

Artículo original

La exposición crónica al herbicida paraquat produce cambios en la sensibilidad y la demografía de *Scenedesmus quadricauda*.

Chronic exposure to paraquat affects *Scenedesmus quadricauda* sensibility and demography.

✉ María Elena Sáenz^{1,2,*}, Ricardo Santiago Martínez^{1,2}, José Luis Alberdi¹,
✉ Walter Darío Di Marzio^{1,2}

¹ Programa de Investigación en Ecotoxicología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET, Buenos Aires, Argentina

Resumen

Los herbicidas utilizados en las prácticas agrícolas constituyen un grupo de sustancias de especial interés en la evaluación de la fitotoxicidad de grupos de algas por la similitud de sus mecanismos de acción en plantas superiores, que son los organismos blanco de estas sustancias químicas, y son componente fundamental en la evaluación del riesgo ecológico. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar los cambios en el crecimiento, la sensibilidad y la demografía de *Scenedesmus quadricauda* luego de su exposición crónica a concentraciones subletales del herbicida paraquat. Para ello se incubaron poblaciones de algas en diferentes concentraciones subletales de paraquat durante cuatro meses. Se encontraron cambios en la sensibilidad al herbicida, según lo demostró el aumento de los índices de toxicidad en correspondencia con las concentraciones más altas antes de la exposición. Los experimentos con varias poblaciones antes de pre exposición y en ausencia del herbicida permitieron observar modificaciones en los modelos de crecimiento logístico que apuntan al carácter permanente de los cambios observados. Se discuten las implicaciones ambientales de este fenómeno de adaptación de las comunidades fitoplanctónicas de agua dulce en relación con el impacto del uso de herbicidas en las prácticas agrícolas.

Palabras clave: Paraquat; Algas; Subletal; Adaptación; Tolerancia.

Abstract

Herbicides used in agricultural practices are a group of substances of particular interest in evaluating phytotoxicity on algal groups due to the similarity of their action mechanisms on higher plants, which are the target organisms of these chemical substances. They are also a fundamental component in assessing ecological risk. In this study, we evaluated growth, sensitivity, and demographic changes of *Scenedesmus quadricauda* after chronic exposure to sublethal concentrations of the herbicide paraquat. To achieve this, algal populations were incubated at different sublethal concentrations of paraquat for four months. Subsequently, toxicity tests were conducted with each of these populations, revealing changes in sensitivity to the herbicide, as demonstrated by higher toxicity indices corresponding to higher pre-exposure concentrations. Experiments performed with the various pre-exposed populations in the absence of the herbicide allowed us to observe modifications in the logistic growth models suggesting a permanent nature of the changes observed. The environmental implications of this adaptation on freshwater phytoplankton communities are discussed in relation to the impact of herbicide use in agricultural practices.

Keywords: Paraquat; Algae; Sublethal; Adaptation; Tolerance.

Citación: Sáenz ME, *et al.* La exposición crónica al herbicida paraquat produce cambios en la sensibilidad y la demografía de *Scenedesmus quadricauda*. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 49(190):113-128, enero-marzo de 2025. doi: <https://doi.org/10.18257/racefyn.3089>

Editor: Elizabeth Castañeda

***Correspondencia:**

María Elena Sáenz; mesaenz@aae.org.ar;
mesaenz@unlu.edu.ar

Recibido: 9 de octubre de 2024

Aceptado: 16 de marzo de 2025

Publicado en línea: 26 de marzo de 2025



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Introducción

Los ecosistemas acuáticos expresan la tensión que se origina en los ecosistemas terrestres de la cuenca que drenan, por lo que el estado de las aguas epicontinentales de una región refleja también el de dichos ecosistemas terrestres. Todos los ecosistemas contaminados y eutrofizados son ecosistemas forzados, que funcionan bajo tensión (**Margalef, 1983**). Los efectos de esta tensión pueden manifestarse en forma inmediata o presentarse con en el tiempo y están determinados por las propiedades de la sustancia, su modo de acción y la capacidad de los organismos de metabolizarlo o biotransformarlo. Estos efectos pueden ser reversibles o irreversibles según el grado de daño producido por el tóxico. Cuando un organismo se encuentra expuesto a bajas concentraciones de una sustancia tóxica, puede excretarlo, acumularlo o iniciar sus mecanismos de detoxificación para así continuar su ciclo de vida. Las concentraciones elevadas de un tóxico o la exposición prolongada a su acción, causan eventualmente una ruptura de los procesos normales de homeostasis que ocasiona daños. Si la concentración aumenta, tales daños pueden ser irreversibles y llevar a la muerte del organismo (**Machado & Soares, 2021**).

Los estudios de ecotoxicología acuática buscan conocer los efectos directos del tóxico en los organismos, lo que es de gran interés e importancia, ya que permite estimar los efectos indirectos o interpretar situaciones específicas. Los efectos indirectos incluyen la modificación de la viabilidad de los organismos, lo que tiene implicaciones en las relaciones tróficas, al originar una nutrición disminuida, o alteraciones en la composición específica de las comunidades (**Polazzo *et al.*, 2022**).

La evaluación de la fitotoxicidad, en especial la de los herbicidas utilizados en las prácticas agrícolas, es un componente fundamental de la evaluación del riesgo ecológico (**Polazzo *et al.*, 2022**). Los productores primarios constituyen un nivel trófico esencial de cualquier ecosistema, por cuanto proveen la energía básica para las redes alimentarias acuáticas (**Wetzel, 2001**). Incluso en los sistemas donde la entrada de energía alóctona es considerable, la productividad de las algas autóctonas puede contribuir significativamente al flujo de energía del sistema. Las algas tienen un importante papel en la incorporación de nutrientes al ciclo energético del sistema y mantienen la calidad de las aguas continentales (**Reynolds, 2006**). Debido a que los cuerpos de agua naturales son los recipientes últimos de la mayoría de las sustancias liberadas al ambiente por la actividad industrial, agrícola y doméstica, la evaluación de los efectos tóxicos en las algas es particularmente crítica. El concepto de estrés o tensión en el contexto de las microalgas, se define como una disrupción del estado de homeostasis debido a diferentes estresores que incluyen sustancias como los herbicidas, y que conllevan cambios en el metabolismo celular del organismo durante la aclimatación y la recuperación del estado de homeostasis. Esa recuperación puede incluir estados de alarma, regulación, aclimatación y adaptación (**Borowitzka, 2018**).

Además de su importancia ecológica, ciertos atributos de las algas las convierten en buenas indicadoras de los cambios ambientales generados por los distintos tóxicos que entran a los sistemas. Entre los más relevantes se pueden mencionar su representatividad, dada su amplia distribución geográfica y su sensibilidad, en algunos casos, frente a una amplia gama de tóxicos a los cuales son más sensibles que otros organismos acuáticos. Además, proveen una información única con respecto a la condición del sistema debido a sus cortos tiempos de generación y a sus rápidas respuestas ante cambios ambientales, lo que les confiere una capacidad anticipatoria de los cambios adversos (**Blaise & Ferard, 2005**).

