de los tratamientos sobre la comunidad de diatomeas perifítica, se reportaron y analizaron las condiciones físico-químicas a las que estuvo expuesta la comunidad durante, la colonización de los sustratos (en la laguna) y los experimentos (en laboratorio).

#### 3.2.1 Condiciones físico-químicas en campo y laboratorio

La columna de agua se encontraba mezclada (ver condiciones promedio los días de muestreo, Tabla 3). En el laboratorio la temperatura ambiente promedio durante el experimento de invierno 2014 fue de 17.4 °C (mínima promedio 14.0 °C y máxima promedio 20.0 °C) y en primavera 2015 fue de

18.5 °C (mínima promedio 13.5 °C y máxima promedio 19.8 °C). Las variables físico-químicas no mostraron diferencias significativas entre unidades experimentales (evaluado mediante RDA) y además fueron similares para los dos experimentos (Tabla 4).

**Tabla 3.** Condiciones físico-químicas del agua registradas, *in situ*, en la Laguna del Cisne en invierno 2014 y primavera 2015. Se registró oxígeno disuelto, pH, temperatura y se calculó el coeficiente de extinción de la luz (Kd) a partir de medidas de luz cada 10 cm de la columna de agua.

Experimento	Oxígeno (mg L <sup>-1</sup> )	pH	Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Kd
Invierno 2014	8.8	6.7	-	13.7	4.3
Primavera 2015	9.4	7.5	202	17.9	6.0

**Tabla 4.** Condiciones físico-químicas del agua registradas en las unidades experimentales durante los experimentos de invierno 2014 y primavera 2015.

	Oxígeno (mg L <sup>-1</sup> )		pH		Temperatura (°C)	
	Invierno 2014	Primavera 2015	Invierno 2014	Primavera 2015	Invierno 2014	Primavera 2015
<b>Promedio</b>	9.5	8.8	8.4	8.0	17.6	18.5
<b>Mínima</b>	8.1	6.3	7.0	6.9	12.4	16.2
<b>Máxima</b>	10.9	11.2	9.6	8.7	20.2	20.6

Durante el experimento de invierno 2014 en el laboratorio (de ahora en adelante, Ex.-Inv.-14) las concentraciones de nutrientes disueltos encontradas fueron bajas (por dificultades logísticas se tomaron muestras integradas para cada tratamiento: PO<sub>4</sub> entre 15.9 µg L<sup>-1</sup> y 35.9 µg L<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub> entre 55.3 µg L<sup>-1</sup> y 177.8 µg L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub> entre 1.6 µg L<sup>-1</sup> y 4.7 µg L<sup>-1</sup>).

En el experimento de primavera 2015 (de ahora en adelante Ex.-Prim.-15) se tomó una muestra para cada réplica de cada tratamiento y para cada día de muestreo (Tabla 5). Se verificó que se partió de condiciones

experimentales similares, ya que en el día cero (D0) no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos para las concentraciones de nutrientes ( $p \geq 0.05$  ANOVA, para  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ). Por otro lado, en los días diez (D10) y quince (D15) hubo una concentración promedio de  $\text{PO}_4$  mayor en los tratamientos control que en aquellos con altas concentraciones del HBG ( $p \leq 0.05$  ANOVA). No se encontraron diferencias significativas en el resto de los pares de tratamientos. En el día cinco (D5) la concentración de  $\text{NH}_4$  fue mayor en los tratamientos con mayor adición del HBG (i.e. comparación entre  $0 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) ( $p \leq 0.05$  ANOVA).

**Tabla 5.** Promedios de nutrientes ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para las réplicas de los distintos tratamientos ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de i.a.) del experimento de primavera 2015, muestreados los D5, D10 y D15. Se asignó un color a cada tratamiento que se mantiene en cada gráfica y tabla con resultados.

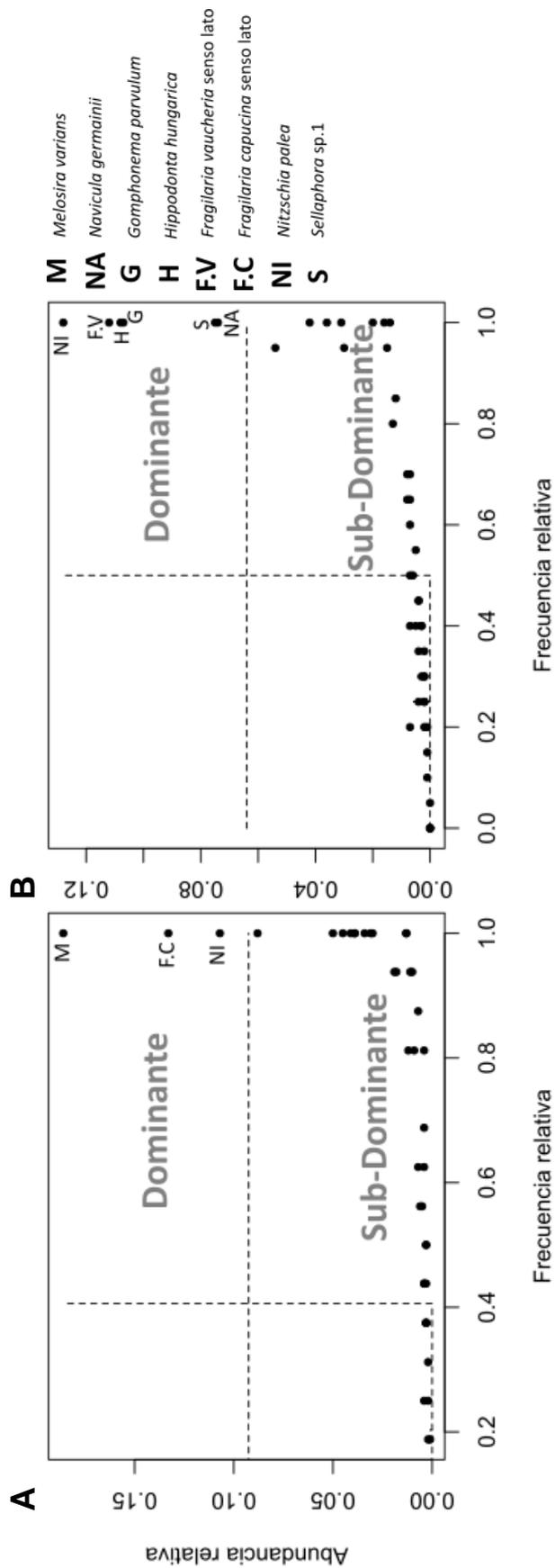
	$\text{PO}_4$		$\text{NO}_3$		$\text{NH}_4$	
	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío
<b>0</b>	284.2	14.0	291.2	35.1	9.7	6.4
<b>1</b>	279.3	44.6	297.4	11.5	7.7	5.4
<b>3</b>	263.0	41.4	307.9	39.8	9.1	3.3
<b>5</b>	243.3	37.5	300.0	75.3	18.8	15.2
<b>10</b>	216.7	29.6	292.2	4.6	23.2	29.4

### 3.2.2 Análisis de la comunidad de especies de diatomeas

El análisis de los ensambles de diatomeas resultó en la identificación de 134 especies pertenecientes a 42 géneros (Tabla G en Anexo). La composición y estructura comunitaria de la que se partió (D0) fue distinta entre ambas estaciones (i.e. invierno 2014 [Ex.-Inv.-14] y primavera 2015 [Ex.-Prim.-15]) (Figura 10).

La comunidad de diatomeas perteneciente al Ex.-Inv.-14 fue dominada por tres especies (*Melosira varians* [20%], *Fragilaria capucina* senso lato [10%] (senso lato, de ahora en adelante s.l.), *Nitzschia palea* [7%]), mientras que la comunidad del Ex.-Prim.-15 fue más equitativa, ya que fueron seis las especies dominantes (*Nitzschia palea* [14%], *Fragilaria vaucheriae* s.l. [11%], *Hippodonta hungarica* [6%], *Gomphonema parvulum* [8%], *Sellaphora* sp. 1 [6%], *Navicula germainii* [6%]) (Figura 10). Vale mencionar que para los dos experimentos permanecen registrados dos complejos de especies: *Fragilaria capucina* s.l. y *Fragilaria vaucheriae* s.l. (posiblemente con varias variedades cada uno).

En términos de riqueza y diversidad la comunidad de diatomeas del Ex.-Inv.-14 presentó valores un poco menores a la comunidad analizada en primavera 2015. En Invierno 2014 se encontraron 99 especies y el índice de Shannon fue 3.1, mientras que en primavera 2015 se registraron 115 especies y el índice de Shannon fue 3.5. Ni la riqueza ni los índices de diversidad presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$  ANOVA).



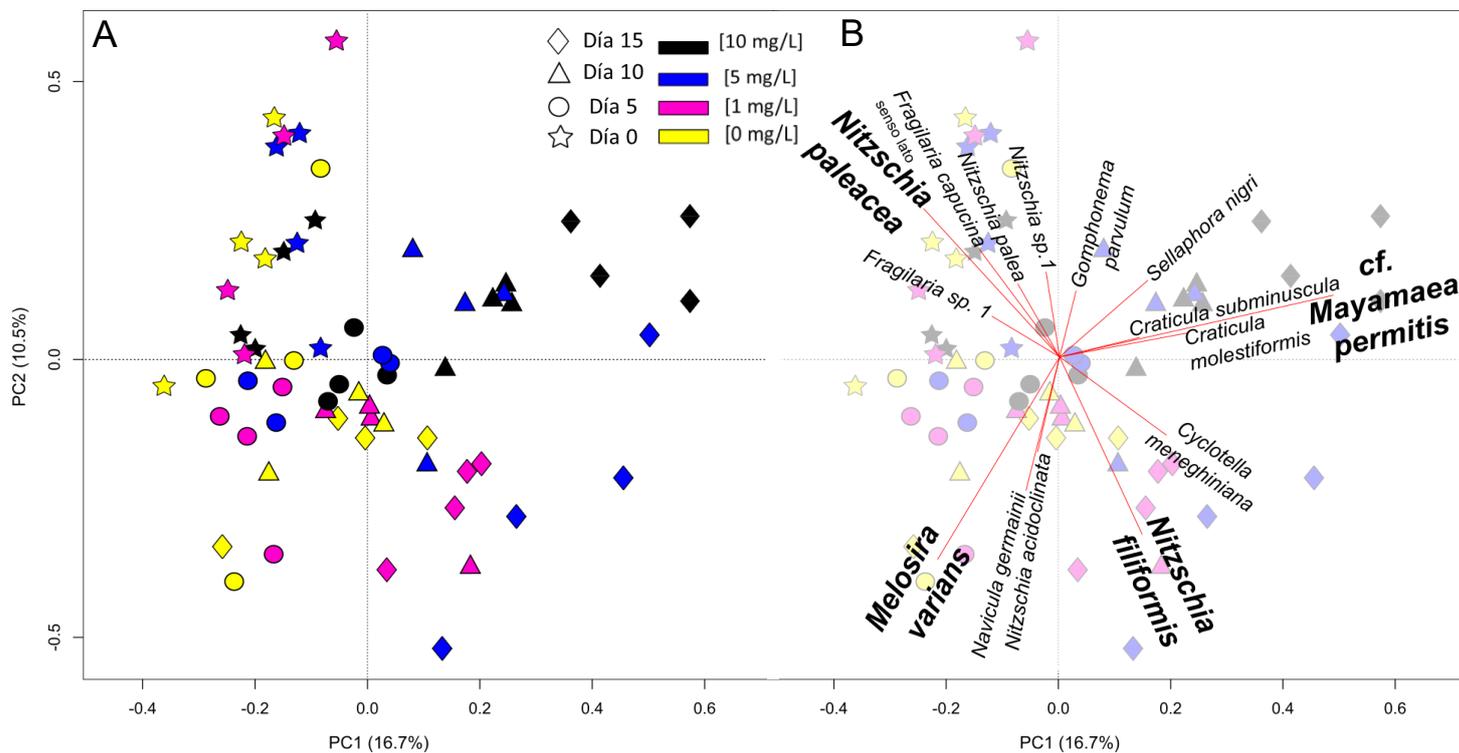
**Figura 10.** Abundancia relativa en función de la frecuencia relativa de diatomeas en los experimentos. Se indican las especies dominantes (aquellas cuya frecuencia relativa y una abundancia relativa es mayor a la mitad de la diferencia entre sus respectivos máximos y mínimos) y sub-dominantes (cuya frecuencia relativa es mayor y su abundancia relativa menor, a la diferencia entre sus respectivos máximos y mínimos) para ambos experimentos. **A)** experimento de invierno 2014. **B)** experimento de primavera 2015.

Para ninguno de los experimentos se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el D0 ( $p \geq 0.05$  PERMANOVA). Por lo tanto, se partió de una composición específica entre unidades experimentales estadísticamente igual. El análisis para la comunidad final, luego del tratamiento experimental (D15), del Ex.-Inv.-14 mostró que los tratamientos tuvieron diferente composición específica entre sí, salvo las concentraciones más altas que no difirieron entre ellas ( $5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). En el Ex.-Prim.-15, en contraste, fueron pocos los tratamientos con diferencias significativamente distintas en su composición específica (Tabla 6).

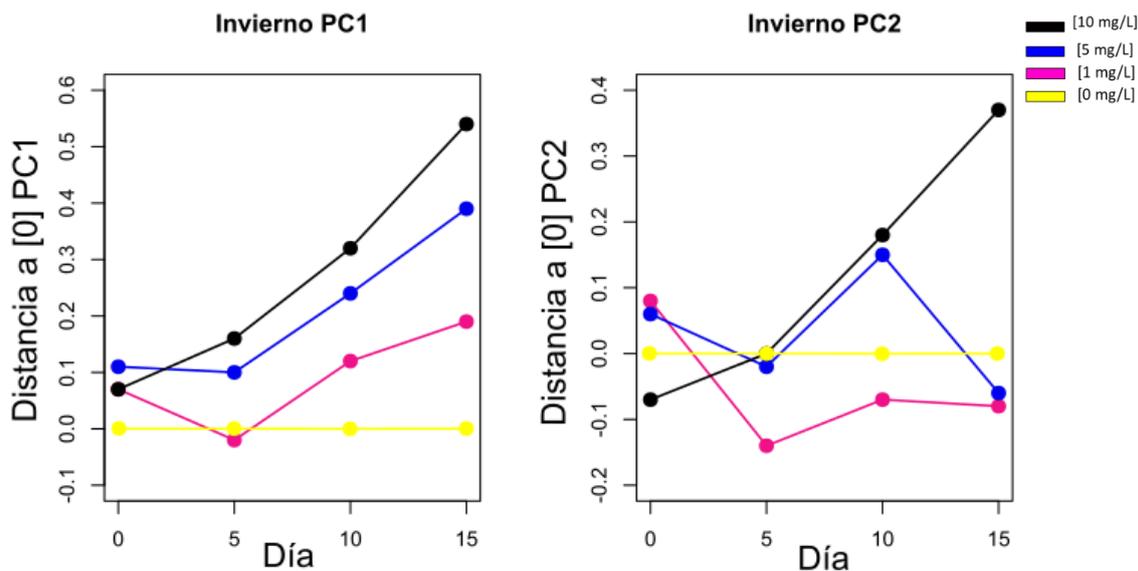
**Tabla 6.** Análisis de PERMANOVA en base a la composición relativa de especies de la comunidad de diatomeas perifíticas de la Laguna del Cisne al final de los experimentos de invierno 2014 y de primavera 2015. Se reportan los valores  $p$  para cada comparación entre pares de tratamientos y su correspondiente corrección de Bonferroni. Los tratamientos de glifosato fueron:  $0 \text{ mg L}^{-1}$  [0],  $1 \text{ mg L}^{-1}$  [1],  $3 \text{ mg L}^{-1}$  [3],  $5 \text{ mg L}^{-1}$  [5] y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  [10]. Las comparaciones significativas se marcaron en **negrita** y a las marginalmente significativas se las marcó (').

	Tratamiento	Valor $p$	$p$ - Bonferroni		Tratamiento	Valor $p$	$p$ - Bonferroni
I N V I E R N O	[0] VS [1]	<b>0.005</b>	<b>0.030</b>	P R I M A V E R A	[0] VS [1]	0.306	1.000
	[0] VS [5]	<b>0.001</b>	<b>0.006</b>		[0] VS [3]	0.185	1.000
	[0] VS [10]	<b>0.001</b>	<b>0.006</b>		<b>[0] VS [5]</b>	<b>0.003</b>	<b>0.030</b>
	[1] VS [5]	<b>0.007</b>	<b>0.042</b>		<b>[0] VS [10]</b>	<b>0.001</b>	<b>0.010</b>
	[1] VS [10]	<b>0.001</b>	<b>0.006</b>		[1] VS [3]	0.830	1.000
	[5] VS [10]	0.130	0.780		[1] VS [5]	0.071	0.710
					[1] VS [10]	0.027	0.270
					[3] VS [5]	0.032	0.320
					<b>[3] VS [10]</b>	<b>0.008</b>	<b>0.080'</b>
					[5] VS [10]	0.943	1.000

La composición específica de la comunidad de diatomeas en el Ex.-Inv.-14 fue distinta en muestras expuestas a distintas concentraciones del HBG. El cambio en la composición de especies para los distintos tratamientos a lo largo del tiempo fue similar, especialmente a lo largo del eje PC1 (Figuras 11 y 12). Los dos primeros ejes del PCA explicaron un 27.2% (PC1=16.7%, PC2=10.5%) de la varianza entre las muestras. Las especies asociadas a los tratamientos sin adición del HBG fueron *Nitzschia paleacea*, *Nitzschia palea*, *Fragilaria capucina* sensu lato, *Fragilaria* sp. 1 y *Nitzschia* sp. 1, mientras que las más abundantes en condiciones con altas concentraciones del HBG fueron *Sellaphora nigri*, *Craticula subminuscula*, *Craticula molestiformis* y cf. *Mayamaea permitis*, todas especies de muy pequeño porte (hasta 12  $\mu\text{m}$  de largo) (Figura 11). *Gomphonema parvulum* es una especie que si bien apareció en el cuadrante donde se agrupan las muestras con altas concentraciones del HBG, no estuvo dentro de las especies más correlacionadas con las muestras pertenecientes a ese grupo (Figura 11). Por último, un grupo de especies se asoció a muestras sin adición del HBG o expuestas a bajas concentraciones y a días avanzados en el experimento, estas fueron *Melosira varians*, *Nitzschia* sp. aff. *acidoclinata*, *Navicula germainii*, *Nitzschia filiformis* y *Cyclotella meneghiniana*.



