Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Contaminación antrópica de los cuerpos de agua. Estudio de su efecto sobre organismos del fitoplancton a escala ecológica y de bioensayos de laboratorio

Nannavecchia, Paula Silvia

2016-09-23

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Nannavecchia, Paula Silvia. (2016-09-23). Contaminación antrópica de los cuerpos de agua. Estudio de su efecto sobre organismos del fitoplancton a escala ecológica y de bioensayos de laboratorio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Nannavecchia, Paula Silvia. "Contaminación antrópica de los cuerpos de agua. Estudio de su efecto sobre organismos del fitoplancton a escala ecológica y de bioensayos de laboratorio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-09-23.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Contaminación antrópica de los cuerpos de agua. Estudio de su efecto sobre organismos del fitoplancton a escala ecológica y de bioensayos de laboratorio.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Paula Silvia Nannavecchia

Director de Tesis: Dra. Visitación Conforti
Director Asistente: Dra. Ángela Juárez

Consejero de Estudios: Dra. Visitación Conforti

Buenos Aires, 2016.

ÍNDICE

	Página
Resumen	6
Resumen en inglés	7
Abreviaturas	8
Agradecimientos	10
Dedicatoria	11
Introducción General	12
Objetivo General	40
Capítulo I	41
I.1. Introducción	42
I.1.1 Calidad del agua	43
I.1.2. Interpretación ecológica de los parámetros fisicoquímicos	44
I.1.3. Variables bacteriológicas	52
I.1.4. Contaminación, fitoplancton y estrés oxidativo	52
I.1.5. Objetivos	54
I.1.6. Hipótesis	54
I.2. Materiales y métodos	55
I.2.1. Área de estudio y diseño del muestreo	55
I.2.2. Determinación de variables ambientales	57
I.2.3. Parámetros biológicos	58
I.2.3.1. Fitoplancton	58
I.2.3.2. Análisis bacteriológico	59
I.2.4. Índice de calidad del agua (ICA)	59
I.2.5. Evaluación de parámetros de estrés oxidativo y actividad detoxificante	61
I.2.5.1. Preparación de los homogenatos celulares	61
I.2.5.2 Actividad de la enzima detoxificante GST	61
I.2.5.3. Actividad de la enzima antioxidante SOD	62
I.2.5.4. Actividad de la enzima antioxidante CAT	62
I.2.5.5. Daño oxidativo: Peroxidación lipídica	63
I.2.6. Análisis estadístico	64

I.3. Resultados 65
I.3.1. Variables ambientales 65
I.3.2. Parámetros biológicos 71
I.3.2.1. Estructura y composición del fitoplancton 71
I.3.2.2. Análisis bacteriológico 75
I.3.3. Calidad del agua 77
I.3.4. Análisis de componentes principales 77
I.3.5. Análisis de conglomerado 78
I.3.6. Parámetros de estrés oxidativo y actividad detoxificante 79
I.4. Discusión 84
I.4.1. Variables ambientales 84
I.4.2. Parámetros biológicos 90
I.4.2.1. Análisis del Fitoplancton 90
I.4.2.2. Análisis bacteriológico 92
I.4.3. Análisis de los parámetros de estrés oxidativo del fitoplancton 93
I.5. Conclusiones 97

Capítulo II 99
II.1. Introducción 100
II.1.1. Arsénico 102
II.1.2. Los microorganismos y el arsénico 104
II.1.3. Arsénico y estrés oxidativo 107
II.1.4. Objetivos 108
II.1.4.1. Objetivo general 108
II.1.4.2. Objetivos específicos 108
II.1.5. Hipótesis 108
II.2. Materiales y métodos 109
II.2.1 Cultivos y crecimiento 109
II.2.2. Bioensayos 110
II.2.2.1. Determinación de la densidad celular 111
II.2.2.2. Determinación de carbohidratos 112

II.2.2.3. Determinación de pigmentos 112
II.2.2.4. Preparación de homogenatos 113
II.2.2.5. Determinación de proteínas 113
II.2.2.6. Actividad detoxificante glutatión S-transferasa (GST) 113
II.2.2.7. Actividad antioxidante enzimática superóxido dismutasa (SOD) 114
II.2.2.8. Antioxidante no enzimático glutatión reducido (GSH) 115
II.2.2.9. Daño oxidativo: Peroxidación lipídica 116
II.2.3. Análisis estadístico 117
II.2.4. Morfología y ultraestructura celular 117
II.2.4.1. Microscopía óptica 117
II.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) 118
II.3. Resultados 119
II.3.1. Crecimiento 119
II.3.2. Crecimiento en medio con arsénico 121
II.3.2.1. Proteínas 124
II.3.2.2. Carbohidratos 125
II.3.2.3. Pigmentos 126
II.3.2.4. Antioxidante no enzimático GSH 128
II.3.2.5. Actividad antioxidante enzimática (SOD) 129
II.3.2.6. Actividad detoxificante GST 129
II.3.2.7. Daño oxidativo: Peroxidación lipídica 130
II.3.3. Morfología y ultraestructura 131
II.3.3.1. Microscopía óptica 131
II.3.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) 133
II.4. Discusión 136
II.5. Conclusiones 143

Capítulo III 144
III.1 Introducción 145
III.1.1. La contaminación por materia orgánica en los cuerpos de agua naturales y su efecto sobre la biota acuática 145

III.1.2. *Phacus brachykentron* 147
III.1.3. Objetivos 148
III.4. Hipótesis 149
III.2. Materiales y métodos 150
III.2.1. Cultivos 150
III.2.2. Bioensayos 150
III.2.2.1. Recuento de células 151
III.2.3. Morfología y ultraestructura 151
III.2.3.1. Microscopía óptica 151
III.2.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) 152
III.2.3.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB) 153
III.2.4. Análisis estadístico 153
III.3. Resultados 154
III.4. Discusión 160
III.5. Conclusiones 164

Conclusiones generales 165
Bibliografía 168

Contaminación antrópica de los cuerpos de agua.
Estudio de su efecto sobre organismos del fitoplancton a escala ecológica y de bioensayos de laboratorio.

En esta tesis se evaluó el impacto de la contaminación sobre organismos del fitoplancton, a nivel ecológico e *in vitro*. Se caracterizaron las condiciones ecológicas del arroyo Carabassa, contaminado por efluentes industriales y urbanos. Se analizó la composición del fitoplancton y biomarcadores de estrés oxidativo, determinándose un elevado deterioro de sus aguas. Los sitios más contaminados presentaron altas concentraciones de metales y materia orgánica, excediendo los niveles permitidos. Los grupos más abundantes fueron las Chlorophyceae, Cyanobacteria y Euglenophyceae y los parámetros de estrés oxidativo mostraron los valores más altos en el fitoplancton de los sitios más contaminados.

Se realizaron bioensayos toxicológicos con microalgas aisladas de un río contaminado por exceso de materia orgánica (MO) y metales pesados (río Matanza).

Se estudió la respuesta de *Phacus brachykentron* a diferentes concentraciones de MO. El aumento de MO determinó una menor tasa de crecimiento y deformaciones celulares. Se modificaron características sistemáticas específicas, lo que implica que organimos considerados como otras especies pueden ser ecomorfos del mismo taxón.

Se analizó el efecto del arsenito de sodio sobre el crecimiento, morfología y parámetros de estrés oxidativo de dos cepas de *Euglena gracilis*, especie cosmopolita que también habita relaves mineros con altas concentraciones de arsénico. Se emplearon cultivos de dos cepas: UTEX (de una colección de cultivos) y MAT (aislada del río Matanza), en medio mineral y orgánico. El arsenito inhibió el crecimiento de manera dosis dependiente, independientemente del medio. Aumentó el contenido de la sustancia de reserva y el diámetro celular. Los resultados sugieren la participación de estrés oxidativo en la toxicidad del arsenito y diferencias en la respuesta antioxidante de ambas cepas.

Palabras claves: Contaminación, fitoplancton, *Phacus brachykentron*, materia orgánica, *Euglena gracilis*, arsénico, estrés oxidativo.

Anthropogenic contamination of freshwater bodies.
A study on how it affects phytoplankton organisms at an ecological scale and in laboratory bioassays.

The impact of contamination on phytoplankton organisms at an ecological scale and in laboratory bioassays was evaluated. The ecological conditions of the Carabassa stream, which is contaminated by urban and industrial effluents, were characterized. The analysis of the phytoplankton composition and oxidative stress biomarkers determined a high deterioration of its waters. The most contaminated sites had a high concentration of metals and organic material, which exceeded the maximum permitted levels. The most abundant groups were the Chlorophyceae, Cyanobacteria, and Euglenophyceae. The highest oxidative stress responses were measured on the most contaminated sites.

Toxicological bioassays were performed in *Phacus brachykentron*, a microalgae strain isolated from a river contaminated with excess of organic matter (MO) and heavy metals (Matanza River). An increase in MO in the bioassays decreased the growth rate of the organisms and increased cellular deformations. Specific characteristics used to identify this species were modified, thus, organisms that might be consider a different species in the wild might be ecomorphs of the same taxa.

The effect of sodium arsenite on the growth, morphology, and the oxidative stress response of *Euglena gracilis* were analyzed. This species has worldwide distribution and also inhabits mine tailings with high arsenic concentrations. Bioassays were performed in mineral and organic media in two strains: one from a culture collection (UTEX) and another isolated from the Matanza River (MAT). Regardless of the medium the experiments were performed, the arsenic inhibition on the growth rate of both strains was concentration dependent. The cellular reserves and the cellular diameter increased with increased arsenic concentration. The results suggest that oxidative stress could be involved in the toxicity of arsenite in *Euglena*, with differences in the antioxidant response between both strains.