La evaluación de los potenciales efectos tóxicos de las sustancias puede hacerse a través de exposiciones a corto plazo (exposiciones agudas) o a largo plazo (exposiciones crónicas). En las evaluaciones a corto plazo, los organismos se exponen a los agentes tóxicos por algunas horas o días, y a largo plazo, estos son expuestos a bajas concentraciones de las sustancias químicas por un largo período de tiempo (semanas, meses), dependiendo de su ciclo de vida (**Blaise & Ferard, 2005**). Los herbicidas utilizados en las prácticas agrícolas

son de especial interés en la evaluación de la fitotoxicidad en grupos de algas dada su similitud con los mecanismos de acción sobre plantas superiores, que son los organismos blanco de estas sustancias químicas.

Los herbicidas paraquat y diquat pertenecen al grupo de los bipyridilos y los dos se utilizan en el control de malezas acuáticas (**World Health Organization - WHO**, 1984). El mecanismo de acción del paraquat, específicamente, involucra las reacciones de la fotosíntesis, especialmente en los fotosistemas. La ferredoxina, uno de los transportadores de electrones del fotosistema I, puede reducirse y transferir electrones a distintas sustancias. La reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) es la reacción dependiente de la ferredoxina más importante. Cuando un dipiridilo está presente, sustituye a la ferredoxina y acepta electrones del fotosistema I y, por consiguiente, se produce una inhibición en la formación de NADPH₂. Su rápida acción se explica porque el herbicida sería reducido a radicales libres que, en un ambiente aeróbico, serían inmediatamente oxidados por acción del oxígeno molecular, generando radicales superóxidos. Así, el paraquat está en condiciones de volver a aceptar otro electrón y, de esa manera, continuar generando radicales superóxidos (**WHO**, 1984; **Huang et al.**, 2019).

La generación del anión superóxido lleva a las células al estrés oxidativo, produciendo formas más tóxicas de oxígeno reducido como el peróxido de hidrógeno y los grupos hidroxilos. Estos compuestos son responsables de la peroxidación de los lípidos en reacciones en cadena, de lo que lleva a la destrucción de las membranas celulares, la inactivación de proteínas y daños en el ADN. Por otra parte, la interrupción de la formación de NADPH, una de las más importantes reacciones dependientes de ferredoxina, inhibe todos los procesos bioquímicos que requieren NADPH (**Moreland**, 1980; **WHO**, 1984).

En este estudio nos propusimos evaluar los cambios en el crecimiento, la sensibilidad y la demografía de *Scenedesmus quadricauda* después de su exposición crónica a concentraciones subletales del herbicida paraquat. La hipótesis de trabajo supuso que la exposición crónica a concentraciones subletales de contaminantes produce cambios en las respuestas observadas, la sensibilidad y la demografía de microalgas de agua dulce.

Materiales y métodos

Organismo utilizado

Se utilizó la cepa 276/21 de la especie *Scenedesmus quadricauda* (división Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Chlorococcales, familia Scenedesmaceae), proveniente de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos del Institute of Freshwater Ecology (CCAP) del Reino Unido. Esta cepa se mantiene en el cepario del Programa de Investigación en Ecotoxicología de la Universidad Nacional de Luján, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Sustancias utilizadas

Se utilizó una formulación comercial con 27,6 % del principio activo del paraquat. Este herbicida está clasificado como de Clase II según la categorización toxicológica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA N 350/1999) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las cuales lo definen como moderadamente peligroso (banda amarilla en la etiqueta), o como uno que normalmente no presenta peligro (banda verde en la etiqueta) (**CASAFE**, 2024). En el caso particular del paraquat, se indica que es “ligeramente tóxico para peces, moderadamente tóxico para abejas y aves y por ingestión tóxico para mamíferos”. A pesar de tratarse de un herbicida, no se mencionan riesgos ni toxicidad para organismos vegetales inferiores ni superiores. Las diferentes concentraciones utilizadas en los experimentos se expresaron en miligramos de ingrediente activo de paraquat por litro (mg Pq i.a/l).

Experimentos de exposición crónica a concentraciones subletales

Para estudiar el efecto de la exposición prolongada a concentraciones subletales del paraquat en el crecimiento poblacional, se incubaron poblaciones de algas *S. quadricauda* en medio nutritivo adicionado con concentraciones subletales del herbicida, determinadas

a partir de estudios de toxicidad anteriores. Las concentraciones utilizadas fueron 0,05, 0,1, 0,2 y 0,8 mg Pq i.a/l en cuatro poblaciones preexpuestas, etiquetadas como B, C, D y E. La incubación se hizo en medio de control exento de herbicida, serie a la que se denominó A.

El medio nutritivo utilizado se preparó adicionando las soluciones de macronutrientes y micronutrientes a agua Milli-Q®. La formulación del medio nutritivo, así como las concentraciones finales de cada elemento, se presenta en la **Tabla 1 (U.S. Environmental Protection Agency - US EPA, 2002)**. El pH del medio se ajustó a 7,5 (± 1) utilizando soluciones de 0,1 de N NaOH o HCl, como se describe en **US EPA (2002)**, **Sáenz & Di Marzio (2009)** y **Sáenz *et al.* (2012)**. La dureza media del medio resultante fue de 200 mg/l (as CaCO₃) y la alcalinidad media de 50 mg/l (as CaCO₃). El medio se filtró a través de una membrana de 0,45 μ m de poro y se esterilizó en autoclave a 120 °C por 15 minutos antes de emplearlo. El tiempo de incubación o preadaptación fue de cuatro meses, en condiciones controladas de 24 °C \pm 1 °C y 86 \pm 8,6 μ E/m²/s de iluminación y recambio mensual de las soluciones del herbicida y los controles (**US EPA 2002**).

Ensayos con las poblaciones preexpuestas a las concentraciones subletales

Al cabo de la preadaptación, los cultivos pre-expuestos a las diferentes concentraciones subletales del herbicida, así como los controles (sin herbicida), se centrifugaron y se utilizaron después en los ensayos, siguiendo las recomendaciones de **US EPA (2002)** y los métodos descritos en **Sáenz y Di Marzio (2009)** y **Sáenz *et al.* (2012)**. Los ensayos consistieron en exponer una densidad inicial conocida de células de algas provenientes de las poblaciones preexpuestas a un rango de concentraciones más amplio, el cual incluyó las mismas concentraciones subletales y otras superiores. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml del medio nutritivo esterilizado ya descrito

Tabla 1. Concentraciones finales de macronutrientes y micronutrientes en el medio de cultivo (US EPA 2002)

Macronutrientes	Concentración (mg/l)	Elemento	Concentración (mg/l)
NaNO ₃	25,5	N	4,20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12,2	Mg	2,90
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,41	Ca	1,20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,7	S	1,91
K ₂ HPO ₄	1,04	P	0,186
NaHCO ₃	15,0	Na	11,0
		K	0,469
		C	2,14
Micronutrientes			
H ₃ BO ₃	185,0	B	32,5
MnCl ₂ ·4H ₂ O	416,0	Mn	115,0
ZnCl ₂	3,27	Zn	1,57
FeCl ₃ ·6H ₂ O	160,0	Fe	33,1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,43	Co	0,354
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,26	Mo	2,88
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012	Cu	0,004
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300	--	--
Na ₂ SeO ₄	2,39	Se	0,91

suplementado con las distintas concentraciones del herbicida a las que se agregó el volumen apropiado a partir de una solución stock. El medio nutritivo sin herbicida se consideró como control. Los cultivos tratados y los controles se hicieron por triplicado. La exposición duró 11 días bajo las mismas condiciones ya mencionadas: $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $86 \pm 8,6\text{ }\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de iluminación continua, con una agitación de 100 rotaciones por minuto (rpm) en un agitador orbital (Forma®). Los matraces se ubicaron al azar en el agitador diariamente. A intervalos regulares se estimó la densidad celular mediante recuento de células utilizando un microscopio Nikon®, modelo Eclipse 600. El conteo celular se expresó como número de células/ml. A las 96 horas de exposición se estimaron las concentraciones inhibitorias (CI₅₀) de cada población preexpuesta y de los controles mediante el método de interpolación lineal para crecimiento de algas utilizando el *software* ICPIN Versión 2.0 (US EPA Duluth MN USA). Las comparaciones entre las CI₅₀ a las 96 horas en las distintas poblaciones tratadas y los controles se hicieron mediante análisis de la varianza (Sprague, 1990).