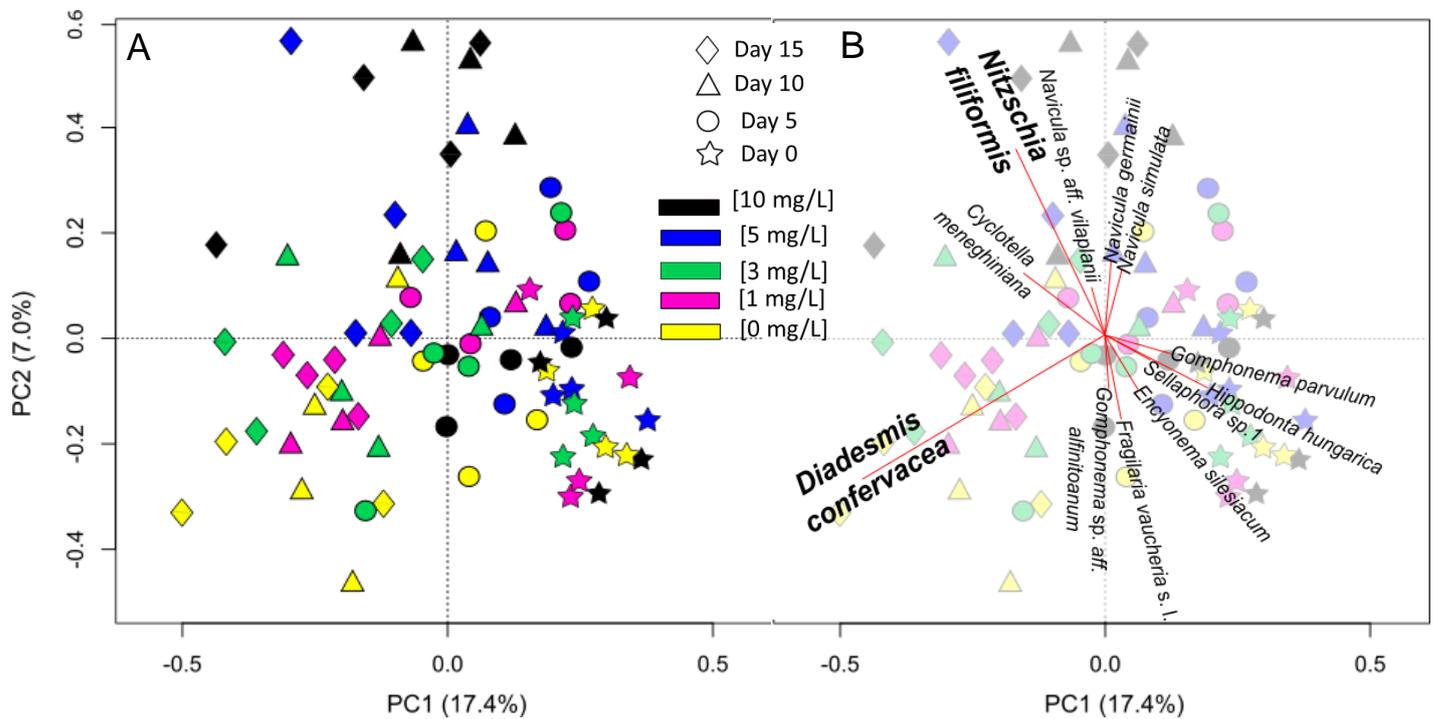
**Figura 11.** Análisis de componentes principales (PCA) de las especies de diatomeas que ocurrieron en el experimento de **invierno 2014**. **A)** Los símbolos indican el día en el que la muestra fue tomada y el color indica la concentración de glifosato aplicada en cada tratamiento. **B)** Las especies que más contribuyeron a la ordenación se encuentran ubicadas en el espacio según cuan correlacionadas estén con los distintos tratamientos. Cada una de ellas está unida al origen del gráfico con una línea que muestra el eje sobre el que se puede estimar la correlación de cada muestra mediante una proyección perpendicular.



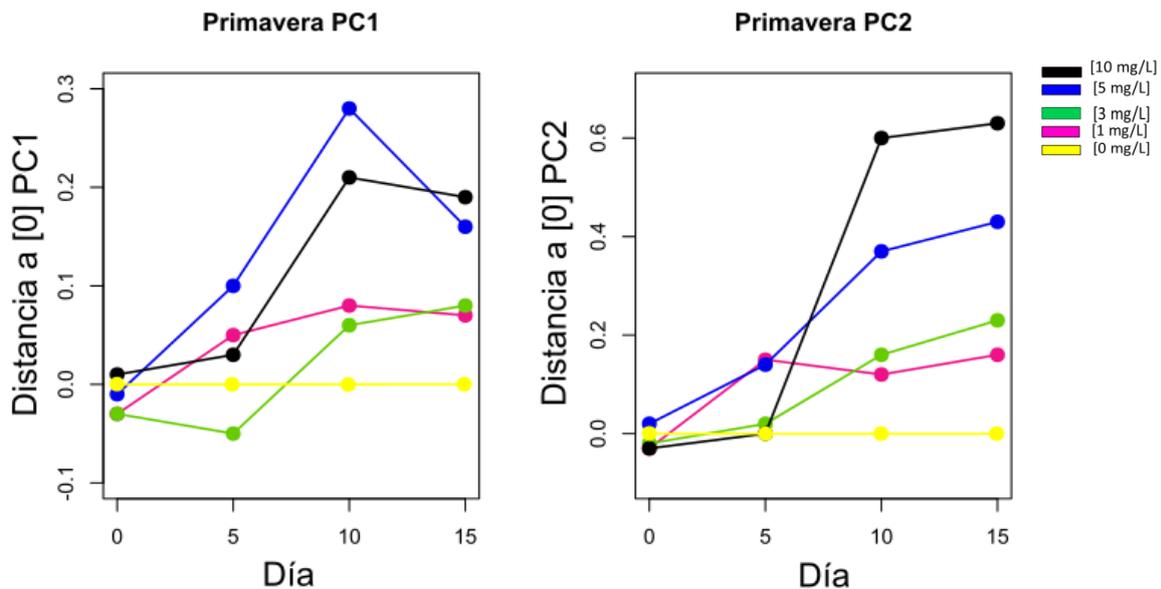
**Figura 12.** Diferencia entre la posición promedio de las réplicas pertenecientes al tratamiento sin adición de glifosato ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y los distintos tratamientos con adición de glifosato ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), para cada día del experimento de **invierno 2014**. El gráfico se construyó para la ubicación de las réplicas en el PCA, según el eje 1 (PC1 - derecha) y el eje 2 (PC2 - izquierda).

La composición específica de la comunidad de diatomeas en el Ex.-Prim.-15 también cambió a lo largo del tiempo y en torno a la exposición al HBG. En el transcurso de los días la composición de las muestras se tornó similar, por un lado, entre las muestras expuestas a concentraciones del HBG más bajas (i.a. 1 mg L<sup>-1</sup> y 3 mg L<sup>-1</sup>) y por el otro, a las expuestas a concentraciones del HBG más altas (i.a. 5 mg L<sup>-1</sup> y 10 mg L<sup>-1</sup>) (Figuras 13 y 14). Los dos primeros ejes del PCA explicaron un 24.4% (PC1=17.4%, PC2=7.0%) de la varianza entre las muestras. Las muestras pertenecientes a los tratamientos sin adición del HBG se correlacionaron positivamente con *Gomphonema parvulum*, *Hippodonta hungarica*, *Sellaphora* sp. 1, *Encyonema silesiacum*, *Fragilaria vaucheriae* s.l. y *Gomphonema* sp. aff. *alfinitoanum* (Figura 13).

Por otro lado, las especies asociadas a altas concentraciones del HBG, en los días más avanzados de este experimento fueron *Nitzschia filiformis*, *Navicula* sp. aff. *vilaplantii*, *Navicula germainii* y *Navicula simulata* (Figura 13). *Diadsmis confervacea* tuvo una alta correlación con muestras avanzadas en el tiempo experimental y bajo condiciones de no adición del HBG o relativamente bajas concentraciones (Figura 13).



**Figura 13.** Análisis de componentes principales (PCA) realizado a las muestras del experimento de **primavera 2015**. **A)** Los símbolos indican el día en el que la muestra fue tomada y el color indica la concentración de glifosato aplicada en cada tratamiento. **B)** Las especies que más contribuyeron a la ordenación se encuentran ubicadas en el espacio según cuan correlacionadas estén con los distintos tratamientos. Cada una de ellas está unida al origen del gráfico con una línea que muestra el eje sobre el que se puede estimar la correlación de cada muestra mediante una proyección perpendicular.



**Figura 14.** Diferencia entre la posición promedio de las réplicas pertenecientes al tratamiento sin adición de glifosato ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y los distintos tratamientos con adición de glifosato ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) para cada día del experimento de **primavera 2015**. El gráfico se construyó para la ubicación de las réplicas según el eje 1 (PC1 - derecha) y el eje 2 (PC2 - izquierda) del PCA.

### **3.3 Objetivos Específicos 2 y 3**

#### **3.3.1 Análisis de especies indicadoras**

En el Ex.-Inv.-14 las especies con mayor índice de indicación del tratamiento sin adición del HBG fueron *Nitzschia paleacea*, *Nitzschia subacicularis*, *Fragilaria* sp. 1 y *Ulnaria ulna*. Al tratamiento con 1 mg L<sup>-1</sup> i.a. glifosato se le asociaron *Navicula germainii* y *Nitzschia* sp. aff. *acidoclinata*, mientras que a concentraciones bajas del HBG (i.e. al agrupar las réplicas del tratamiento sin adición con las de tratamiento de 1 mg L<sup>-1</sup> i.a. glifosato) apareció también *Ulnaria acus* como especies indicadora. Es interesante que *Navicula germainii* apareció también asociada a la suma de los tratamientos 1 mg L<sup>-1</sup> y 5 mg L<sup>-1</sup> y con un mayor índice de asociación que al testearla sólo en relación a 1 mg L<sup>-1</sup> i.a. glifosato. Las especies indicadoras de los tratamientos con mayor concentración del HBG (i.e. 5 mg L<sup>-1</sup> y 10 mg L<sup>-1</sup> i.a. glifosato) tienen en común que son todas de pequeño porte (hasta 12 µm) a excepción de *Gomphonema parvulum* (Tabla 7).

En el Ex.-Prim.-15 las especies con mayor índice de indicación para los tratamientos con menor concentración del HBG fueron *Cyclostephanos invisitatum*, *Gomphonema* sp. aff. *alfinitoanum* y *Fragilaria vaucheriae* s.l.. Es interesante que ninguna especie se asoció únicamente al tratamiento sin adición del HBG. Por otro lado, tres especies fueron las que se asociaron a los tratamientos con mayores concentraciones *Navicula erifuga*, *Craticula subminuscula* y *Nitzschia filiformis* (Tabla 8).

**Tabla 7.** Análisis de especies indicadoras para el experimento de invierno 2014 para cada tratamiento o combinaciones de tratamientos consecutivos (0 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup>, 5 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> i.a. de glifosato). Los tratamientos se ordenaron de arriba hacia abajo en orden descendiente según la concentración nominal del i.a. glifosato a la que fue expuesta la comunidad de diatomeas perifíticas. Los colores asignados a cada tratamiento son los mismos que se han utilizado en todos los gráficos a lo largo del manuscrito. Se reportan los valores de indicación (At, Bt y Sqrt, ver texto por su interpretación), además de la abundancia relativa máxima alcanzada en las muestras pertenecientes al tratamiento.

Invierno 2014					
Concentración (mg L <sup>-1</sup> i.a. glifosato)	Especies	At	Bt	Sqrt	Abundancia relativa máxima
5 + 10	<i>cf. Mayamaea permitis</i>	0.77	1.00	0.88	34.69
	<i>Craticula molestiformis</i>	0.68	0.96	0.81	9.65
	<i>Craticula subminuscula</i>	0.71	0.79	0.75	2.54
	<i>Sellaphora nigri</i>	0.59	1.00	0.77	13.50
	<i>Gomphonema parvulum</i>	0.60	1.00	0.77	15.51
1 + 5	<i>Navicula germainii</i>	0.64	1.00	0.80	16.40
	<i>Nitzschia semirobusta</i>	0.71	0.79	0.75	2.52
0 + 1	<i>Nitzschia paleacea</i>	0.66	0.98	0.80	20.63
	<i>Fragilaria</i> sp. 1	0.65	1.00	0.81	4.69
	<i>Ulnaria acus</i>	0.67	0.93	0.79	3.13
10	<i>cf. Mayamaea permitis</i>	0.48	1.00	0.69	34.69
1	<i>Navicula germainii</i>	0.43	1.00	0.65	16.40
	<i>Nitzschia</i> aff. <i>acidoclinata</i>	0.36	1.00	0.60	2.93
0	<i>Nitzschia paleacea</i>	0.44	1.00	0.67	20.63
	<i>Nitzschia subacicularis</i>	0.67	0.79	0.73	3.44
	<i>Ulnaria ulna</i>	0.60	0.75	0.67	1.86
	<i>Fragilaria</i> sp. 1	0.37	1.00	0.61	4.69

**Tabla 8.** Análisis de especies indicadoras para el experimento de primavera 2015, se reportan especies indicadoras para cada tratamiento o combinaciones de tratamientos consecutivos (0 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup>, 3 mg L<sup>-1</sup>, 5 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> i.a. de glifosato). Los tratamientos se ordenaron de abajo hacia arriba en orden ascendente según la concentración nominal del i.a. glifosato a la que fue expuesta la comunidad de diatomeas perifíticas. Los colores asignados a cada tratamiento son los mismos que se han utilizado en todos los gráficos a lo largo del manuscrito. Se reportan los valores de indicación (At, Bt y Sqrt), además de la abundancia relativa máxima alcanzada en las muestras pertenecientes al tratamiento.

Primavera 2015					
Concentración (mg L <sup>-1</sup> i.a. glifosato)	Especies	At	Bt	Sqrt	Abundancia relativa máxima
3 + 5 + 10	<i>Nitzschia filiformis</i>	0.79	0.92	0.85	25.80
	<i>Craticula subminuscula</i>	0.68	0.97	0.82	7.91
10 + 10	<i>Navicula erifuga</i>	0.61	1.00	0.78	8.24
0 + 1 + 3	<i>Gomphonema</i> aff. <i>alfinitoanum</i>	0.73	0.91	0.82	4.35
	<i>Fragilaria vaucheriae</i> s.l.	0.66	1.00	0.81	21.71
10	<i>Navicula erifuga</i>	0.39	1.00	0.62	8.24
	<i>Craticula subminuscula</i>	0.34	0.92	0.56	7.91
1	<i>Cyclostephanos invisitatum</i>	0.77	0.42	0.57	4.32

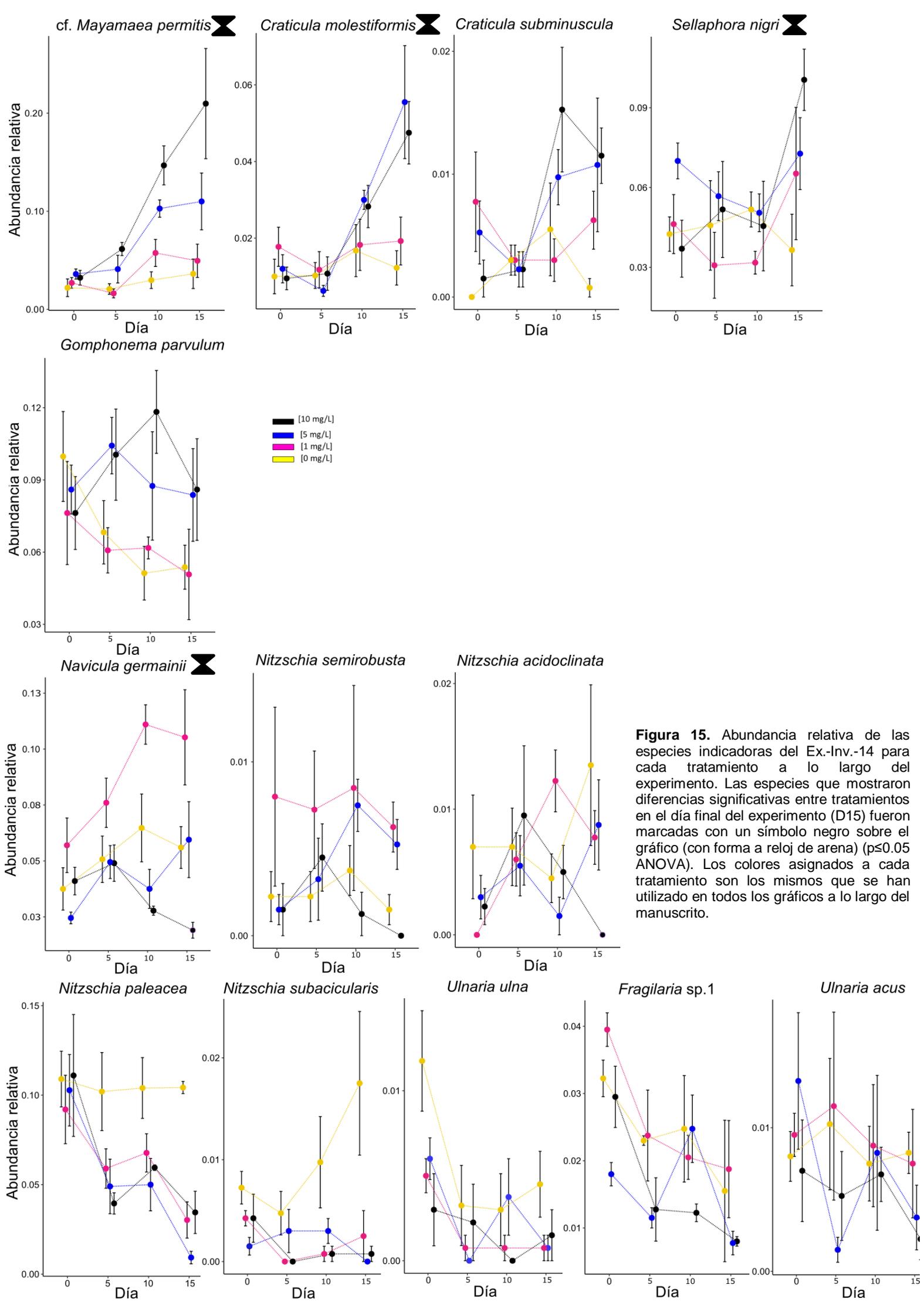
Fueron analizadas las diferencias entre tratamientos en base a las abundancias relativas de las especies indicadoras (Tablas 8 y 9) mediante pruebas ANOVA, (de una vía: factor concentración del i.a. glifosato de un HBG) para el día cero y el día final de los experimentos, previa verificación de cumplimiento de los supuestos. Para el D0 sólo *Fragilaria* sp. 1 no pudo ser analizada para el Ex.-Inv.-14. A excepción de dicha especie, todas las especies mostraron una abundancia relativa similar entre tratamientos al inicio de periodo experimental (Figura 15). Por otro lado, en el último día del Ex.-Inv.-14, las tendencias más claras fueron para las especies cuya abundancia fue elevada a altas concentraciones del HBG (cf. *Mayamea permitis*, *Sellaphora nigri* y *Craticula molestiformis*) (Tabla 9; Figura 15). Por otro lado, si bien la abundancia de *Nitzschia paleacea* no pudo ser evaluada mediante test de ANOVA, los cambios en su abundancia a lo largo del experimento sugieren que puede ser una especie sensible a la exposición al HBG (Figura 15).

