

Efectos de la aplicación de glifosato sobre parámetros químico-fisiológicos en *Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr

MARÍA FERNANDA CARRERA & HEBE ALEJANDRA CARRERAS ✉

Departamento de Química. Cátedra de Química General; Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

RESUMEN. La difusión del empleo de glifosato como herbicida para el control de malezas, principalmente en cultivos de soja transgénica, puede provocar alteraciones biológicas y ecológicas al ecosistema. Con el fin de estimar el efecto de este herbicida sobre la flora líquénica se empleó la especie *Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr como biomonitor "in situ". Se trasplantaron muestras de este líquen a un campo de cultivo de soja y a una zona control y durante tres meses se determinaron parámetros fisiológicos indicadores de daño. En otro ensayo se evaluó, en condiciones controladas, el efecto de distintas dosis de herbicida sobre la fisiología del líquen. Los resultados del experimento a campo mostraron que la aplicación de glifosato produjo una disminución significativa de los pigmentos fotosintéticos. Se observó una disminución significativa de los contenidos de feofitina 'a' y 'b' y un aumento en las concentraciones de los productos de oxidaciones de membranas celulares. Los resultados obtenidos en condiciones controladas fueron similares, por lo que se comprueba el efecto perjudicial del glifosato sobre *U. amblyoclada* y se pone de manifiesto la utilidad de esta especie como biomonitor de zonas agrícolas.

[Palabras clave: líquen, herbicida, control de malezas, soja, biomonitor]

ABSTRACT. Effects of the application of glyphosate on chemical-physiological parameters of *Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr: The expansion in the use of glyphosate as herbicide in order to control weeds, mainly in transgenic soybean cultivation, causes biological and ecological deterioration in the ecosystem. The species *U. amblyoclada* has been used as biomonitor "in situ", in order to estimate this herbicide's effect in the lichenic flora. Thus, the samples were transplanted during a 3-month period in a soybean field and in a control area. After that, physiological parameters indicating lichenic damage were established. Furthermore, the effect of different herbicide doses on the lichen's physiology was tested in the laboratory. The results showed a meaningful decrease in the photosynthetic pigments after the fumigation with glyphosate. A significant decrease of the contents was observed of feofitina 'a' and 'b' and, in addition, an increase in the concentrations of the products of oxidations of cellular membranes. These results were observed also in the experiments in laboratory. In this way, the damaging effects of glyphosate on the lichen *U. amblyoclada* and the usefulness of this species as biomonitor in agricultural areas were demonstrated.

[Keywords: lichen, herbicide, weed control, soybean, biomonitor]

✉ Departamento de Química. Cátedra de Química General (Cs. Biológicas); Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Av. Vélez Sársfield 1161, Ciudad Universitaria, (X5016GCA) Córdoba, Argentina. hcarreras@com.uncor.edu.

Recibido: 31 de enero de 2011; Fin de arbitraje: 14 de abril de 2011; Revisión recibida: 29 de junio de 2011; Aceptado: 24 de agosto de 2011

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el herbicida más usado en el mundo, y en particular en la Argentina, es el glifosato. Es un herbicida de acción sistémica y no es selectivo. La formulación química más común es la sal isopropilamina (IPA) de N-(fosfonometil) glicina, o sal isopropilamina de glifosato, muy soluble en agua y casi insoluble en solventes orgánicos. Existen diferentes formulaciones de este herbicida que se caracterizan por contener variadas concentraciones de sal IPA de glifosato y de surfactantes [e.g., el compuesto polioxietil amina (POEA) (Nivia 2002)]. Este herbicida inhibe la enzima 5-enolpyruvyl-siquimato-3- fosfato sintetasa, lo cual impide la unión del metabolito fosfoenolpiruvato en el sitio activo de la enzima (Ho & Ching 2003). No obstante, también se ha observado que dosis subletales de glifosato pueden incrementar la susceptibilidad de algunas plantas a enfermedades causadas por hongos, inhibir la formación de hongos benéficos y producir aberraciones cromosómicas en células meristémicas de raíz de cebolla (Nivia 2002).