Para analizar las diferencias observadas entre el crecimiento de las poblaciones expuestas de forma crónica a las concentraciones subletales del herbicida y el de las de control, mantenidas en las mismas condiciones de experimentación, se recurrió a un análisis de varianza (ANOVA) combinado con la prueba de Dunnett ($\alpha < 0,05$) de las pendientes de las distintas curvas de crecimiento ajustadas al modelo exponencial (Sparks, 2000; Zar, 2010).

Experimentos con las poblaciones preexpuestas en ausencia de herbicida

Para determinar si las diferencias observadas en el crecimiento en los ensayos anteriores eran transitorias o permanentes, se analizó el crecimiento de las poblaciones preexpuestas a las concentraciones subletales en un medio nutritivo exento de paraquat por 21 días. Simultáneamente se estudió el crecimiento de poblaciones no preexpuestas, con el fin de comparar los modelos de crecimiento de las poblaciones tratadas con los de las poblaciones de control. Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo logístico de crecimiento:

$$N = N_{\text{máx}} * \left(\frac{1}{1 + e^{-r(T-t_m)}} \right)$$

donde N máx es el número de células máximo, r es la tasa de crecimiento y t_m es el tiempo medio.

Para el análisis de las diferencias observadas entre los modelos de crecimiento de las poblaciones preexpuestas a las concentraciones subletales sin paraquat por 21 días y los controles, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) combinado con las pruebas de Dunnett y de Tuckey ($\alpha < 0,05$) de las constantes r (tasas de crecimiento) y N máx (número de células máximo) de los modelos de crecimiento logístico. Todos los análisis de varianza (ANOVA) se hicieron con el programa TOXSTAT versión 3.5 (West Inc and Gulley, 1996).

Resultados y discusión

Ensayos de toxicidad con la población de control (A)

En los ensayos llevados a cabo con la población de control (A), se registró un incremento del crecimiento superior al observado en las poblaciones expuestas a las diferentes concentraciones del herbicida. Las tasas de crecimiento de las poblaciones expuestas a concentraciones entre 0,05 y 0,4 mg Pq i.a./l no difirieron significativamente de aquellas de las poblaciones de control. Sin embargo, las poblaciones expuestas a 0,8 y 1,6 mg Pq i.a./l presentaron tasas de crecimiento de 0,279 y 0,19, respectivamente, resultando significativamente menores a los controles (ANOVA + prueba de Dunnett con $\alpha < 0,05$). Las poblaciones expuestas a 3,2 y 6,4 mg Pq i.a./l presentaron una inhibición total del crecimiento (**Figura 1, Tabla 2**).

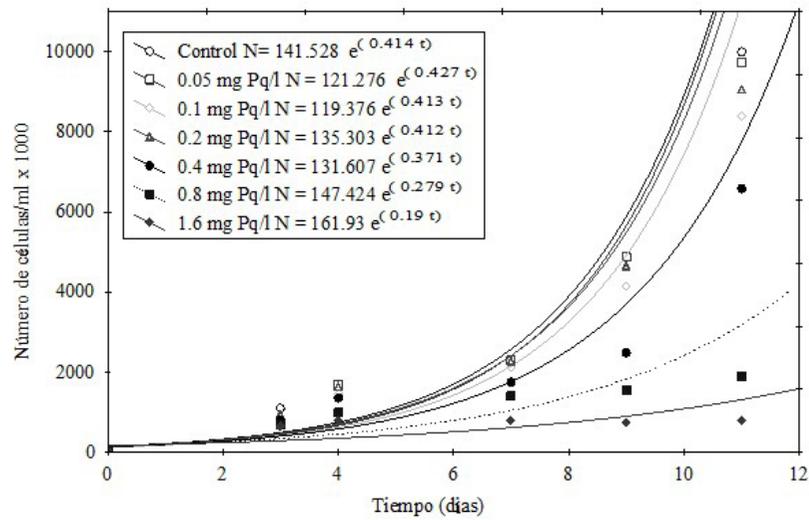


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en los ensayos de toxicidad de la serie A (población sin preexposición al herbicida)

Tabla 2. Tasas de crecimiento de las poblaciones de control y preexpuestas a las distintas concentraciones subletales (serie A: control sin preadaptación, serie B: 0,05, serie C: 0,1, serie D: 0,2 y serie E: 0,8 mg Pq i.a./l)

mg Pq i.a./l	A	B	C	D	E
0	0,414	0,448	0,399	0,442	0,406
0,05	0,427	0,460	0,440	ND	ND
0,1	0,413	0,449	0,434	0,444	ND
0,2	0,412	0,445	0,425	0,459	0,422
0,4	0,371	0,409	0,384	0,418*	0,423
0,8	0,279*	0,276*	0,251*	0,375*	0,414
1,6	0,190*	0,190*	0,237*	0,352*	0,364*
3,2	0	0	0	0,256*	0,258*
6,4	0	0	0	0,119*	0,191*

*Diferencias significativas en ANOVA y prueba de Dunnett (p<0,05)
ND: no determinada

Ensayos de toxicidad con las poblaciones preexpuestas a 0,05 (B) y 0,1 (C) mg Pq i.a./l

En los ensayos de toxicidad llevados a cabo en las poblaciones preexpuestas a 0,05 (B) y 0,1 (C) mg Pq i.a./l, se obtuvieron resultados similares a los observados en la serie de ensayos A. Las poblaciones expuestas a 0,05 mg Pq i.a./l (serie B) registraron una tasa de crecimiento levemente mayor, pero esta diferencia no fue significativa comparada con la tasa de crecimiento de los controles. Las poblaciones de algas expuestas a 0,05 y 0,1 mg Pq i.a./l en la serie de ensayos C presentaron una tasa de crecimiento superior, de 11 % y 9 %, respectivamente, con respecto a la de los controles.

Las poblaciones expuestas a 0,8 y 1,6 mg Pq i.a./l presentaron tasas de crecimiento de 0,276 y 0,19, respectivamente, en los ensayos de la serie B (0,05 mg Pq i.a./l) y de 0,251 y 0,237, respectivamente, en la serie C (0,1 mg Pq i.a./l), resultando significativamente menores (p<0,05) a las registradas en las poblaciones de control.

El crecimiento de las poblaciones expuestas a 3,2 y 6,4 mg Pq i.a./l fue inhibido de forma total (100 %) (Figura 2, Figura 3, Tabla 2).