Key words: Contamination, phytoplankton, *Phacus brachykentron*, organic matter, *Euglena gracilis*, arsenic, oxidative stress

Abreviaturas

A- afluente

ACP- análisis de componentes principales

ACUMAR- Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo

ANOVA- análisis de la varianza

APHA- *American Public Health Association*

ATP- trifosfato de adenosina

AWWA- *American Water Works Association*

BHT- hidroxitolueno metilado

Cal EPA- Agencia de Protección Ambiental de California

CAT- catalasa

CCME- Consejo Canadiense de Ministros del Medio Ambiente

CDNB- 1-cloro-2, 4- dinitrobenceno

CIC- Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata

CI_{50}- concentración inhibitoria cincuenta

Clf- clorofila

CONAMA- Consejo Nacional de Medio Ambiente del Brasil

CP- cauce principal

DBO- demanda biológica de oxígeno

DQO- demanda química de oxígeno

DMMA- dimetilarsínico

DOF- Diario Oficial de la Federación (México)

EDTA- ácido etilendiaminotetraacético

EGM- medio de cultivo para *Euglena gracilis*

EROs- especies reactivas de oxígeno

Fig.- figura

GS- glutatión

GSH- glutatión reducido

GST- glutatión-S-transferasa

ICA- índice de calidad del agua

INDEC- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

MDA- malondialdehído

MMAA- monometilarsónico

NMP- número más probable

NTU- unidades nefelométricas de turbidez

OD- oxígeno disuelto

Oxoglut. DH- 2-oxoglutarato deshidrogenasa

Pir-DH- piruvato deshidrogenasa

PMSF- fluoruro de fenilmetilsulfonilo

SAAM- sustáncias activas al azul de metileno

SOD- superóxido dismutasa

SSRH- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación

ST- sólidos totales

SWM- medio de cultivo tierra-agua

TBA- ácido tiobarbitúrico

TBARS- sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA- ácido tricloroacético

TEM- microscopía electrónica de transmisión

upH- unidades de pH

US EPA- Agencia de protección ambiental de Estados Unidos

WPCF- *Water Pollution Control Federation*

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires por brindarme el beneficio de una beca que facilitó el desarrollo de mi Doctorado.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por permitir mi formación académica, y especialmente al departamento de Biodiversidad y Biología Experimental por darme un lugar para investigar.

A Bibi y a Ángela, mis directoras; quiero agradecerles por estos años compartidos en los que me han transmitido sus enseñanzas, experiencias, y su calidez como personas. Por el apoyo, la buena predisposición que han tenido siempre.

A mis compañeros de laboratorio, los que me han acompañado desde mis comienzos, y a los que se fueron sumando luego, brindándome su ayuda y consejos, y con quienes compartí tan lindos días: Analía Tolivia, Iara Rocchetta, Vanina Galzenati, Laura Ruiz, Laura Carignano, Silvina Rosa, Cristian Solari, María Luz Padulles, Juan Pablo Basualdo, Verónica Viau, Yasmín Daglio.

A la Dra. María del Carmen Ríos de Molina del Departamento de Química Biológica, FCEyN, siempre predispuesta a brindarme su ayuda y abrirme las puertas de su laboratorio cuando lo necesité. A los investigadores que trabajan junto a ella, especialmente a Mercedez Iummatto por los buenos momentos que pasamos en los viajes a congresos.

A la Dra Gabriela Malanga de la Facultad Farmacia y Bioquímica, por colaborar en los estudios bioquímicos, y al Dr. Rubén Lombardo de FCEyN por asesorarme en las pruebas estadísticas. Al personal del laboratorio de análisis ambientales "ABIA", de la municipalidad de Pilar, por su colaboración en la logística de los muestreos.

A todo el personal del Jardín "Mi Pequeña Ciudad, FCEyN", por la dedicación y la confianza que generaron en mis hijos, lo cual posibilitó en gran parte el desarrollo de mi Doctorado. Les agradezco que ellos recuerden con una sonrisa su paso por el jardíncito.

A mi Familia y a mis Amigos por estar SIEMPRE.

.

A mis hijos Camila y Santino

INTRODUCCIÓN GENERAL

Contaminación acuática

Los cambios que se dan en la naturaleza por la interacción de los seres vivos con el medio físico mantienen al sistema en un equilibrio dinámico (Lovelock y Margulis 1974, Lovelock 1979, Lenton, 1998, 2004, Volk 2009, Carranza, 2013), el cual puede ser alterado por fenómenos naturales y por acción del hombre. Como consecuencia de ello, la concentración de muchas sustancias naturales puede modificarse; y junto a la presencia de nuevos componentes que irrumpen en los ecosistemas, la mayoría poco, o no biodegradables, ese equilibrio natural puede tornarse inestable. Particularmente, en los sistemas acuáticos esta realidad implica modificaciones de la composición fisicoquímica de las aguas naturales y de su diversidad de especies (Boyle, 1984; O'Farrell *et al*., 2002) afectando, de este modo, los patrones espacio– temporales de las comunidades que los habitan. Cuando estos cambios ocurren por la acción directa o indirecta del hombre, de modo que las aguas afectadas dejan de ser útiles para los fines habituales de su estado natural, se dice que ese cuerpo de agua está contaminado. Con el pasar del tiempo, los efectos adversos de la contaminación antrópica sobre la vida en el medio ambiente han ido incrementándose (His *et al*., 1999; Swaminathan, 2003). Al respecto, cabe destacar que las modificaciones que se perciben como contaminación son inevitables en la evolución de un ecosistema, particularmente en aquellos influenciados por el hombre (Margalef, 1983).

Los factores naturales que afectan la composición de las aguas involucran diversos tipos de fenómenos de los cuales el ecosistema puede, con el correr del tiempo, reestablecerse y llegar a su equilibrio natural, o alcanzar uno nuevo. La importancia del transporte y deposición de materiales por la atmósfera constituye un factor influyente en la composición química de las aguas. Se estimó que del total de la carga anual de fósforo y nitrógeno presentes en un cuerpo de agua, el 13% proviene del aporte desde la atmósfera (Scheren, *et al*., 2004). También lo es la lluvia, que lava el suelo arrastrando sólidos y elementos disueltos a los sistemas acuáticos (Vega *et al*., 2014). Pero, el principal contribuyente lo constituye la erosión hídrica de las rocas que aporta una gran cantidad de minerales al agua de modo que su composición química se relaciona con las características geológicas de la cuenca en cuestión (Neal *et al*., 2000, Robles-Camacho y Armienta, 2000, Quinn y Stroud, 2002). Por otro lado, la actividad biológica también influye, aunque de

otro modo, mediante el aprovechamiento de los componentes orgánicos e inorgánicos disponibles y mediante la excreción de metabolitos por parte de los organismos.

Los factores antrópicos son muy diversos y pueden clasificarse de acuerdo a la ubicación y periodicidad de sus aportes. Cuando las descargas pueden delimitarse geográficamente, constituyen fuentes puntuales o fijas de contaminación. Éstas pueden ser continuas, como lo son los vertidos de efluentes de plantas de tratamiento de residuos cloacales e industriales, o intermitentes como lo son los desagües de ciertas industrias y aguas de alcantarillas, entre otras. En estos sistemas, es más fácil el seguimiento directo de los cambios que se producen en el medio receptor, por lo que pueden ser controlados sin dificultades. Contrariamente, cuando la descarga abarca zonas extensas no delimitadas, el monitoreo y la regulación es más difícil. Algunos ejemplos de este tipo de fuentes no puntuales o difusas, son las escorrentías provenientes de zonas urbanas y rurales, la contribución de aguas subterráneas contaminadas, la precipitación atmosférica y el uso recreativo de las aguas (FAO, 1981). Bajo estas circunstancias, el monitoreo y la regulación de estas fuentes es mas complicado, por lo cual son más difíciles de controlar que las fuentes puntuales de contaminación.

Contaminantes y su impacto sobre la biota acuática

El desarrollo de las actividades humanas y la creciente urbanización mundial que implica el uso del agua, están perjudicando progresivamente la calidad de este recurso (UNESCO, 2006). Una de las consecuencias directas de este "progreso" es la gran productividad y el establecimiento de contaminantes en el ambiente, cuya presencia, como se mencionó anteriormente, altera su equilibrio ecológico. Estos pueden ser compuestos naturales o de origen antrópico (xenobióticos), con o sin toxicidad intrínseca, diferenciándose de este modo, los que son tóxicos de los que no lo son.

Entre estos últimos se encuentra por ejemplo, la variación térmica dada por el ingreso de los efluentes provenientes de la actividad industrial. El aumento de la temperatura del agua deriva en la disminución de la solubilidad del oxígeno en ella, lo cual afecta directamente a los organismos aeróbicos. Otros tipos de contaminantes no tóxicos como nutrientes, materia orgánica biodegradable y microorganismos patógenos provienen

principalmente de los drenajes de tierras agrícolas, de desechos domésticos e industriales, y de la actividad ganadera y desechos hogareños, respectivamente.