Los líquenes son organismos formados por la asociación simbiótica entre un alga y un hongo y se encuentran distribuidos desde los trópicos hasta las regiones polares, sobre todo en ambientes terrestres. Son plantas perennes con una tasa de crecimiento muy lenta, por lo que mantienen una morfología uniforme a lo largo del tiempo (Webber & Andrews 1973). Estos organismos carecen de sistema radical, por lo que dependen por completo de la atmósfera para obtener sus nutrientes. Debido a la concentración baja de los nutrientes en la atmósfera, los líquenes han desarrollado mecanismos concentradores esenciales para su supervivencia. Además, estos organismos cumplen una función importante en el ecosistema como plantas pioneras de la secuencia sucesional, formando parte de los ciclos minerales (Syers & Iskandar 1973) y en la fijación del nitrógeno atmosférico (Lang et al. 1976). Más importante aun es su capacidad para acumular elementos en concentraciones que exceden por mucho sus requerimientos fisiológicos (Nash 1996). Por este motivo, desde hace varias décadas los

líquenes han sido reconocidos como uno de los bioindicadores ideales de contaminación atmosférica en diferentes sitios del mundo (Carreras 2004). En Argentina también han sido empleados para evaluar la calidad del aire en diferentes ciudades como Bariloche (Calvelo et al. 2009; Calvelo & Liberatore 2009), San Luis (Santoni & Lijteroff 2006; Lijteroff et al. 2009) y Córdoba (González & Pignata 1994; Carreras et al. 1998; Carreras & Pignata 2001, 2002). Los estudios realizados en Córdoba han demostrado que existían zonas cercanas a las áreas de cultivo donde los líquenes se encontraban muy dañados o prácticamente estaban ausentes. Esto podría deberse al impacto de las prácticas agrícolas, y en particular al empleo de herbicidas o insecticidas.

Existen muy pocos antecedentes que describan el efecto de los pesticidas sobre líquenes. Alstrup (1991), en Dinamarca, informó efectos adversos en el crecimiento de los líquenes ocasionados por herbicidas y fungicidas y demostró que la sensibilidad del líquen frente a pesticidas difiere entre especies y compuestos químicos empleados. En este sentido, los herbicidas resultan menos perjudiciales que los fungicidas. Jensen et al. (1999) realizaron estudios sobre la sensibilidad del fotosistema II en tres especies de líquenes expuestos a diferentes tipos de herbicidas y encontraron que las especies estudiadas fueron más sensibles a herbicidas elaborados a base de urea respecto a los elaborados a base de triazina. También comprobaron que no existía una particular sensibilidad en el líquen respecto a otras algas de vida libre o cloroplastos de plantas superiores.

Hasta el momento existen muy pocos antecedentes de estudios acerca de los efectos de prácticas agrícolas en la biología de líquenes (Brown 1992; Van Dobben 1996). Las referencias que encontramos solo analizan los efectos de herbicidas a nivel de comunidades líquénicas (Newmaster et al. 1999; Tretiach et al. 2007). Sin embargo la información obtenida en estudios previos de biomonitoreo sugiere que, en efecto, la aplicación de herbicidas o pesticidas podría afectar el metabolismo normal de las especies líquénicas que crecen

en cercanía a zonas de cultivo. El objetivo general de este trabajo fue evaluar, en el campo y en laboratorio, el efecto de la aplicación de glifosato sobre parámetros fisiológicos de una especie de líquen muy abundante en la provincia de Córdoba. Específicamente, (1) comparar la respuesta químico-fisiológica de líquenes trasplantados a una zona de cultivo de soja y a una zona control no cultivada, (2) estimar los efectos del glifosato sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos, productos de oxidación, acumulación de azufre y contenido de humedad en los líquenes, (3) comparar los efectos de la aplicación de diferentes concentraciones del herbicida sobre parámetros químico-fisiológicos en condiciones controladas de laboratorio y (4) comparar el efecto del glifosato recibido a campo con los efectos encontrados en condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó la especie *Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr., de amplia distribución en la provincia de Córdoba y empleada previamente en estudios de monitoreo (Carreras et al. 1998; Carreras & Pignata 2001). Es una especie saxícola, con estructura fruticosa, lo cual facilita su separación del sustrato. En un área alejada de fuentes importantes de contaminación (Cerro Blanco, Los Gigantes, 1200 m.s.n.m.), 100 km al norte de la ciudad de Córdoba, fueron recolectados al azar talos liquénicos de *U. amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr. fijados sobre sustrato rocoso. Parte del material vegetal recolectado se reservó para realizar los mismos análisis de las muestras utilizadas en los experimentos, a fin de obtener un nivel basal para los parámetros medidos.

Estudio en el campo

Los líquenes fueron trasplantados de acuerdo a la técnica descrita por González & Pignata (1994). Fueron limpiados con cuidado y separados de la porción basal del talo para evitar contaminación por partículas del

sustrato. Las muestras fueron conservadas en bolsas a temperatura ambiente hasta su preparación para el trasplante. Cada unidad experimental consistió en 12 g de líquen colocados en bolsas de red de nylon de 20x20 cm, que fueron sujetos a caños de PVC y enterrados de manera tal que los líquenes quedaran a una altura de 60 cm respecto a la superficie del suelo.

