

# **Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología**



La impresión de este libro ha sido financiada con el aporte del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT). Proyectos PICT 2013-1348 y PICT 2014-1460.

# **Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
*de* MAR DEL PLATA  
.....

ISBN: 978-987-544-756-1

Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología / Débora Jesabel Perez ... [et al.]; compilado por Débora Jesabel Perez; Mirta Luján Menone. - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-544-756-1

1. Contaminación Ambiental. 2. Medio Ambiente. 3. Plantas Acuáticas. I. Perez, Débora Jesabel II. Perez, Débora Jesabel, comp. III. Menone, Mirta Luján, comp.

CDD 577.6

Fotos de cubierta: Débora Jesabel Pérez, Mirta Luján Menone

Primera Edición: Mayo de 2017

# **Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología**

## **Compiladores**

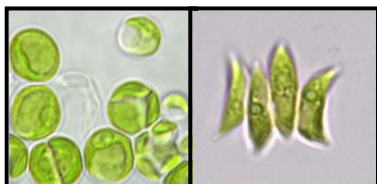
Dra. Pérez, Débora Jesabel

Dra. Menone, Mirta Luján

# ÍNDICE

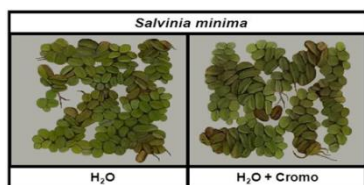
Presentación .....	7
--------------------	---

Capítulo 1 .....	9
------------------	---



Microalgas como modelo biológico en estudios de contaminación ambiental: Efecto de herbicidas y antibióticos sobre la fisiología, morfología, ultraestructura y parámetros de estrés oxidativo.

Capítulo 2 .....	32
------------------	----



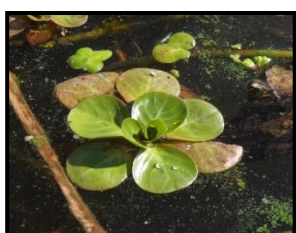
Aspectos bioquímicos y fisiológicos de la tolerancia al cromo por *Salvinia minima*.

Capítulo 3 .....	54
------------------	----



Efecto de contaminantes sobre las macrófitas acuáticas: aplicaciones en la fitorremediación.

Capítulo 4 .....	84
------------------	----



Utilización de la hidrófita *Ludwigia peploides* para biomonitoreo del herbicida glifosato en ecosistemas acuáticos. Estudio en una cuenca del sudeste bonaerense.

# Utilización de la hidrófita *Ludwigia peploides* para biomonitoreo del herbicida glifosato en ecosistemas acuáticos. Estudio en una cuenca del sudeste bonaerense

---

Débora Jesabel Pérez, Elena Okada, Mirta Luján Menone, Virginia Carolina Aparicio, José Luis Costa

## RESUMEN

*Ludwigia peploides* (H.B.K.) o “falsa verdolaga” (Fam. Onagracea) es una hidrófita perenne nativa de Sudamérica. *L. peploides* se encuentra ampliamente distribuida en arroyos del sudeste bonaerense, lo cual permite el estudio de esta especie como biomonitor de contaminantes de origen agrícola. Este trabajo tuvo como objetivos, 1) establecer y validar una metodología de extracción y cuantificación de glifosato en *L. peploides*, 2) determinar el rol de esta especie como biomonitora de glifosato en la cuenca agrícola-ganadera del arroyo “El Crespo”. En el mes de marzo de 2016 se recolectaron especímenes de *L. peploides* en ocho sitios de muestreo del arroyo. En forma simultánea se colectaron muestras de agua superficial y sedimento. Las muestras vegetales se secaron (60°C), molieron y tamizaron utilizando una malla de 50 µm. Para la extracción de glifosato se pesaron 0,5 gr de tejido vegetal, fortificado con estándar interno de glifosato y luego se agregó agua ultrapura. El extracto vegetal obtenido se trató con carbón activado para disminuir el efecto matriz. Para las muestras de agua y sedimentos se utilizó un método de extracción alcalino. Luego de la extracción todas las muestras fueron derivatizadas con 9-cloroformiato de fluorenilmetilo. La detección y cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas. Los límites de detección y cuantificación en tejido vegetal fueron 4 y 12 µg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. La recuperación del método fue del 117% (± 20%). La frecuencia de detección de glifosato en las muestras de *L. peploides* fue de 93%. Los niveles variaron entre 16 – 108 µg Kg<sup>-1</sup>, encontrándose la mayor



concentración en sitios localizados aguas arriba del arroyo. En el sitio de mayor acumulación de glifosato en *L. peploides*, se registró la concentración más alta en el agua superficial. Sin embargo, no se encontró una relación entre la concentración en los sedimentos y la acumulación de glifosato en las hidrófitas. El hábito de crecimiento perenne y las características anatómicas de la especie, como la ausencia de cutícula, epidermis delgada y hojas anfistomáticas, podrían favorecer el ingreso de glifosato, así como también de otros plaguicidas hidrofílicos de uso corriente.

**Palabras claves:** hidrófita, glifosato, bioacumulación, cuenca agrícola-ganadera

## Glifosato en el ambiente

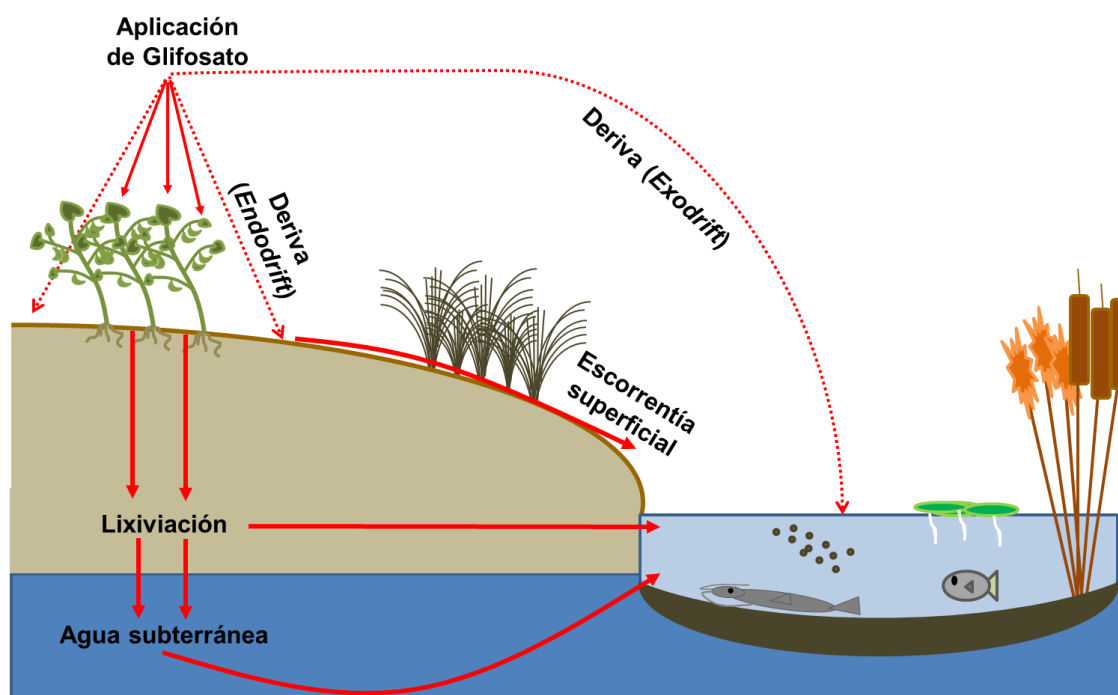
De todos los contaminantes presentes en el medio ambiente, los plaguicidas son los más ampliamente criticados debido a su aplicación masiva y directa en los sistemas naturales. La aplicación de plaguicidas en los ambientes bajo cultivo a veces resulta en la introducción de forma directa o indirecta de las áreas adyacentes. Este hecho crea preocupación ya que tanto las poblaciones humanas y naturales resultan expuestas a los agroquímicos (Connell, 2005). En la Argentina, la actividad agropecuaria se encuentra fuertemente ligada a la disponibilidad de agua, lo cual resulta en una relación directa de la localización de los campos cultivados con ecosistemas acuáticos superficiales y/o subterráneos. La aplicación de agroquímicos en toda la extensión de los campos, puede causar una introducción directa en el suelo (*endodrift*), en los cursos de agua superficiales por deriva (*exodrift*) (Himel, 1974), y luego también pueden incorporarse por eventos de escorrentía superficial y lixiviación principalmente (Figura 1).