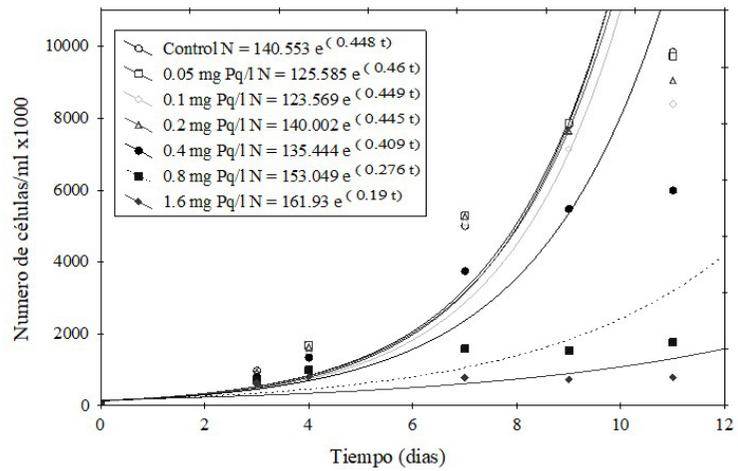


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en los ensayos de toxicidad de la serie B (población preexpuesta a 0,05 mg Pq i.a./l)

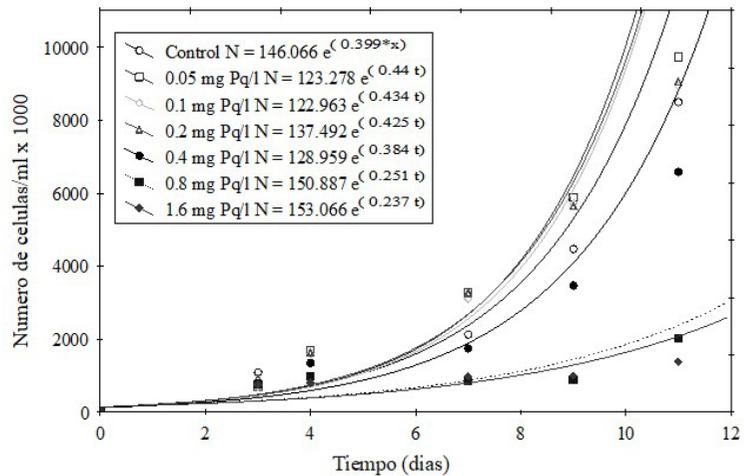


Figura 3. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en los ensayos de toxicidad de la serie C (población preexpuesta a 0,1 mg Pq i.a./l)

Ensayos de toxicidad con la población preexpuesta a 0,2 mg Pq i.a./l (D)

En los ensayos con la población de algas preexpuesta a 0,2 mg Pq i.a./l se observó que en esa concentración del herbicida el crecimiento fue un 3 % superior (tasa de crecimiento = 0,459) a la de la población de control (tasa de crecimiento = 0,442) (Tabla 2). A partir de concentraciones de exposición de 0,4 mg Pq i.a./l, se observó una reducción significativa de las tasas de crecimiento con respecto a la de la población de control.

En esta serie de ensayos se observaron notables diferencias en el crecimiento de las poblaciones de algas, ya que, al contrario de lo observado en las series de ensayos precedentes (A, B y C), las poblaciones expuestas a 3,2 y 6,4 mg Pq i.a./l tuvieron una tasa de crecimiento de 0,256 y 0,119, respectivamente (Figura 4, Tabla 2).

Ensayos de toxicidad con la población preexpuesta a 0,8 mg Pq i.a./l (E)

A lo largo de los ensayos de toxicidad en la población de algas preexpuesta a 0,8 mg Pq i.a./l se registró un aumento en la tasa de crecimiento de las poblaciones expuestas a 0,2 y 0,4 mg Pq i.a./l de un 3 % con respecto a este mismo parámetro en la población de control (Tabla 2).

La población expuesta a 0,8 mg Pq i.a./l presentó una tasa de crecimiento 1,9 % superior a la de la población de control (Tabla 2). Se observó un crecimiento de igual magnitud en las poblaciones expuestas a 3,2 mg Pq i.a./l comparado con el registrado en los ensayos de la serie D en el grupo de tratamiento expuesto a la misma concentración del tóxico (tasa de crecimiento de 0,258).

La población expuesta a 6,4 mg Pq i.a./l experimentó un mayor crecimiento en esta serie que el registrado en los ensayos de la serie D de exposición a la misma concentración (tasa de crecimiento en la serie E de 0,191; tasa de crecimiento en la serie D de 0,119) (Figura 5, Tabla 2).

Si bien las evaluaciones descritas se hicieron durante 11 días de exposición, al cabo de las primeras 96 horas se estimó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀ 96 horas) para cada serie de ensayos. Los valores alcanzados por el índice estimado se observan en la Tabla 3.

Según los resultados obtenidos, los valores de las CI₅₀ a las 96 horas significativamente superiores correspondieron a aquellas poblaciones de algas de *S. quadricauda* preexpuestas

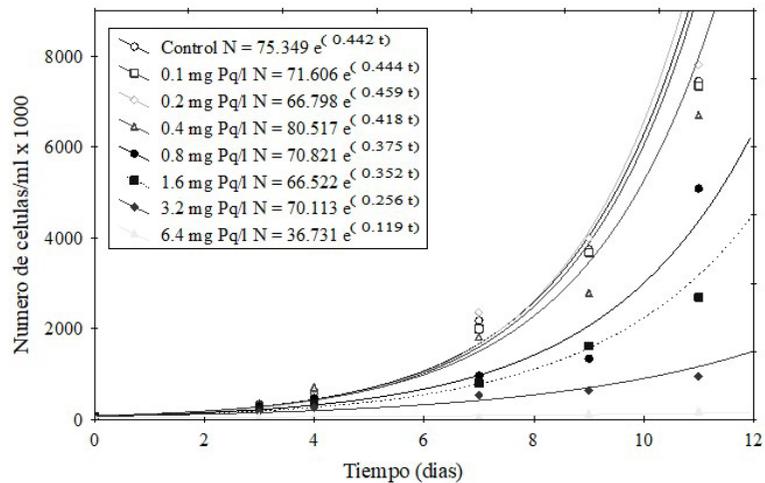


Figura 4. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en los ensayos de toxicidad de la serie D (población preexpuesta a 0,2 mg Pq i.a./l)

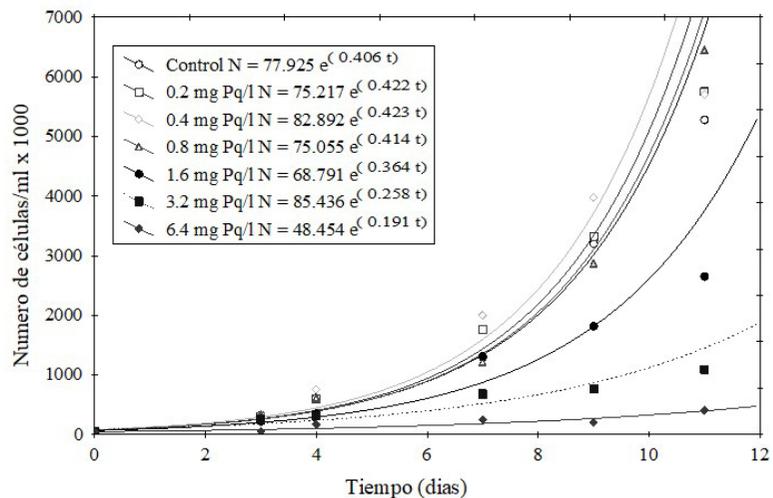


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en los ensayos de toxicidad de la serie E (población incubada con 0,8 mg Pq i.a./l)