En el Ex.-Prim.-15 sólo una especie resultó significativamente asociada a la concentración del HBG más elevada y fue *Navicula erifuga* (Tabla 9; Figura 16). *Fragilaria vaucheriae* s.l. mostró una tendencia a disminuir ante la exposición a la mayor concentración del HBG, pero no resultó estadísticamente significativa. El hecho de ser posiblemente un complejo de especies no ayuda a dilucidar claramente su respuesta. *Nitzschia filiformis* mostró un aumento similar en su abundancia bajo cualquier escenario de exposición al HBG. Si bien sus promedios de abundancia

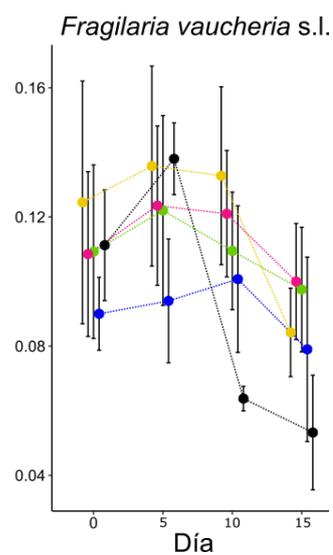
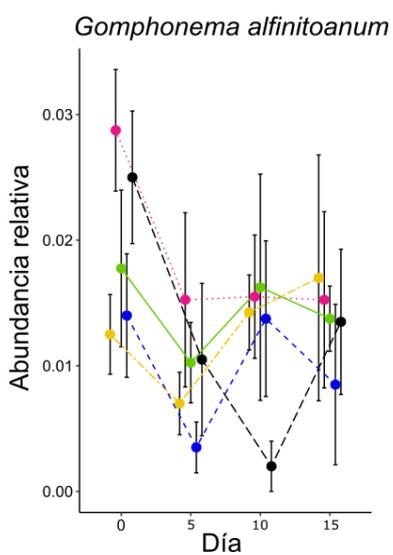
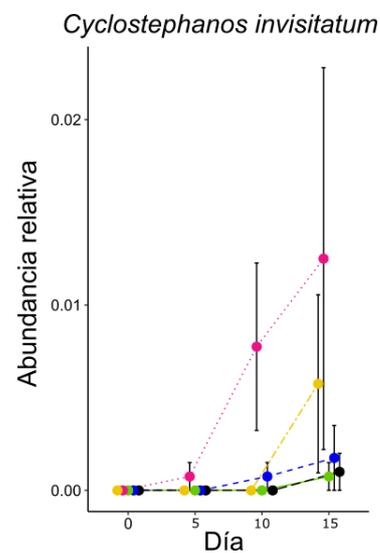
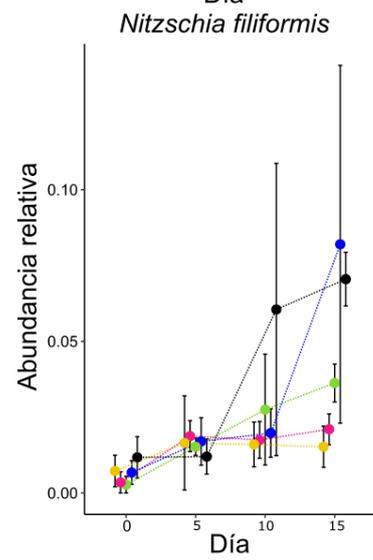
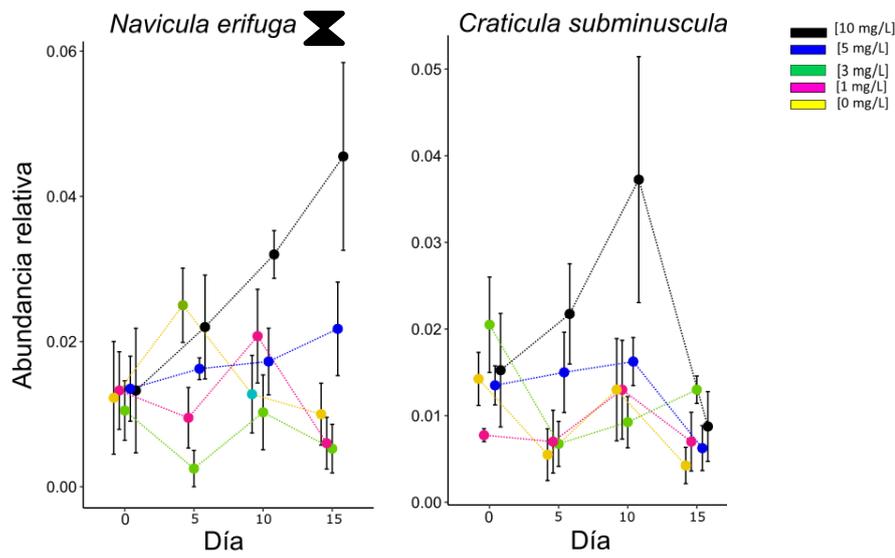
relativa en el D15 se ordenaron según la concentración del i.a. glifosato (del HBG) de los tratamientos, no se encontraron diferencias significativas (Figura 16).

**Tabla 9.** *Post hoc* de las especies indicadoras del Ex.-Inv.-14 y del Ex.-Prim.-15 para las que se realizó test de ANOVA de una vía (concentración del i.a. glifosato) en base a su abundancia relativa. Las diferencias marginalmente significativas se señalaron (').

I N V E R N O	Tratamiento	Valor <i>p</i>	Especie	P R I M A V E R A	Tratamiento	Valor <i>p</i>	Especie
		[0] VS [10]	0.023		<i>Navicula</i>		[1] VS [10]
	[1] VS [10]	0.001	<i>germainii</i>		[3] VS [10]	0.019	<i>erifuga</i>
	[5] VS [10]	0.028					
	[0] VS [10]	0.019	<i>cf. Mayamaea</i>				
	[1] VS [10]	0.070'	<i>permitis</i>				
	[0] VS [5]	0.025	<i>Craticula</i>				
	[0] VS [10]	0.030	<i>molestiformis</i>				
	[1] VS [5]	0.090'					
	[0] VS [10]	0.051'	<i>Sellaphora nigri</i>				



**Figura 15.** Abundancia relativa de las especies indicadoras del Ex-Inv.-14 para cada tratamiento a lo largo del experimento. Las especies que mostraron diferencias significativas entre tratamientos en el día final del experimento (D15) fueron marcadas con un símbolo negro sobre el gráfico (con forma a reloj de arena) ( $p \leq 0.05$  ANOVA). Los colores asignados a cada tratamiento son los mismos que se han utilizado en todos los gráficos a lo largo del manuscrito.



**Figura 16.** Abundancia relativa de las especies indicadoras del Ex.-Prim.-15 en cada tratamiento a lo largo del experimento. Las especies que mostraron diferencias significativas entre tratamientos en el día final del experimento (D15) fueron marcadas con un símbolo negro sobre el gráfico (con forma a reloj de arena) ( $p \leq 0.05$  ANOVA). Los colores asignados a cada tratamiento son los mismos que se han utilizado en todos los gráficos a lo largo del manuscrito.

## 4 Discusión

### 4.1 Procesos a distintas escalas espaciales y temporales

Este estudio evalúa cambios que ocurren a una escala microscópica y a corto plazo (composición de diatomeas perifíticas), que potencialmente reflejan impactos de procesos que ocurren a una escala del orden de los kilómetros cuadrados (cuenca de la Laguna del Cisne) y en periodos de tiempo prolongados (momento de aplicación del herbicida, permanencia en los suelos, en el agua de escorrentía y en el sedimento y agua de la laguna). Se pretendió abarcar un sistema con tres elementos operando a tres escalas espaciales y temporales distintas, pero cuyas dinámicas están sumamente conectadas: la cuenca de la Laguna del Cisne, la Laguna del Cisne propiamente dicha y la comunidad perifítica (Figura 17).



**Figura 17.** Tres escalas espaciales (con sus escalas temporales asociadas) fueron abarcadas en este estudio, cuyo foco estuvo sobre la variable respuesta: cambios en la composición específica de la comunidad de diatomeas perifíticas.

Las distintas escalas contempladas en este estudio, pueden ser entendidas como filtros en serie que en conjunto determinan las condiciones abióticas y bióticas que estructuran a las comunidades biológicas de la laguna. En este sentido, los filtros a nivel del paisaje, tales como la posición geográfica y las características de la cuenca, determinan los efectos del clima local y la aptitud del suelo para distintos usos, por ende afectan qué sustancias, en qué momento y con qué frecuencia e intensidad ingresan al cuerpo de agua receptor (Blenckner, 2005).

Parte de la cuenca de drenaje de la Laguna del Cisne es destinada a fines agrícolas y forestales, lo que se ha intensificado y extendido (ocupando el 27% de la cuenca en el 2015), siguiendo la tendencia nacional elaborada en el marco teórico en Antecedentes en Uruguay. Otra característica importante de esta cuenca es la presencia y función del humedal del Estero, responsable de gran parte del aporte de sustancias húmicas que le dan un color té al agua de la laguna. Este sistema es altamente regulador de las características físico-químicas de este cuerpo de agua en términos, por ejemplo, de biodisponibilidad de sustancias químicas (e.g. capacidad de secuestro de metales por sustancias húmicas) incluyendo nutrientes, así como la disponibilidad de luz (Steinberg *et al.*, 2006; Goyenola, 2011; Goyenola *et al.*, 2017). El impacto del humedal sobre la laguna está determinado por el área que éste ocupa, que sufrió una reducción de 10 ha (área original: 176 ha) entre los años 2001 y 2015, así como por el régimen hidrológico que regula la magnitud de esa conexión.

La conectividad entre la cuenca de drenaje y los sistemas acuáticos a los que abastece está dada por fluctuaciones en el viento y la lluvia actuando sobre el paisaje, cuyo aporte además, se ve particularmente afectado por la pendiente, tipo y cobertura del suelo. Si bien no se pudo estimar la precipitación acumulada en la cuenca de la Laguna del Cisne por no haber datos de estaciones pluviométricas en la misma, en su lugar, se comparó el régimen hídrico de la región entre las dos estaciones del año en que se realizó el muestreo (invierno 2014 y primavera 2015). En el invierno 2014 la laguna puede haber recibido mayor influencia de la cuenca de drenaje que en primavera 2015 dada la mayor frecuencia de eventos de lluvia de magnitud. Sin embargo, por otro lado, uno de los picos elevados de precipitación en primavera ocurrió tres días después de poner los sustratos a colonizar y tanto el nitrato ( $\text{NO}_3$ ) como el ortofosfato ( $\text{PO}_4$ ) se encontraron en mayor concentración en primavera 2015 que en invierno 2014 (Tabla E en Anexo). Por lo tanto, es posible que aunque fueran menos los eventos de lluvia en la primavera, las concentraciones de nutrientes en la laguna reflejaran de forma más inmediata la actividad en la cuenca o que la actividad desarrollada fuera más intensiva en esta estación.

A una escala menor podemos hablar de filtros internos a la laguna, como su historia, sus características morfométricas (profundidad, área, línea de costa) y las interacciones abióticas y bióticas. La historia de la laguna se vincula estrechamente con su manejo y las actividades desarrolladas en su cuenca, ya que las mismas afectan la concentración de nutrientes y otras

sustancias en la columna de agua, así como su acumulación en el sedimento (Blenckner, 2005). En este sentido, la concentración de nutrientes en el agua de la Laguna del Cisne ha aumentado históricamente, especialmente en comparación a los registros más antiguos (1987-1989), reflejando la intensificación productiva en su cuenca. Los sistemas someros, tal como la Laguna del Cisne, son los ecosistemas acuáticos más sensibles a ingresos de nutrientes y por lo tanto más propensos a cambios rápidos en su estado general (Scheffer, 2001). Además, la fuerte interacción entre el viento y el fondo es característica de estos sistemas, por lo que la resuspensión y liberación de sustancias retenidas en este compartimento es frecuente incluso con vientos suaves o moderados (Scheffer, 2001; Jeppesen *et al.*, 2007).

La Laguna del Cisne, por ser somera, tiene un gran potencial de desarrollo de la comunidad perifítica, dado por la extensa zona litoral y bentónica en relación con el volumen de la zona pelágica (Wetzel & Likens, 2000). A la vez, su poca profundidad facilita la disponibilidad a la luz y permite el crecimiento de la comunidad de macrófitas que, al tiempo que compite por luz con la comunidad perifítica, constituye un importante sustrato para su crecimiento (i.e. la comunidad epifítica) (Sand-Jensen & Borum, 1984, 1991; Liboriussen & Jeppesen, 2006). La comunidad epifítica en particular depende principalmente de la columna de agua para la toma de nutrientes y es comúnmente densa bajo condiciones eutróficas (Sand-Jensen & Borum, 1984, 1991).

El conjunto de características bióticas y abióticas definida por los filtros ambientales actuando a distintas escalas sobre la Laguna del Cisne afecta tanto la magnitud y el desarrollo de la comunidad perifítica como la identidad del pool de especies que serán exitosas en estas condiciones de crecimiento.

#### **4.2 Efectos del HBG sobre la composición comunitaria de diatomeas perifíticas**

El diseño experimental aplicado permitió poner a prueba las hipótesis planteadas. La composición de la comunidad natural de diatomeas perifíticas proveniente de la Laguna del Cisne cambió frente a la exposición experimental a un pulso de un HBG (sal isopropilamina de glifosato, Glifotec). En consonancia con los supuestos de la hipótesis 1, el HBG afectó a otros productores primarios fuera de su blanco de aplicación. La composición específica de la comunidad de diatomeas siguió una trayectoria distinta según el tratamiento experimental. Asimismo, se evidenció una relación positiva entre la exposición a las concentraciones más altas del HBG y una mayor abundancia de un conjunto de especies pennadas y (en su mayoría) de muy pequeño porte (largo <math><12 \mu\text{m}</math>). Por lo tanto, se encontró evidencia que apoya a la hipótesis 2, ya que la magnitud de los efectos observados sobre la composición comunitaria aumentó al aumentar la exposición a la formulación de glifosato.

El efecto del HBG sobre la composición de la comunidad fue observado en las dos estaciones del año, aunque fue más marcado en el experimento de invierno que en el de primavera. Igualmente, en primavera ninguna especie se asoció al tratamiento control, sin adición del HBG (Figura 1 en Anexo), por lo tanto, todas las especies clasificadas como sensibles se determinaron a partir del experimento de invierno. El ensamble de especies inicial en los experimentos (i.e. Día 0) fue distinto entre invierno y primavera, lo que puede haberse debido a las diferencias en las condiciones ambientales naturales (e.g. temperatura del agua y régimen lumínico). Sin embargo, también puede haber influido la probable aplicación de algún HBG en la cuenca de drenaje durante la primavera, ya que la primavera y el verano son las épocas de típica aplicación en las plantaciones de soja. El ingreso del HBG al sistema puede haber ocurrido en el evento de lluvia registrado en la región durante la primavera, tres días después de colocados los sustratos en la laguna. La exposición de la comunidad perifítica a un pulso de un HBG puede ser definido como un estresor, es decir, como una variable que como resultado de la actividad humana excedió su rango normal de variación y afectó adversamente a la composición de la comunidad (Auerbach, 1981 en Townsend *et al.*, 2008). Es esperable que la ausencia de especies sensibles en primavera se haya debido a que la comunidad no reaccionó del mismo modo en las dos estaciones frente a la misma aproximación experimental. Una previa exposición a un HBG y/o sus metabolitos de degradación en la laguna pudo

haber disminuido la proporción de taxa sensibles presentes en la comunidad perifítica que colonizó a los sustratos y de esta manera explicar que no se detectaran especies sensibles en el experimento de primavera 2015. Considerando además que la ausencia de especies sensibles en primavera, no se debió a que la comunidad no se haya desarrollado con éxito en esta estación del año, ya que en comparación a otras comunidades autótrofas (i.e. cianobacterias y algas verdes) las diatomeas presentaron la mayor proporción de clorofila *a* el último día del experimento de primavera 2015 en todos los tratamientos (Figura 2 en Anexo – mediciones cuantitativas mediante fluorescencia realizadas con un *bbe Benthos Torch*).

La re-estructura de una comunidad estresada como mecanismo que aumenta su tolerancia frente al estresor ha sido descrita bajo el concepto de Tolerancia Comunitaria Inducida por Contaminación (PICT, sigla en inglés; Blanck & Wängberg, 1988; Tlili *et al.*, 2016). Si bien para confirmar la ocurrencia del mecanismo PICT hace falta llevar adelante un experimento con un diseño acorde a esta pregunta (Clements *et al.*, 2016), vale mencionar que este mecanismo ha sido reportado en trabajos de campo y laboratorio, en perifiton (y otras comunidades como la bacteriana y la fitoplanctónica) para la contaminación por metales pesados y por el herbicida atrazina, donde las especies capaces de tolerar este tipo de estrés son seleccionadas y las especies sensibles tienden a disminuir su abundancia o incluso a desaparecer (Blanck, 2002; Tlili & Montuelle, 2011;

Morin *et al.*, 2012; Wood, 2017). Estos cambios comunitarios pueden deberse a alteraciones competitivas entre las especies o a cambios en las interacciones con otras comunidades (Tlili *et al.*, 2017).