En las últimas décadas, el uso de plaguicidas orgánicos caracterizados por su alta persistencia ambiental y lipofilicidad provocó un amplio rango de efectos negativos sobre los ecosistemas debido a su capacidad de bioconcentrarse y bioacumularse en los organismos. Por esta razón,



actualmente se utilizan plaguicidas menos persistentes y más solubles en agua, es decir más hidrofílicos, disminuyendo así la capacidad de acumularse en los organismos (Alvarez *et al.*, 2008).

El glifosato, es un herbicida post-emergente no selectivo usado a nivel mundial para el control de diversas gramíneas, malezas de hoja ancha y hierbas acuáticas (Zhang *et al.*, 2011). Basados en las propiedades físico-químicas del glifosato, como su alta afinidad a las partículas del suelo, resulta esperable que este herbicida tenga baja movilidad en el suelo (Okada *et al.*, 2016). Sin embargo, la alta polaridad y solubilidad en agua (Log Kow = -3,57 a 20°C) pueden explicar su presencia frecuente en los cuerpos de agua superficiales.



**Figura 1:** Dispersión ambiental del herbicida glifosato.

Según los informes de la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) del total de agroquímicos vendidos, el glifosato representa aproximadamente el 65% de las ventas, convirtiéndose de esta manera en el agroquímico más vendido y más utilizado en la actividad agrícola en nuestro país (CASAFE, 2012). Los formulados comerciales que contienen un 54% de ingrediente activo son los más utilizados actualmente. El glifosato puede aplicarse hasta tres veces sobre los cultivos transgénicos, como la soja, trigo y algodón. La primera aplicación se realiza para preparar el suelo para el cultivo en siembra directa, el llamado barbecho químico; la segunda aplicación se realiza previa a la siembra y la tercera aplicación durante el crecimiento del cultivo. En este sentido, las tasas de aplicaciones anuales de glifosato pueden variar desde 5 hasta 13 L/Ha dependiendo el tipo de cultivo.

El uso indiscriminado de este herbicida dentro de los agroecosistemas, ya sea por las altas dosis aplicadas y las reiteradas aplicaciones a lo largo de un año, es la principal razón por la cual el glifosato y su metabolito el ácido aminometilfosfónico (AMPA) son los residuos de plaguicidas más detectados en los ecosistemas acuáticos (Pérez *et al.*, 2016). Las concentraciones en ecosistemas superficiales de la Pampa Austral pueden oscilar entre 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  en aguas superficiales y desde 10-200  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  en sedimentos de fondo (Aparicio *et al.*, 2013; Ronco *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2016).

El glifosato puede inducir efectos adversos en la biota acuática no blanco (Myers *et al.*, 2016), sumado a esto, en el año 2015 la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer clasificó a este herbicida como probable carcinogénico en humanos (Grupo 2A) (Guyton *et al.*, 2015). En este sentido, la presencia en los distintos compartimientos ambientales debe ser considerada un tópico de estudio relevante necesario para implementar acciones que reduzcan sus posibles impactos ambientales.

## **Funciones ecosistémicas que brindan las hidrófitas**

Las hidrófitas o macrófitas acuáticas son un importante componente del sistema béntico de producción primaria, proporcionando oxígeno fotosintético,

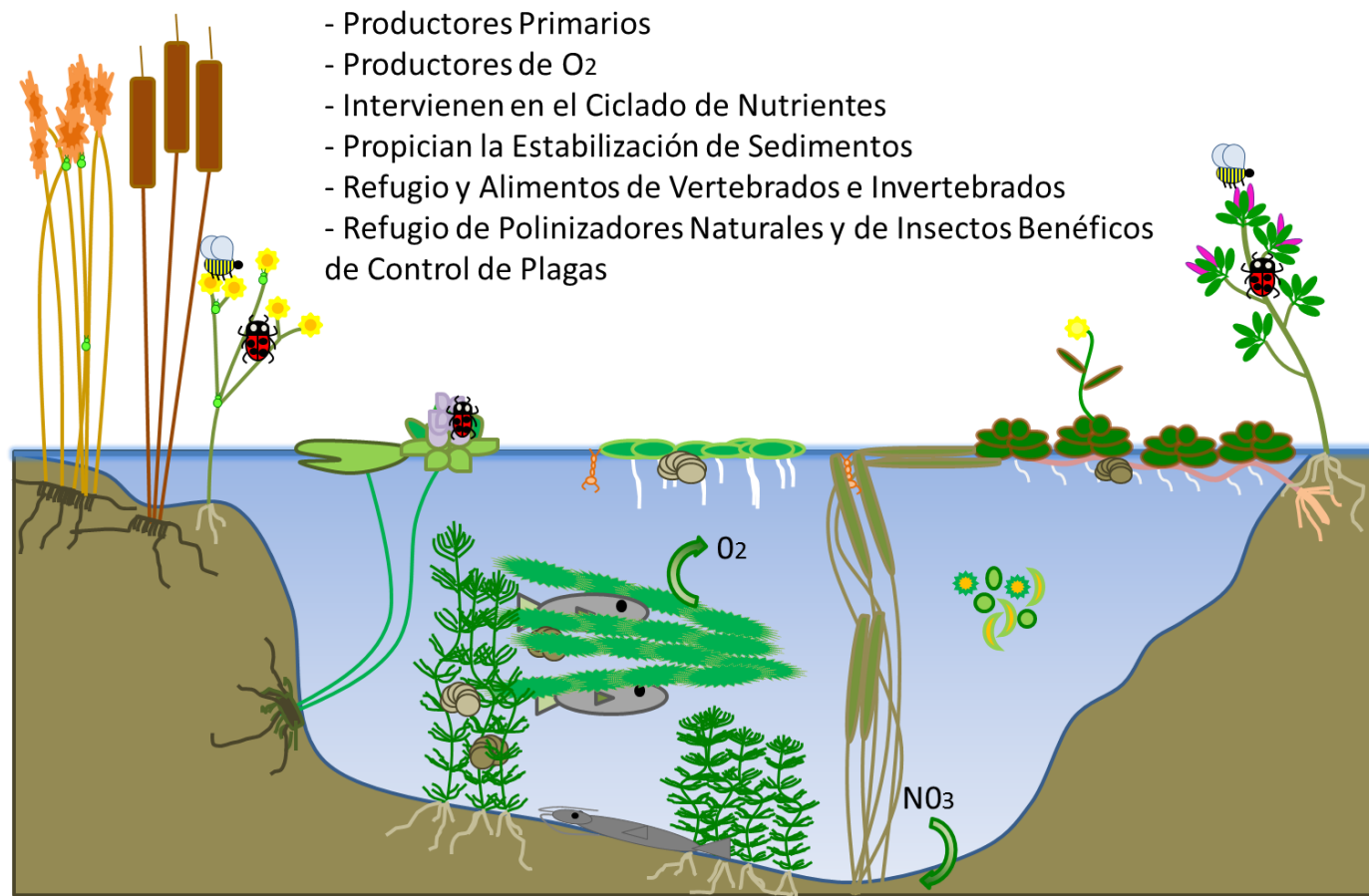
interviniendo en el ciclado de nutrientes y en la estabilización de los sedimentos, proporcionando hábitats y refugios a invertebrados y peces (Freemark y Boutin, 1994; Arts *et al.*, 2010). También, proveen hábitats para polinizadores e insectos benéficos que actúan como controladores de plagas en los campos de cultivos adyacentes a ecosistemas acuáticos (Figura 2).