Los líquenes fueron trasplantados a una parcela con soja en el Campo Escuela perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, ubicado en camino a Capilla de Los Remedios, en el kilómetro 15.5. Las muestras (n=8) fueron ubicadas en dos líneas de siembra paralela separadas a una distancia de 5 m, de tal manera que recibieron las mismas dosis de glifosato empleadas para dicho cultivo. Durante el periodo en el que los líquenes estuvieron expuestos no se aplicaron otros pesticidas, solamente 2 herbicidas diferentes: sulfosato marca Syngenta (sal potásica del ácido-[N-(fosfonometil) glicina], con una concentración de principio activo igual a 34% P/V y glifosato marca Atanor (sal de isopropilamina), con una concentración de principio activo igual a 48% P/V. En ambos casos se empleó una concentración del formulado igual a 3 L/ha. Como control se trasplantaron muestras a una zona residencial en la Ciudad de Córdoba, alejada de zonas de cultivos y con vegetación natural abundante. En ambos sitios las muestras permanecieron expuestas durante 2.5 meses, desde el 1 de noviembre de 2007 hasta el 15 de enero de 2008. Transcurrido el tiempo de exposición, las muestras fueron llevadas al laboratorio para su análisis. Las determinaciones químicas se realizaron por triplicado en cada submuestra y se expresaron en relación al peso seco del material vegetal.

Se determinó el peso seco en estufa a 60 °C. El material vegetal fue pesado sucesivamente hasta que alcanzó un peso constante; este procedimiento permitió determinar el contenido de agua. Los pigmentos fotosintéticos se determinaron a partir de la trituration del material vegetal y su homogeneización en 10 ml de etanol al 96% V/V

a temperatura ambiente y filtrado. Las clorofilas se determinaron a partir de la absorbancia a 649 nm y 665 nm, a 654 nm y 666 nm para feofitinas, luego del agregado de HCl 0.6 M y a 470 nm para carotenos, en un espectrofotómetro Beckman DU7000. La concentración de clorofilas, feofitinas y carotenos se calculó de acuerdo a Wintermans & Motts (1965) y a partir de ellas estimamos las relaciones clorofila 'b'/clorofila 'a' y feofitina 'a'/clorofila 'a'. Para la cuantificación de hidroperóxidos conjugados (HPDC) se midió la absorbancia a 234 nm del sobrenadante etanólico proveniente de la extracción de pigmentos. La concentración se calculó mediante el coeficiente de extinción $2.65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (González & Pignata 1994). La concentración de malondialdehído (MDA) se determinó a partir de 50 mg de material homogeneizado con 2.5 ml de agua destilada. Posteriormente se agregó un volumen equivalente de TBA al 0.5% en solución de TCA al 20% y se incubó a 95 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo en baño de hielo y luego la suspensión se centrifugó a 10000 x g para separar el sobrenadante. Se midió la absorbancia a 532 nm de acuerdo a Kosugi et al. (1989), restando la absorción no específica a 600 nm. La concentración de MDA se calculó a partir del coeficiente de extinción $155 \text{ m M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Heath & Packer 1968). El contenido de azufre se cuantificó a partir de alícuotas de 0.5 g de material fresco triturado al que se le agregaron 2.5 ml de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. La mezcla se calentó a 500 °C hasta obtener cenizas claras, las que se resuspendieron en 2.5 ml de HCl 6 M. La solución resultante fue filtrada, llevada a ebullición durante 3 minutos y luego a un volumen final de 50 ml. El contenido de SO_4^{2-} en la solución se determinó por un método turbidimétrico con BaCl_2 y la absorbancia se midió a 420 nm (González & Pignata 1994).

Estudio en laboratorio

A fin de corroborar si el efecto observado en los talos líquénicos trasplantados en el campo experimental se debía a la aplicación del herbicida se realizó una aplicación en laboratorio, colectando nuevas muestras de

líquenes del mismo lugar en que se habían recolectado para el estudio a campo. Una porción de este material se separó y guardó como material basal. En el laboratorio las muestras fueron distribuidas en 3 cámaras de vidrio cerradas (15 g de material vegetal por cámara) para mantener constantes los valores de temperatura y humedad. En una de las cámaras, a los líquenes se les aplicó glifosato marca GLEX (sal isopropilamina del N-fosfonometil glicina) cuyo ingrediente activo tiene la misma concentración que el glifosato Atanor empleado a campo (48% P/V). Se realizaron diluciones para igualar la concentración del formulado empleada a campo (3 L/ha), considerando la superficie de las cámaras de exposición. En otra de las cámaras las muestras recibieron glifosato a la mitad de concentración y en una tercera cámara a los líquenes se los roció sólo con agua (control de posibles efectos producidos solo por un incremento en la humedad de la cámara). En todas las cámaras las muestras permanecieron expuestas durante 7 días, tiempo mínimo para que el herbicida tenga efecto en plantas perennes, según datos del fabricante del herbicida. Cabe aclarar que si bien los herbicidas empleados a campo y en laboratorio no fueron de la misma marca, se respetó la concentración final de su principio activo. Transcurrido el tiempo de exposición, se realizaron las mismas determinaciones de parámetros fisiológicos que las descritas en el experimento a campo.