En este sentido, la predominancia del grupo de especies de diatomeas pequeñas, en los tratamientos con mayor exposición al HBG, puede estar evidenciando una selección de las especies en base a una estrategia de crecimiento en común. Grime (1977) postuló la evolución de tres estrategias de crecimiento para las plantas, teoría que ha sido aplicada para otros organismos (e.g. hongos y animales) así como las diatomeas (Morin, 2008). Las estrategias primarias agrupan a las especies en tres categorías: R (especies rudas o pioneras) son pequeñas especies, colonizadoras tempranas o especies oportunistas, tienen una rápida tasa de crecimiento, baja biomasa y resisten disturbios intensos, S (especies tolerantes) son especies de pequeño a mediano porte, colonizadoras lentas, adaptadas a colonizar hábitats deteriorados, tienen una tasa de crecimiento intermedia y biomasa entre baja y media, C (especies competitivas) son especies de gran tamaño, colonizadoras lentas, con una baja tasa de crecimiento y una alta biomasa (Morin *et al.*, 2008). Estos grupos pueden resultar muy generales pero conforman un marco útil para discutir las respuestas de distintos grupos de especies a los estresores ambientales. Las especies tolerantes a las altas concentraciones del HBG fueron en su mayoría de muy pequeño porte, pertenecieron al grupo R, es decir, fueron especies oportunistas que aprovecharon el vacío provocado

por la liberación de nicho a partir de que las especies sensibles al HBG perecieran.

La selección de especies pequeñas es una respuesta comunitaria que ha sido también observada frente a la exposición a metales pesados (Morin *et al.*, 2012; 2014). La matriz polisacárida secretada por las algas y bacterias constituyentes del biofilm, en conjunto con una capa externa de células muertas (Teitzel & Parsek, 2003), ejerce una protección física sobre los organismos que componen a esta comunidad. Esta protección es, en parte, debida a la reducción del intercambio entre las células contenidas en el biofilm y el ambiente (Ivorra *et al.*, 2000). En particular para metales pesados se sostiene que la protección física por parte de la matriz polisacárida es más eficiente sobre especies pequeñas, con menor superficie de absorción, y por ende podría ser un mecanismo de selección positiva (Khoshmanesh *et al.*, 1997; Joux-Arab *et al.*, 2000; Morin *et al.*, 2007) que podría también actuar frente a la exposición a un HBG.

#### **4.3 Detección de especies indicadoras y de umbrales de reacción**

La exposición a agentes potencialmente tóxicos (i.e. estresores) puede ser un gran determinante de la estructura de las comunidades (Morin *et al.*, 2014). En este experimento, se evidenció un recambio de especies, en el que un conjunto de especies fue identificado como tolerante porque se desarrolló con éxito frente a altas concentraciones del HBG (i.e. *Sellaphora*

*nigri*, *Craticula molestiformis*, *Craticula subminuscula*, cf. *Mayamaea permitis*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula erifuga*, *Nitzschia filiformis*), mientras que otro conjunto de especies fue identificado como sensible debido a su baja abundancia relativa frente a la exposición al HBG, ya sea por haber perecido o por haber disminuido su tasa de crecimiento (i.e. *Nitzschia subacicularis*, *Ulnaria ulna*, *Ulnaria acus*, *Nitzschia paleacea*, *Fragilaria* sp.1) (Figura 18). La asociación de las especies al escenario de mayor impacto con altas concentraciones del HBG y por otro lado al escenario control, sin adición del HBG, fue robusta. Sin embargo, la concentración intermedia (3 mg L<sup>-1</sup>) agregada en primavera no mostró una asociación clara de especies, lo que hubiera ayudado a establecer un umbral de reacción por parte de las especies que formaron parte de la comunidad. De hecho, el experimento de primavera en general mostró menos asociaciones fuertes entre las especies y los tratamientos.

Dentro de las especies tolerantes al HBG *S. nigri* y *C. molestiformis* han sido clasificadas como pertenecientes al grupo de especies R, es decir, especies oportunistas, altamente móviles, con una rápida tasa de crecimiento y resistentes a disturbios intensos (Kelly *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2008).

*S. nigri* además, ha sido observada en altas abundancias en ambientes fuertemente impactados por eutrofización, pesticidas, metales pesados y contaminación orgánica (Lange-Bertalot & Bonik, 1976; Weber &

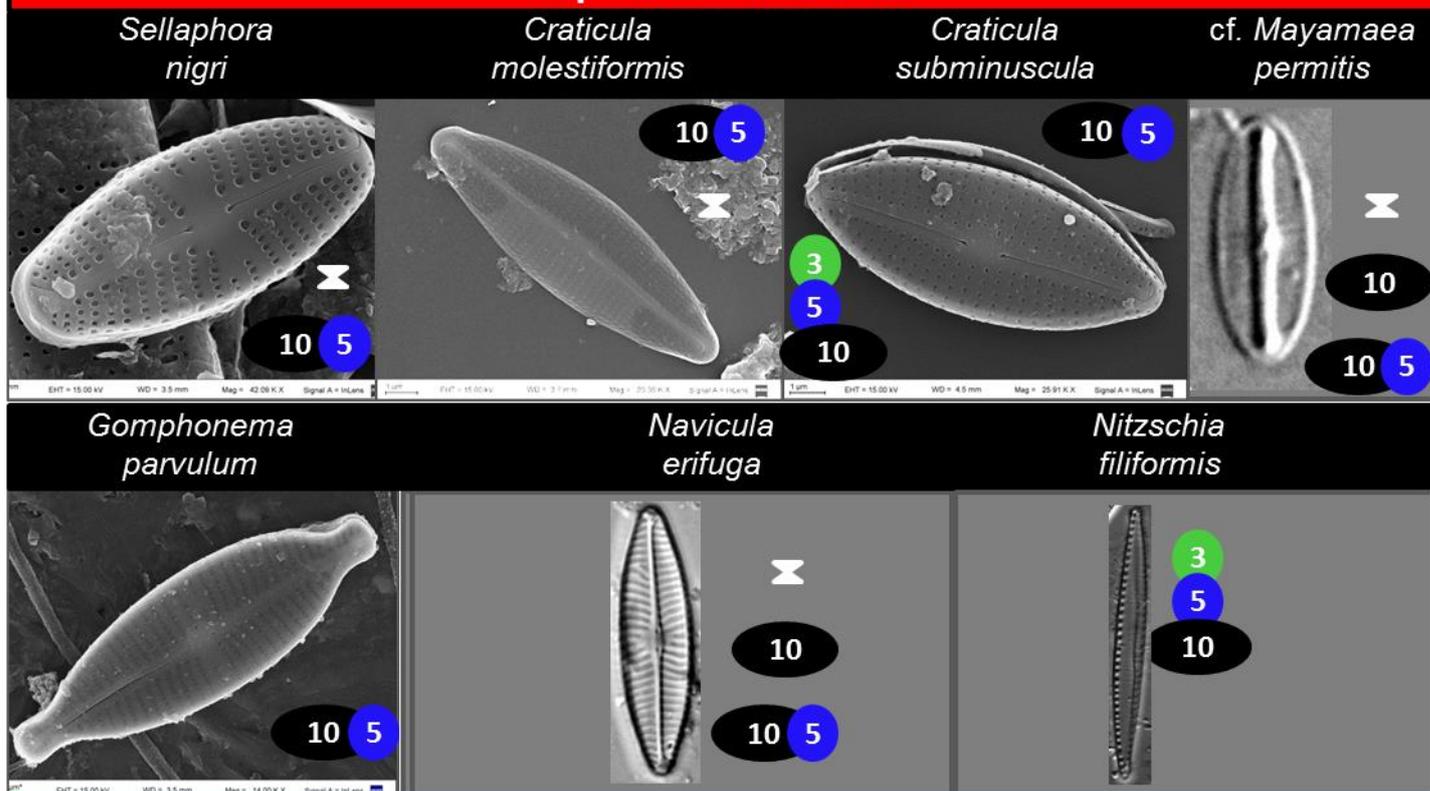
McFarland, 1981; Dayner & Johansen, 1991; Morin *et al.*, 2012, 2014; Delgado & Pardo, 2015; Moisset *et al.*, 2015). Esta especie también ha sido reportada formando ensambles con otros taxa característicos de ambientes acuáticos afectados por contaminación orgánica (Wetzel *et al.*, 2015) y cuya composición es similar a la encontrada en nuestros tratamientos con mayor exposición al HBG: *C. subminuscula* (muy abundante en los tratamientos con altas concentraciones del HBG), *Nitzschia palea* (muy abundante en el experimento de invierno pero no resultó indicadora), *Navicula gregaria* (presente en baja abundancia), *Mayamaea atomus* (taxonómicamente próxima a cf. *M. permitis*, especie con mayor abundancia relativa en los tratamiento con mayor concentración del HBG, hasta 34.69%) (Figura 18). Asimismo, ante exposiciones a distintas concentraciones del herbicida diuron (muy utilizado en plantaciones de caña de azúcar), *S. nigri* y *N. palea* no mostraron diferencia en su crecimiento (Moisset *et al.*, 2015), que fue explicado por una posible regulación genética temprana, ya observada en *S. nigri* bajo condiciones de contaminación por cadmio (Tiam *et al.*, 2012).

*C. subminuscula* de pequeño porte y parte del ensamble de especies tolerantes al HBG en nuestros experimentos, ha sido ampliamente reportada en ambientes altamente contaminados, eutróficos y de meso a polisapróbicos (Figura 18) (Lowe, 1974; Van Dam *et al.*, 1994; Gómez & Licursi, 2001). Lobo *et al.* (2015) halló a *C. subminuscula* en un sistema lótico (cuenca del Río Pardo, Río Grande del Sur, Brasil; 2005 - 2013),

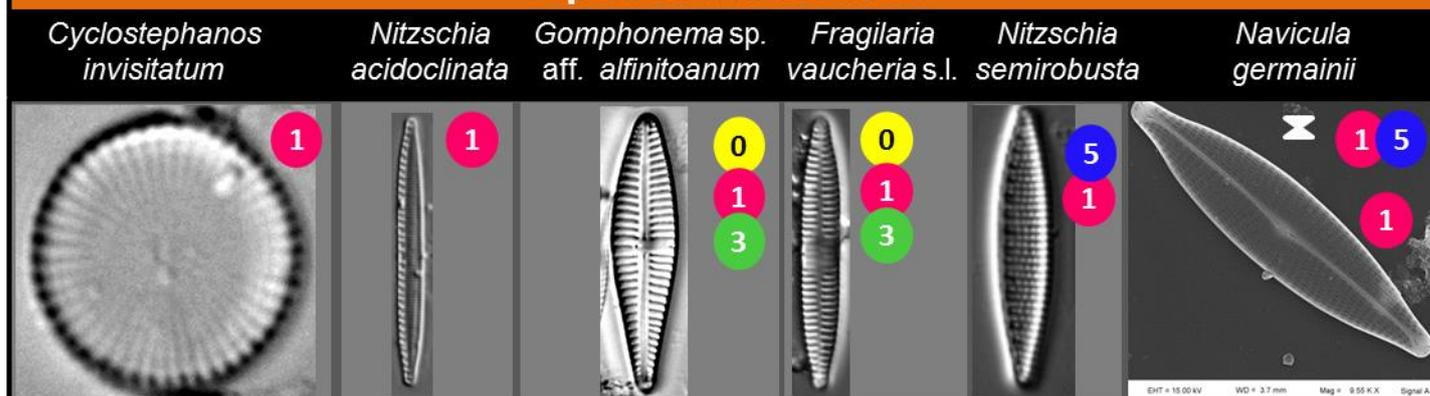
conformando un ensamble altamente resistente a la eutrofización, compuesto por especies similares a las que resultaron tolerantes en nuestros experimentos: *C. molestiformis*, *Mayamaea permitis* y *N. palea* (ésta especie fue abundante pero no identificada como tolerante en nuestro estudio). Por otro lado, *G. parvulum* y *N. germainii*, se asociaron a contaminación intermedia en el trabajo de Lobo *et al.* (2015), mientras que en nuestro trabajo *G. parvulum* fue identificada como tolerante (Figura 18).

*Nitzschia filiformis* resultó indicadora de concentraciones de glifosato de intermedias a altas (3+5+10) en primavera. Esta amplia asociación va en la misma línea de lo hallado por Gómez & Licursi (2001) en 164 arroyos de la Pampa argentina, donde *N. filiformis* se asoció a un amplio rango de condiciones, desde baja eutrofización a condiciones de alta eutrofización, con altas concentraciones de materia orgánica, amonio y nitritos (Figura 18).

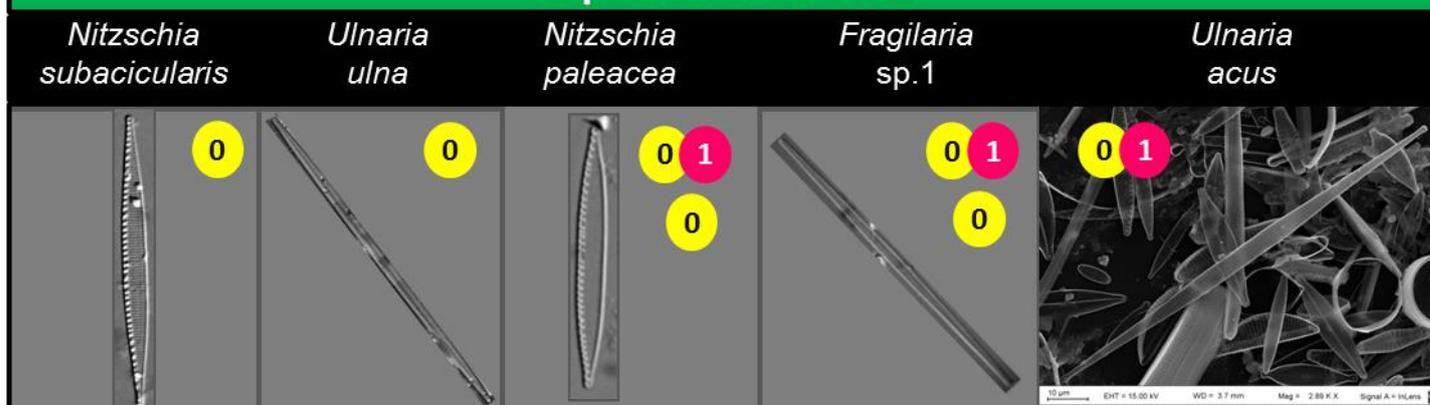
## Especies tolerantes



## Especies moderadas



## Especies sensibles



**Figura 18.** Clasificación de especies según su asociación a los tratamientos con distintas concentraciones de glifosato, construido según el análisis de especies indicadoras y el análisis de varianza (ANOVA). Los tratamientos o conjuntos de tratamientos a los que se asociaron las especies están indicados en círculos con los colores utilizados para cada tratamiento en los distintos gráficos del manuscrito. Las especies significativamente asociadas a un tratamiento en el D15 según los test de ANOVA, están marcadas con un símbolo blanco con forma a reloj de arena. Las **"Especies tolerantes"** están asociadas al tratamiento con 10 mg L<sup>-1</sup> o a la combinación de tratamientos 5 mg L<sup>-1</sup> + 10 mg L<sup>-1</sup> o 3 mg L<sup>-1</sup> + 5 mg L<sup>-1</sup> + 10 mg L<sup>-1</sup>). Las **"Especies moderadas"** están asociadas al tratamiento con 1 mg L<sup>-1</sup> o a la combinación de tratamientos sin adición + 1 mg L<sup>-1</sup> + 3 mg L<sup>-1</sup> o 1 mg L<sup>-1</sup> + 5 mg L<sup>-1</sup>). Las **"Especies sensibles"** están asociadas al tratamiento sin adición o a la combinación de tratamientos sin adición + 1 mg L<sup>-1</sup>.

*Gomphonema parvulum* ha sido clasificada como una especie S, es decir, con una tasa de crecimiento intermedia, adaptada a colonizar hábitats deteriorados (Kelly *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2008). En este estudio fue tolerante al HBG y se encontró en alta abundancia tanto en primavera como en invierno. En otros estudios, también ha sido reportada como tolerante a altas concentraciones de glifosato ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) en experimentos en mesocosmos eutróficos (Vera *et al.*, 2010), así como a la contaminación orgánica y por metales pesados (Lange-Bertalot, 1979; Morin *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2015). Asimismo, Wood (2017) la encontró sensible a la exposición a glifosato y a atrazina grado técnico (99% pureza), frente a su exposición a bajas concentraciones (i.e. entre  $50$  y  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) en experimentos a partir de muestras de un sistema lótico impactado de Australia (Barratta Creek) con previa exposición a herbicidas.

Por otro lado, *Nitzschia paleacea* fue reportada por Wood (2017) como una especie tolerante a la exposición a bajas concentraciones de glifosato grado técnico (i.e. hasta  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que resultó ser una especie sensible al HBG en nuestros experimentos (i.e  $5$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). *Ulnaria ulna* fue otra de las especies que resultaron sensibles al HBG, ha sido reportada como una especie de ambientes mesotróficos (Petters & Ector, 2017) y clasificada por Morin *et al.* (2008) como parte del grupo de especies C, es decir, con alta biomasa y baja tasa de crecimiento, característica de una comunidad en etapas de sucesión avanzada. Tanto *Ulnaria ulna* como

*Fragilaria* sp. 1, también sensible al HBG, tienen una gran capacidad de adhesión al sustrato (por tener campo poroso apical) lo que les permite establecerse sobre sustratos u otras diatomeas y son altamente competitivas frente a condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (Stevenson *et al.*, 1991; Biggs *et al.*, 1998). Las diatomeas estrategas C son capaces de crear estructuras altas por encima de la capa basal de taxa que previamente colonizaron el hábitat (i.e. especies de los grupos R y S) y por lo tanto tener ventajas competitivas por espacio y recursos como luz y nutrientes. Es interesante que los tratamientos de menor impacto, en nuestro estudio, hayan permitido el desarrollo de especies, cuya estrategia de crecimiento a su vez indican la presencia de una comunidad madura sin afección reciente por un estresor.