Como ya se mencionó, existe una vinculación frecuente y estrecha entre los cuerpos de agua superficiales y las tierras cultivadas, y en esta relación las hidrófitas juegan un rol central en la acumulación de plaguicidas. Existen diversos estudios que demuestran la capacidad de las hidrófitas flotantes, sumergidas o emergentes de acumular agroquímicos y de esta manera ser excelentes bioindicadores *in situ* de la calidad del agua superficial (Lewis, 1995; Carvahlo *et al.*, 2007; Turgut, 2005; Pérez *et al.*, 2013, Gonzalez *et al.*, 2013).

Sin embargo, las hidrófitas pueden estar sometidas a un riesgo ecotoxicológico importante debido al impacto de los herbicidas, que siendo aplicados en los campos de cultivo, llegan a los cuerpos de agua. Para obtener datos precisos de la magnitud de la acumulación de plaguicidas en sus tejidos, se utilizan diferentes factores que indican la razón entre la cantidad de un compuesto en los tejidos y la concentración en el agua circundante, Factor de Bioconcentración (FBC) (ecuación 1) o en el sedimento donde la planta esté arraigada, Factor de Acumulación Biota-Sedimento (FABS) (ecuación 2).

$$\text{Ecuación 1} \quad FBC = \frac{[\text{Concentración del compuesto en los tejidos}]}{[\text{Concentración del compuesto en el agua}]}$$

$$\text{Ecuación 2} \quad FABS = \frac{[\text{Concentración del compuesto en los tejidos}]}{[\text{Concentración del compuesto en los sedimentos}]}$$



**Figura 2:** Funciones ecosistémicas que brindan las hidrófitas.

## Descripción y ciclo de crecimiento de *Ludwigia peploides*

El género *Ludwigia* (H.B.K.) (Fam. Onagraceae) es un género extenso y ampliamente distribuido en el mundo, contiene alrededor de 82 especies divididas en 23 secciones. El género exhibe un patrón biogeográfico complejo, con 10 secciones endémicas del Sur-Centro de América, tres de Norteamérica, cuatro de África, tres en Asia, dos en los Paleotrópicos, y dos son cosmopolitas (Hock *et al.*, 2011). La poliploidía está muy representada, con número cromosómicos gaméticos que van desde  $n = 8$  a  $n = 64$  (Hock *et al.*, 2011; Menone *et al.*, 2015).

La mayoría de las especies crecen en climas templados a subtropicales húmedos y tienen mucho vigor para crecer en ambientes acuáticos. Actualmente, el género se ha convertido en foco de estudio debido a la expansión de especies invasoras en países de Europa (Dandelot *et al.*, 2005; Bou Manobens y Font Garcia, 2016), así como también en estados del sur de Estados Unidos (Wood 2006). Fuertes evidencias moleculares y morfológicas ubicarían al género *Ludwigia* como una Familia hermana del resto de las Onagraceae (Hock *et al.*, 2011).

En Argentina el género está representado por 11 especies. *Ludwigia peploides* (H.B.K.) o “falsa verdolaga” es una especie nativa distribuida en los humedales naturales del sudeste de la provincia de Buenos Aires, y con una amplia distribución en las Américas, creciendo desde Estados Unidos y México hasta América del Sur (Lahitte y Hurell, 1997). Es una hidrófita flotante perenne que se desarrolla mediante crecimiento vegetativo durante los meses de otoño e invierno. Su crecimiento está caracterizado por tallos tendidos flotantes (rizomas) con hojas oblongas, raíces arraigadas y flotantes que crecen en los nudos. Antes de la floración, aparecen tallos ascendentes con hojas lanceoladas y en primavera - verano, se presentan las ramas floríferas ascendentes de hasta 60 cm con flores axilares amarillas (Lahitte y Hurell, 1997) (Figura 3).

Los ambientes pampásicos donde habita *L. peploides* son regiones de intensa actividad agrícola, por lo que la llegada de agroquímicos a los cuerpos de agua superficiales es un factor crucial que puede determinar la dinámica

poblacional de todo el ecosistema y en particular la bioacumulación de plaguicidas en las hidrófitas. Gonzalez et al., (2013) han evaluado la capacidad de *L. peploides* de acumular plaguicidas organoclorados en el sudeste bonaerense. Sin embargo, la falta de información acerca de la acumulación de plaguicidas de uso actual en hidrófitas llevó a realizar este estudio, el cual se focalizó en estudiar la capacidad de *L. peploides* de acumular glifosato en sus tejidos para ser utilizada como una especie biomonitora en ecosistemas acuáticos superficiales.