Se analizó el efecto de glifosato sobre las variables fisiológicas a través de análisis de varianza. Cuando se detectaron diferencias significativas se empleó el test a posteriori LSD (Least Significant Difference), con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio en el campo

Los contenidos medios de clorofila y caroteno no difirieron significativamente entre las muestras ubicadas en cultivo y el control. En cambio, la concentración de feofitinas 'a' y

'b' fueron significativamente mayores en las muestras provenientes del cultivo (Figura 1). En el material basal el contenido de feofitina 'a' fue mayor que el de clorofila 'a' lo cual puede deberse a la deshidratación de los talos en el momento en que se colectaron las muestras, dado que en dicho momento todavía no había comenzado la temporada de lluvia. Este hecho fue observado previamente por Groos (1991).

Nuestros resultados indican que no solamente el contenido de feofitinas en términos absolutos se vio afectado por el herbicida, sino también sus proporciones relativas. De hecho, se ha determinado que la alteración en la composición de pigmentos es una herramienta muy valiosa para valorar el daño producido por contaminantes atmosféricos (Agrawal 1994). No obstante, estos cambios en la composición de pigmentos no son específicos del impacto de un determinado tipo de estrés por lo que su valor diagnóstico es limitado si no se lo acompaña de otras determinaciones fisiológicas (Tausz et al. 1996). Así, en el presente estudio se calculó, además, el cociente $Clo\ 'b' / Clo\ 'a'$ como indicador de predominancia de clorofila 'a' respecto a la 'b' y el índice de feofitización ($Feo\ 'a' / Clo\ 'a'$) como indicador de la degradación de clorofilas a feofitinas. El cociente $Clo\ 'b' / Clo\ 'a'$ no mostró variaciones significativas entre sitios, si bien el índice de feofitización ($Feo\ 'a' / Clo\ 'a'$) tuvo un incremento significativo en las muestras trasplantadas respecto al material basal, lo que sugiere una activa degradación de clorofilas. La feofitización de clorofilas es el resultado directo de acidificación provocada por contaminantes, en donde se sustituye el Mg^{+2} de las clorofilas por H^+ (Figura 1).

Por otro lado, se observó que el cociente PS/PF fue ligeramente mayor en las muestras basales que las trasplantadas, indica también un menor contenido de agua en los talos al momento de la recolección, lo cual coincide con la hipótesis planteada anteriormente (Figura 1).

Los líquenes son capaces de acumular compuestos azufrados en el talo. De hecho, los niveles de azufre en el ambiente guardan

una relación directa con los niveles de azufre determinados en los talos, razón por la cual los líquenes han sido y son empleados con frecuencia como biomonitores de ambientes urbanos (Seaward 1993; Rodríguez et al. 2007). En este estudio, sin embargo, el contenido medio de azufre no varió entre sitios (Figura 1). Esto podría deberse al aporte de compuestos azufrados posiblemente como coadyuvantes del principio activo del glifosato (i.e., solventes, dispersores, emuladores y surfactantes) para mejorar las propiedades fisicoquímicas y la eficacia biológica de las materias activas pero que no tienen una actividad como pesticida propia. Si bien los resultados obtenidos no confirman la hipótesis planteada, sirven de base para futuros estudios.

Se observó que la mayor concentración de HPDC correspondió al material basal y la menor a los talos trasplantados al campo de cultivo (Figura 1). Este resultado podría deberse a la transformación rápida a productos de oxidación secundarios, tales como MDA, como lo sugiere los mayores valores de MDA de las muestras provenientes del cultivo (Figura 1). Estos resultados sugieren la presencia de compuestos oxidantes que reaccionan con los ácidos grasos insaturados de membrana y provocan una alteración en su funcionamiento. En coincidencia con estos resultados, numerosos autores señalan que los pesticidas pueden inducir estrés oxidativo mediante la generación de radicales libres y la alteración de sistemas enzimáticos antioxidantes o secuestradores de especies reactivas de oxígeno (Banerjee et al. 1999; Bukowska 2003; Inbaraj & Chignell 2004).