Tabla 3. CI_{50} -96 horas (mg Pq i.a./l) estimadas en los ensayos de toxicidad utilizando las poblaciones preexpuestas a 0,05, 0,1, 0,2 y 0,8 mg Pq i.a./l y en ausencia de tóxico (0). Entre paréntesis se indican los intervalos de confianza del 95 %

0	0,05	0,1	0,2	0,8
1,10 (0,8 – 1,4)	1,01 (0,79 – 1,24)	0,98 (0,79 – 1,18)	1,88* (1,47 – 2,29)	3,13* (2,56 – 3,93)

*Diferencias significativas en ANOVA y prueba de Dunnett ($p < 0,05$)

que se expusieron a concentraciones subletales en el rango de 0,2 a 0,8 mg Pq i.a./l. Las diferencias entre los valores de las CI_{50} a las 96 horas de la población control y las preexpuestas a 0,05 y 0,1 mg Pq i.a./l no fueron significativas ($p > 0,05$).

Las poblaciones que presentaron una total inhibición del crecimiento en las series A, B y C (3,2 y 6,4 mg Pq i.a./l) registraron un crecimiento significativo comparado con el de los controles cuando se las sometió a las condiciones de exposición de las series D y E, aunque con tasas de crecimiento significativamente inferiores ($p < 0,05$) que las de las poblaciones de control (**Figura 4, Figura 5**).

Además, según lo observado en los experimentos con las series C, D y E, las poblaciones de algas registraron un crecimiento superior (9, 3 o 2 %) con la concentración de tóxico seleccionada para su preexposición que el observado en las otras poblaciones expuestas, incluidos los controles no expuestos a la adición de tóxico (**Figura 3, Figura 4**).

Evaluación del crecimiento de las poblaciones preexpuestas incubadas en ausencia de tóxico

Con el fin de estudiar si las modificaciones observadas en el crecimiento de las distintas poblaciones preexpuestas al herbicida comparadas con los controles eran transitorias o permanentes, se incubaron las distintas poblaciones preexpuestas en ausencia del herbicida paraquat por un período de 21 días para comprobar si las poblaciones preexpuestas se comportaban igual que los controles en ausencia del herbicida y establecer si las diferencias observadas en su crecimiento se trataban de un fenómeno transitorio (aclimatación) ocasionado por la presencia del herbicida. Si por el contrario se observaba una modificación en sus constantes de crecimiento, aún sin herbicida, las diferencias observadas responderían a un fenómeno permanente relacionado con su proceso de adaptación. Las poblaciones utilizadas en estos experimentos correspondieron a los controles de las series de ensayos B, C, D, y E. Simultáneamente, se estudió el crecimiento de poblaciones no preexpuestas (correspondientes a los controles en la serie de ensayos A), con el fin de compararlo con el de modelos de crecimiento en una población no tratada. Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo de crecimiento logístico según lo mencionado en Materiales y métodos.

Las constantes de los modelos logísticos correspondientes a cada población preexpuesta y a las de control se presentan en la **Figura 6** y la **Tabla 4**.

Se observaron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las poblaciones preexpuestas a 0,1 y 0,2 mg Pq i.a./l y las de las poblaciones de control. Las diferencias observadas entre las tasas de crecimiento de las poblaciones preexpuestas a 0,05 y 0,8 mg Pq i.a./l y las de control no fueron significativas (ANOVA + Dunnett, $p > 0,05$). Cuando se analizaron las diferencias observadas entre las diferentes concentraciones de preexposición, se observó que las tasas de crecimiento de las poblaciones preexpuestas a 0,2 y 0,8 difirieron significativamente entre sí (ANOVA + Tuckey, $p < 0,05$) (**Figura 6, Tabla 4**).

El análisis de los N máx indicó que las poblaciones preexpuestas a 0,2 y 0,8 mg Pq i.a./l presentaron constantes significativamente diferentes al control (ANOVA + Dunnett, $p < 0,05$). Por otra parte, los N máx de las poblaciones preexpuestas a 0,05 y 0,1 mg Pq i.a./l no difirieron de la constante correspondiente a la población de control (ANOVA + Dunnett, $p > 0,05$). Al analizar las diferencias encontradas entre las distintas poblaciones

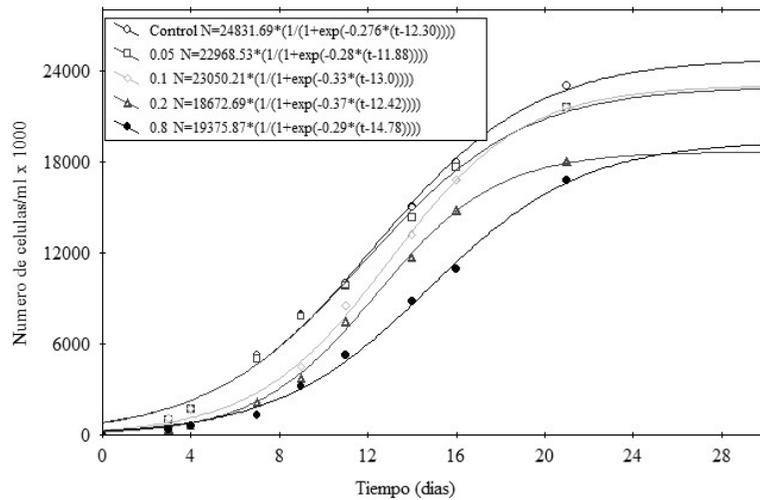


Figura 6. Curvas de crecimiento de poblaciones de *Scenedesmus quadricauda* de control y de las preexpuestas a concentraciones subletales de paraquat e incubadas por 21 días en medio nutritivo en ausencia del herbicida

Tabla 4. Constantes de los modelos logísticos de crecimiento de las poblaciones de control y las preexpuestas a las distintas concentraciones subletales incubadas en ausencia de paraquat

mg Pq i.a./l	N máx	r	tm
0	24831,69	0,27	12,30
0,05	22968,53	0,28	11,88
0,1	23050,21	0,33*	13,0
0,2	18672,69*	0,37*#	12,42
0,8	19375,87*	0,29*#	14,78

*Diferencias significativas en ANOVA y prueba de Dunnett (p<0,05)

#Diferencias significativas en ANOVA y prueba de Tuckey (p<0,05)

preexpuestas, los N máx de las poblaciones expuestas a 0,2 y 0,8 mg Pq i.a./l no difirieron entre sí, como tampoco los N máx estimados para las poblaciones preexpuestas a 0,05 y 0,1 mg Pq i.a./l (ANOVA + Tuckey, p>0,05) (**Figura 6, Tabla 4**).

Del análisis de estas experiencias podemos reconocer distintas combinaciones en los modelos de crecimiento. La población preexpuesta a 005 alcanzaría Nmáx similares al control, con tasas de crecimiento también similares. En este caso, la población preexpuesta incubada en medio exento de tóxico presentó un modelo de crecimiento similar al control, es decir, no habrían existido cambios originados por la acción de concentraciones subletales de paraquat de 0,05 mg Pq i.a./l.