**Figura 3:** Ciclo de crecimiento anual de *Ludwigia peploides*. Fuente: A-B Pérez DJ.; C-E: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Ludwigia+peploides>

## Área de estudio y sitios de muestreo

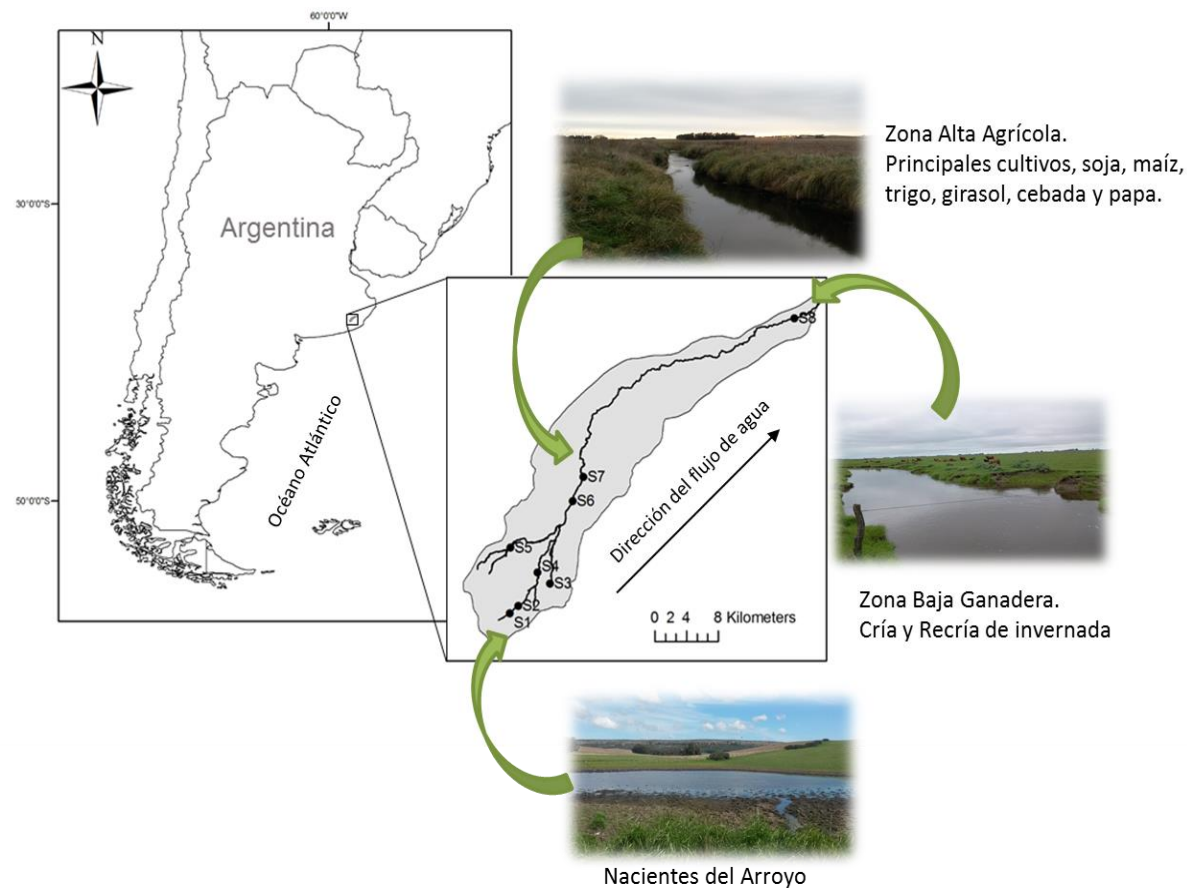
El arroyo El Crespo es un arroyo de tercer orden, localizado al sudeste de la Provincia de Buenos Aires, en el Partido de Balcarce (Figura 3), con una cuenca que tiene una superficie de 490 km<sup>2</sup>. El sentido de dirección del flujo de agua es de Sur a Norte, recorriendo una distancia de 65 km. Esta cuenca se caracteriza por estar influenciada solamente por actividades agropecuarias, sin intervención de actividades urbanas o industriales, convirtiéndose en un sitio óptimo de estudio de procesos de contaminación por plaguicidas de uso agrícola.

Las nacientes del arroyo están localizadas en el Sistema de Tandilia con un sistema de drenaje continuo debido al aporte de agua subterránea. En esta zona de cuenca alta los suelos son Argiudoles Típicos aptos para el desarrollo de la agricultura. La desembocadura se encuentra en el extremo norte, localizado dentro de la planicie de inundación, caracterizado por suelos Natracuoles Típicos cubiertos de pastizales naturales, aptos para la ganadería, los cuales no presentan historial de aplicación de plaguicidas.

Los principales cultivos desarrollados en la zona durante la campaña 2014-2015 fueron soya, girasol, maíz, trigo, cebada, papa, sorgo, los cuales cubrieron una superficie de 45,48%, 17,51%, 9,96%, 15,12%, 6,33%, 2,32%, 1,89%, respectivamente, según las estimaciones del Ministerio de Agroindustria (SIIA, 2016) y las encuestas realizadas a los productores de la zona.

Para la realización de este trabajo, se determinaron ocho sitios de muestreo dentro del arroyo desde las nacientes hasta la desembocadura, y las muestras fueron tomadas en Marzo de 2016. Los sitios de muestreo fueron enumerados desde Sitio 1 (nacientes) hasta Sitio 8 (desembocadura) (Figura 4).





**Figura 4:** Delimitación de la cuenca del arroyo El Crespo y localización de los sitios de muestreo (Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina).

## Recolección y procesamiento de las muestras

Se colectaron 3 especímenes jóvenes de *L. peploides* en cada sitio. Estos se mantuvieron en bolsas llenas de agua del arroyo para el traslado al laboratorio. Luego, se los enjuagó tres veces con agua de la canilla, para retirar el material particulado y los posibles residuos de glifosato adheridos a las hojas. Se diseccionaron las hojas y se colocaron en bolsas de papel y se secaron a una temperatura constante de 60°C durante siete días. Posteriormente, se molieron y tamizaron con tamiz de 0,5 mm de malla.

En los mismos sitios se colectaron muestras de agua superficial y sedimentos del arroyo, las cuales fueron procesadas y analizadas para determinar la presencia y niveles de glifosato y AMPA, siguiendo la metodología de Aparicio *et al.*, (2013).

## Puesta a punto de la técnica de extracción de glifosato en *Ludwigia peploides*

Existen diferentes protocolos de extracción de glifosato en tejidos vegetales (Koskinen *et al.*, 2016). Debido a la diversidad en composición de los distintos tejidos vegetales en relación a los pigmentos fotosintéticos, el contenido proteico y lipídico, no hay una metodología estandarizada para la extracción del herbicida. Por esta razón, es necesario determinar un protocolo óptimo para ser utilizado en cada modelo vegetal.