Mientras que algunas especies han sido ampliamente reportadas en estudios con contaminantes y su comportamiento ha sido consistente, otras especies requieren profundizar el conocimiento en su ecología antes de ser definidas como sensibles o como tolerantes en general. Asimismo, no es esperable que todas las comunidades, con distintas condiciones e historias de vida, reaccionen igual a la exposición de contaminantes, ya que el desarrollo de tolerancias a estresores naturales o antropogénicos tiene un costo asociado, de modo que la comunidad puede volverse más vulnerable a otros estresores ambientales (Clements & Rohr, 2009; Clements *et al.*, 2016; Tlili *et al.*, 2016). Es interesante que la comunidad perifítica de la

Laguna del Cisne, a pesar de tener un historial extenso de exposición a altas cargas de nutrientes (décadas), respondió a la exposición al HBG en nuestro acercamiento experimental, especialmente en invierno 2014 (previamente discutido).

## **5 Conclusiones**

- Las especies de diatomeas perifíticas identificadas fueron características de sistemas eutróficos y a su vez se detectaron especies tolerantes (*Sellaphora nigri*, *Craticula molestiformis*, *Craticula subminuscula*, cf. *Mayamaea permitis*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula erifuga*, *Nitzschia filiformis*) y especies sensibles (*Nitzschia subacicularis*, *Ulnaria ulna*, *Ulnaria acus*, *Nitzschia paleacea*, *Fragilaria* sp.1) a la exposición a un HBG, lo cual es potencialmente útil tanto para bioensayos de laboratorio como estudios de campo. Asimismo, se destaca el aporte a nivel metodológico de este trabajo en futuros bioensayos desarrollados con esta comunidad.
- La afección del HBG sobre la comunidad implicó una sustitución por especies tolerantes y de muy pequeño porte con estrategias de crecimiento reportadas en la bibliografía como R y S, con mayor tasa de crecimiento. Asimismo, el grupo de especies sensibles incluyó taxa identificados como C, que indican una comunidad que no ha sido recientemente afectada por estresores. La evidencia sugiere

una apertura de nicho, liberada por las especies sensible debido a su muerte o disminuida tasa de crecimiento, aprovechada por especies oportunistas con alta tasa de crecimiento.

- Este estudio es uno de los escasos trabajos que evalúan cambios a nivel de composición de especies en esta comunidad clave. Además, contribuye a la aplicación de las diatomeas como bioindicadoras de contaminación por un HBG en ecosistemas someros eutróficos, que en nuestro país se encuentran en escenarios de aumento debido a la agricultura intensiva en sus cuencas.

## **6 Perspectivas**

- Se sugieren líneas de investigación específicamente dirigidas a determinar los mecanismos fisiológicos actuantes detrás de los patrones su sustitución comunitaria observados. En este sentido, buscar definir el efecto fisiológico del HBG sobre las especies sensibles y tolerantes. Existen experiencias con biofilms en el estudio de la expresión del ADN ribosomal 18s, aproximación que aportaría a definir qué rutas metabólicas son afectadas por la exposición al HBG. De esta manera, se podría separar el efecto de distintos mecanismos concomitantes: los mecanismos de defensa a nivel fisiológico, el posible efecto refugio tamaño dependiente por parte de la matriz polisacárida y las distintas estrategias de crecimiento.

- Sería interesante incluir variables cuantitativas absolutas como la concentración de pigmentos y la abundancia absoluta de especies.
- Debido a que la comunidad proviene de condiciones eutróficas, podría suponerse que los efectos del HBG observados no deberían haber sido generados por un aumento en la concentración de nutrientes, sino por la toxicidad del HBG agregado. Sin embargo, esto debería ser abordado en detalle con el fin de separar tres aspectos: la toxicidad de los surfactantes, la toxicidad del principio activo y la afectación sólo debido a una disponibilidad aún mayor de nutrientes. Asimismo, sería interesante evaluar los efectos crónicos de exposición a bajas concentraciones y los posibles efectos teratogénicos sobre esta comunidad.
- Aportaría hacer un seguimiento exhaustivo de las concentraciones reales y la partición ambiental del glifosato a lo largo del tiempo experimental y estudiar su interacción con otros agroquímicos aplicados en la cuenca, así como los efectos emergentes de este conjunto de factores sobre la biota. Este acercamiento aportaría aún más realismo al análisis de las condiciones multifactoriales y estresores múltiples a las que se encuentran expuestos los organismos en la realidad productiva actual en nuestro país, la región y a nivel global.
- Finalmente, aportaría abordar el posible efecto sobre otros niveles tróficos. El efecto de HBGs sobre la calidad de la comunidad

perifítica como subsidio energético de otras comunidades (por ejemplo, macro y microinvertebrados ramoneadores) debería ser analizado en experimentos de mayor complejidad y duración que los realizados en esta tesis. Esto permitiría aproximarse aún más a determinar los efectos de los usos intensivos actuales en las cuencas sobre el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos de nuestro país.

## 7 Anexo

**Tabla A.** Concentraciones de glifosato registradas o esperadas en sistemas naturales. ND corresponde a información que no se reportó. Los trabajos fueron ordenados de menor a mayor según la concentración de glifosato registrada o esperada, dónde se indican promedios (prom), máximos (max) y medianas (med).

Referencia	País de muestreo	Año de muestreo	Concentración de glifosato (mg L <sup>-1</sup> )	Tipo de sistema muestreado
Okada <i>et al.</i> , 2018	Argentina	2015 - 2016	8.2 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Arroyo
Berman <i>et al.</i> , 2018	Argentina	2015	2.11 x 10 <sup>-3</sup> (prom) 4.52 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Lagos
Bonanseña <i>et al.</i> , 2017	Argentina	2010 - 2011	1.25 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Río
Ronco <i>et al.</i> , 2016	Argentina Paraguay Bolivia Uruguay Brasil	2016	0.06 x 10 <sup>-3</sup> (prom)	Lótico (Río Paraná)
Battaglin <i>et al.</i> , 2014	USA	2001 - 2010	0.03 x 10 <sup>-3</sup> (med) 0.073 (max)	Arroyos
			0.03 x 10 <sup>-3</sup> (med) 3.08 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Grandes ríos
			<0.02 x 10 <sup>-3</sup> (med) 0.30 (max)	Lagos, lagunas y humedales
Aparicio <i>et al.</i> , 2013	Argentina	2012	7.6 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Arroyos
Coupe <i>et al.</i> , 2011	USA	2004	430 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Río
Struger <i>et al.</i> , 2008	USA	2004-2005	40.80 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Ríos, arroyos, humedales
Battaglin <i>et al.</i> , 2005	USA	2002	8.7 x 10 <sup>-3</sup> (max)	Lótico
Ludvigsen & Lode, 2001	Noruega	1995-1999	0.93 x 10 <sup>-3</sup> (max) 0.13 x 10 <sup>-3</sup> (prom)	Agua superficial
Peruzzo <i>et al.</i> , 2008	Argentina	2008	0.10; 0.70	Lótico
Berkovic <i>et al.</i> , 2006	Argentina	ND	1.8; 10.9	Lótico (arroyo el Sauce)
Humphries <i>et al.</i> , 2005	Canadá	ND	8 (max)	Aguas superficiales
Thompson <i>et al.</i> , 2004	Canadá	1999-2001	1.95 (max)	Humedales
Peruzzo <i>et al.</i> , 2003	Argentina	-	2.70; 5.90 (CME)	Escorrentía

			1.51 (CME)	Cuerpo de agua
Edwards <i>et al.</i> , 1980	USA	ND	6.9	Agua de escorrentía

**Tabla B** Concentraciones de glifosato a la que fueron expuestos distintas especies de algas, formulación del herbicida y tiempo de exposición. ND corresponde a información que no se encontró disponible.

Referencia	Sujeto experimental	Concentraciones en experimentos (mg L <sup>-1</sup> i.a.)	Formulación	Duración experimental
Vera <i>et al.</i> , 2014	Perifiton	3	Glifosato puro Atanor <sup>®</sup>	2 (días)
Vera <i>et al.</i> , 2012	Perifiton	3.5	Atanor <sup>®</sup>	21 (días)
Vera <i>et al.</i> , 2010	Perifiton	8	Roundup <sup>®</sup>	42 (días)
Vera tesis MSc, 2011	Perifiton	6 ; 12	Roundup <sup>®</sup>	11 (días)
Pesce <i>et al.</i> , 2009	Perifiton	10 x 10 <sup>-3</sup>	Glifosato puro (?)	14 (días)
Austin <i>et al.</i> , 1991	Perifiton	1 x 10 <sup>-3</sup> a 0.3	Vision <sup>®</sup>	3 (meses)
Wood tesis MSc, 2017	Perifiton	0.05; 0.2; 0.5	Glifosato puro	2 (días)
Goldsborough & Brown, 1988	Perifiton	0.89 a 1800	Roundup <sup>®</sup>	4 (horas)
Pérez <i>et al.</i> , 2007	Fitoplancton y Perifiton	6 y 12	Roundup <sup>®</sup>	11 (días)
Smedbol <i>et al.</i> , 2018	Fitoplancton	10 x 10 <sup>-3</sup> a 1	Factor 540 <sup>®</sup>	96 (horas)
Schaffer & Sebetich, 2004	Fitoplancton	0.125; 1.25; 12.5	Rodeo <sup>®</sup>	7 (horas)
Smedbol <i>et al.</i> , 2017	Cultivo de 6 algas y 3 especies de cianobacterias	10 x 10 <sup>-3</sup> a 1	Factor 540 <sup>®</sup>	48 (horas)
Blanck <i>et al.</i> , 1984	Cultivos de 13 especies (Clorofitas, Cianofitas, Xantofitas, Carofita)	2.8 a 23	Glifosato puro (?)	14 o más (días)
Tsui & Chu, 2003	<i>Selenastrum capricornutum</i> (C. Clorofita) <i>Skeletonema costatum</i> (C. Diatomea)	1 a 100 (AE)*	Roundup <sup>®</sup>  Sal isopropilamina de glifosato  Glifosato puro	96 (horas)
Zhu <i>et al.</i> , 2016	<i>Scenedesmus obliquus</i> (C. Clorofita)	0 a 2.0	Glifosato puro	9? (días)

Reno <i>et al.</i> , 2014	<i>Chlorella vulgaris</i> <b>(C. Clorofita)</b>	0.5 a 16	Eskoba <sup>®</sup>	48 (horas)
Saenz & Di Marzio, 2009	<i>Scenedesmus acutus</i> (A)	1 a 97 (A)	Glifosato puro	96 (horas)
	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (A)	0.77 a 100 (B)		
	<i>Chlorella vulgaris</i> (B)			
	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (B) <b>(C. Clorofitas)</b>	0.3 a 41.4	Roundup <sup>®</sup>	
Vedrell <i>et al.</i> , 2009	<i>Scenedesmus acutus</i>	0.1 a 100	Glifosato puro	72 (horas)
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>			
	<i>Chlorella vulgaris</i>			
	<i>Chlorella saccharophila</i> <b>(C. Clorofitas)</b>			
Ma <i>et al.</i> , 2001	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <b>(C. Clorofita)</b>	3.53	Glifosato puro (?)	96 (horas)
Wong, 2000	<i>Scenedesmus quadricauda</i> <b>(C. Clorofita)</b>	0.02; 0.2; 2; 20; 200	Glifosato puro (?)	ND
Gardner <i>et al.</i> , 1997	<i>Ankistrodesmus</i> sp. <b>(C. Clorofita)</b>	5 x10 <sup>-3</sup> ; 20 x10 <sup>-3</sup> ; 80 x10 <sup>-3</sup> ; 0.32; 1.28; 5.12	Rodeo <sup>®</sup>	10 (días)

\*C: Cultivo, \*\*EA: Equivalente Ácido

**Tabla C.** Datos disponibles sobre importación histórica de glifosato al país. Para cada año se reporta: las formulaciones del ingrediente activo (glifosato), la importación del ingrediente activo (i.a.) en toneladas, el porcentaje de ingrediente activo importado según su formulación y la cantidad de marcas importadas (dónde ND significa No Disponible).

Año	Formulación de glifosato <sup>1</sup>	Importación de i.a. (toneladas)	Importación de i.a. según formulación (%)	Cantidad de marcas importadas
2002	Glifosato	1494	100	ND
2004	Glifosato	4197	100	ND
2005	Glifosato, sal isopropilamina	2830	74	ND
	Glifosato, sal amónica	622	16	ND
	Glifosato, sal potásica	391	10	ND
2006	Glifosato, sal isopropilamina	1228	65	ND
	Glifosato, sal potásica	301	16	ND
	Glifosato, sal amónica	368	19	ND
2007	Glifosato, sal isopropilamina	1596	59	ND
	Glifosato, sal amónica	655	24	ND
	Glifosato, sal potásica	465	17	ND
2008	Glifosato, sal isopropilamina	3311	65	ND
	Glifosato, sal potásica	1008	20	ND
	Glifosato, sal amónica	801	15	ND
2009	Glifosato, sal isopropilamina	1617	64	22 <sup>2</sup>
	Glifosato, sal amónica	582	23	9
	Glifosato, sal potásica	303	13	3
2010	Glifosato, sal isopropilamina	4673	52	28 <sup>3</sup>
	Glifosato, sal potásica	1967	22	5
	Glifosato, sal amónica	2395	26	13
	Glifosato, sal dimetilamina	ND	-	ND
2011	Glifosato, sal potásica	2467	26	6
	Glifosato, sal amónica	2428	26	13
	Glifosato, sal isopropilamina	2756	29	20 <sup>4</sup>
	Glifosato, sal dimetilamina	1821	19	3
2012	Glifosato, sal potásica	2451	24	
	Glifosato, sal amónica	2696	28	
	Glifosato, sal dimetilamina	2316	24	
	Glifosato, sal isopropilamina	2091	22	ND
	Glifosato, sal monoamínica	26	1	
	Glifosato, sal potásica	25	1	
	Glifosato ácido			
2013	Glifosato, sal amónica	3303	28	
	Glifosato, sal potásica	2901	25	
	Glifosato, sal dimetilamina	2533	22	
	Glifosato, sal isopropilamina	2295	20	ND
	Glifosato, sal amónica	408	3	
	Glifosato, sal potásica	178	1	
	Glifosato ácido			
2014	Glifosato, sal monoamínica	9	< 1	
	Glifosato, sal amónica	3297	22	
	Glifosato, sal dimetilamina	3014	20	
	Glifosato, sal potásica	3275	22	ND
	Glifosato, sal isopropilamina	2431	16	
	Glifosato	1070	7	
	Glifosato, sal amónica	473	3	

	Glifosato, sal isopropilamina	472	3	
	Glifosato ácido	506	3	
	Glifosato, sal monoamónica	102	< 1	
	Glifosato, sal potásica	74	< 1	
	Glifosato potásico del N-fosfonometil glicina	36	< 1	
2015	Glifosato, sal dimetilamina	2369	27	ND
	Glifosato, sal amónica	2420	27	
	Glifosato, sal potásica	2758	31	
	Glifosato, sal isopropilamina	1152	13	
	Glifosato + Glifosato, sal isopropilamina	161	2	
	Glifosato, sal isopropilamina + Glifosato, sal potásica	50	< 1	
2016	Glifosato, sal amónica	3424	38	ND
	Glifosato, sal dimetilamina	2895	32	
	Glifosato, sal potásica	1079	12	
	Glifosato, sal isopropilamina	1669	18	

1. La mayoría de las formulaciones son sales donde sólo difieren los cationes.
2. En el 2009 Glifotec fue la marca más importada para la formulación Glifosato, sal isopropilamina.
3. En el 2010 Glifotec ocupó el segundo lugar en cantidad de importación para la formulación Glifosato, sal isopropilamina.
4. En el 2010 Glifotec ocupó el cuarto lugar en cantidad de importación para la formulación Glifosato, sal isopropilamina.

**Tabla D.** Porcentaje y área de cobertura para cada uso del suelo en el año 2001 y 2015, para la cuenca de la Laguna del Cisne.

Categorías de clasificación	Área de cobertura (ha)	
	2001	2015
Agua	322 (6,3%)	227 (4,4%)
Cultivos	570 (11,1%)	915 (17,9%)
Forestación	376 (7,4%)	484 (9,5%)
Humedal	176 (3,4%)	166 (3,2%)
Zona urbana	65 (1,3%)	75 (1,5%)
Otros	3604 (70,5%)	3246 (63,5%)

**Tabla E.** Concentraciones de nutrientes registrado para la Laguna del Cisne durante la puesta y colecta de los sustratos de colonización en invierno 2014 y primavera 2015.

Fecha de muestreo	Nutrientes ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	Disueltos	Totales
04-08-14 (invierno)	<b>PO<sub>4</sub></b> : 295.5 <b>NH<sub>4</sub></b> : 20.3	<b>PT</b> : 315.4
18-08-14 (invierno)	<b>PO<sub>4</sub></b> : 313.3 <b>NO<sub>3</sub></b> : 282 <b>NH<sub>4</sub></b> : 28.1	<b>PT</b> : 365.1
28-09-15 (primavera)	<b>PO<sub>4</sub></b> : 345.8 <b>NO<sub>3</sub></b> : 444.9 <b>NH<sub>4</sub></b> : 22.2	-
13-10-15 (primavera)	<b>PO<sub>4</sub></b> : 380.1 <b>NO<sub>3</sub></b> : 434.4 <b>NH<sub>4</sub></b> : 13.36	-

**Tabla F.** Recopilación histórica de datos publicados de concentraciones de nutrientes en la Laguna del Cisne. Los datos en los trabajos consultados correspondieron a promedios (cita marcada con un asterisco\*) y a datos puntuales (citas no marcadas).