Algunos compuestos naturales, que son importantes para el crecimiento de muchos organismos acuáticos, pueden actuar como contaminantes a altas concentraciones. Al respecto, algunos metales esenciales (Fe, Mn, B, Zn, Cl, Cu, Ni) pueden ser limitantes en bajas concentraciones y a medida que sus niveles se incrementan, alcanzan concentraciones que resultan óptimas para el desarrollo de muchas funciones biológicas, actuando muchos de ellos como cofactores de proteínas (Marschner, 1993; Lee & Allen, 1998; Sigg *et al*., 1999; Glaesener *et al*., 2013; Malasarn *et al*., 2013; Jain *et al*., 2015; Kropat *et al*., 2015). La introducción de agentes quelantes en cultivos de microalgas con metales, ha sido de gran utilidad para estudiar la importancia de sus concentraciones en el crecimiento de estos organismos (Wheaton, 1982). Sin embargo, cuando los niveles de metales exceden las concentraciones óptimas, se ha visto que sus efectos sobre estos organismos son adversos (Baos *et al*., 2002; Ramanan *et al*., 2016). Lo mismo puede ocurrir con otro tipo de compuestos. Tal es así, que la materia orgánica disuelta en el agua naturalmente en sistemas no contaminados resulta favorable para el desarrollo de muchos microorganismos fitoplanctónicos; pero en exceso, puede resultar nociva para su desarrollo. Particularmente, en algunas especies de euglenofitos, se ha visto que el exceso de estos compuestos produce una serie de alteraciones a nivel celular que conducen finalmente a una disminución del crecimiento poblacional (Nannavecchia *et al*., 2014, Conforti *et al*., en prensa).

Por otro lado, el excesivo aporte de materia orgánica biodegradable de origen antrópico como la proveniente de las descargas de detergentes, aumentan las concentraciones de fosfatos, nitratros y cloruros en las aguas, lo cual provoca un enriquecimiento de nutrientes que afecta a la biota acuática (O'Farrel *et al*., 2002). Como consecuencia de esto ultimo, se produce una descompensación entre los procesos biológicos de síntesis y de degradación de la materia orgánica, que afecta especialmente a la biomasa algal y bacteriana (Huntsman & Sunda, 1980; Smith & Schindler, 2009). Los primeros efectos de la contaminación orgánica en el agua implican una disminución del oxígeno disuelto, lo cual ocasiona la eliminación y reemplazo de especies con alta demanda de oxígeno, aumentando los organismos con metabolismo anaeróbico, muchos de ellos patógenos. Como resultado de este proceso

denominado eutrofización, se produce un aumento de la biomasa y un empobrecimiento de la biodiversidad del ecosistema afectado (Cosme *et al*., 2015; Srivastava *et al*., 2015).

Entre los xenobióticos, se encuentran los plaguicidas, que son utilizados intencionalmente para destruir o controlar plagas como las de insectos, moluscos, microorganismos y hierbas, entre otras, que interfieren en la productividad de alimentos, propagan o son vectores de enfermedades, o causan molestias en los seres humanos y animales. La mayoría de los casos de contaminación por plaguicidas en los cuerpos de agua se deben al uso descuidado o abusivo de estos compuestos, ante los cuales inevitablemente quedan expuestos otros organismos "no blanco", que son afectados perjudicialmente directa o indirectamente. En la actividad agrícola se usan una gran variedad de pesticidas, entre ellos los herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y rodenticidas, de los cuales los dos primeros son los de mayor uso en Argentina (CASAFE, 2015). Por otro lado, la probabilidad de que se contamine el ambiente por hidrocarburos del petróleo es alta (Ferrera-Cerrato *et al*., 2006), debido a que en las sociedades modernas se hace uso excesivo de una gran variedad de estos compuestos tales como la gasolina, el kerosén, el aceite combustible, el aceite mineral y el asfalto. Estos están constituidos por una mezcla de sustancias químicas de carbono e hidrógeno derivadas originalmente del petróleo crudo. Estos contaminantes pueden llegar al ambiente terrestre o acuático a raíz de derrames accidentales desde las industrias manufactureras o como productos secundarios a raíz de su uso comercial o privado. En caso que sean liberados al suelo, ellos pueden adherirse a sus partículas permaneciendo así durante mucho tiempo, o ser degradados por microorganismos. También pueden movilizarse hacia el agua subterránea y, desde allí, evaporarse y pasar al aire o disolverse alejándose del área de liberación. En contacto con el agua superficial, pueden flotar formando una capa delgada, evaporarse o dirigirse y acumularse en el sedimento del fondo pudiendo afectar a peces y a otros organismos que se alimentan del bentos. Otros contaminantes altamente tóxicos son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), producidos durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, la basura y otras sustancias orgánicas. Existen más de 100 clases diferentes, algunos se encuentran naturalmente en el ambiente y otros son xenobióticos. Los HAPs de más de 4 anillos bencénicos son muy poco solubles y tienen una mayor recalcitrancia (Petro Cardona & Mercado Montero, 2015). Los más tóxicos son

los subproductos organoclorados que se forman, tales como dioxinas, dibenzofuranos, bifenilos y bencenos policlorinados, todos ellos no biodegradables. Es así que el mayor peligro asociado a estos compuestos es la bioacumulación a lo largo de la cadena trófica y su persistencia en el tiempo. Este proceso comienza por el ingreso de los HAPs en la comunidad fitoplanctónica (Allen-Gil *et al*., 1997), quien puede metabolizarlos o biotransformarlos (Tiko *et al*., 1997; Semple *et al*., 1999; Yang *et al*, 2002).

Los metales pesados, todos aquellos que poseen una densidad mayor que cinco (Whitton, 1984), se dispersan por fenómenos naturales y/o por las actividades humanas relacionadas con la industria química, la metalúrgica, la actividad agrícola intensiva, la descarga de plantas de tratamiento municipales o industriales, la utilización de combustible fósil, la producción de cemento y la actividad minera (Xue *et al*., 2003; Potikha, 2012; Chernova *et al*., 2105). Los más importantes en función del daño que ocasionan al medio ambiente, considerados de este modo por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), son: el arsénico, el cadmio, el cobalto, el cobre, el mercurio, la plata, el plomo, el selenio, el titanio y el zinc. Su grado de toxicidad y de tolerancia, varía de un metal a otro y depende de su concentración y de su movilidad en el ambiente, que a su vez depende de su especiación química, persistencia y tendencia a la acumulación o bioacumulación (Hörcsik *et al*., 2006; Domenech & Peral, 2008; Kumar, *et al*., 2012; Jasrotia *et al*., 2014). El termino especiación alude a la presencia de los metales en el agua en varias formas o "especies metálicas" que se distribuyen en una fracción soluble y una insoluble. Entre las formas de la fracción soluble se encuentran el ión metal libre en diferentes estados de oxidación, y el asociado formando complejos orgánicos e inorgánicos simples. La fracción insoluble comprende los coloides orgánicos e inorgánicos, los ligados a superficies de óxidos de hierro y manganeso, y aquellos asociados a partículas sólidas con superficie cargada negativamente (Stumm y Morgan, 1996). De todas estas formas, el ión metal libre es la que determina la disponibilidad o la toxicidad de los metales para los organismos (Campbell, 1995). Asimismo, muchos ligandos orgánicos simples pueden incrementar la incorporación intracelular de metales (Errécalde y Campbell, 2000; Wang *et al*., 2013).

En presencia de metales, las células desempeñan dos tareas de vital importancia para mantener un equilibrio en relación con los iones de estos elementos presentes y disponibles en el medio circundante. La primera es seleccionar aquellos metales pesados esenciales para el

crecimiento y excluir a los que no lo son, y la segunda es mantener concentraciones intracelulares óptimas de los iones esenciales (Cobbett y Goldsbrough, 2002). Los límites de las concentraciones tóxicas en el ambiente, difieren para cada metal, acorde con el nivel de susceptibilidad de los organismos que afecta y dependen de los efectos fisiológicos asociados (Sengupta, 2002) (**fig. 1**).

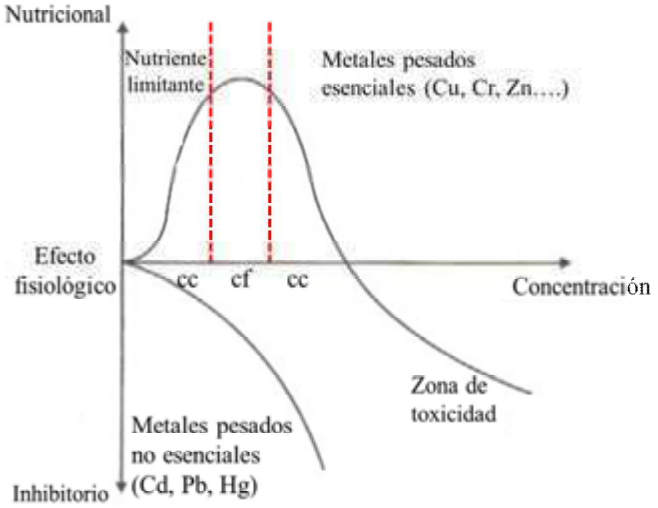


Figura 1. Efectos fisiológicos (nutricional o inhibitorio) de los metales pesados en los seres vivos. cc: concentración crítica; cf: concentración fisiológica. Figura adaptada del trabajo de Sengupta (2002).