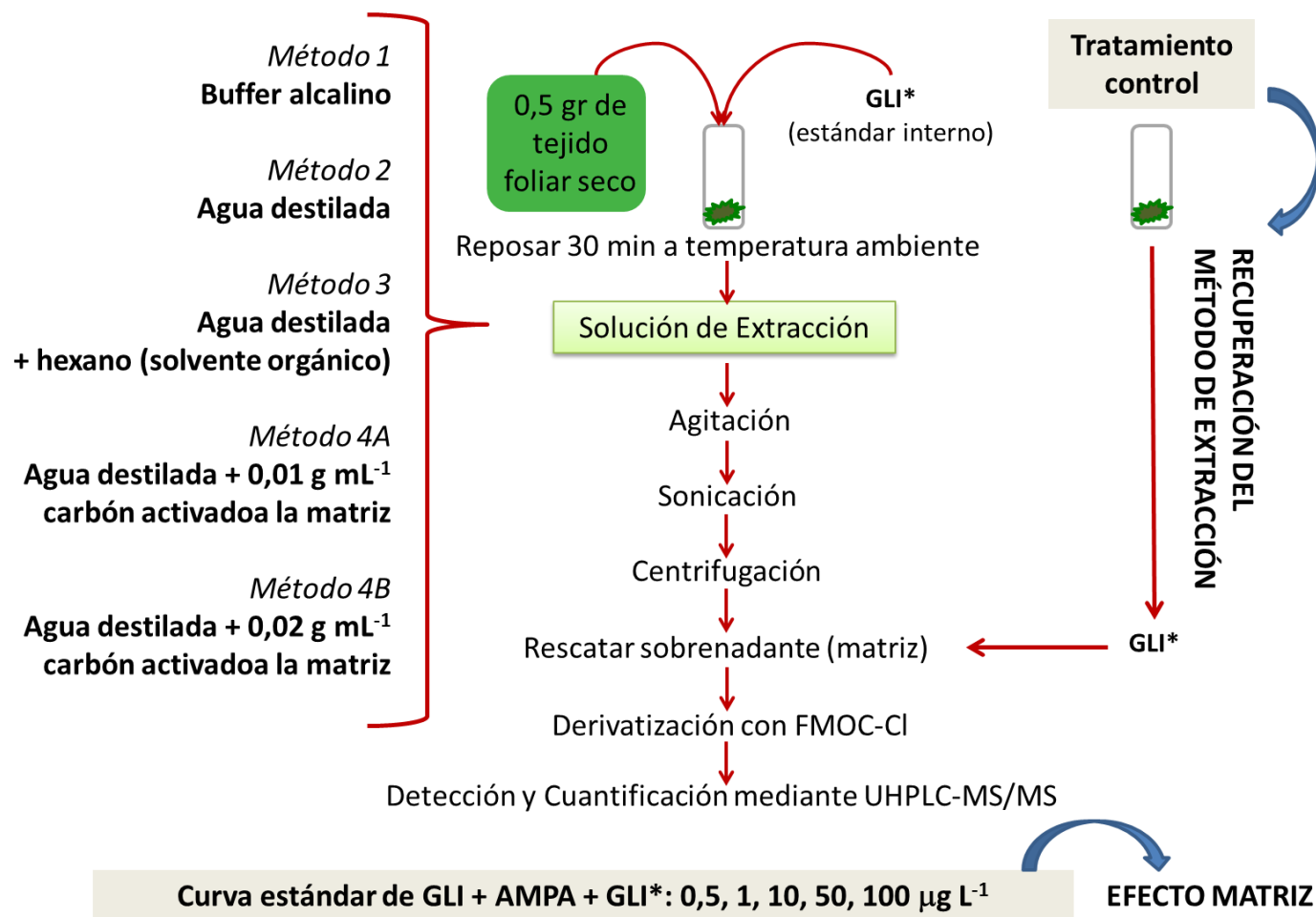
Para ello se utilizaron diferentes soluciones para la extracción de glifosato en hojas. Para todos se utilizaron submuestras de 0,5 gr de tejido seco, las cuales fueron fortificadas con una solución stock de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de [1,2- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-glifosato (GLI\*) (Figura 5). En cada uno de los métodos de extracción se prepararon muestras controles, que consistieron en muestras de tejido de hoja que fueron tratadas de la misma forma que las muestras de los diferentes métodos, donde la alícuota de GLI\* fue adicionada al extracto final de la muestra. Mediante estos controles se evalúa el efecto producido por la matriz vegetal y la recuperación del método de extracción. Para cada juego de

muestras analizadas se preparó una curva estándar con seis concentraciones (0,5; 1; 10; 20; 50 y 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y con una cantidad de GLI\* equivalente a la concentración final en las muestras analizadas. Luego del paso de extracción las muestras, muestras controles y las curvas estándar fueron derivatizadas con 2 mL de una solución de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  of 9-fluorenil-metil-cloroformiato (FMOCCl) en acetonitrilo por 12 hs en oscuridad.

Posteriormente, todas las muestras fueron agitadas con 5 mL de diclorometano durante 3 min y centrifugadas a 3000 rpm. La fase hidrofílica fue filtrada a través de una malla de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  y fue colocada en un vial de 1 mL de capacidad para la determinación de glifosato mediante UHPLC-MS/MS.

El LD para glifosato y AMPA en tejido foliar fue definido como la mínima concentración a la cual el analito difiere del ruido y se obtuvo con la concentración más baja a la cual la relación señal/ruido fue 3. El LC se consideró como la mínima concentración validada por el método usando las muestras controles fortificadas con recuperaciones entre 70% y 120% y una precisión medida a través del desvío estándar relativo (DER) menor a  $\leq 20$  (Ibáñez *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos de los distintos métodos de extracción se muestran en la Tabla 1. El método 1, basado en una extracción alcalina, tuvo una tasa de recuperación baja  $< 20\%$  y un efecto matriz de interferencia alta (70%). En el método 2, basado en una extracción en fase acuosa, se obtuvo una reducción de la interferencia de la matriz del 50%, sin embargo la recuperación del GLI\* en las muestras controles fue similar al método 1. La extracción en fase acuosa resultó más satisfactoria cuando los extractos fueron tratados con un solvente orgánico, en este caso hexano (método 3); sin embargo la interferencia de la matriz fue alta. El método 4A, basado en una extracción acuosa y un paso de limpieza del extracto con 0,01 g  $\text{mL}^{-1}$  de carbón activado vegetal resultó ser el óptimo. En este método se obtuvo una precisión alta en la cuantificación del glifosato (DER  $< 20\%$ ) y una recuperación altamente satisfactoria en las muestras controles de  $110 \pm 23\%$ .



**Figura 5:** Procedimiento de extracción de glifosato y su metabolito ácido metil-fosfónico (AMPA) en hojas de *Ludwigia peploides*. GLI: glifosato. Fmoc-Cl: 9-cloroformiato de fluorenilmetilo. Gli\*: [1,2-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-glifosato.

Estos resultados están en concordancia con otros estudios en los cuales se han desarrollado métodos de extracción para plantas terrestres, basados en extracciones en fase acuosa (Hernández *et al.*, 2000; Goscinny *et al.*, 2012). El principal problema de la extracción realizada en fase acuosa es la presencia de otros compuestos solubles en agua presentes en el tejido vegetal que podrían interferir en el análisis. Para reducir esta interferencia desde la matriz es necesario implementar un paso de limpieza de la misma para eliminar estas moléculas solubles. Por ejemplo, para tejidos vegetales con alto contenido de proteínas y/o lípidos, una limpieza con un solvente orgánico resulta efectivo (Goscinny *et al.*, 2012); para un tejido rico en clorofilas es conveniente utilizar algún tipo de sorbente, como por ejemplo el carbón activado vegetal, debido a la alta afinidad de ambas moléculas (Agilent, 2016). En hojas de *Ludwigia peploides*, la limpieza del extracto con 0,01 g mL<sup>-1</sup> resultó efectiva. Una concentración mayor de carbón activado resultó en un incremento en el efecto matriz, debido posiblemente a que el carbón activado podría secuestrar moléculas de glifosato. En base a estos resultados, el método 4A fue el utilizado para los análisis posteriores de las muestras ambientales de *L. peploides*.