Año de muestreo Fuente	PT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	PTD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	PO <sub>4</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	NT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	NTD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	NO <sub>3</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	NH <sub>4</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>1987 - 1989</b> Mazzeo, 1995*	102		67			172	49
<b>2003</b> Kruk, 2006	413		329	1048		209	37
<b>2006</b> Gelós, 2010*	611			1062			
<b>2009</b> Goyenola, 2011	650			294			
<b>2015</b> Datos propios 2015			346			445	22
<b>2015</b> Datos propios 2015			380			434	13
<b>2014</b> Datos propios 2014	315		296				20
<b>2014</b> Datos propios 2014	365		313			282	28
<b>2016</b> Goyenola <i>et al.</i> , 2017*	443	428	423	986	904	299	45

**Tabla G.** Lista de especies de diatomeas identificadas para la Laguna del Cisne.

<i>Achnanthes</i> sp. 1	<i>Lemnicola hungarica</i>
<i>Amphora veneta</i>	<i>Luticola hungarica</i>
<i>Aulacoseira granulata</i>	<i>Melosira varians</i>
<i>Aulacoseira italica</i> var. <i>tenuissima</i>	<i>Navicula cryptocephala</i>
<i>Bacillaria paxillifer</i>	<i>Navicula germainii</i>
<i>Caloneis</i> sp. 1	<i>Navicula gregaria</i>
<i>Carpantograma</i> sp. 1	<i>Navicula rostellata</i>
cf. <i>Mayamaea permitis</i>	<i>Neidium bisulcatum</i>
<i>Cocconeis placentula</i>	<i>Nitzschia acicularis</i>
<i>Craticula halophila</i>	<i>Nitzschia acicularoides</i>
<i>Craticula halophilioides</i>	<i>Nitzschia acus</i>
<i>Craticula molestiformis</i>	<i>Nitzschia constricta</i>
<i>Craticula</i> sp.1	<i>Nitzschia denticula</i>
<i>Craticula subminuscula</i>	<i>Nitzschia filiformis</i>
<i>Ctenophora pulchella</i>	<i>Nitzschia gracilis</i>
<i>Cyclostephanos</i> sp. 1	<i>Nitzschia hungarica</i>
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	<i>Nitzschia intermedia</i>
<i>Cymbella charrua</i>	<i>Nitzschia nanana</i>
<i>Diadesmis confervacea</i>	<i>Nitzschia palea</i>
<i>Diploneis</i> sp. 1	<i>Nitzschia paleacea</i>
<i>Encyonema sileciacum</i>	<i>Nitzschia rostellata</i>
<i>Epithemia</i> sp. 1	<i>Nitzschia salinarum</i>
<i>Eunotia bilunaris</i>	<i>Nitzschia semirobusta</i>
<i>Eunotia didyma</i>	<i>Nitzschia subacicularis</i>
<i>Eunotia major</i>	<i>Nitzschia linearis</i>
<i>Eunotia monodon</i>	<i>Nitzschia sigma</i>
<i>Fragilaria capucina</i> var. <i>vaucheriae</i>	<i>Nitzschia dissipata</i>
<i>Fragilaria acus</i>	<i>Pinnularia</i> spp.
<i>Fragilaria capucina</i> <i>sensu lato</i>	<i>Placoneis</i> spp.
<i>Fragilaria</i> sp. 1	<i>Planothidium</i>
	<i>biporum</i>
	<i>Planothidium</i>
	<i>lanceolatum</i>
	<i>Rhopalodia</i> sp. 1
<i>Geissleria</i> sp. 1	<i>Sellaphora nigri</i>
<i>Gomphonema augur</i>	<i>Sellaphora pupula</i>
<i>Gomphonema</i> cf. <i>affine</i>	<i>Sellaphora sauguerresi</i>
<i>Gomphonema</i> cf. <i>innocens</i>	<i>Surirella angusta</i>
<i>Gomphonema parvulum</i>	

*Gomphonema pseudoaugur*  
*Grunowinitzschia* sp. 1  
*Gyrosigma obtusatum*  
*Hippodonta hungarica*

*Surirella tenera*  
*Triblionella acuminata*  
*Ulna ulnaria*

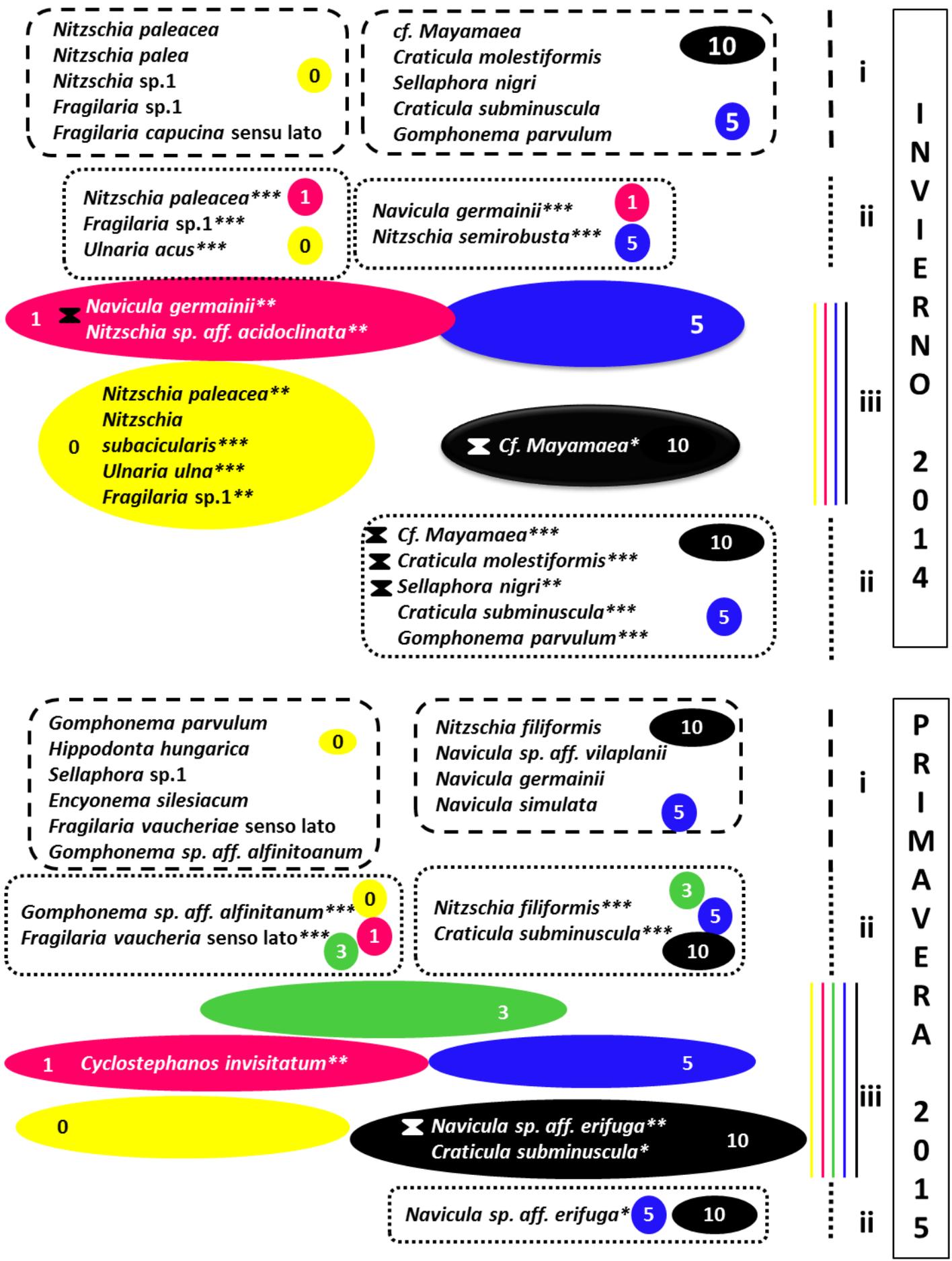
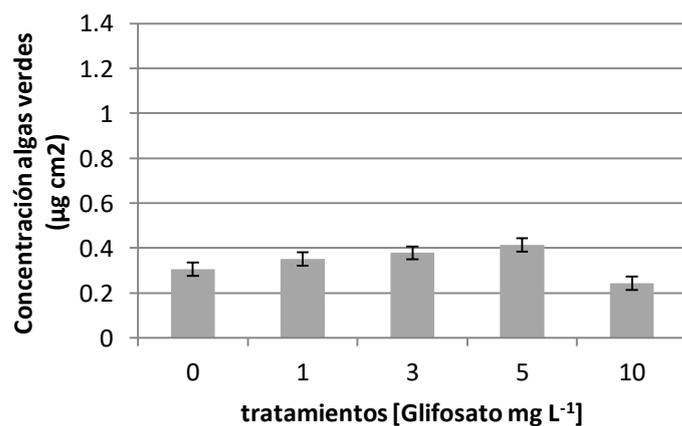
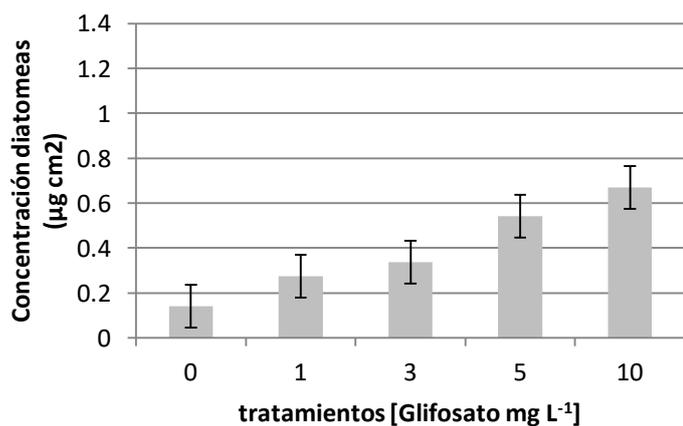
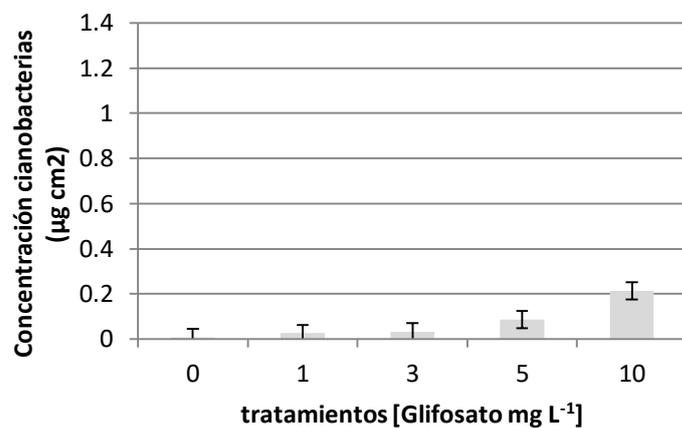
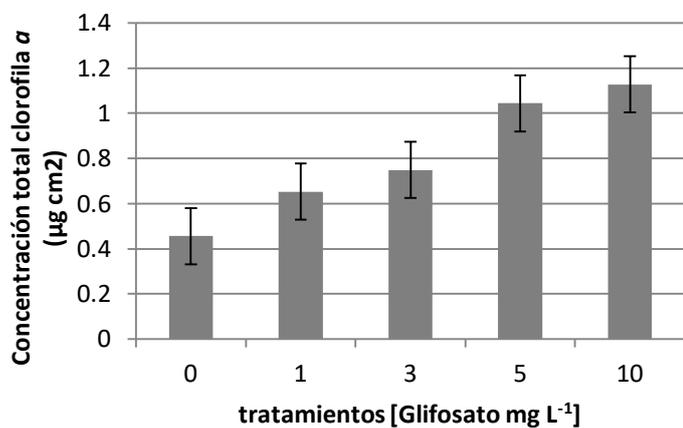


Figura 1. Resumen de especies asociadas a los distintos tratamientos en el experimento de invierno 2014 y de primavera 2015. i) Especies con tendencias a ser sensibles o tolerantes según PCA. ii) asociación de especies, según análisis de especies indicadoras, a un conjunto de tratamientos. iii) especies asociadas a un único tratamiento, según análisis de especies indicadoras.



**Figura 2.** Promedio de medidas de concentración de clorofila a ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en las paredes de las unidades experimentales de los distintos tratamientos en primavera 2015. Al finalizar el experimento (D15) se realizaron cinco medidas para cada réplicas de cada tratamiento (*Bentho Torch*).

## 8 **Bibliografía**

- Alexandratos, N. and J. Bruinsma. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. ESA Working paper No. 12-03. Roma, FAO.
- Algaebase.org. (2015). *Algaebase: Listing the World's Algae* [Internet]. Extraído de: <http://www.algaebase.org> [Acceso 20 de febrero 2018].
- Algarte, V. M. (2009). *Avaliação dos efeitos do dessecamento sobre a comunidade de algas perifíticas na planície de inundação do alto rio Paraná*. Tesis de Maestría, Universidad Estatal de Maringá.
- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Agustina Etchegoyen, M., & 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, p.89-96.
- Altieri, M., & Pengue, W. (2006). GM soybean: Latin America's new colonizer. *Seedling*, 1, p.13-17.
- Anderson, M. J., & Walsh, D. C. I. (2013). Permanova, Anosim, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing?. *Ecological monographs*, 83(4), p.557-574.
- 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), p.1866-1873.
- American Public Health Association, APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington DC, USA. 21st edition. Washington, DC, APHA.
- Aubriot, L. E., Delbene, L., Haakonsson, S., Somma, A., Hirsch, F., & Bonilla, S. (2018). Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: influencia de la intensificación productiva y perspectivas. *Innotec*, (14), p.07-16.
- Austin, 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), p.29-35.
- Avila-Vazquez, M., Difilippo, F. S., Lean, B. Mac, Maturano, E., & Etchegoyen, A. (2018). Environmental Exposure to Glyphosate and Reproductive Health Impacts in Agricultural Population of Argentina. *Journal of Environmental Protection*, 09(03), p.241-253.
- Bachand, M., Pellerin, S., Côté, S.D., Moretti, M., Cáceres, M.D., Brousseau, P.M., Cloutier, C., Hébert, C., Cardinal, É., & Martin, J.L. (2014). Species indicators of ecosystem recovery after reducing large herbivore density: comparing taxa and testing species combinations. *Ecological Indicators*, 38, p.12-19.
- Bae, M. J., & Park, Y. S. (2014). Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review. *Science of the Total Environment*, 466, p.635-649.

- Battaglin, W. A., Kolpin, D. W., Scribner, E. A., Kuivila, K. M., & Sandstrom, M. W. (2005). Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams, 2002. *Journal of the American Water Resources Association*, 41(2), p.323-332.
- Battaglin, W. A., Meyer, M. T., Kuivila, K. M., & Dietze, J. E. (2014). Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*, 50(2), p.275-290.
- BBC. (2018a). *Monsanto ordered to pay \$289m damages in Roundup cancer trial* [Internet], BBC News. Extraído de: <<https://www.bbc.com/news/world-us-canada-45152546>> [Acceso el 25 de Agosto de 2018].
- BBC. (2018b). *Weedkiller glyphosate "doesn't cause cancer" - Bayer* [Internet], BBC News. Extraído de: <<https://www.bbc.com/news/world-us-canada-45154362>> [Acceso el 25 de Agosto de 2018].
- Benachour, N., & Séralini, G.E. (2009). Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1), p.97-105.
- Benítez-Leite, S., Macchi, M.L., Acosta, M. (2009). Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 48(4), p.204-217.
- Bennett, E. M., Carpenter, S. R., & Caraco, N. F. (2001). Human Impact on Erodable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective. Increasing accumulation of phosphorus in soil threatens rivers, lakes, and coastal oceans with eutrophication. *BioScience*, 51(3), p.227-234.
- Berkovic, A., Marino, D., Lespade, P., & Ronco, A. (2006). Análisis de pesticidas asociados al cultivo de soja en aguas y sedimentos de un sector productivo de la pampa ondulada. En: *Anales XXVI Congreso Argentino de Química, 1995, San Luis*. San Luis, pp.8-053.
- Berman, M.C., Marino, D.J.G., Quiroga, M.V., & Zagarese, H. (2018). Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere*, 200, p.513-522.
- Biggs, B.J., Stevenson, R.J., & Lowe, R.L. (1998). A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Archiv fur Hydrobiologie*, 143, p.21-56.
- Blanck, H. (2002). A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(5), p.1003-1034.
- Blanck, H., Wallin, G., & Wängberg, S. Å. (1984). Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8(4), p.339-351.
- Blanck, H., & Wängberg, S.Å. (1988). Induced Community Tolerance in

- Marine Periphyton established under Arsenate Stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(10), p.1816-1819.
- Blenckner, T. (2005). A conceptual model of climate-related effects on lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 533(1-3), p.1-14.
- Blum, A., Narbondo, I., & Oyhantcabal, G. (2008). ¿Dónde nos lleva el camino de la soja? Sojización a la uruguaya: principales impactos socioambientales. *RAP-AL Uruguay*, p.1-42.
- Bonan, G. B. (2008). Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science*, 320(5882), p.1444-9.
- Bonanseal, R., Filippi, I., Wunderlin, D., Marino, D., & Amé, M. (2017). The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment. *Toxics*, 6(1), p.1-3.
- Bonilla, S. y Meerhoff, M., (2014). *Informe CASAS: Calidad de agua de sistemas acuáticos superficiales. Estado actual de la calidad del agua de sistemas acuáticos superficiales en Uruguay y recomendaciones, con énfasis en la cuenca del Río Santa Lucía*. Montevideo: CURE-Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (Informe inédito). pp.22.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., Pírez, M., Piccini, C., Martínez de la Escalera, G., Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F., Aubriot, L. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *Innotec*, (10 ene-Dic), p.9-22.
- Bouwman, A. F., Beusen, A. H. W., & Billen, G. (2009). Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970-2050. *Global Biogeochemical Cycles*, 23(4).
- Busse, M. D., Ratcliff, A. W., Shestak, C. J., & Powers, R. F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), p.1777-1789.
- Cáceres, M. D. (2013). How to use the indicpecies package (versión 1.7.1). Extraído de: <<ftp://128.61.111.11/pub/CRAN/web/packages/indicpecies/vignettes/indicpeciesTutorial.pdf>> [Acceso el Julio de 2015].
- Cáceres, M. D., & Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, 90(12), p.3566-3574.
- Carlisle, S. M., & Trevors, J. T. (1988). Glyphosate in the environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 39(3-4), p.409-420.
- Camacho, A., & Mejía, D. (2017). The health consequences of aerial spraying illicit crops: The case of Colombia. *Journal of Health Economics*, 54, p.147-160.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, CCME. (2012). Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Glyphosate. En: CCME. *Canadian environmental quality guidelines*,

- Canadian Council of Ministers of the Environment. Winnipeg, CCME, p.1-10.
- Carpenter, S.R., Mooney, H.A., Agard, J., Capistrano, D., Defries, R.S., Diaz, S., Dietz, T., Duraiappah, A.K., Oteng-Yeboah, A., Pereira, H.M., Perrings, C., Reid, W.V., Sarukhan, J., Scholes, R.J., & Whyte, A. (2009). Science for managing ecosystem services: beyond the millennium ecosystem assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, p.1305-1312.
- Carpenter, S. R., Stanley, E.H., & Vander Zanden, M.J. (2011). State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, Chemical, and Biological Changes. *Annual Review of Environment and Resources*, 36(1), p.75-99.
- Chalar, G., Delbene, L., González-Bergonzoni, I., & Arocena, R. (2013). Fish assemblage changes along a trophic gradient induced by agricultural activities (Santa Lucía, Uruguay). *Ecological indicators*, 24, p.582-588.
- Clarke, K.R., Somerfield, P.J., & Chapman, M.G. (2006). On resemblance measures for ecological studies, including taxonomic dissimilarities and a zero-adjusted Bray–Curtis coefficient for denuded assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 330(1), p.55-80.
- Clements, W.H., Kashian, D.R., Kiffney, P.M., & Zuellig, R.E. (2016). Perspectives on the context-dependency of stream community responses to contaminants. *Freshwater Biology*, 61(12), p.2162-2170.
- Clements, W.H., & Rohr, J.R. (2009). Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(9), p.1789-1800.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., & Wiegand, C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157(1), p.57-63.
- Coupe, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D., & Gregoire, C. (2011). Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science*, 68(1), p.16-30.
- Cox, E.J. (2011). Morphology, cell wall, cytology, ultrastructure and morphogenetic studies. En: Seckbach, J., ed., Kociolek, P., ed. *The diatom world*. Dordrecht, Springer, p.21-45.
- Cuhra, M., Traavik, T., & Bøhn, T. (2013). Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(2), p.251-262.
- Dale, V.H., & Polasky, S. (2007). Measures of the effects of agricultural practices on ecosystem services. *Ecological Economics*, 64(2), p.286-296.