Las poblaciones preexpuestas a 0,1 mg Pq i.a./l. alcanzarían N máx similares al control, pero a expensas de una tasa de crecimiento mayor. Las poblaciones preexpuestas a 0,2 y 0,8 mg Pq i.a./l. se verían imposibilitadas de alcanzar el N máx de la población de control. Al analizar las tasas de crecimiento de ambas poblaciones, se observa que la población preexpuesta a 0,2 mg Pq i.a./l. alcanza un Nmáx similar al alcanzado por la preexpuesta a 0,8 mg Pq i.a./l., pero con una mayor producción de células por unidad de tiempo. La concentración subletal de paraquat de 0,8 mg Pq i.a./l no habría originado cambios en la tasa de crecimiento de estas poblaciones, ya que la misma es similar a la hallada para la población de control.

Podemos concluir que la preexposición a concentraciones subletales entre 0,1 y 0,8 mg Pq i.a./l habría determinado cambios permanentes e irreversibles en las poblaciones de algas de la cepa de *S. quadricauda*, ya que al ser incubadas en ausencia de tóxico presentaron modificaciones en las constantes de los modelos de crecimiento significativamente diferentes a las observadas en las poblaciones de control no preexpuestas. Estas concentraciones subletales de preexposición al paraquat habrían afectado el modelo de crecimiento, no solo en lo relativo a la demografía de las algas sino también a la sensibilidad al herbicida, según lo demostraron los índices de toxicidad mayores en correspondencia con una mayor concentración de preexposición.

A partir de los resultados obtenidos es posible postular que las concentraciones subletales del herbicida paraquat en el rango entre 0,2 y 0,8 mg Pq i.a./l generarían poblaciones resistentes de *S. quadricauda*. Esta resistencia o tolerancia se incrementaría proporcionalmente al aumento de la concentración subletal a la que las poblaciones estuvieron preexpuestas.

Dicha resistencia o tolerancia puede deberse a mecanismos de aclimatación o de adaptación. En el primer caso, se trataría de la modificación de los niveles de expresión de genes ya presentes en el genoma de las algas, en tanto que en el segundo caso, se trataría de la selección de nuevas variantes genotípicas que aparecerían al azar debido a mutaciones espontáneas. Existen antecedentes bibliográficos sobre la inducción de la resistencia a herbicidas y contaminantes en grupos de algas y se han propuesto distintos mecanismos como los cambios en las secuencias de ADN, los efectos epigenéticos, los cambios en las tasas de crecimiento, interpretados como un costo fisiológico ante la acción del herbicida, o la existencia de mutaciones que afectarían la fisiología celular, entre otros (**Belfiore & Anderson**, 2001; **Funke et al.**, 2006; **Prado et al.**, 2009; **Vogwill et al.**, 2012; **Kronholm et al.**, 2017; **Borowitzka**, 2018; **Fugere et al.**, 2020; **Melero-Jiménez et al.**, 2021).

En cuanto a las implicaciones de este fenómeno en las comunidades naturales, **Bai et al.** (2019) estudiaron la sensibilidad diferencial de grupos de algas frente a este herbicida y concluyeron que los contaminantes ejercen una presión de selección sobre los componentes de la comunidad fitoplanctónica, modificando y moldeando su estructura. La resistencia a este herbicida ha sido registrada por **Jindakaraked et al.** (2023) para cepas microbianas, lo que ha resultado en su utilización en la remoción del paraquat de aguas contaminadas. También deben mencionarse estudios anteriores en ambientes naturales que ya mencionaban la evidencia de resistencia a herbicidas. En este sentido, **De Noyelles et al.** (1982) (en **Kosinski & Merkle**, 1984) observaron en una laguna tratada con 0,5 mg/kg de atrazina el desarrollo de una flora resistente al herbicida. **Valentine y Bingham** (1976) (en **Kosinski & Merkle**, 1984) hallaron una cepa natural de *Euglena* sp. resistente que se desarrollaba con éxito en presencia de 10 mg/kg de atrazina. **Kosinski y Merkle** (1984) realizaron estudios en comunidades de algas en arroyos, con el fin de determinar la magnitud de los efectos crónicos producidos por la exposición a herbicidas, entre ellos la atrazina y el paraquat, y establecer, así, si la exposición a bajas concentraciones de los herbicidas podía inducir resistencia. Los autores concluyeron que existirían evidencias de inducción de formas resistentes debido al estrés crónico asociado con la exposición al herbicida paraquat.

También hay antecedentes bibliográficos relacionados con la acción mutagénica y genotóxica del paraquat en organismos procariotas, algas y plantas vasculares. Así, se han hecho estudios sobre la acción genotóxica del paraquat en *Escherichia coli* (**Machigov et al.**, 2022) y *Chlamydomonas reinhardtii* (**Jamers & De Coen**, 2010), y sobre plantas vasculares como *Conyza*, *Erigeron philadelphicus*, *E. canadensis*, *Nicotiana tabacum*, *Lolium perenne* y *Arabidopsis thaliana* (**Miller & Hughes**, 1980; **Fuerst et al.**, 1985; **Tanaka et al.**, 1986; **Jansen et al.**, 1989; **Hawkes**, 2014; **Brunharo & Hanson**, 2017; **Nazish et al.**, 2022).

Diversos autores han postulado que el paraquat presenta actividad y capacidad mutagénica debido a su disponibilidad para la generación de radicales libres, ocasionando una cascada de eventos que incluyen la elevada expresión de las enzimas relacionadas con

el sistema de defensa antioxidante, alteraciones del metabolismo energético, daños en el ADN por acción genotóxica, y alteraciones subcelulares que resultan en citotoxicidad y apoptosis (Prado *et al.*, 2009; Jamers & De Coen, 2010; Brunharo & Hanson, 2017; Gravina *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021; Nazish *et al.*, 2022; Bai *et al.*, 2023; Rychel *et al.*, 2023). La preexposición a concentraciones subletales puede incrementar la resistencia mediante la activación de las enzimas encargadas de los mecanismos de detoxificación. Estos mecanismos incluyen el sistema de las enzimas oxidasas de función mixta (OFM) y las enzimas del mecanismo de defensa antioxidante, tal como la enzima superóxido dismutasa, las cuales aumentan su actividad en presencia de sustancias generadoras de radicales libres, como es el caso del paraquat (Jamers & De Coen, 2010; Bai *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2023).

Kao y Hassan (1985) realizaron estudios para establecer las bases bioquímicas de la tolerancia al paraquat de una cepa mutante de *E. coli*. Los autores estudiaron el incremento en la producción de la enzima superóxido dismutasa de la cepa mutante y la compararon con la de una cepa no tolerante al paraquat. Los resultados indicaron que no hubo diferencias en la inducción de la actividad enzimática de las cepas; se encontró que el mecanismo por el cual el mutante presentaba tolerancia al tóxico estaba asociado a alteraciones en las proteínas de la membrana celular, responsables del transporte activo que incorpora el Pq^{+2} extracelular. En estudios más recientes que combinan genómica, transcriptómica y metabolómica se ha demostrado que las deleciones, amplificaciones y duplicaciones del genoma pueden alterar directamente la expresión de los genes, afectando los mecanismos de transporte de las membranas, en tanto que las mutaciones pueden cambiar la expresión de los genes implicados, afectando la regulación de las respuestas frente al estrés, principalmente por dañar las enzimas que contienen hierro, así como el ADN, y provocar cambios en rutas metabólicas (Rychel *et al.*, 2023).