Los LD y LC de glifosato y AMPA en hojas de *L. peploides* fueron establecidos en 4 µg Kg<sup>-1</sup> y 12 µg Kg<sup>-1</sup> de peso seco.

**Tabla 1:** Recuperación del glifosato y efecto matriz para los diferentes métodos de extracción en hojas de *Ludwigia peploides*.

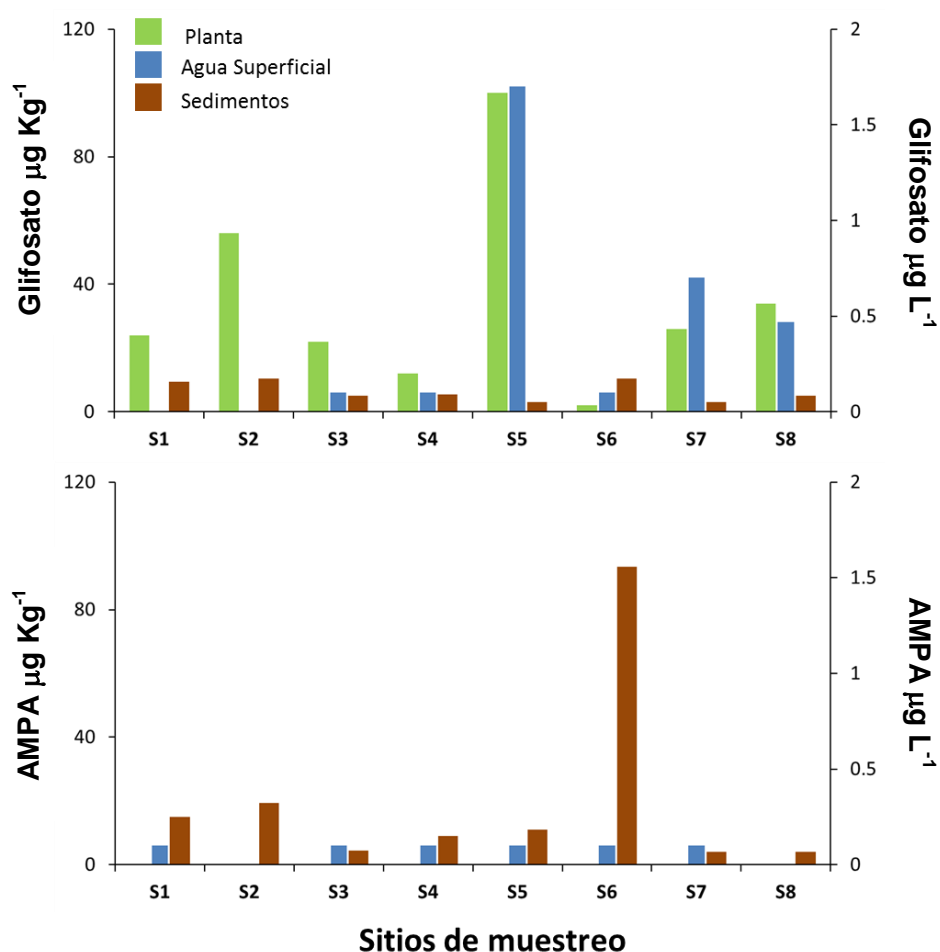
Método de Extracción	Recuperación (%)	Efecto Matriz (%)
1	< 20	70
2	< 20	50
3	40	50
4A	117 ± 20	20
4B	110 ± 23	40

## Biomonitoreo de glifosato utilizando *Ludwigia peploides*

En la campaña de cultivo que abarcó el período 2014-2015, la superficie sembrada con organismos transgénicos dentro de la cuenca del arroyo El Crespo se estimó en 147 Km<sup>2</sup> (SIIA, 2016). En relación a esto, el plaguicida más detectado en agua superficial y sedimentos durante este período de siembra fue el glifosato y su metabolito AMPA (Pérez *et al.*, 2016).

En el presente estudio, el glifosato y el AMPA fueron detectados en el 75% y el 100% de las muestras de agua superficial y sedimentos. Las concentraciones de glifosato en agua superficial oscilaron entre 0 – 1,7 µg L<sup>-1</sup> y las de AMPA entre 0 – 0,1 µg L<sup>-1</sup>, mientras que en los sedimentos los niveles variaron entre 3,0 – 10,5 µg Kg<sup>-1</sup> y 3,5 – 93,5 µg Kg<sup>-1</sup>, para glifosato y AMPA, respectivamente. La frecuencia de detección de glifosato en hojas de *L. peploides* fue de 94,1 %, mientras que no se detectaron residuos de AMPA en este tejido. Los niveles de glifosato en el tejido foliar variaron entre 4,0 y 108,0 µg Kg<sup>-1</sup> de peso seco (Figura 6).

El herbicida glifosato se detectó en todos los sitios donde se colectó *L. peploides*, incluyendo el S8 que no posee historial de aplicación de agroquímicos. Los niveles de glifosato en las hojas no mostraron un patrón definido en relación con los usos del suelo en la cuenca. En el sitio S8, donde no se usan agroquímicos, los niveles fueron similares a los detectados en sitios de muestreo adyacentes a campos agrícolas; sugiriendo que las moléculas del herbicida pueden sufrir escurrimiento superficial transportadas por el agua o por la deposición de sedimentos llegando finalmente aguas abajo y acumulándose en la biota. En el sitio S5 se detectaron los mayores niveles de glifosato, alcanzando en las hojas valores de 100,0 ± 11,3 µg Kg<sup>-1</sup> y en agua superficial de 1,7 µg L<sup>-1</sup> (Figura 6). En el resto de los sitios de muestro la acumulación de glifosato pudo ocurrir por diferentes vías de entrada del herbicida a los tejidos de *L. peploides*. En los sitios S1 y S2 donde el glifosato no fue detectado en el agua superficial circundante, los procesos de ingreso como la deposición de moléculas en las hojas flotantes o el ingreso desde los sedimentos hacia las raíces arraigadas pudo contribuir de forma sustancial.



**Figura 6:** Niveles de glifosato y ácido aminometil-fosfónico (AMPA) en *Ludwigia peploides*, agua superficial y sedimentos.

Al momento de la recolección, las plantas no presentaban manifestaciones de contacto con el herbicida a nivel macroscópico (ausencia de síntomas de clorosis o blanqueamiento de las hojas). Este hecho es importante porque la presencia de residuos de glifosato podría inducir efectos subletales a nivel suborganismo, como se han demostrado en otras especies (Boutin *et al.*, 2014) o también podría generar efectos de tipo hormético, como es el incremento en la biomasa que ha sido estudiado en especies terrestres (Cedergreen *et al.*, 2007; Cedergreen, 2008).