Muchos cationes funcionan como macronutrientes celulares, ellos corresponden al grupo de los cationes fuertes tales como el sodio (Na^+), el potasio (K^+), el magnesio (Mg^{2+}) y el calcio (Ca^{2+}). Estos forman complejos solubles con fluoruro (F^-) y ligandos que contienen oxígeno (O^{2-}), y precipitados solubles al unirse con grupos hidroxilo (-OH), carbonato (CO_3^{2-}) y fosfatos (PO_4^{3-}). El Ca^{2+}, por ejemplo, es un mensajero intracelular que se une a proteínas por los grupos funcionales carbonilo (-CO), carboxilo ($-CO_2H$) y -OH activando múltiples funciones celulares. Otro catión vital es el Mg^{2+}, el cual se enlaza al nucleótido ATP inactivo y forma el complejo ATP-Mg activo biológicamente, además es indispensable para la estabilidad de todos los compuestos polifosfatados de las células incluyendo a aquellos relacionados con la síntesis de los ácidos nucleicos al actuar como cofactor de la ADN polimerasa. Por otro lado, el Mg^{2+} es la base estructural de la molécula de clorofila. Otros cationes constituyen micronutrientes esenciales u oligoelementos que actúan como cofactores

de proteínas y de enzimas. Estos son el cobre (Cu^{+}), el zinc (Zn^{2+}) que forman complejos solubles con ioduro (I-), cloruro (Cl-), sulfuro (S^{2-}), sulfhidrilo (SH-) o cianuro (CN-), y metales de transición como el hierro (Fe^{2+}, Fe $^{3+}$), cobalto (Co^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), molibdeno (Mo^{6+}), niquel (Ni^{2+}) y cobre (Cu^{2+}) que establecen uniones a S^{2-} y SH^{-}. Por ejemplo, el Fe^{2+} es cofactor de la enzima ferredoxina que interviene en la fijación de nitrógeno, y además junto con el Cu^{2+} son cofactores de diferentes enzimas que actúan en el transporte de electrones en el proceso de fotosíntesis y respiración celular. Otros cationes esenciales lo son el Mo^{6+}, que es cofactor de la enzima nitrato reductasa importante en la asimilación del nitrógeno, y el Zn^{2+} que funciona como cofactor de la ADN y ARN polimerasas, enzimas que interviene en la replicación y transcripción de los ácidos nucleicos.

Otros cationes metálicos como el Cd^{2+}, el Hg^{2+}, el Cr^{3+}, el Pb^{2+}, el Ni^{2+} y el metaloide arsénico (As $^{3+,\ 5+}$) por ejemplo, se los consideran "no esenciales" al no formar parte de procesos biológicos. Al no ser estos biodegradables pueden acumularse por procesos de bioconcentración y transferirse a los diferentes niveles tróficos dando lugar a fenómenos de biomagnificación (Deacon y Driver, 1999; Pistocchi *et al*., 2000; Azizur Rahman *et al*., 2012; Birungi & Chirwa, 2015). A su vez, independientemente de su concentración en el medio, pueden ser fácilmente absorbidos por la biota acuática sobre la que ejercen diversos efectos (Cervantes *et al*., 2006), como unirse a componentes celulares vitales tales como proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, e interferir con el funcionamiento celular. De este modo, interfieren con procesos celulares vitales como el crecimiento (Cordero *et al*., 2005; Jyothi *et al*. 2012; Becaro *et al*., 2015) y la fotosíntesis (Kuepper *et al*., 2002, Perales y González-Moreno, 2007; Wang *et al*., 2012; Suresh Kumar *et al*., 2014), alteran la permeabilidad de la membrana plasmática celular por la sustitución de grupos fosfatos de moléculas biológicas como los fosfolípidos y proteínas integrales de la membrana (Rai *et al*., 1991; Miot *et al*., 2009, Wang *et al*., 2013; Azizur Rahman *et al*., 2014), generan especies reactivas de oxígeno desencadenando daño oxidativo a biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Lage *et al*., 1994 a; Wong *et al*., 1994; Girotti, 2001; Watanabe *et al*., 2003; Mallick, 2004; Rocchetta *et al*., 2006 a, b; Rocchetta *et al*., 2007; Nowicka *et al*., 2016) y diferentes respuestas antioxidantes (Yang *et al*., 2002; Lei *et al*., 2003; Watanabe y Suzuki, 2004; Suman *et al*., 2015).

Indicadores de contaminación acuática

Los cambios en la calidad del agua pueden ser determinados y monitoreados a través de la medición y la evaluación de diferentes parámetros indicadores. Estos se diferencian en índices biológicos y fisicoquímicos. Los primeros se basan en determinaciones cuantitativas y cualitativas de la ictiofauna, la fauna bentónica de invertebrados, los macrófitos, el zooplancton, el bacterioplancton, el fitoplancton y el fitobentos, entre otros. Los fisicoquímicos implican una serie de mediciones de los factores abióticos del sistema (**tabla 1**).

Tabla 1. Indicadores abióticos de la calidad del agua

Parámetros			
Fisicoquímicos generales	**Hidrológicos y morfométricos**	**Estéticos**	**Radioactivos**
temperatura	caudal	percepción de olores	emisiones de radiación alfa, beta y gamma
turbidez y transparencia	profundidad	observación de manchas,	
color	longitud	colores y material flotante	
sólidos suspendidos y disueltos			
pH			
oxígeno disuelto			
demanda biológica de oxígeno (DBO)			
demanda química de oxígeno (DQO)			
nutrientes (nitrógeno y fósforo)			
compuestos orgánicos e inorgánicos			

Habitualmente, el monitoreo y la evaluación de la calidad del agua de los ecosistemas acuáticos se realiza mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos,

debido a que es el método más directo para la obtención rápida de resultados precisos en valor absoluto. La ventaja de estas mediciones consiste en que la mayoría de ellas se pueden realizar *in situ* y de esos resultados se puede inferir el estado de ese sitio. Si la medición se realiza sobre el efluente contaminante se podrán preveer las medidas que permitan operar controles sobre esas descargas. Como desventajas se pueden indicar que proporcionan información parcial y puntual al momento del muestreo. Es decir, no contemplan las variaciones en la cantidad de contaminantes que ingresaron al sistema o sus intermitencias, como así tampoco si hubo descargas de contaminantes anteriores al momento del monitoreo. Por lo tanto, los resultados obtenidos de este análisis, dan una idea de las condiciones del agua en un momento específico y no permiten interpretar lo acontecido tiempo atrás en ese curso de agua. Por otro lado, aquellas sustancias que pueden bioacumularse podrían no ser detectadas si las técnicas analíticas aplicadas no son lo suficientemente sensibles, y lo mismo sucede cuando el monitoreo fisicoquímico se realiza en zonas alejadas del foco de contaminación. Mas aún, para la detección de sustancias tóxicas, el análisis químico revela sólo la existencia de sustancias para las cuales este estudio ha sido diseñado, ignorando otras.

Frente a la limitación que ofrece el tipo de monitoreo fisicoquímico, surge la necesidad de contar con información que refleje la integridad ecológica global y los cambios ambientales significativos. Dado esto, además de estos parámetros, se hace necesario conocer las características biológicas del ecosistema en cuestión. Esta información integrada de todas las variables, bióticas y abióticas actuando simultáneamente, nos brindan una idea más acabada de la situación (Whitton y Kelly, 1995). El monitoreo biológico tiene como principal ventaja, el proporcionar una visión integrada y extendida en el tiempo de la calidad del agua, dado que los organismos responden a la totalidad de las condiciones ambientales acontecidas a lo largo de sus vidas. De este modo, ellos son una evidencia indirecta de los factores que actuaron tiempo atrás o de vez en cuando en el ambiente y que no podrían ser registrados en uno ni en varios muestreos fisicoquímicos repetidos.

Los estudios implícitos en el monitoreo biológico analizan respuestas que varían en cuanto a la abundancia y distribución de los organismos. Entre ellas se encuentran las respuestas individuales que se dan en horas a semanas y que pueden ser de tipo

bioquímica, fisiológica, morfológica y/o comportamental. Para clasificar y obtener la abundancia de organismos de una muestra de agua natural, se elaboran listas de especies, por ejemplo, relacionadas con sitios con diferente grado de contaminación, y se realizan recuentos para estimar su cantidad relativa. La integración de estos resultados posibilita la elaboración de índices de biodiversidad. La interpretación de esta información, es de gran utilidad en la búsqueda de especies y asociaciones de organismos como indicadores ecológicos. También se pueden analizar las respuestas supraorganismo en las que se tienen en cuenta datos provenientes de semanas a años del sistema en estudio. Se pueden evaluar cambios en la estructura y la dinámica de las comunidades, alteraciones de la biomasa y de la productividad, alteraciones de las tramas tróficas, reducción de la tasa de descomposición orgánica y modificaciones en los ciclos biogeoquímicos.