Según estos antecedentes, la tolerancia observada en las poblaciones de *S. quadricauda* preexpuestas sugeriría una mutación ocasionada por la exposición al paraquat. Sin embargo, si bien las modificaciones en los modelos de crecimiento logístico observadas en nuestros experimentos con las distintas poblaciones preexpuestas en ausencia del herbicida serían de carácter permanente, no se exploró esta hipótesis.

Habría que evaluar la posibilidad de que la tolerancia estuviera determinada por alteraciones generadas en la biosíntesis de las enzimas responsables de los mecanismos de detoxificación y del sistema de defensa antioxidante en cuanto a su actividad. La exploración de estas hipótesis será motivo de futuros estudios.

Con respecto a las consideraciones ambientales del uso de este herbicida y su impacto en las comunidades vegetales, es importante destacar que el paraquat causa efectos adversos en las *Clorofitas* de agua dulce con menores concentraciones de exposición que otros herbicidas usados frecuentemente en prácticas agrícolas, como el glifosato o el 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Sáenz *et al.*, 1997a; Sáenz *et al.*, 1997b; Wong, 2000; Sáenz & Di Marzio, 2009). Este hecho revela el importante impacto de este herbicida sobre organismos que no son su blanco, ya que las algas *Clorofitas* constituyen los principales componentes de las comunidades fitoplactónicas de los sistemas acuáticos dulceacuícolas. En particular, los estudios realizados sobre la acción de este herbicida en distintos parámetros de *S. quadricauda* Berb 614 demuestran que las concentraciones de 0,02 y 0,2 mg Pq i.a./l produjeron una inhibición significativa de la tasa de crecimiento y del contenido de clorofila a, mientras que las concentraciones mayores a 2 mg Pq i.a./l causaron una inhibición total del crecimiento y de la síntesis de ese pigmento (Wong, 2000). Se determinó la acción de este herbicida sobre la tasa fotosintética, reportándose una inhibición del 60 % con concentraciones de exposición de 0,2 mg Pq i.a./l, en tanto que lo misma no se detectó con concentraciones mayores a 2 mg Pq i.a./l (Wong, 2000). Sáenz *et al.* (1997a) en sus estudios sobre la acción de este herbicida en distintas cepas de la misma especie y otras especies de algas *Clorofitas* llegaron a conclusiones similares. Las concentraciones de 0,1 mg Pq I.a./l ejercieron una inhibición significativa del crecimiento

en una cepa de *S. quadricauda* aislada del río Luján (Provincia de Buenos Aires, Argentina), y el mismo efecto se observó con concentraciones de 0,8 mg Pq i.a./l en la cepa de *S. quadricauda* (CCAP 276-21). También se observó este efecto en *S. acutus* (SAG 276-3a) con concentraciones de 0,05 mg Pq i.a./l, lo que demostró una mayor sensibilidad de esta especie al herbicida paraquat (Sáenz *et al.*, 1997a). La inhibición significativa del crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum* se registró con concentraciones de 0,1 y 0,2 mg Pq i.a./l, respectivamente (Sáenz *et al.*, 1997a). Con respecto a las concentraciones ambientales esperables (CAE) de este herbicida, teniendo en cuenta su tasa de aplicación en prácticas agrícolas, Wong (2000) comparó los efectos registrados con las CAE reportadas por Peterson *et al.* (1994) para el paraquat de 0,8 mg Pq i.a./l. Debe mencionarse, en este sentido, que el paraquat se utiliza en la Provincia de Buenos Aires también para el control de malezas acuáticas de lagunas abiertas al público con fines recreativos en la dosis de aplicación recomendada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), es decir, entre 0,1 y 2 mg Pa i.a./l., por lo que es posible que las concentraciones de este herbicida en ambientes acuáticos superen ampliamente las CAE reportadas en ambos estudios.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos podríamos postular que las concentraciones de paraquat inferiores a las consideradas letales producirían cambios irreversibles en la demografía de las poblaciones de algas, ocasionando la modificación de los modelos de crecimiento y provocando una menor sensibilidad a los tóxicos presentes en los ambientes acuáticos. El impacto de las concentraciones crecientes de herbicidas en los ecosistemas acuáticos continentales en áreas de actividad agrícola, además de su uso en el control de malezas acuáticas, involucraría cambios en la composición específica de las comunidades fitoplanctónicas debido a la selección de especies resistentes y la desaparición de otras más sensibles, lo que, además, afecta la demografía de las poblaciones de algas y la integridad de la comunidad en su conjunto.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Luján y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo que hizo posible el desarrollo de este estudio.

Contribución de los autores

Conceptualización, diseño, metodología, supervisión, redacción, revisión y edición: MES. Conceptualización, conservación y análisis de datos, manejo de *software*, adquisición de fondos: WDDM. Análisis, adquisición de datos y determinaciones de laboratorio: RSM y JLA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses relacionado con la publicación de este artículo.

Referencias

- Bai, F., Jia Y., Yang, C., Li, T., Wu, Z., Liu, J., Song, L. (2019). Multiple physiological response analyses aid the understanding of sensitivity variation between *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella* sp. under paraquat exposures. *Environmental Sciences Europe*, 31, 83. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0255-4>
- Bai, F., Jia, Y., Li, J., Wu, Z., Li, L., Song, L. (2023). Paraquat induces different programmed cell death patterns in *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella luteoviridis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114429. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114429>
- Belfiore, N.M. & Anderson, S. L. (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489 (2-3), 97-122. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(01\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(01)00065-5)