En el presente estudio, hemos evaluado la magnitud de los procesos de bioconcentración y bioacumulación de glifosato y AMPA en los tejidos de *L. peploides* a través de los cálculos de FBC y FABS. Ambos parámetros fueron



muy variables entre los individuos de distintos sitios respecto a el compuesto parental. Mientras que para el metabolito, no se pudieron calcular debido a la ausencia de AMPA en las hojas. En los sitios S1 y S2 donde no se detectó glifosato en agua superficial, no fue posible calcular los FBC. En los sitios restantes donde se calcularon los FBC, se observó que estos fueron muy superiores a los FABS, para cada sitio (Tabla 2), indicando que la biodisponibilidad del glifosato está dada mayoritariamente por las moléculas disueltas en el agua superficial más que por las presentes en los sedimentos.

**Tabla 2:** Factores de bioconcentración (FBC) y de acumulación biota-sedimento (FABS) de glifosato en *Ludwigia peploides*.

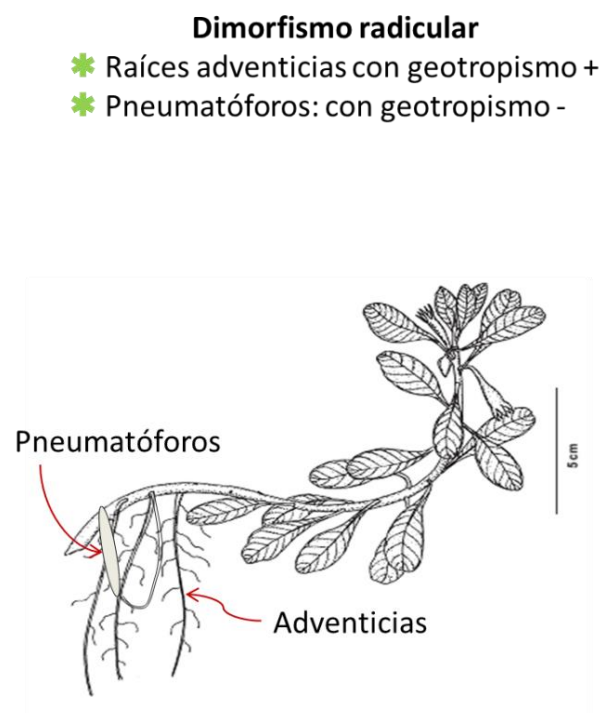
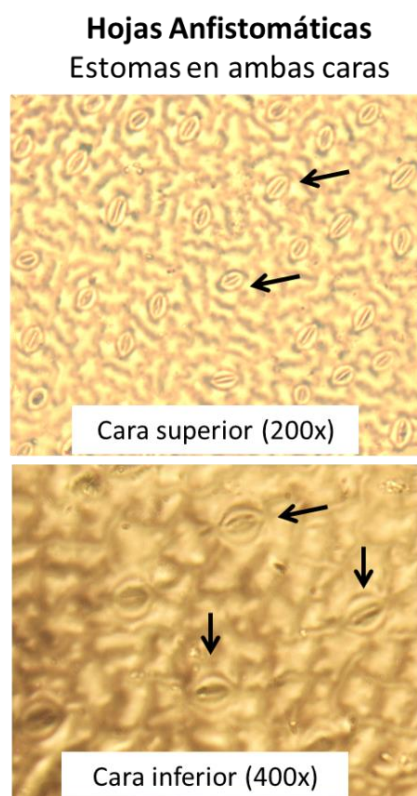
Sitio de muestreo	FBC ( $L\ g^{-1}$ )	FABS <sup>a</sup>
S1	n.c.	$2,5 \pm 0,8$
S2	n.c.	$5,4 \pm 0,5$
S3	$220,0 \pm 60$	$4,4 \pm 1,7$
S4	$120,0 \pm 80$	$2,2 \pm 2,1$
S5	$58,8 \pm 4,7$	$33,3 \pm 3,8$
S6	$20,0 \pm 20$	$0,2 \pm 0,3$
S7	$37,1 \pm 8,5$	$8,7 \pm 2,8$
S8	$68,0 \pm 4,0$	$6,8 \pm 0,6$

<sup>a</sup>: Sin unidades; n.c.: no calculado

El ingreso de glifosato en *L. peploides* podría ocurrir a través de las hojas flotantes o a través de las raíces flotantes sumergidas. En el primer caso, el ingreso por las hojas puede ocurrir por la difusión de agua principalmente teniendo en cuenta que el glifosato es una molécula altamente hidrofílica. La anatomía de las hojas puede contribuir al ingreso foliar del glifosato debido a que éstas se caracterizan por la ausencia de cutícula y la presencia de estomas en ambas caras de las hojas, hojas anfistomáticas (Bedoya y Madriñán, 2014), que incrementan la superficie de intercambio con el agua (Figura 7).

Por otro lado, la presencia de pneumatóforos en las raíces flotantes sumergidas (Figura 7) también podría facilitar el ingreso del herbicida a la

planta, debido a que los mismos están involucrados en el intercambio de sustancias e iones disueltos en agua (Ellmore, 1981; Bedoya y Madriñán, 2014). Los FABSs bajos obtenidos para el glifosato en *L. peploides* podrían ser explicados por la fuerte absorción de las moléculas a la fracción de materia orgánica de los sedimentos (datos no presentados). En este sentido, la biodisponibilidad del glifosato desde los sedimentos a las raíces arraigadas al sedimento sería baja.



**Figura 7:** Características anatómicas de las hojas y raíces de *Ludwigia peploides*. Microfotografías tomadas por la autora. Flecha: células oclusivas. Diagrama del cuerpo vegetal modificado de Cumana Campo (2010).

Hasta el momento, la degradación metabólica del glifosato en las plantas está descrita por diversos mecanismos (Duke y Powles, 2008). González-Torralva *et al.*, (2012) compararon el metabolismo en dos biotipos de *Conyza canadensis*, uno resistente y uno no susceptible. Los autores encontraron que en el primero, se produce la desaparición completa de glifosato por conversión a glioxilato, sarcosina y AMPA dentro de las primeras 96 h después del tratamiento. Sin embargo, en el biotipo susceptible, solamente se encontró glioxilato. Otros estudios han descrito la detección de residuos de AMPA en plantas tolerantes a glifosato (Cruz- Hipolito *et al.*, 2011; Rojano- Delgado *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay información disponible acerca de la biotransformación de glifosato en plantas silvestres susceptibles. Por lo tanto, la ausencia de AMPA en las hojas de *L. peploides* podría deberse a que ésta hidrófita no es capaz de metabolizar el glifosato por la vía del AMPA.

## Reflexión final

La capacidad de *L. peploides* para acumular contaminantes ha sido previamente informada para plaguicidas organoclorados, indicando junto con nuestros resultados, de acumulación del herbicida glifosato, la importancia de esta especie como un organismo biomonitor para evaluar los niveles de plaguicidas en los cuerpos de agua dulce superficiales. Asimismo, debido a su amplia distribución en las Américas, esta hidrófita puede ser propuesta para programas de biomonitoreo a gran escala.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el financiamiento otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2014-1460 otorgado a la Dra. Débora J. Pérez; PICT 2014-1462 otorgado al Dr. José Luis Costa).