Como se comentó anteriormente, la calidad del agua tiene incidencia directa en la salud de los organismos y en el equilibrio de los ecosistemas. Es así que la contaminación disminuye el valor del recurso natural, ya sea por perder su condición de poder ser utilizado como fuente de agua potable, o por el deterioro de su capacidad de sustento de las comunidades que la habitan. De este modo, con el objetivo central de conservar la salubridad e integridad de los ecosistemas acuáticos se han desarrollado diversos "índices de calidad del agua" que informan del estado general de las aguas en función de rangos de calidades establecidos. Estos índices se construyen fundamentalmente en base a parámetros fisicoquímicos (Lamontagne y Provencher, 1977; Queralt, 1982) e indicadores biológicos (Shannon y Weaver, 1949; Woodiwiss, 1964; Hellawell, 1978 y Alba-Tercedor *et al*., 2002). Estos se valen de los denominados "niveles guía de calidad del agua" que son rangos numéricos asignados en función del uso que va a tener ese recurso, los cuales permiten controlar y mejorar su utilidad específica. Para su elaboración se toma como nivel de referencia el de las aguas no contaminadas, a partir del cual, y en base a criterios de ecotoxicidad, se establecen los diferentes niveles de protección. Pasados estos umbrales, las condiciones que ofrece el cuerpo de agua resultan perjudiciales sobre los organismos, indicando niveles letales y subletales de toxicidad.

En resumen, para establecer estándares de calidad del agua y determinar el nivel aceptable de un contaminante, se requiere de la información obtenida del relevamiento físico y químico, del monitoreo biológico y de las investigaciones ecofisiológicas y

toxicológicas. Estas últimas se realizan en el laboratorio mediante bioensayos de toxicidad estandarizados, empleando especies ya establecidas como modelo biológico o especies autóctonas. Como ejemplo, se encuentran los protocolos implementados por la US EPA, 1994 (United States Environmental Protection Agency). Los bioensayos de toxicidad permiten predecir y cuantificar el efecto de los contaminantes mediante el análisis de variaciones en parámetros bioquímicos, fisiológicos, comportamentales y poblacionales y posibilitan evaluar la toxicidad subletal. La integración de toda esta información posibilita establecer medidas de control de la contaminación, el chequeo de la eficiencia de los tratamientos de desechos aplicados y la formulación de mejores estrategias para el manejo de las aguas.

Bioindicadores y biomarcadores de contaminación acuática

Los bioindicadores son organismos o comunidades, que por su presencia y abundancia proveen alguna información, ya sea cualitativa, cuantitativa o ambas, de las condiciones ambientales imperantes en un determinado lugar (Hellawell, 1978). Ellos pueden emplearse como señales de alerta que reflejan el estado de "salud" de un sistema (Bellinger y Sigee, 2010) ya que su existencia, sus características estructurales y sus respuestas cambian al modificarse las condiciones ambientales. De ahí su utilidad en estudios de evaluación de calidad del agua, especialmente en sistemas contaminados cuyas condiciones, en su mayoría complejas, son el resultado de muchos factores difíciles de separar (Ghetti, 1980). La diversidad de organismos indicadores de contaminación acuática es amplia y, aunque la gran mayoría de ellos pertenecen a los niveles inferiores de la cadena trófica, incluyen bacterias, protistas, macrófitas, peces y macroinvertebrados.

La elección y clasificación de los organismos bioindicadores se realiza según diferentes criterios, basados en su sensibilidad, tipo y medición de su respuesta a los contaminantes (Capó-Martí, 2002). Lo más habitual, consiste en percibir el nivel de sensibilidad que tienen algunas especies frente a diferentes estímulos ambientales, existiendo un amplio espectro de reacción, desde las muy sensibles hasta las resistentes, pasando por todas las gradaciones intermedias. Los organismos también pueden diferenciarse según el tipo de respuesta que expresan frente a las alteraciones ambientales.

Así es que pueden encontrarse los detectores, cuyas respuestas implican entre otras, cambios en la vitalidad, la mortalidad, la capacidad reproductiva y la abundancia. Los explotadores, por su presencia indican alta probabilidad de que haya ocurrido una perturbación y como consecuencia traen aparejado la eliminación de especies competidoras, provocando una abundancia repentina de estos bioindicadores. Los centinelas, funcionan como "alarmas" de detección de contaminantes por su alta sensibilidad y rápida respuesta. Los acumuladores, generalmente son resistentes a ciertos compuestos que pueden absorber y acumular. Por último, los organismos de prueba o modelos, son los usados en ensayos de laboratorio para detectar la presencia y concentración de tóxicos. También se los puede diferenciar de acuerdo a la posibilidad de medida de su respuesta. Los bioindicadores en sentido estricto indican con su presencia y abundancia o su ausencia los efectos de un factor ambiental de forma cualitativa. Por otro lado, los biomonitores son especies que indican de manera cuantitativa la perturbación ambiental (Whitton, 1984), ya que sus respuestas son proporcionales al grado de la alteración.

Para que un organismo pueda ser calificado como un bioindicador debe reunir una serie de requisitos, a saber:

- ser especies estenoicas, es decir organismos adaptados para ocupar un nicho ecológico muy estrecho, en el que al cambiar sus condiciones se les hace muy difícil readaptarse;
- ser sedentario, para permitir un análisis efectivo de las perturbaciones;
- ser abundante bajo condiciones favorables;
- ser fácilmente identificable, para lo cual se debe disponer de claves de identificación taxonómica adecuadas que permitan una correcta interpretación de los datos;
- ser bien conocido en cuanto a su tolerancia ecológica, sus requerimientos y sus adaptaciones para resistir la contaminación aguda y crónica;
- ser fácil de muestrear y de cuantificar;
- estar asociado a una abundante información autoecológica, para la realización de un buen análisis de los resultados de estudios de contaminación o índices bióticos;
- tener importancia económica como recurso, perjuicio o peste;

- acumular fácilmente los contaminantes, lo cual permite inferir sobre los niveles de estos en el ambiente, y así facilitar la comprensión de su distribución en función del nivel de los contaminantes;
- ser fácilmente cultivable en el laboratorio;
- tener baja variabilidad, tanto genética como en su función en la comunidad biológica (Hellawell, 1986; Bellinger y Sigee, 2010).

Las investigaciones sobre los bioindicadores de contaminación implican dos niveles de estudio. Se pueden hacer investigaciones autoecológicas, mediante las que se establecen los límites de tolerancia de una especie a una sustancia o a una mezcla, o por ensayos ecotoxicológicos desarrollados en el laboratorio. Por otro lado, el otro nivel corresponde a los estudios sinecológicos, que se basan en la observación y el análisis de las relaciones entre las diversas especies de organismos de una población y el medio que habitan.

En los casos en que los cambios inducidos por los contaminantes sean demasiado complejos y no son visibles rápidamente, el uso de organismos indicadores retardaría la predicción de la calidad ambiental (Depledge *et al.*, 1993). En esta situación, el uso de marcadores que puedan proporcionar un pronóstico temprano de advertencia sobre la calidad del agua, constituye una medida adecuada para la solución a ese problema. Para ello, se caracterizan distintos marcadores a nivel molecular, bioquímico, celular y fisiológico, que responden a cambios ambientales y reciben el nombre de biomarcadores. Peakall (1994) los define como una respuesta biológica a uno o más productos químicos, que da una medida de la exposición y, a veces también, de efecto tóxico. En general, los biomarcadores se definen como medidas cuantitativas de cambios en el sistema biológico, las que pueden estar relacionadas con la exposición a sustancias químicas ambientales (OMS, 1993). Dichos cambios son indicativos de la toxicidad de los xenobióticos (Lam y Gray, 2003; Van der Oost et al., 2003).

Indicadores fitoplanctónicos

Los organismos de la comunidad fitoplanctónica cuentan con una serie de características fundamentales que los hace ventajosos en cuanto a su utilidad como

indicadores de la calidad del agua, ya que en muchos casos permiten una rápida evaluación. Ellos responden rápidamente a los cambios ambientales por ser muy sensibles a los tóxicos, aun más que organismos tales como invertebrados y peces (Lewis, 1995). Además, presentan ciclos de vida cortos con curvas de crecimiento exponencial, son fáciles de cultivar y muestran una rápida respuesta fisiológica, por lo cual los efectos de los tóxicos pueden detectarse rápidamente.

La escala de tiempo en la que suceden las perturbaciones en la comunidad fitoplanctónica, como consecuencia de cambios en el ambiente, abarca desde segundos hasta años (**fig. 2**).

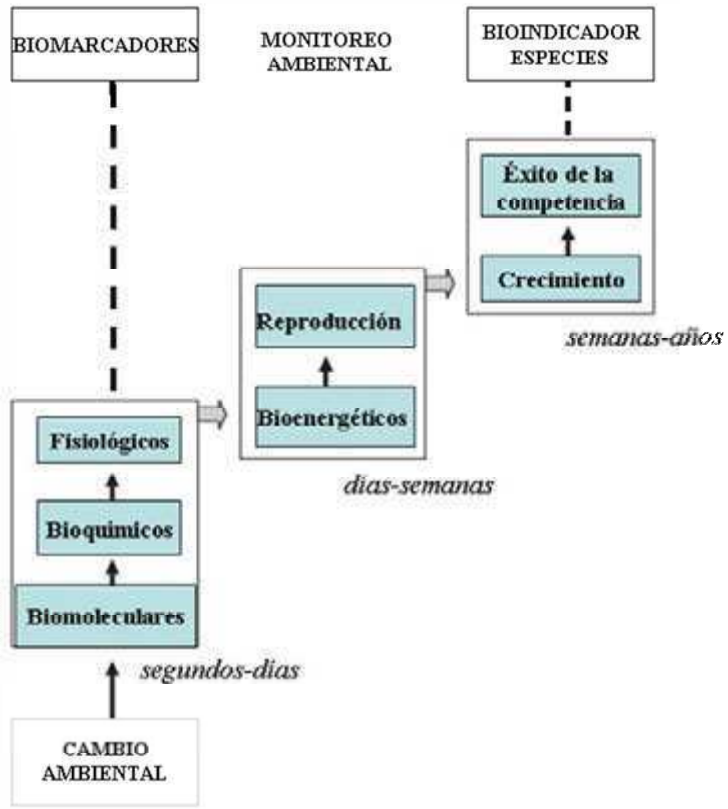


Figura 2. Respuestas jerárquicas de las algas a las alteraciones de la calidad del agua. La diferencia en el tiempo de respuesta se relaciona a diferentes aspectos de la comunidad algal: "sub-organismos" a la izquierda, individuos en el centro y población a la derecha. Figura adaptada del trabajo de Adams (2005).