- Blaise, C. & Féraud, J.** (2005). *Small-scale freshwater toxicity investigations. Volume 1: Toxicity test methods*. Springer. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3120-3>
- Borowitzka, M. A.** (2018). The 'stress' concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Apply Phycology*, 30, 2815-2825. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1399-0>
- Brunharo, C.A. & Hanson, B.D.** (2017). Vacuolar sequestration of Paraquat is involved in the resistance mechanism in *Lolium perenne* L. spp. *multiflorum*. *Frontiers in plant science*, 8, 290157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01485>
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE).** (2024). Uso responsable de fitosanitarios: lectura de etiqueta. <https://www.casafe.org/pdf/emerg.pdf>.
- Chen, J., Su, Y., Lin, F., Iqbal, M., Mehmood, K., Zhang, H., Shi, D.** (2021). Effect of paraquat on cytotoxicity involved in oxidative stress and inflammatory reaction: A review of mechanisms and ecological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112711. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112711>
- De Noyelles, F., Kettle, W.D., Sinn, D.E.** (1982). The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology*, 63, 1285-1293. <https://doi.org/10.2307/1938856>
- Fuerst, E.P., Nakatani, H.Y., Dodge, A.D., Penner, D., Arntzen, C.J.** (1985). Paraquat resistance in *Conyza*. *Plant Physiology*, 77, 984-989
- Fugère, V., Hébert, M. P., da Costa, N. B., Xu, C.C.Y., Barret Rowan D. H., Beisner, B. E., Bell, G., Fussmann, G. F., Shapiro, B. J., Yargeau, V., Gonzalez, A.** (2020). Community rescue in experimental phytoplankton communities facing severe herbicide pollution. *Nature Ecology & Evolution*, 4(4), 578-588. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1134-5>
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M.L., Fischer, M., Schönbrunn, E.** (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 103 (35), 13010-13015. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603638103
- Gravina, F., Dobrzanski, T., Olchanheski, L. R., Galvão, C. W., Reche, P. M., Pileggi, S. A., Azevedo, R. A., Sadowsky, M. J., Pileggi, M.** (2017). Metabolic Interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.027>
- Hawkes, T. R.** (2014). Mechanisms of resistance to paraquat in plants. *Pesticide Management Science*, 70 (9), 1316-1323. <https://doi.org/10.1002/ps.3699>
- Huang, Y., Zhan, H., Bhatt, P. Chen, S.** (2019). Paraquat degradation from contaminated environments: Current Achievements and Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1754. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01754>
- Jamers, A. N. / De Coen, W.** (2010). Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 29 (4), 893-901.
- Jansen, M.A.K., Shaaltiel, Y., Kazzes, D., Canaani, O., Malkin, S., Gressel.** (1989). Increased *Conyza bonariensis* measured by photoacoustic spectroscopy and ¹⁴CO₂ fixation. *Plant Physiology*, 91, 1174-1178.
- Jindakaraked, M., Khan, E., Kajitvichyanukul, P.** (2023). Biodegradation Capabilities of Paraquat-Degrading Bacteria Immobilized on Nanoceramics. *Toxics*, 11, 638. <https://doi.org/10.3390/toxics11070638>
- Kao, S.M. & Hassan, M.** (1985). Biochemical characterization of a Paraquat-tolerant mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 260 (19), 10478-10481.
- Kosinski, R. & Merkle, M.G.** (1984). The effect of four terrestrial herbicides on the productivity of artificial stream algal communities. *Jornal of Environmental Quality*, 13 (1), 75-82.
- Kronholm, I., Bassett, A., Baulcombe, D., Collins, S.** (2017). Epigenetic and Genetic Contributions to Adaptation in *Chlamydomonas*. *Molecular Biology and Evolution*, 34(9), 2285-2306. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx166>
- Machado, M. D. & Soares, E. V.** (2021). Exposure of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to environmentally relevant concentrations of the herbicide metolachlor: Impact on the redox homeostasis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111264>

- Machigov, E.A., Igonina, E.V., Sviridova, D.A.** (2022). The genotoxic effect of the Paraquat radiomimetic on *Escherichia coli* bacteria. *Biological Bulletin Russian Academy of Sciences*, 49, 2486-2494. <https://doi.org/10.1134/S106235902212010X>
- Margalef, R.** (1983). *Limnología*. Omega.
- Melero-Jiménez, I.J., Bañares-España, E., Reul, A., Flores-Moya, A., García-Sánchez, M. J.** (2021). Detection of the maximum resistance to the herbicides diuron and glyphosate, and evaluation of its phenotypic cost, in freshwater phytoplankton. *Aquatic Toxicology*, 240, 105973. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105973>
- Miller, O.K., Hughes, K.W.** (1980). Selection of Paraquat-resistant variants of tobacco from cell cultures. *In vitro*, 16 (2), 1085-1091.
- Moreland, D.E.** (1980). Mechanisms of action of herbicides. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 597-638.
- Nazish, T., Huang, Y.J., Zhang, J., Jing, J., Jin-Qiu, X., Alfatih, A., Chao, L., Xiao-Teng, C., Jing, X., Ping, X., Cheng-Bin, X.** (2022). Understanding paraquat resistance mechanisms in *Arabidopsis thaliana* to facilitate the development of paraquat-resistant crops. *Plant Communications*, 3 (3). <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100321>
- Peterson, H.G., C. Boutin, P.A. Martin, K.E. Freemark, N.J. Ruecker., Moody, M.J.** (1994). Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentration. *Aquatic Toxicology*, 28, 275-292. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)90038-8)
- Polazzo, F., Oliveira dos Anjos, T. B., Arenas-Sánchez, A., Romo, S., Vighi, M., Rico, A.** (2022). Effect of multiple agricultural stressors on freshwater ecosystems: The role of community structure, trophic status, and biodiversity-functioning relationships on ecosystem responses. *Science of The Total Environment*, 807 (3), 151052. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151052>
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, A.** (2009). Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environment International*, 35 (2), 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.06.012>
- Reynolds, C.S.** (2006). *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Rychel, K., Tan, J., Patel, A., Lamoureux, C., Hefner, Y., Szubin, R., Johnsen, J., Mohamed, E.T.T., Phaneuf, P. V., Anand, A., Olson, C. A., Park, J. H., Sastry, A. V., Yang, L., Feist, A. M., Palsson, B. O.** (2023). Laboratory evolution, transcriptomics, and modeling reveal mechanisms of paraquat tolerance. *Cell Reports*, 42 (9), 113105. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113105>
- Sáenz, M.E., Alberdi, J.L., Di Marzio, W.D., Accorinti, J., Tortorelli, M.C.** (1997a). Paraquat Toxicity to different Green Algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58 (6), 922-928. <https://doi.org/10.1007/s001289900422>
- Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., Accorinti, J., Tortorelli, M.C.** (1997b). Effects of technical grade and a commercial formulation of Glyphosate on algal population growth. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59 (4), 638-644. <https://doi.org/10.1007/s001289900527>
- Sáenz, M.E. & Di Marzio, W.D.** (2009). Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas dulceacuícolas. *Limnética*, 28 (1), 1-10. <https://doi.org/10.23818/limn.28.11>
- Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L.** (2012). Toxicity assessment of Cyfluthrin commercial formulation on growth, photosynthesis and catalase activity of green algae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.07.001>
- Sparks, T.** (2000). *Statistics in ecotoxicology*. Wiley.
- Sprague, J.B.** (1990). Aquatic Toxicology. In: C. B. Schreck and P. B. Moyle (eds.) *Methods for fish biology*. (p. 491-527). American Fisheries Society.
- Tanaka, Y., Chisaka, H., Saka, H.** (1986). Movement of Paraquat in resistant and susceptible biotypes of *Erigeron philadelphicus* and *E. canadensis*. *Physiologia Plantarum*, 66, 605-608.
- U.S. Environmental Protection Agency (US EPA).** (2002). *Selenatrum capricornutum* growth test. In: *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms*. EPA-821-R-02- 013. U.S. Environmental Monitoring and Support Laboratory Office of Research and Development.
- Valentine, K.P. & Bingham, S.W.** (1976). Influence of algae on amitrole and triazine residues in water. *Canadian Journal of Botany*, 54, 2100-2107.

-
- Vogwill, T., M., Lagator, Colegrave, N., Neve, P.** (2012). The experimental evolution of herbicide resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* results in a positive correlation between fitness in the presence and absence of herbicides. *Journal of Evolutionary Biology*, 25 (10), 1955-1964. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02558.x>
- West, Inc. & D. D, Gulley.** (1996). TOXSTAT® V 3.5. Western Ecosystems Technology Inc.
- Wetzel, R.G.** (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Academic Press.
- Wong, P.K.** (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614 Aug 2000. *Chemosphere*, 41(1-2), 177-82. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00408-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00408-7)
- World Health Organization (WHO).** (1984). International Program on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria N° 39: Paraquat and Diquat*, World Health Organization.
- Zar, J.H.** (2010). *Biostatistical analysis*. Pearson.