Estudio en laboratorio

El estudio en condiciones controladas reveló una disminución significativa en la concentración de clorofila 'a', clorofila 'b' y feofitina 'b' de las muestras tratadas con la solución de glifosato más concentrada. En cambio, la concentración de carotenos y de feofitina 'a', no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2). El cociente $Clo\ 'b' / Clo\ 'a'$ fue mayor en las

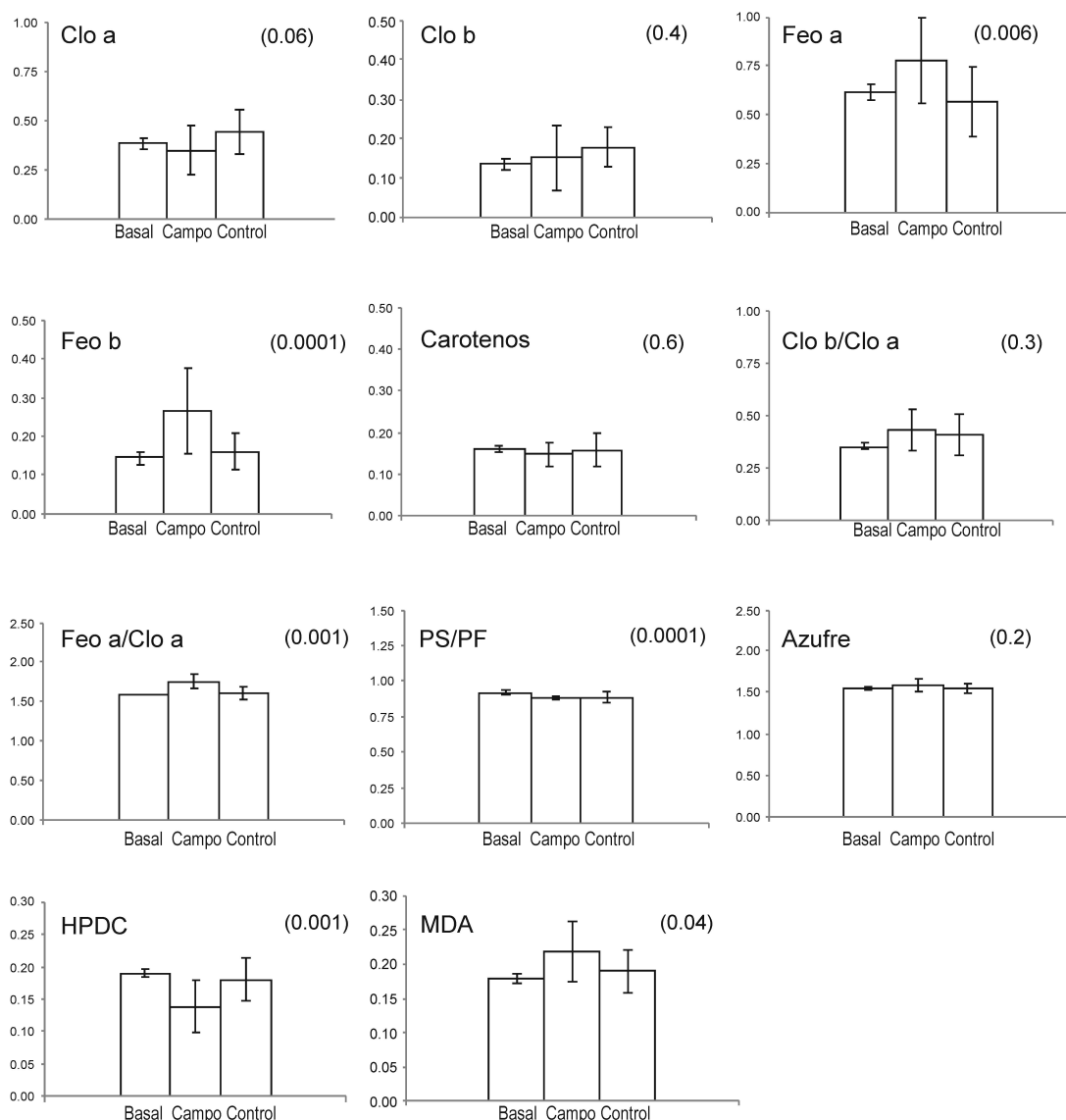


Figura 1. Concentración de pigmentos fotosintéticos (mg/g peso seco), relaciones entre ellos, concentración de azufre (mg/g peso seco) y productos de oxidación: HPDC (moles/g) y MDA (mmoles/g), en muestras basales y transplantadas de *U. amblyoclada*. Los valores entre paréntesis indican el valor de probabilidad obtenido en el ANOVA. Las barras verticales indican desvío estándar.