## Referencias

- Agilent Technologies. 2016. Agilent Products for Solid Phase Extraction Brochure. [www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com). Consulta en línea 17 Diciembre de 2016.
- Alvarez DA, Huckins JN, Petty JD, Jones-Lepp T, Stuer-Lauridsen F, Getting DT, Goddard JP, Gravell A. 2008. Chapter 8: Tool for monitoring hydrophilic contaminants in water: polar organic chemical integrative sampler (POCIS). In Greenwood R, Mills G, Vrana B, eds, *Comprehensive Anal Chem* 48:171-197.
- Aparicio VC, De Gerónimo E, Marino D, Primost J, Carriquiriborde P, Costa JL. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-73.
- Arts G, Davies J, Dobbs M, Ebke P, Hanson M, Hommen U, Knauer K, Loutseti S, Maltby L, Mohr S, Poovey A, Poulsen V. 2010. AMEG: the new SETAC advisory group on aquatic macrophyte ecotoxicology. *Environ Sci Pollut Res*. 17:820–823.
- Bedoya AM, Madriñán S. 2014. Evolution of the aquatic habit in *Ludwigia* (Onagraceae): morpho-anatomical adaptive strategies in the Neotropics. *Aquat Bot* 120: 352–362.
- Bou Manobens J, Font Garcia J. 2016. Situació de *Ludwigia peploides* (Onagraceae) a Catalunya. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, 80, pp.57–58.
- Boutin C, Strandberg B, Carpenter D, Mathiassen SM, Thomas PJ. 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?. *Environ Poll* 185: 295-306.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. <http://www.casafe.org/publicaciones/guia-de-productos-fitosanitarios/>. Consulta en línea 20 de Octubre de 2012.
- Carvahlo RF, Bromilow RH, Greenwood R. 2007. Uptake and translocation of non-ionised pesticides in the emergent aquatic plant parrot feather *Myriophyllum aquaticum*. *Pest Manag Sci* 63:798–802.
- Cedergreen N. 2008. Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Research* 48:429–438.
- Cedergren N, Streibig JC, Kudsk P, Mathiassen SK, Duke SO. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-response* 5: 150-162.
- Connell DW. 2005. Pesticides, in Connell DW, ed, *Basic Concepts of Environmental Chemistry* 2nd ed, Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 167-189.

- Cruz-Hipolito H, Rojano-Delgado A, Domínguez-Valenzuela JA, Heredia A, Luque de Castro MD, De Prado R. 2011. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant Soil* 347: 221–230.
- Cumana Campos LJ. 2010. Clave para especies de *Ludwigia* L. (Onagraceae) de la Región Nor-Oriental e Insular de Venezuela depositadas en el herbario IRBB. *Acta Bot Venez* 33:299-327.
- Dandelot S, Verlaque R, Dutartre A, Cazaubon A. 2005. Ecological, dynamic and taxonomic problems due to *Ludwigia* (Onagraceae) in France. *Hydrobiologia* 551: 1–6.
- Discover Life. <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Ludwigia+peplodes>. Consulta en línea: 27 de Abril de 2017.
- Duke SO, Powles SB. 2008. Mini- Review glyphosate: a once- in- a- century herbicide. *Pest Manag Sci*. 64: 319- 325.
- Ellmore G. 1981. Root dimorphism in *Ludwigia peploides* (Onagraceae): structure and gas content of mature roots. *Amer J Bot* 68: 557-568.
- Freemark K, Boutin C. 1994. Nontarget-plant risk assessment for pesticide registration. *Environ Manag* 18:841–854.
- Gonzalez M, Miglioranza KSB, Grondona S, Silva Barni MF, Martinez DE, Peña A. Organic pollutant levels in an agricultural watershed: The importance of analyzing multiple matrices for assessing streamwater pollution. *Environ Sci Processes Impact* 15: 739-750.
- González-Torralva F, Rojano-Delgado AM, Luque de Castro MD, Mülleder N, De Prado R. 2012. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J Plant Physiol* 169: 1673–1679.
- Gosciny S, Unterluggauer H, Aldrin J, Hanot V, Masselter S. 2012. Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. *Food Anal Methods*, 5:1177-1185.
- Guyton KZ, 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. *Lancet Oncol* 16:490-491.
- Hernández F, Hidalgo C, Sancho JV. 2000 Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J of AOAC International* 83: 728-734.

- Himel CM. 1974. Analytical methodology in ULV. In: Pesticide application by ULV Methods. British Crop Protection Council Monograph. 11: 112–119.
- Hock P, Barber J, Diazgranados M. 2011. Phylogeny and biogeography of *Ludwigia* (Onagraceae).  
<http://2011.botanyconference.org/engine/search/index.php?func=detail&aid=345>.  
 Consulta en línea 14 de Septiembre de 2016.
- Ibañez M, Pozo OJ, sancho JV, López FJL, Hernández F. 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry J. *Chromatogr A*. 1081:145-155.
- Koskinen WC, Marek L, Hall KE. 2016. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. *Pest Manag Sci* 72: 423–432.
- Lahitte HB, Hurrell JA. 1997. Plantas de la Costa. Literature of Latin America. Colin Sharp, Buenos Aires, Argentina.
- Lewis MA. 1995. Algae and vascular plants tests, in Rand, G.M. (Ed). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment, second ed. Taylor and Francis, Washington, D.C., 135-169 pp.
- Menone ML, Pérez DJ, Lukaszewicz G, Camadro EL. 2015. Identificación de hidrófitas dulceacuícolas para estudios de genotoxicidad de contaminantes acuáticos. *J. Basic Appl. Genetics*. 26:5-13.
- Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP, Mesnage R, Vandenberg LN, vom Saal JS, Welshons WV, Benbrook CM. 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* 17:15-19.
- Okada E, Costa JL, Bedmar F. 2016. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263:78–85.
- Perez DJ, Menone ML, Doucette WJ. 2013. Root-to-shoot transfer and distribution of endosulfan in the wetland macrophyte *Bidens laevis* L. *Environ Toxicol Chem* 32: 2478–2481.
- Perez DJ, Okada E, De Gerónimo E, Aparicio VC, Menone ML, Costa JL. 2016. Dynamics of current-use pesticides in the agricultural model basin. VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC, Capítulo Argentino). Córdoba 11-14 de 2016. Argentina.

- Rojano-Delgado AM, Cruz-Hipolito H, De Prado R, Luque de Castro MD, Rodríguez Franco A. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry* 2012; 73:34–41.
- Ronco AE, Marino DJ, Abelando M, Almada P, Apartin CD. 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess* 188:458.
- Siembra, Cosecha, Producción y Rendimiento. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación. [http://www.siiia.gob.ar/\\_apps/siis/estimaciones/estoma2.php](http://www.siiia.gob.ar/_apps/siis/estimaciones/estoma2.php). Consulta en línea Septiembre de 2016.
- Turgut C. 2005. Uptake and modelling of pesticides by roots and shoots of parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). *Environ Sci Pollut Res* 12:342-346.
- Wood M. 2006. Squelching water primrose. *Agricultural Research Magazine* 54(5): 13.
- Zhang W, Jiang F, Ou J. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with 800 China as a focus. *Proc Int Acad Ecol Envir Sci* 1: 125-144.