El monitoreo ambiental implica la observación y el seguimiento de las respuestas a nivel de biomarcadores y especies bioindicadoras (Adams, 2005). Aunque la rápida

respuesta de los biomarcadores los hace útiles como sistema de alerta temprana de los cambios ambientales, el uso de bioindicadores proporciona resultados con alta relevancia ecológica y tiene la ventaja de poder analizar las muestras en cualquier momento, luego de haberlas fijado químicamente.

El ingreso de un contaminante o cualquier otro evento particular que perturbe las condiciones iniciales de un sistema acuático, tiene una serie de efectos en los organismos, quienes responden individualmente manifestando alteraciones a nivel de marcadores, como pueden ser los parámetros bioquímicos y/o fisiológicos. Por ejemplo, se ha visto que, frente a la exposición gradual a metales pesados, muchas especies de algas responden tempranamente acumulándolos intracelularmente (Rocchetta *et al*., 2007; Halter *et al*., 2012) situación que puede reflejar niveles iniciales de contaminación ambiental. Con el transcurso del tiempo, los efectos de la contaminación se reflejan a nivel de especies indicadoras. Por ejemplo, la ausencia de ciertas especies sensibles, constituye una evidencia de toxicidad elevada y la superación de un umbral de tolerancia a los contaminantes. Aquellas especies que permanecen, tolerantes o facultativas, prosperan, lo cual sería una prueba de que durante su ciclo de vida la contaminación no excedió su umbral de tolerancia.

De este modo, el efecto de los contaminantes sobre los organismos ocasiona cambios a nivel poblacional, comunitaria y/ o ecosistémica. La magnitud de estos cambios depende del tiempo que dure la perturbación de las condiciones iniciales, su intensidad, su naturaleza y la sensibilidad de los organismos (Pinilla, 2000).

Además de la utilidad de las algas como biomarcadores en las normas de calidad de sistemas acuáticos y aguas residuales (Lann *et. al*., 1999) ellas también son empleadas en ensayos toxicológicos cuyo objetivo es poder determinar los efectos de diferentes contaminantes, como así también, establecer niveles límite de riesgo ecológico. La ventaja de emplear algas en estos tipos de estudios, radica en la rapidez de su realización, con resultados altamente reproducibles (Stauber, 1995). Ellas responden a la presencia de concentraciones muy bajas de sustancias tóxicas, y permiten evaluar el efecto combinado de diversos compuestos.

Efectos de los contaminantes sobre el fitoplancton

Como se mencionó anteriormente, los contaminantes en el ecosistema acuático pueden alterar la composición y abundancia de la comunidad fitoplanctónica. Esta situación repercute rápidamente sobre los organismos de los niveles tróficos superiores (Schäfer *et al*., 2011) debido al rol de las algas como recicladores de nutrientes, generadores de la mayor parte del oxígeno del agua y principales productores primarios. En general, los contaminantes producen efectos nocivos sobre las algas, afectándolas a nivel bioquímico y celular. Entre ellos se incluyen: alteraciones del crecimiento (Angel *et al*., 2015; Ji *et al*., 2011; Tai *et al*., 2010) y la morfología (Watanabe y Suzuki, 2002 Rocchetta *et al*., 2007; Bauer *et al*., 2012; Suman *et al*., 2015; Nannavecchia *et al*., 2014; Asselborn *et al*., 2015), pérdida de la integridad de membrana (Machado *et al*., 2015; Nogueira *et al*., 2015), inhibición de la actividad enzimática (Machado *et al*., 2015), alteración en la síntesis proteica (Rocchetta *et al*., 2007), destrucción de pigmentos fotosintéticos e inhibición de su síntesis (Küpper *et al.,* 2002; Schiariti *et al*., 2004; Satoh *et al*. 2005; Juárez *et al*., 2006; Bakar *et al*., 2015; Nowicka *et al*., 2016), feofitinización de pigmentos fotosintéticos y variaciones en la motilidad celular (Rodríguez *et al*., 2007), disminución de la fotosíntesis (Booij *et al*., 2015; Kumar *et al*., 2014), generación de especies reactivas de oxígeno (Dao y Beardall, 2016), expresión de respuestas antioxidantes (Lei *et al*., 2003; Rocchetta *et al*., 2003; Johnstone *et al*., 2006; Chen *et al*., 2012) y generación de daño oxidativo (Li *et al*., 2015; Yang *et al*., 2002), entre otras.

La supervivencia de los organismos fitoplanctónicos en aguas contaminadas se debe posiblemente al desarrollo de mecanismos de resistencia a los tóxicos presentes en el ambiente, que implican procesos fisiológicos de tolerancia o de adaptación a través de cambios genéticos (Klerks & Weis, 1987; García-Balboa *et al*., 2013). En el caso de los metales, el conocimiento sobre sus mecanismos de toxicidad, y el sistema de defensa y/o detoxificación de las algas, es fundamental para entender el proceso de tolerancia. En este sentido, se ha determinado que algunas algas, como un mecanismo de protección contra la toxicidad de los metales pesados, aumentan la producción de polisacáridos de su pared celular (Andrade *et al*., 2010). Otras, frente a elevadas concentraciones de metales en el medio extra e intracelular, sintetizan péptidos que ligan al tóxico en el interior de la célula

(Torres *et al*., 1997, 2000; Pistochi *et al*., 2000) u otros quelantes como los ácidos orgánicos (malato, glutamato, citrato), el fosfato y el pirofosfato (Avilés *et al*., 2003, 2005), los que les posibilitan resistir tales condiciones. Otro mecanismo de resistencia consiste en acumular el metal en vacuolas citoplasmáticas (Andrade *et al*., 2004; Cervantes *et al*., 2006; Rocchetta et al. 2007).

Entonces, las algas que viven en sitios contaminados con metales pesados han desarrollado estrategias de resistencia, las cuales podrían ser consecuencia de procesos de adaptación fisiológica (aclimatación), procesos de mutación post-adaptativa o procesos de mutación antes de la exposición (Maravá *et al*., 2010). Por ejemplo, en un bioensayo de toxicidad aguda con cromo, se ha visto que una cepa de la microalga *Euglena gracilis* aislada de un río contaminado con dicho metal, entre otros tóxicos, presentaba una mayor tolerancia que una cepa crecida bajo condiciones óptimas de cultivo y que nunca había sido expuesta al cromo (Rocchetta *et al*., 2003). También pueden ocurrir mutaciones espontáneas que den lugar a novedades evolutivas en los ambientes acuáticos. Por ejemplo, se ha determinado que algunos organismos sensibles, disminuyen su tasa de crecimiento cuando son expuestos a un contaminante pero, con el paso del tiempo, pueden recuperar el crecimiento porque se desarrollan formas resistentes (Lopez-Rodas *et al.*, 2001) que son el resultado de mutaciones post-adaptativas.

La distribución cuantitativa y cualitativa de algunas microalgas en el ecosistema acuático, sugiere estados de preferencia o de tolerancia por algún compuesto químico presente. Por ejemplo, una presencia importante de euglenófitos en cuerpos de agua, puede ser indicativa de la existencia de determinados niveles de materia orgánica biodegradable (Conforti *et al*., 2005), en general esta condición incluye el desarrollo de bacterias, de cuyos metabolitos (vitaminas) se nutren estas microalgas. Por otro lado, una gran diversidad de este grupo también puede encontrarse en sitios contaminados con metales tóxicos. Su resistencia podría deberse a una amplia tolerancia a condiciones nocivas, o bien que las poblaciones presentes en esos ambientes representan nuevas variedades / clones que evolucionaron en aguas contaminadas con metales y están adaptadas para vivir en este entorno (Płachno *et al*., 2015).

Estrés oxidativo

El sistema de producción de energía en todos los organismos aeróbicos emplea una ruta metabólica en la que el oxígeno es el último aceptor de electrones. En este proceso se producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs). En general, las EROs se generan a partir de la excitación de una molécula de O_2 y la formación de oxígeno singulete ($^1O_2$), o a través de la transferencia de uno, dos o tres electrones hacia el O_2, que resulta en la formación del radical anión superóxido ($^{\cdot}O_2^-$), de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o del radical hidroxilo ($^{\cdot}OH^-$), respectivamente (Baker y Orlandi, 1995). En presencia de oxígeno también se generan especies reactivas del nitrógeno tal como el óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), que es un radical libre formado por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). En los organismos aeróbicos fotosintéticos, las principales fuentes endógenas de EROs las constituyen el sistema mitocondrial de transporte de electrones, donde éstas se forman como producto secundario del metabolismo energético oxidativo (Kowaltowski, *et al*., 2009) y las reacciones que ocurren en los fotosistemas durante la fotosíntesis (Asada, 1999). Además, la producción de EROs, puede ser inducida por factores bióticos o abióticos como desecación, salinidad y presencia de contaminantes (Fujita *et al*., 2006). Por ejemplo, el exceso de metales de transición conduce a una superproducción de EROs, siendo las más peligrosas $^{\cdot}O_2^-$, H_2O_2, y $^{\cdot}OH^-$.