Figure 1. Concentration of photosynthetic pigments (mg/g dry weight), their ratios, sulphur (mg/g dry weight), and oxidation products: HPDC (moles/g) and MDA (mmoles/g), in basal and transplanted samples of *U. amblyoclada*. Values in parenthesis indicate the p-value obtained in the ANOVA. Vertical bars indicate standard deviation.

muestras tratadas con la solución de glifosato menos concentrada, lo cual indicaría que este herbicida con la mitad de la concentración usualmente empleada a campo ya es suficiente para provocar la destrucción de clorofila 'a' en esta especie de líquenes. Del mismo modo, el

índice de feofitina fue significativamente mayor en los líquenes tratados con la solución de glifosato menos concentrada, lo que indica una mayor degradación de clorofilas a feofitinas en estas muestras. Experimentos "in vitro" han demostrado que son necesarias

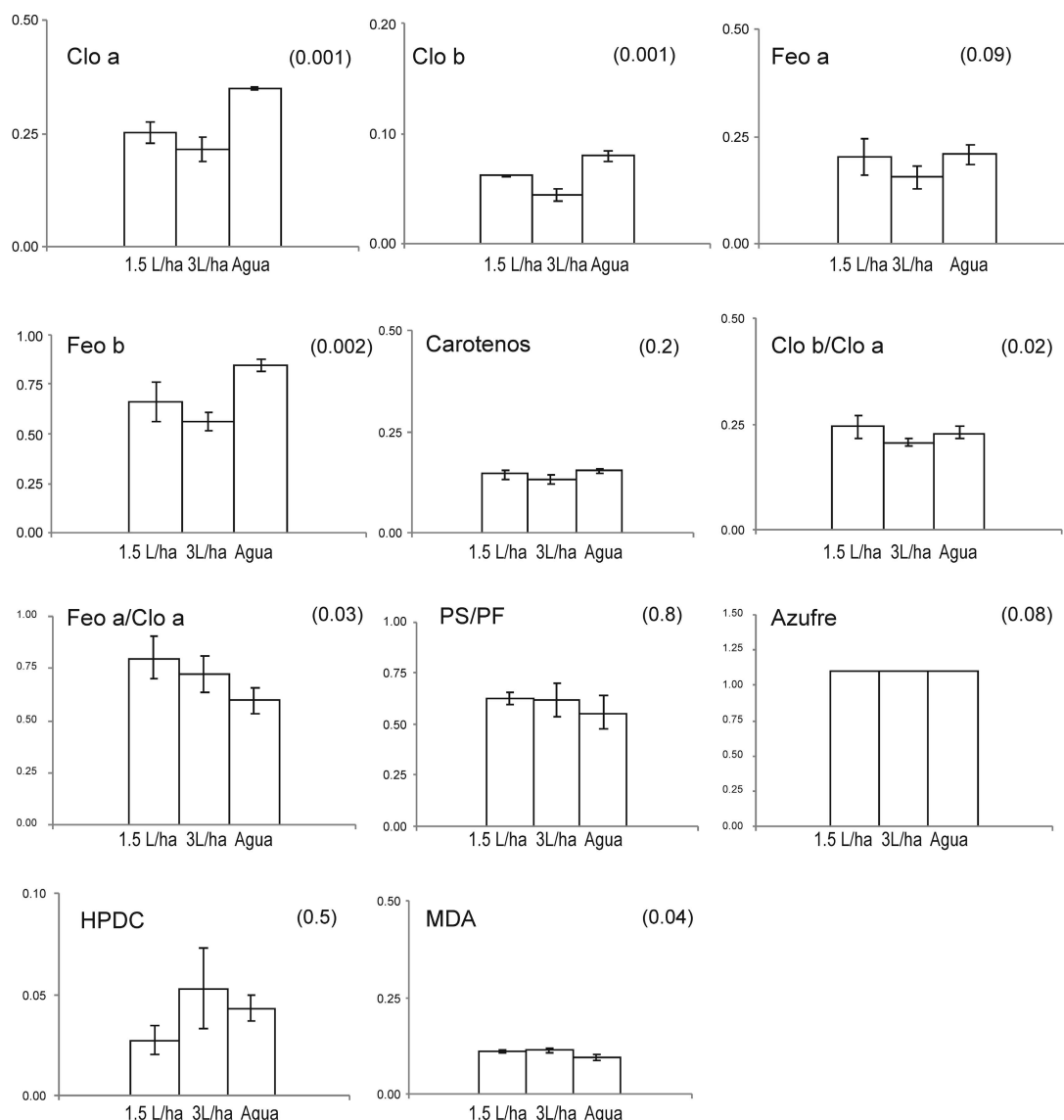


Figura 2. Concentración de pigmentos fotosintéticos (mg/g peso seco), relaciones entre ellos, concentración de azufre (mg/g peso seco) y productos de oxidación: HPDC (moles/g) y MDA (mmoles/g), en muestras tratadas “in vitro” de *U. amblyoclada*. Los valores entre paréntesis indican el valor de probabilidad obtenido en el ANOVA. Las barras verticales indican desvío estándar.