- Dallegrave, E., Mantese, F.D., Coelho, R.S., Pereira, J.D., Dalsenter, P.R., & Langeloh, A. (2003). The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. *Toxicology letters*, 142(1-2), p.45-52.
- Dávila, M. (2012). La política sobre uso de agroquímicos en Argentina y Uruguay. En: *VII Jornadas Interdisciplinarias de Estudios Agrarios y Agroindustriales, Facultad de Ciencias Económicas, Universidad de Buenos Aires, 1-4 de noviembre de 2011*.
- Dayner, D., & Johansen, J. (1991). Observations on the algal flora of Seneca Cavern, Seneca County, Ohio. *The Ohio Journal of Science*, 91(3), p.118-121.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., & Pinelli, E. (2008). Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquatic Toxicology*, 88(1), p.88-94.
- 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), p.11-17.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., & Pinelli, E. (2010). Effects of pesticides on freshwater diatoms. En: De Voogt, P., ed. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Nueva York, Springer, p.87-103.
- Delgado, C., & Pardo, I. (2015). Comparison of benthic diatoms from Mediterranean and Atlantic Spanish streams: Community changes in relation to environmental factors. *Aquatic Botany*, 120(PB), p.304-314.
- DeNicola, D. M. (1996). Periphyton responses to temperature at different ecological levels. En: Stevenson, R.J., ed., Bothwell M. L., ed. & Lowe R. I., ed. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. San Diego, Academic Press, p.149-181.
- Dirección General de Servicios Agrícolas, DGSA. (2016). *Importaciones fitosanitarias 2002-2016* [Internet], Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. Extraído de: <<http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/direccion-general-de-servicios-agricolas/tramites-y-servicios/servicios/datos>> [Acceso el 30 de Abril 2015].
- Dick, R. E., & Quinn, J. P. (1995). Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. *FEMS Microbiology Letters*, 134(2-3), p.177-182.
- Dirección de Estadística Agropecuaria, DIEA. (2016). *Anuario Estadístico de DIEA 2016* [Internet], Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. Extraído de: <<http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>> [Acceso el 30 de Abril 2015].
- Dill, G.M., CaJacob, C.A., & Padgett, S.R. (2008). Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Management*

- Science*, 64(4), p.326-331.
- Do Carmo Langiano, V., & Martinez, C.B. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(2), p.222-231.
- Domitrovic, Y.Z., Neiff, J.J., & Vallejos, S.V. (2013). Factores que regulan la distribución y abundancia del perifíton en ambientes lenticos. *Ecología do perifíton*. San Carlos, Rima, p.103-130.
- Druart, C., Millet, M., Scheifler, R., Delhomme, O., & de Vaufleury, A. (2011). Glyphosate and glufosinate-based herbicides: Fate in soil, transfer to, and effects on land snails. *Journal of Soils and Sediments*, 11(8), p.1373-1384.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Sullivan, C. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), p.163-182.
- Dufrêne, M., & Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67(3), p.345-366.
- Edwards, W.M., Triplett, G.B., & Kramer, R.M. (1980). A Watershed Study of Glyphosate Transport in Runoff. *Journal of Environment Quality*, 9(4), p.661-665.
- European Food Safety Authority, EFSA. (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 13(11), p.4302.
- Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., Márquez, A., Errico, E., Segura, A. M., Heinzen, H. & Pérez-Parada, A. (2018). Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. *Science of the total environment*, 631, p.169-179.
- Espectador. (2013). *OSE: agua potable en zona de Canelones amenazada por soja* [Internet], Semanario Alternativas. Extraído de: <<http://www.espectador.com/noticias/260602/ose-agua-potable-en-zona-de-canelones-amenazada-por-soja>> [Acceso el 20 de mayo de 2016].
- Falasco, E., Bona, F., Badino, G., Hoffmann, L., & Ector, L. (2009). Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*, 623(1), p.1-35.
- FAO, MVOTMA, & DINOT. (2015). *Atlas de Cobertura del Suelo del Uruguay. Cobertura del Suelo y Detección de Cambios, 2000-2011*. Uruguay, Mosca, pp.54.
- 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), p.1110-1118.
- Fernandes, V. O. (2005). Perifíton: conceitos e aplicações da limnologia à

- engenharia. En: Roland, F., ed., Cesar, D., ed. & Marinho, M., ed. *Lições de limnologia*. San Carlos, Rima Editora, p.351-370.
- Ferragut, C. & de Campos Bicudo, D. (2010). Periphytic algal community adaptive strategies in N and P enriched experiments in a tropical oligotrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 646(1), p.295-309.
- Fiorino, E., Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Svobodova, Z., & Faggio, C. (2018). Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(9), p.8542-8549.
- Foley, J.A., Defries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Snyder, P.K. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), p.570-574.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Zaks, D.P.M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), p.337-342.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (2009). *Food Insecurity in the World: Economic crises-impacts and lessons learned*. Roma, FAO, pp.5.
- 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), p.443-456.
- Fortes, C., Mastroeni, S., Segatto, M., Hohmann, C., Miligi, L., Bakos, L., & Bonamigo, R. (2016). Occupational Exposure to Pesticides with Occupational Sun Exposure Increases the Risk for Cutaneous Melanoma. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 58(4), p.370-375.
- Gardner, S.C., Grue, C.E., Grassley, J.M., Lenz, L.A., Lindenauer, J.M., & Seeley, M.E. (1997). Single species algal (*Ankistrodesmus*) toxicity tests with Rodeop and Garlonp 3A. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(3), p.492-499.
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C., & Séralini, G.E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262(3), p.184-91.
- Geiszinger, A., Bonnineau, C., Faggiano, L., Guasch, H., López-Doval, J.C., Proia, L., Sabater, S. (2009). The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(5), p.619-626.
- Gelós, M., Teixeira-de Mello, F., Goyenola, G., Iglesias, C., Fosalba, C., García-Rodríguez, F., Pacheco, J.P., García S., Meerhoff, M. (2010). Seasonal and diel changes in fish activity and potential cascading effects in subtropical shallow lakes with different water transparency. *Hydrobiologia*, 646(1), p.173-185.
- Giesy, J.P., Dobson, S., & Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 167, p. 35-120.

- Goldsborough, L.G., & Brown, D.J. (1988). Effect of glyphosate (Roundup formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), p.253-260.
- Goldsborough, L.G., & Brown, D.J. (1993). Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(7), p.1139-1147.
- Gómez, N., & Licursi, M. (2001). The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology*, 35(2), p.173-181.
- Goyenola, G., Acevedo, S., Machado, I. & Mazzeo, N., (2011). Diagnóstico del Estado Ambiental de los Sistemas Acuáticos Superficiales del Departamento de Canelones. III: Laguna del Cisne. En: Goyenola, G., ed. *Informe Desarrollo de Línea de Base sobre Calidad de Agua 2008-2009. Plan Estratégico Departamental de Calidad de Agua (PEDCA)*. Comuna Canaria; Facultad de Ciencias; Asociación Civil Investigación y Desarrollo. Canelones, pp.33.
- Goyenola, G., Meerhoff, M., Teixeira-de Mello, F., González-Bergonzoni, I., Graeber, D., Fosalba, C., Fosalba C., Vidal N., Mazzeo N., Ovesen N. B., Jeppesen E. & Kronvang, B. (2015). Monitoring strategies of stream phosphorus under contrasting climate-driven flow regimes. *Hydrology and Earth System Sciences*, 19(10), p.4099-4111.
- Goyenola, G., Vidal, N., Fosalba, C., Corrales, N., Olsson, D., Levrini, P., (2017). Laguna del Cisne. Informe de las Campañas de Monitoreo. Setiembre 2016/Marzo 2017. CURE-UDELAR/Intendencia de Canelones, Salinas, pp.13.
- Griffero, L., Gomes, G., Berazategui, M., Fosalba, C., Teixeira de Mello, F.T., Rezende, C.E., Bila, D.M., & Gacía-Alonso, J. (2018). Estrogenicity and cytotoxicity of sediments and water from the drinkwater source-basin of Montevideo city, Uruguay. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 13(1), p.15-22.
- Grime, J.P. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist*, 111, p.1169-1194.
- Gutierrez, M.F., Battauz, Y., & Caisso, B. (2017). Disruption of the hatching dynamics of zooplankton egg banks due to glyphosate application. *Chemosphere*, 171, p.644-653.
- Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet. Oncology*, 16(5), p.490-491.
- Hill, W. (1996). Effect of light. En: Stevenson, R. J., ed., Bothwell, M.L., ed., & Lowe R.L., ed. *Algal ecology: Freshwater benthic ecosystem*. San Diego, Academic press, p.121-148.
- Hofmann, G., Werum, M., & Lange-Bertalot, H. (2011). *Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa: Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis; über 700 der häufigsten Arten und ihrer*

- Ökologie*. Ruggell, A.R.G. Gantner, pp.908.
- Howarth, R.W., Billen, G., Swaney, D., Townsend, A., Jaworski, N., Lajtha, K. & Zhao-Liang, Z. (1996). Regional nitrogen budgets and riverine N & P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: Natural and human influences. En: Howarth, R.W., ed. *Nitrogen Cycling in the North Atlantic Ocean and its Watersheds*. Dordrecht, Springer, p.75-139.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., & Veldhoen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8), p.1928-1938.
- Humphries, D., Byrtus, G., Anderson, A.M., (2005). Glyphosate Residues in Alberta's Atmospheric Deposition, Soils and Surface Waters. Environmental Monitoring and Evaluation Branch, Alberta Environment. Edmonton, Canada, pp.51.
- Insam, H. (1990). Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? *Soil Biology and Biochemistry*, 22(4), p.525-532.
- INIA, Intensificación agropecuaria y sostenibilidad. (2017). Las Brujas, (2017). *Residuos de pesticidas en recursos hídricos del bajo Río Negro y Esteros de Farrapos*, Andrés Perez. INIA Actividades, <http://www.inia.uy/estaciones-experimentales/direccionesregionales/inia-las-brujas/intensificaci%C3%B3n-agropecuaria-y-sostenibilidad#>
- 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), p.1332-1339.
- Jeppesen, E., Meerhoff, M., Jacobsen, B.A., Hansen, R.S., Søndergaard, M., Jensen, J.P., Lauridsen, T.L., Mazzeo, N., & Branco, C.W. (2007). Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation-the successful strategy varies with lake size and climate. *Hydrobiologia*, 581(1), p.269-285.
- Johnson, R.K., Wiederholm, T., & Rosenberg, D.M. (1993). Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. En: Rosenberg, D.M., ed., & Resh, V.H., ed. *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Nueva York, Chapman & Hall, p.40-158.
- Joux-Arab, L., Berthet, B., & Robert, J.M. (2000). Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pennate diatom *Haslea ostrearia*?. *Marine Biology*, 136(2), p.323-330.
- Kalff, J. (2002). *Limnology: inland water ecosystems*. Nueva Jersey, Prentice Hall, pp.592.
- Kelly, M.G., Whitton, B.A. & Lewis, A. (1996). Use of diatoms to monitor eutrophication in UK rivers. *Use of algae for monitoring rivers*, (2), p.79-86.

- Khoshmanesh, A., Lawson, F., & Prince, I.G. (1997). Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Elsevier*, 65(1), p.13-19.
- Kindt, R., & Coe, R. (2005). Tree diversity analysis. *Training*, 18(18), p.598-614.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1986). *Bacillariophyceae, 1 Teil: Naviculaceae*. Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2/1. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, pp.876.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1988). *Bacillariophyceae, 2 Teil 2: Epithemiaceae, Bacillariaceae, Surirellaceae*. Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2/2. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, pp. 611.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1991a). *Bacillariophyceae, 3 Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2/3. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, pp.576.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1991b). *Bacillariophyceae, 4 Teil: Achnantheaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*. Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2/4. Jena, Gustav Fischer Verlag, pp.437.
- Krammer, K. (2000). *The genus Pinnularia*. Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, 1. Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G., pp.703.
- Krammer, K. (2002). *Cymbella*. Diatoms of Europe, diatoms of the European inland waters and comparable habitats, 3. Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G., pp.584.
- Kremer, R., Means, N., & Kim, S. (2005). Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85(15), p.1165-1174.
- Kruk, C., Rodríguez-Gallego, L., Meerhoff, M., Quintans, F., Lacerot, G., Mazzeo, N., Scasso, F., Paggi, J.C, Peeters, E., & Marten, S. (2009). Determinants of biodiversity in subtropical shallow lakes (Atlantic coast, Uruguay). *Freshwater Biology*, 54(12), p.2628-2641.
- La diaria (2018). *Monsanto deberá indemnizar a un hombre por efectos cancerígenos del glifosato* [Internet], La diaria. Extraído de: <<https://ladiaria.com.uy/articulo/2018/8/monsanto-debera-indemnizar-a-un-hombre-por-efectos-cancerigenos-del-glifosato/>> [Acceso el 25 de Agosto de 2018].
- Laitinen, P., Siimes, K., Rämö, S., Jauhiainen, L., Eronen, L., Oinonen, S., & Hartikainen, H. (2008). Effects of soil phosphorous status on environmental risk assessment of glyphosate and glufosinate-ammonium. *Journal of Environmental Quality*, 37(3), p.830-838.
- Lampert, W., & Sommer, U. (2007). *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*. Nueva York, Oxford university press, pp.382.
- Lange-Bertalot, H., & Bonik, H. (1976). Massenentwicklung bisher seltener und unbekannter Diatomeen als Indikator starker Abwasserbelastung in Flüssen. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, p.303-332.

- Lange-Bertalot, H. (1979). Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedwigia*, 64, p.285-304.
- Lange-Bertalot, H. (2001). *Navicula sensu stricto, 10 genera separated from Navicula sensu lato, Frustulia*. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats, 2. Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G., pp. 526.
- Lange-Bertalot, H., Bak, M., Witkowski, A., & Tagliaventi, N. (2011). *Eunotia and some related genera*. Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, 6. Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G., pp.747.
- Lange-Bertalot, H., & Ulrich, S. (2014). Contributions to the taxonomy of needle-shaped *Fragilaria* and *Ulnaria* species. *Lauterbornia*, 78, p.1-73.
- Lau, D.C.P., Leung, K.M.Y., & Dudgeon, D. (2009). Are autochthonous foods more important than allochthonous resources to benthic consumers in tropical headwater streams?. *Journal of the North American Benthological Society*, 28(2), p.426-439.
- Legendre, P., & Gallagher, E.D. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129(2), p.271-280.
- Legendre, P., & Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology*. 2. Amsterdam, Elsevier, pp.969.
- Leps, J., & Smilauer, P. (2003). *Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO*. Cambridge, Cambridge University Press, pp.282.
- Levkov, Z. (2009). *Amphora sensu lato*. En: Lange-Bertalot, H., ed. *Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats*, 5. Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G., pp.287.
- Levkov, Z., Metzeltin, D., & Pavlov, A. (2013). *Luticola and Luticolopsis*. En: Lange-Bertalot, H., ed. *Diatoms of Europe Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats*, 7. Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G., pp. 697.
- Liboriussen, L., & Jeppesen, E. (2003). Temporal dynamics in epipellic, pelagic and epiphytic algal production in a clear and a turbid shallow lake. *Freshwater Biology*, 48(3), p.418-431.
- Liboriussen, L., & Jeppesen, E. (2006). Structure, biomass, production and depth distribution of periphyton on artificial substratum in shallow lakes with contrasting nutrient concentrations. *Freshwater Biology*, 51(1), p.95-109.
- Liu, C.M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C., & Cannon, F.C. (1991). Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family *Rhizobiaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), p.1799-1804.
- Lobo, E.A., Schuch, M., Heinrich, C.G., da Costa, A.B., Düpont, A., Wetzels, C.E., & Ector, L. (2015). Development of the Trophic Water Quality Index (TWQI) for subtropical temperate Brazilian lotic systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(6), p.1-13.
- López, S., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F.,

- Poletta, G., Sanchez, N., Simoniello, M.F., Carrasco, A.E. (2012). Pesticides used in South American GMO-based agriculture: a review of their effects on humans and animal models. En: Fishbein, J.C., ed., Heilman, J.M., ed. *Advances in Molecular Toxicology*, 6. Amsterdam, Países Bajos, Elsevier, p.47-71.
- Lowe, R.L. (1974). *Environmental requirements and pollution tolerance of freshwater diatoms*. US Environmental Protection Agency, EPA-670/4-74-005, Cincinnati, OH.
- Ludvigsen, G.H., & Lode, O. (2001). Jordmonnsobservasjon i Norge. Pesticider 1999. Landbruksdepartementet, Statens Forurensningstilsyn. 109 s. *Jordforsk rapport*, (22/01).
- Lund-Høie, K., & Friestad, H.O. (1986). Photodegradation of the herbicide glyphosate in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(1), p.723-729.
- Ma, J., Liang, W., Xu, L., Wang, S., Wei, Y., & Lu, J. (2001). Acute toxicity of 33 herbicides to the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(4), p.536-541.
- Mallat, E., & Barceló, D. (1998). Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), p.129-136.
- Malmqvist, B. & Rundle, S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation*, 29 (2), p.134-153.
- Matson, P.A, Parton, W.J., Power, A.G., & Swift, M.J. (1997). Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, 277(5325), p.504-509.
- Mazzeo, N., Gorga, J., Crosa, D., Ferrando, J., & Pintos, W. (1995). Spatial and Temporal Variation of Physicochemical Parameters in a Shallow Reservoir Seasonally Covered by *Pistia stratiotes* L. in Uruguay. *Journal of Freshwater Ecology*, 10(2), p.141-149.
- Mazzeo, N., Rodríguez-Gallego, L., Kruk, C., Meerhoff, M., Gorga, J., Lacerot, G., Quintans, F., Loureiro, M., Larrea, D., & García-Rodríguez, F. (2003). Effects of *Egeria densa* Planch. beds on a shallow lake without piscivorous fish. *Hydrobiologia*, 506-509(1-3), p.591-602.
- Metzeltin, D., Lange-Bertalot, H., & García-Rodríguez, F. (2005). *Diatoms of Uruguay. Compared with other taxa from South America and elsewhere*. Iconographia Diatomologica, 15. Ruggell, Liechtenstein, A.R.G. Gantner Verlag, pp.736.
- Metzeltin, D. & Lange-Bertalot, H. (2007). *Tropical diatoms of South America II. Special remarks on biogeographic disjunction*. Iconographia Diatomologica, 18. Ruggell, Liechtenstein, A.R.G. Gantner Verlag pp.877.
- Millennium Ecosystem Assessment, MEA (2005). *Ecosystems and Human*