Los niveles de EROs o de especies reactivas del nitrógeno, depende del balance entre su velocidad de formación y de neutralización o eliminación por el sistema de defensa antioxidante. De este modo, la autorregulación del estado redox celular, se mantiene por medio de diversos mecanismos que lo reestablecen después de una exposición a elevadas concentraciones de especies oxidantes. Las EROs son altamente reactivas y pueden oxidar moléculas celulares claves, pero también son fundamentales por formar parte de un sistema de señalización que implica la detección, síntesis y regulación de biomoléculas implicadas en respuestas protectoras a daños oxidativos (Mittler, 2002); de este modo, cuando su concentración aumenta, se induce la expresión de genes que codifican la síntesis de proteínas y otros compuestos con actividad antioxidante.

Si la formación de EROs supera la capacidad antioxidante, se produce daño oxidativo a biomoléculas y esa situación se denomina de estrés oxidativo y puede conducir

finalmente a la muerte celular (Strayer, 2003; Demidchik, 2015). El perjuicio ocasionado por estas especies implica la oxidación de macromoléculas esenciales como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, pudiendo ocasionar alteraciones en estructuras celulares, mutagénesis y muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1984, 1999; Buettner, 1993; Powell, 2000; Strayer, 2003). En presencia de EROs, biomoléculas tales como los lípidos son degradadas en un proceso, denominado peroxidación lipídica, que se inicia con una reacción en cadena de un radical libre. En este proceso, los ácidos grasos pueden perder un átomo de hidrógeno, dando lugar a la formación de una serie de radicales libres (radical libre de ácido graso y radical libre de lipoperóxido), algunos de los cuales pueden reaccionar con hierro (II) produciendo radicales libres más reactivos. Estos últimos pueden reiniciar la lipoperoxidación al sustraer un hidrógeno de un ácido graso adyacente el cual, a través de una cadena de sucesivas sustracciones, es degradado a alcoholes, hidrocarburos, ésteres, epóxidos y aldehídos. Esta cascada de reacciones químicas explica el daño que producen los radicales libres sobre los fosfolípidos de las membranas celulares. Consecuentemente, la oxidación de proteínas de membrana puede ocurrir por acción directa de las EROs y por la unión de radicales derivados de lípidos con sus aminoácidos. El daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante EROs es sitio-específica. En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las EROs, que llegan al interior del núcleo celular como consecuencia de un agente externo o de procesos metabólicos celulares. El daño oxidativo al ADN implica ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las dos hebras, modificación de las bases nitrogenadas y formación de uniones cruzadas ADN-ADN ó ADN- proteína, a través de diferentes mecanismos (Zorrilla *et al*., 2004)

La presencia de contaminantes en el medio, puede generar en las células una mayor producción de EROs, lo cual constituye un riesgo para la integridad de moléculas esenciales. Bajo estas circunstancias, las células responden mediante un sistema de defensa antioxidante que retrasa o inhibe la oxidación de dichas moléculas. Éste puede actuar disminuyendo la concentración de oxidantes, deteniendo la propagación y el aumento de los radicales libres, evitando la iniciación de la reacción en cadena al suprimir la reactividad de los primeros radicales libres que se forman, transformando los peróxidos en formas menos reactivas o uniéndose a metales para evitar la formación de especies

reactivas. Para ello, este sistema se vale de numerosos mecanismos antioxidantes que incluyen enzimas y moléculas no enzimáticas de bajo peso molecular (Ríos de Molina, 2003) (**fig. 3**). Las principales enzimas antioxidantes involucradas en estos procesos son:

1) la superóxido dismutasa (SOD), la cual dismuta el anión superóxido a oxígeno y agua. Esta es una reacción clave en la defensa celular contra el estrés oxidativo, debido a que el anión superóxido es precursor de otras EROs (Hassan y Scandalios, 1990).

2) la catalasa (CAT), la cual cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

3) la glutatión-peroxidasa (GPx) la cual cataliza la reducción de H_2O_2 y otros peróxidos, utilizando como co-sustrato al glutatión reducido (GSH), que es oxidado a GSSG.

4) la glutatión-reductasa (GR) la cual cataliza la reducción del GSSG a GSH, que será utilizado por la GPx para la reducción del H_2O_2 y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos.

5) la ascorbato peroxidasa (APx) la cual utiliza el ascorbato como dador de electrones para reducir el H_2O_2 a agua (Nowicka et al 2016).

6) la glutatión–S-transferasa (GST) también puede considerarse con cierta participación en este sistema antioxidante, su función principal es la desintoxicación celular mediante la conjugación de GSH con xenobióticos, con lo cual neutraliza o elimina moléculas prooxidantes.

Los mecanismos no enzimáticos involucran metabolitos antioxidantes tales como el beta-caroteno, el alfa-tocoferol, el ácido ascórbico y el glutatión reducido (GSH) entre otros (Sies, 1997), que actúan donando electrones a otras sustancias, reduciéndolas y haciéndolas menos reactivas. Además de estos mecanismos de defensa, existen proteínas específicas que captan iones metálicos a través de su unión a los grupos sulfhidrilos de las cisteínas, como son las fitoquelatinas y las metalotioeneínas, cuya síntesis se activa ante la presencia de metales.

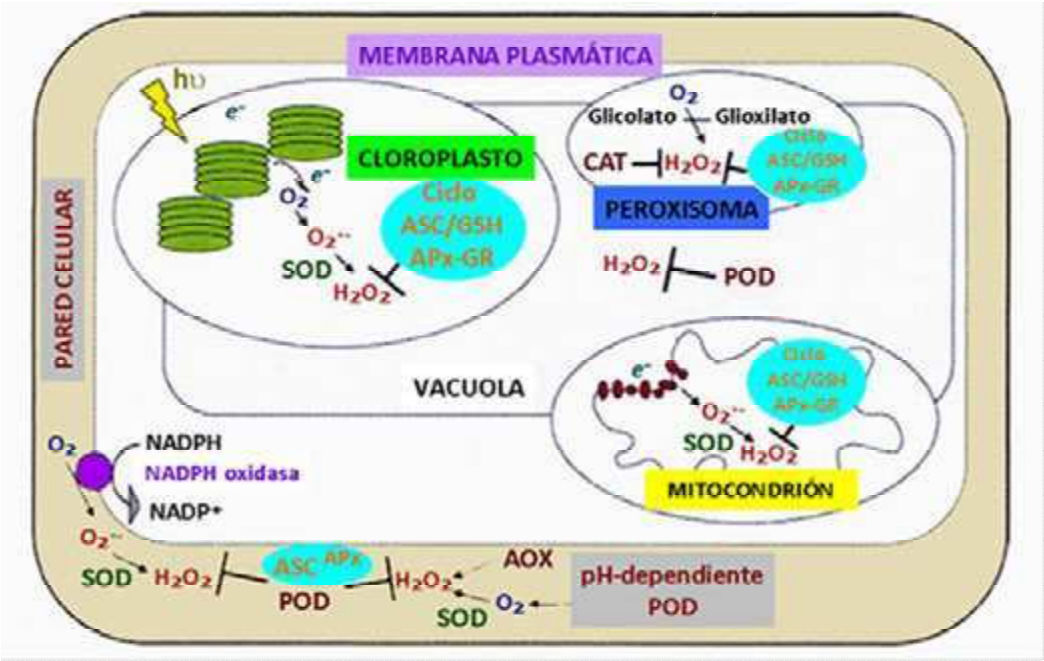


Figura 3. Principales sitios de producción y eliminación de EROs en las células fotosintéticas. Aascorbato (ASC), glutation (GSH), ascorbato peroxidasa (APx), glutation reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa, catalasa (CAT). Imagen modificada del trabajo de De Gara *et al*. (2010).

Existen antecedentes sobre la generación de EROs y producción de estrés oxidativo en el efecto de distintos contaminantes ambientales (Elbaz *et al*., 2010; Chen *et al*., 2016, Marques *et al*., 2016). Investigaciones realizadas utilizando algas, determinaron que la respuesta a muchos contaminantes ocurre mediante la inducción del sistema de defensas antioxidantes, incluyendo enzimas tales como la SOD, CAT, GPx y APx, y la síntesis de compuestos de bajo peso molecular tales como los carotenoides, el ascorbato y el glutatión (Pinto *et al*., 2003, Rocchetta *et al*., 2012).

Euglenofitos

Los euglenofitos son un grupo de microorganismos eucariotas, unicelulares, flagelados, acuáticos, que fueron considerados por largo tiempo tanto como algas y como protozoos, por poseer características morfológicas y funcionales en común con estos organismos. Esto los llevó a ser clasificados redundantemente bajo las normas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica y el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, considerándoselos como un grupo ambirreinal (Patterson, 1986). Los numerosos estudios realizados en el campo de la filogenia molecular y el progreso sobre el conocimiento de algunas características claves de las células eucariotas, han permitido una mejor comprensión de las relaciones evolutivas en organismos con este tipo celular, ubicándose a los euglenofitos, dentro de los *Euglenozoa* que pertenece al supergrupo de los Excavata (Adl *et al*., 2012).