Figure 2. Concentration of photosynthetic pigments (mg/g dry weight), their ratios, sulphur (mg/g dry weight), and oxidation products: HPDC (moles/g) and MDA (mmoles/g), in treated “in vitro” samples of *U. amblyoclada*. Values in parenthesis indicate the p-value obtained in the ANOVA. Vertical bars indicate standard deviation.

concentraciones de contaminantes muy elevadas para encontrar efectos directos de destrucción de pigmentos (Sandman & Gonzales 1989; Hegazy & El Hamid 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la capacidad oxidativa

de este herbicida es muy superior a la de los contaminantes atmosféricos comúnmente presentes en zonas urbanas (Figura 2).

El contenido de humedad en los talos, estimado mediante el cociente PS/PF, fue

también menor en las muestras tratadas con glifosato respecto al control. A pesar de que las diferencias no fueron significativas podría deberse al aumento de los productos de oxidación ya que al oxidarse los lípidos de membrana se destruyen también las membranas celulares, con la consiguiente pérdida de la capacidad de regulación hídrica (Figura 2). Tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración de azufre (Figura 2).

La concentración de HPDC y MDA fue mayor en las muestras tratadas con la concentración más alta de glifosato y menor en las muestras control. La diferencia con el HPDC obtenido en el estudio a campo puede deberse al tiempo de exposición del herbicida fijado en el laboratorio, que quizás no fue suficiente para que el HPDC se convierta en su totalidad a MDA, por lo tanto se encontraron concentraciones altas de ambos compuestos oxidantes (Figura 2).

CONCLUSIONES

La determinación de parámetros fisiológicos indicadores de daño en la fisiología del líquen, permitió comprobar la hipótesis planteada para el presente trabajo, que el líquen *U. amblyoclada* es sensible a los efectos de los herbicidas (formulados de glifosato). Además, se demostró que esta especie líquénica puede ser usada como biomonitor en agroecosistemas, además de su ya conocida capacidad como biomonitor de contaminantes en zonas urbanas.

El estudio de laboratorio contribuyó a explicar lo que fue observado en los líquenes expuestos "in situ" a la acción del glifosato y permitió establecer que sus efectos perjudiciales también dependen de la concentración del herbicida. Esto es particularmente cierto en relación a los pigmentos fotosintéticos. El hecho de que se hayan determinado diferencias significativas en la concentración de pigmentos y en sus cocientes, sugiere que el herbicida está afectando el fotobionte del líquen, pese a que éste solo constituye 10% del talo líquénico.

AGRADECIMIENTOS

Al Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, por facilitar el predio donde se colocaron las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRAWAL, BK. 1994. Ab initio calculation of the electronic, structural, and dynamical properties of Zn-based semiconductors. *Phys. Rev. B.* **50**: 14881-14887.
- ALSTRUP, V. 1991. Effects of pesticides on lichens. *Bryonora* **9**:2-4.
- BANERJEE, BD; V SETHI; A BHATTACHARYA; ST PASHA & AK CHKRABORTY. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.* **107**:33.
- BROWN, DH. 1992. Impact of agriculture on bryophytes and lichens. Pp. 259-283 en: Bates JW & AM Farmer (eds.). *Bryophytes and Lichens in a Changing Environment*. Oxford. Clarendon Press.
- BUKOSWSKA, B. 2003. Effects of 2, 4-d and its metabolite 2, 4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comp. Biochem. Phys. C.* **135**:435.
- CALVELO, S & S LIBERATORE. 2009. Applicability of In Situ or Transplanted Lichens for Assessment of Atmospheric Pollution in Patagonia, Argentina. *Journal of Atmospheric Chemistry* **49**(1-3).
- CALVELO, S; N BACCALÁ & S LIBERATORE. 2009. Lichens as Bioindicators of Air Quality in Distant Areas in Patagonia (Argentina). *Environmental Bioindicators* **4**:123-135.aBs
- CARRERAS, HA; GL GUDIÑO & ML PIGNATA. 1998. Comparative biomonitoring of atmospheric quality in five zones of Córdoba city (Argentina) employing the transplanted lichen *Usnea sp.* *Environmental Pollution* **103**:317-325.
- CARRERAS, HA & ML PIGNATA. 2001. Comparison among air pollutants, meteorological conditions and some chemical parameters in transplanted lichen *Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr. *Environmental Pollution* **111**:45-52.
- CARRERAS, HA & ML PIGNATA. 2002. Biomonitoring of heavy metals and air quality in Córdoba City, Argentina, using transplanted lichens. *Environmental Pollution* **117**:77-87.
- CARRERAS, H. 2004. *Biomonitoreo de metales pesados. Efecto de contaminantes atmosféricos urbanos sobre la incorporación de cationes metálicos en el líquen Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr. Tesis doctoral.