- Well-Being*. Washington, DC, World Resources Institute.
- Moisset, S., Tiam, S.K., Feurtet-Mazel, A., Morin, S., Delmas, F., Mazzella, N., & Gonzalez, P. (2015). Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), p.4046-4055.
- Morin, S., Corcoll, N., Bonet, B., Tlili, A., & Guasch, H. (2014). Diatom responses to zinc contamination along a Mediterranean river. *Plant Ecology and Evolution*, 147(3), p.325-332.
- Morin, S., Cordonier, A., Lavoie, I., Arini, A., Blanco, S., Duong, T.T., Sabater, S. (2012). Consistency in Diatom Response to Metal-Contaminated Environments. En: Guasch, H., ed., Ginebreda, A., ed., & Geiszinger, A., ed. *Emerging and priority pollutants in rivers*. Berlin, Springer, pp.117-146.
- Morin, S., Coste, M. & Delmas, F. (2008). A comparison of specific growth rates of periphytic diatoms of varying cell size under laboratory and field conditions. *Hydrobiologia*, 614(1), p.285-297.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T.T., Boudou, A., Coste, M., & Delmas, F. (2007). Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundamental and Applied Limnology*, 168(2), p.179-187.
- Moss, B. (2008). Water pollution by agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 363(1491), p.659-666.
- Müller, R. & Wiedemann, F. (1955). Die Bestimmung des Nitrats in Wasser. *Jahrbuch für Wasserchemie und Wasserreinigungstechnik*, 12, p.247-271.
- Murakami, E. A. & Rodrigues, L. (2009). Resposta das algas perifíticas às alterações de temperatura e ao enriquecimento artificial de nutrientes em curto período de tempo. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 31(3), p.273-284.
- Murphy, J. & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, p.31-36.
- Nagy, S.S. (2011). Collecting, cleaning, mounting, and photographing diatoms. En: Seckbach, J., ed., Kociolek, P., ed. *The diatom world*. Dordrecht, Springer, p.1-18.
- Okada, E., Pérez, D., De Gerónimo, E., Aparicio, V., Massone, H., & Costa, J.L. (2018). Non-point source pollution of glyphosate and AMPA in a rural basin from the southeast Pampas, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), p.15120-15132.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos P., Henry, M.H., Wagner, S., & Wagner, H. (2016). *vegan: Community Ecology Package*, R package version 2.3-5. Extraído de: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.
- Organización de las Naciones Unidas, ONU. (2010). *Resolución 64/292*, aprobada por la Asamblea General el 28 de Julio de 2010. "El derecho al agua y el saneamiento". EU: ONU.

- Ouellette, M. H., & Legendre, P. (2013). MVPARTwrap: Additional features for package mvpart. *R package version 0.1-9.2*.
- Paerl, H.W., & Otten, T.G. (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, 65(4), p.995-1010.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L., & Carrasco, A.E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), p.1586-1595.
- Parker, R.G., York, A.C., Jordan, D.L., Parker, R.G., York, A.C., & Jordan, D.L. (2005). Comparison of Glyphosate Products in Glyphosate-Resistant Cotton (*Gossypium hirsutum*) and Corn (*Zea mays*). *Weed technology*, 19(4), p.796-802.
- Patrick, R., & Reimer, C.W. (1975). *Entomoneidaceae, Cymbellaceae, Gomphonemaceae, Epithemiaceae*. The diatoms of the United States exclusive of Alaska and Hawaii, 2/1. Filadelfia, The Academy of Natural Sciences of Philadelphia.
- Pérez, G.L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodriguez, P., Vera, M.S., Do Nascimento, M., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M., Izaguirre, I., Pizarro, H., Bonetto, C., Morris, D., & Zagarese, H. (2007). Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*, 17(8), p.2310-2322
- Pérez, G.L., Vera, M.S., & Miranda, L.A. (2011). Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. *Herbicides and the Environment*, 16, p.343-368.
- Peruzzo, P., Marino, D., Cremonese, C., da Silva, M., Porta, A., Ronco, A. (2003). Impacto de pesticidas en aguas superficiales y sedimentos asociado a cultivos por siembra directa. En: *AGUA 2003 (IWA), Memorias Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua*. Cartagena, pp.135-142.
- 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), p.61-66.
- Pesce, S., Batisson, I., Bardot, C., Fajon, C., Portelli, C., Montuelle, B., & Bohatier, J. (2009). Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(7), p.1905-1912.
- Peeters, V. & Ector, L. (2017). *Atlas des diatomées des cours d'eau du territoire bourguignon. (1): Centriques, Araphidées*. Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Bourgogne-Franche-Comté. pp.309.
- Pinzón, J. & Spence, J.R. (2010). Bark-dwelling spider assemblages (Araneae) in the boreal forest: dominance, diversity, composition and life-histories. *Journal of Insect Conservation*, 14(5), p.439-458.
- Pinzón, J., Spence, J.R., & Langor, D.W. (2012). Responses of ground-dwelling spiders (Araneae) to variable retention harvesting practices in

- the boreal forest. *Forest Ecology and Management*, 266, p.42-53.
- Pipke, R., Amrhein, N., Jacob, G.S., Schaefer, J., & Kishore, G.M. (1987). Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. *European Journal of Biochemistry*, 165(2), p.267-273.
- Pizarro, H., Di Fiori, E., Sinistro, R., Ramírez, M., Rodríguez, P., Vinocur, A., & Cataldo, D. (2015). Impact of multiple anthropogenic stressors on freshwater: how do glyphosate and the invasive mussel *Limnoperna fortunei* affect microbial communities and water quality?. *Ecotoxicology*, 25(1), p.56-68.
- Potapova, M., & Charles, D.F. (2007). Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecological Indicators*, 7(1), p.48-70.
- Power, A.G. (2010). Ecosystem services and agriculture: Tradeoffs and synergies. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 365(1554), p.2959-2971.
- Quinn, G.P., & Keough, M.J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Relyea, R.A. (2005). The Lethal Impact of Roundup on Aquatic and Terrestrial Amphibians. *Ecological Applications*, 15(4), p.1118-1124.
- Relyea, R.A., Schoeppner, N.M., & Hoverman, J.T. (2005). Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*, 15(4), p.1125-1134.
- Relyea, R.A. (2012). New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications*, 22(2), p.634-647.
- Reno, U., Gutierrez, M.F., Regaldo, L., & Gagnetten, A.M. (2014). The Impact of Eskoba®, a Glyphosate Formulation, on the Freshwater Plankton Community. *Water Environment Research*, 86(12), p.2294-2300.
- Reuters (2018). *Juez de Brasil suspende uso de agroquímico glifosato* [Internet], Asociación de Consumidores Orgánicos. Extraído de: <<https://consumidoresorganicos.org/2018/08/08/juez-brasil-suspende-uso-agroquimico-glifosato/>> [Acceso el 26 de Agosto de 2018].
- Riechers, D.E., Wax, L.M., Liebl, R.A., & Bullock, D.G. (1995). Surfactant Effects on Glyphosate Efficacy. *Weed Technology*, 9(02), p.281-285.
- Roberts, D. (2016). *labdsv: ordination and multivariate analysis for ecology*, R package version 1.8-0. 2012. Extraído de: <<https://CRAN.R-project.org/package=labdsv>>.
- Rodrigues, L., & Bicudo, D.D.C. (2001). Similarity among periphyton algal communities in a lentic-lotic gradient of the upper Paraná river floodplain, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 24(3), p.235-248.
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., & Apartin, C.D. (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(8), p.1-13.
- Rosemond, A.D., Mulholland, P.J. & Elwood, J.W. (1993). Top-down and

- bottom-up control of stream periphyton: effects of nutrients and herbivores. *Ecology*, 74(4), p.1264-1280.
- Round, F.E. (1991). Diatoms in river water-monitoring studies. *Journal of applied phycology*, 3(2), p.129-145.
- Round, F.E. (1993). *A review and methods for the use of epilithic diatoms for detecting and monitoring changes in river water quality*. Londres, Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, pp.65.
- 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), p.517-528.
- Rumrich, U., Lange-Bertalot, H., & Rumrich, M. (2000). *Diatoms of the Andes from Venezuela to Patagonia/Tierra del Fuego*. Iconographia diatomologica, 9. Koenigstein, Koeltz Scientific Books, pp.673.
- Sáenz, M.E., & Marzio, W.D.D. (2009). Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Limnetica*, 28(1), p.149-158.
- Sand-Jensen, K., & Borum, J. (1984). Epiphyte shading and its effect on photosynthesis and diel metabolism of *Lobelia dortmanna* L. during the spring bloom in a Danish lake. *Aquat. Bot*, 20, p.109-119.
- Sand-Jensen, K., & Borum, J. (1991). Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries. *Aquatic Botany*, 41(1-3), p.137-175.
- Santadino, M., Coviella, C., & Momo, F. (2014). Glyphosate sublethal effects on the population dynamics of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(12), p.2207.
- Sarkar, D. (2008). *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer, Nueva York. ISBN 978-0-387-75968-5
- Schaffer, J.D., & Sebetich, M.J. (2004). Effects of Aquatic Herbicides on Primary Productivity of Phytoplankton in the Laboratory. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(5), p.1032-1037.
- Scheffer, M. (2001). *Ecology of shallow lakes*. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers, pp.357.
- Shinabarger, D.L., & Braymer, H.D. (1986). Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. *Journal of bacteriology*, 168(2), p.702-707.
- Sihtmäe, M., Blinova, I., Künnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M., & Kahru, A. (2013). Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*, 72, p.215-224.
- Simpson G. L. (2016). *Permute: Functions for Generating Restricted Permutations of Data*, R package version 0.9-0. Extraído de: <<https://CRAN.R-project.org/package=permute>>.
- Smedbol, É., Gomes, M.P., Paquet, S., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., & Juneau, P. (2018). Effects of low concentrations of glyphosate-based herbicide factor 540 on an agricultural stream freshwater phytoplankton community. *Chemosphere*, 192, p.133-141.

- Smedbol, É., Lucotte, M., Labrecque, M., Lepage, L., & Juneau, P. (2017). Phytoplankton growth and PSII efficiency sensitivity to a glyphosate-based herbicide (Factor 540®). *Aquatic Toxicology*, 192, p.265-273.
- Stábile, F. (2018). *Evaluación de la bioacumulación y biomagnificación de plaguicidas en la Laguna del Suace (Maldonado, Uruguay)*. Tesis de maestría. Centro Universitario regional Este, UDELAR.
- Steinberg, C.E.W., Kamara, S., Prokhotskaya, V.Y., Manusadzianas, L., Karasyova, T.A., Ilmofeyev, M.A., Menzel, R. (2006). Dissolved humic substances - ecological driving forces from the individual to the ecosystem level?. *Freshwater Biology*, 51(7), p.1189-1210.
- Steffen, M., & Inda, H. (2010). Bases técnicas para el manejo integrado de la Laguna del Sauce y cuenca asociada. *Universidad de la República y South American Institute for resilience and Sustainability Studies (SARAS) Montevideo-Uruguay*.
- Stevenson, R.J., Peterson, C.G., Kirschtel, D.B., King, C.C. & Tuchman, N.C. (1991). Density-dependent growth, ecological strategies, and effects of nutrients and shading on benthic diatom succession in streams. *Journal of Phycology*, 27(1), p.59-69.
- Stevenson, R.J., ed., Bothwell, M.L., ed., Lowe, R.L., ed. (1996). *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. San Diego, Academic Press, pp.749.
- Stevenson, R.J., & Pan, Y. (1999). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. En: Stoermer, E.F., ed., & Smol, J.P., ed. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*, Cambridge, Cambridge University Press.
- Stoermer, E.F., ed., & Smol, J.P., ed. (1999). *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge, Cambridge University Press, pp.484.
- Strayer, D.L., & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), p.344-358
- Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., & Marvin, C. (2008). Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(4), p.378-384.
- Székács, A., & Darvas, B. (2012). Forty Years with Glyphosate. En: Hasaneen, M.N., ed. *Herbicides: Properties, Synthesis and Control of Weeds*. Rijeka, Croacia, InTech, p.247-284.
- Teitzel, G. M., & Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Soc Microbiol*, 69(4), p.2313–2320.
- Teixeira de Mello, F. (2007). *Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del Río Santa Lucía (Uruguay)*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UDELAR.
- 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), p.843-849.
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., & Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, p.129-136.
- Tiam, S.K., Feurtet-Mazel, A., Delmas, F., Mazzella, N., Morin, S., Daffe, G., & Gonzalez, P. (2012). Development of q-PCR approaches to assess water quality: effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*. *Water research*, 46(4), p.934-942.
- Tilman D., Fargione J., Wolff B., D'Antonio C., Howarth R., Schindler D., Schlesinger W.H., Swackhamer D.S. & Swackhamer D. (2001). Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science*, 292(5515), p.281-284.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), p.671-677.
- Tlili, A., Berard, A., Blanck, H., Bouchez, A., Cássio, F., Eriksson, K.M., Behra, R. (2016). Pollution-induced community tolerance (PICT): towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems. *Freshwater Biology*, 61(12), p.2141-2151.
- Tlili, A., & Montuelle, B. (2011). Microbial pollution-induced community tolerance. *Tolerance to environmental contaminants*, p.85-108.
- Townsend, C.R., Uhlmann, S.S. & Matthaei, C.D. (2008). Individual and combined responses of stream ecosystems to multiple stressors. *Journal of Applied Ecology*, 45(6), p.1810-1819.
- Tsui, M.T.K., & Chu, L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), p.1189-1197.
- Tuji, A. (2000). The effect of irradiance on the growth of different forms of freshwater diatoms: implications for succession in attached diatom communities. *Journal of Phycology*, 36(4), p.659-661.
- Instituto Uruguayo de Normas y Técnicas, UNIT. (2010). *UNIT 833:2008* [Internet], OSE. Extraído de: <[http://www.ose.com.uy/descargas/Clientes/Reglamentos/unit\\_833\\_2008\\_.pdf](http://www.ose.com.uy/descargas/Clientes/Reglamentos/unit_833_2008_.pdf)> [Acceso el 14 de Julio de 2015].
- U.S. EPA. (1993). Registration eligibility decision (RED): glyphosate. Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency, Special Review and Registration Division, Washington, D.C.,
- Vadeboncoeur, Y., & Steinman, A.D. (2002). Periphyton Function in Lake Ecosystems. *The Scientific World Journal*, 2, p.1449-1468.
- Vadeboncoeur, Y., Vander Zanden, M.J., & Lodge, D.M. (2002). Putting the Lake Back Together: Reintegrating Benthic Pathways into Lake Food Web Models. *BioScience*, 52(1), p.44.

- 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), p.117-133.
- Vendrell, E., Ferraz, D.G.D.B., Sabater, C., & Carrasco, J.M. (2009). Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(5), p.538-42.
- Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G.L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro R., Ferraro M., Bonetto C., Zagarese H, Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), p.710-721.
- Vera, M.S. (2011). *Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
- Vera, M.S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., Ríos de Molina, M.C., Tell, G., Pizarro, H. (2012). Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21(7), p.1805-16.
- Vera, M.S., Juárez, Á.B., & Pizarro, H.N. (2014). Comparative effects of technical-grade and a commercial formulation of glyphosate on the pigment content of periphytic algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(4), p.399-404.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: A review. *Pest Management Science*, 61(12), p.1139-1151.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A, Lubchenco, J., & Melillo, J.M. (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*, 277(Julio), p.494-499.
- Wardle, D.A., & Parkinson, D. (1992). The influence of the herbicide glyphosate on interspecific interactions between four soil fungal species. *Mycological Research*, 96(3), p.180-186.
- Weber, C.I., & McFarland, B.H. (1981). Effects of copper on the periphyton of a small calcareous stream. En: Bates, J.M., ed., & Weber, C.I., ed. *Ecological Assessments of Effluent Impacts on Communities of Indigenous Aquatic Organisms*. Filadelfia, ASTM International.
- Wetzel, R.G. (1981). *Limnologia*. Barcelona, Omega, pp.679.
- Wetzel, R.G. (1983). Opening remarks. En: Wetzel, R.G., ed. *Periphyton of freshwater ecosystems*. Haya, Países Bajos, Dr. W. Junk Publishers, p.3-4.
- Wetzel, R.G., & Likens, G.E. (2000). Composition and biomass of phytoplankton. En: Wetzel, R.G., ed., & Likens, G.E., ed. *Limnological analyses*. Nueva York, Springer, p.147-174.
- Wetzel, C.E., Ector, L., Van De Vijver, B.V.D., Compère, P., & Mann, D.G. (2015). Morphology, typification and critical analysis of some ecologically important small naviculoid species (*Bacillariophyta*).

- Fottea*, 15(2), p.203-234.
- Wong, P.K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere*, 41, p.177-182.
- Woodburn, A.T. (2000). Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science*, 56, p.309-312.
- WWDR. (2009). United Nations World Water Development Report 3. Water in a changing world.
- Zar, J. (1999). *Biostatistical analysis*. 4. Nueva York, Prentice Hall.
- Zhang, W., Ricketts, T.H., Kremen, C., & Carney, K. (2007). Ecosystem services and dis-services to agriculture. *Ecological Economics*, 64(2), p.253-260.
- Zhu, X., Sun, Y., Zhang, X., Heng, H., Nan, H., Zhang, L., Yang, Z. (2016). Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 162, p.243-251.