- Cátedra de Química General. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Pp. 7-13.
- GONZÁLEZ, CM & ML PIGNATA. 1994. The influence of air pollution on soluble proteins, chlorophyll degradation, MDA, sulphur and amounts of heavy metals in a transplanted lichen. *Chemistry and Ecology* 9:105-113.
- GROOS, J. 1991. *Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- HEATH, RL & L PACKER. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acids peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125:189-198.
- HEGAZY, HS & M EL HAMID. 1998. Physiological responses of barley plants exposed to sequential SO₂ fumigation under dry and humid conditions. I. The impact on acyl lipids composition, photosynthetic pigments and activities of certain enzymes of the leaves. *Desert Institute Bulletin Egypt* 48(1):21-51.
- HO, MW & LL CHING. 2003. *The case for a GM-free Sustainable World. Parte 2: Seven Herbicide Hazards*. Pp. 27-30.
- INBARAJ, JJ & CF CHIGNELL. 2004. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 17:55.
- KOSUGI, H; T KOJIMA & K KIKUGAWA. 1989. Thiobarbituric acid-reactive substances from peroxidized lipids. *Lipids* 24:873-881.
- LANG, GE; WA REINERS & RK HEIER. 1976. Potential alteration of precipitation chemistry by epiphytic lichens. *Oecologia* 25:229-241.
- LIJTEROFF, R; L LIMA & B PRIERI. 2009. Uso de Líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(2):111-120.
- NASH III, TH. 1996. *Lichen Biology*. T.H. Nash III (ed.). University Press, Cambridge.
- NEWMASER, SG; F WAYNE BELL & DH VITT. 1999. The effects of glyphosate and trichloro on common bryophytes and lichens in northwestern Ontario. NRC Canadá. *Can. J.For. Res.* 29:1101-1111.
- NIVIA, E. 2002. *Las Guerras en Colombia: Drogas, Armas y Petróleo*. Conferencia en el Instituto Hemisférico de las Américas. Universidad de California, Davis, Mayo 17-19, 2001. Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos si son peligrosos. Algunas aproximaciones.
- RODRÍGUEZ, JH; HA CARRERAS; ML PIGNATA & CM GONZÁLEZ. 2007. Nickel Exposure Enhances the Susceptibility of Lichens *Usnea amblyoclada* and *Ramalina celastri* to Urban Atmospheric Pollutants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(4):533-540.
- SANDMANN, G & HG GONZALES. 1989. Peroxidative processes induced in bean leaves by fumigation with sulphur dioxide. *Environmental Pollution* 56: 145-154.
- SANTONI, CS & R LIJTEROFF. 2006. Evaluación de la calidad del aire mediante el uso de Bioindicadores en la provincia de San Luis, Argentina. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22(1):49-58.
- SEAWARD, MRD. 1993. Lichens and sulphur dioxide air pollution: field studies. *Environ. Rev.* 1(2):73-91.
- SYERS, JK & IK ISKANDAR. 1973. Pedogenetic significance of lichens. Pp. 225-248 en: Ahmadjian V & ME Hale (eds.). *The lichens*. Academic Press, Inc., New York.
- TAUSZ, M; LJ DE KOK; I STULEN & D GRILL. 1996. Physiological responses of Norway Spruce Trees elevated CO₂ and SO₂. *Journal of Plant Physiology* 148:362-367.
- TRETIACH, M; P CRISAFULLI; N IMAI; H KASHIWADANI; KH MOON; ET AL. 2007. Efficacy of a biocide tested on selected lichens and its effects on their substrata. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59:44-54.
- VAN DOBBEN, HF. 1996. Decline and recovery of epiphytic lichens in an agricultural area in the Netherlands (1900-1988). *Nova Hedwigia* 62:477-485.
- WEBBER, PJ; JT ANDREWS. 1973. Lichenometry: a commentary. *Arct. Alp. Res.* 5(4):295-302.
- WINTERMANS, JFGM & A De Mots. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phaeophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta* 169:448-453.