Los euglenofitos son un grupo muy heterogéneo en cuanto a sus características estructurales, fisiológicas y bioquímicas. La mayoría de las especies crecen en ambientes acuáticos o con cierto nivel de humedad, con salinidades que oscilan desde agua dulce hasta hipersalina. La mayoría son móviles, existiendo un solo género sésil, *Colacium.* Los primeros se desplazan a lo largo de toda la columna de agua encontrándose formas planctónicas y bentónicas. Su gran diversidad ecológica hace posible su distribución en un amplio rango de condiciones, aún en aquellas desfavorables para la vida (Huber-Pestalozzi, 1955; Tell & Conforti, 1986; Walne & Kivic, 1990). Las formas fotoautótrofas se ubican en la clase *Euglenophyceae* (Adl, *et al*., 2012). Ellas presentan cloroplastos de origen endosimbiótico secundario a partir de algas clorofiticas eucariotas (Gibbs, 1978; Martin, *et al*., 1992; Ishida, *et al*., 1997; Leander, 2004; Nozaki, 2005; Wiegert *et al*., 2012). Por esta razón, sus pigmentos son muy similares a los de estas algas, teniendo en común clorofila *a*, *b*, β carotenos y varias xantofilas. Algunas características morfológicas de euglenofitos son empleadas en su identificación, a saber: 1) unicelulares (**fig. 3 B)** o coloniales, 2) células desnudas o cubiertas con lórigas ornamentadas o no, 3) mitocondrias (**fig. 3 C**) con crestas discoidales en forma de paleta, 4) núcleos visibles (**fig. A, B, C**) con cromosomas condensados permanentemente y nucléolo (**fig. 3 C**), 5) fagotrofas, osmotrofas o fototrofas, obligadas o facultativas, 6) presencia de paramilon, polisacárido de reserva con uniones β-

1,3-glucano (**fig. 3 A, B, C**), 7) tricocistos o eyectosomas con forma de extrusomas tubulares, mucocistos o cuerpos mucíferos, 8) dos flagelos en la mayoría de las especies con función locomotora, o uno locomotor y uno que no emerge del bolsillo flagelar en donde se alojan (**fig. 3 D**), 9) otras especies con mas de dos flagelos emergentes y algunas carecen de ellos, 10) vacuolas contráctiles asociadas con el reservorio en linajes de agua dulce (**fig. A y E**), 11) en especies fotoautotrofas, cloroplastos (**fig. 3 A, B, C**) rodeados por tres membranas y tilacoides apilados de a tres con pirenoides presentes (**fig. 3 C**), excepto en *Discoplastis, Phacus* y *Lepocinclis*, 12) estigma (**fig. 3 A, B, D**) y fotorreceptor (**fig. 3 D**) en la base del flagelo emergente en especies fotoautótrofas, 13) bolsillo de alimentación, muy reducido en especies fotoautótrofas y osmótrofas, 14) modos de locomoción diversos y dinámicos, incluyendo movimientos metabólicos, deslizamiento por un sustrato y natación, 15) división en sentido longitudinal en la citocinesis, 16) película compleja debajo de la membrana plasmática que consiste en bandas proteicas en forma de "S" (**fig. 3 A, C y 4 B**) (Triemer y Zakryśz, 2015)

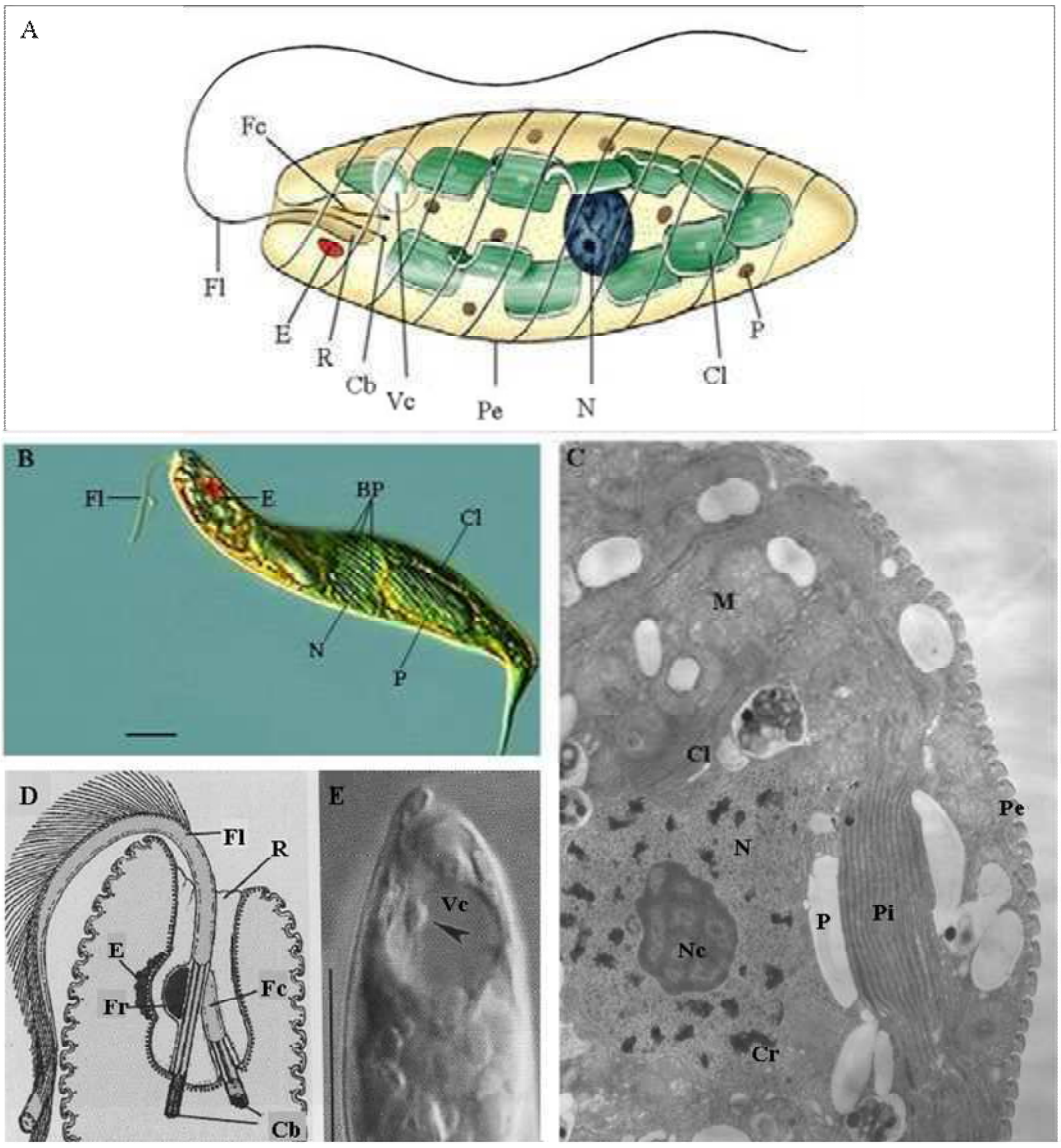


Figura 3. Morfología y ultraestructura general de un organismo euglenofito fotoautotrófico. (**A)** Esquema de la organización celular. (**B** y **E**) Microscopía óptica. (**C**) Microscopía electrónica de transmisión. (**D**) Esquema de la zona anterior de la célula. Cr- cromosomas condensados, Cb- cuerpos basales de los flagelos, Cl- cloroplasto, E- estigma, Fc- flagelo corto, Fl- flagelo largo, M- mitocondria, Fr- fotorreceptor, N- núcleo, Ne- nucleolo, P- paramilon, Pe- película, Pi- pirenoide, Vc- vacuola contráctil, R- reservorio. Escala: 10 µm. Imágenes (**C** y **D**) tomadas del trabajo de Triemer y Zakryśz (2015).

Entre las características mencionadas en la **figura 3,** la película constituye la principal sinapomorfía para este grupo. Ella está compuesta por la membrana plasmática,

un sistema de bandas proteicas, y subyacente a estas hay microtúbulos y vesículas del retículo endoplásmico (**fig. 4 A**) (Leander 2001, 2004; Leander y Farmer 2000a; Leander y Farmer 2001a; Leander et al., 2001). Las bandas se disponen paralelas entre si y longitudinalmente en sentido antero-posterior y, en corte transversal, tienen forma de "S" (**fig. 4 B**). Estas estructuras nacen del reservorio y se prolongan hasta el extremo caudal y la forma en que se ensamblan le confieren un aspecto ondulado (**fig. 5**). Cada una de estas bandas posee alternadamente una zona elevada y una deprimida que, al conectarse entre si, quedan ubicadas entre dos surcos o estrías anexas formando pliegues longitudinales. Estas estructuras proteicas están sostenidas por microtúbulos longitudinales, que varían en número pero no en su posición, ubicados precisamente en la cima de cada pliegue o en el límite de cada banda. Esta distribución se mantiene estable por estar unidos a fibras transversales que los conectan entre si. Las bandas proteicas y los microtúbulos están estrechamente asociados con cisternas tubulares del retículo endoplasmático (**fig. 4 A**). El interior del reservorio también está tapizado por la película, la diferenciación entre bandas y surcos se va perdiendo gradualmente debido a la disminución de su espesor, llegando a ser muy delgada en el fondo de este saco, siendo esta zona la de intercambio entre el medio intra y extra celular.

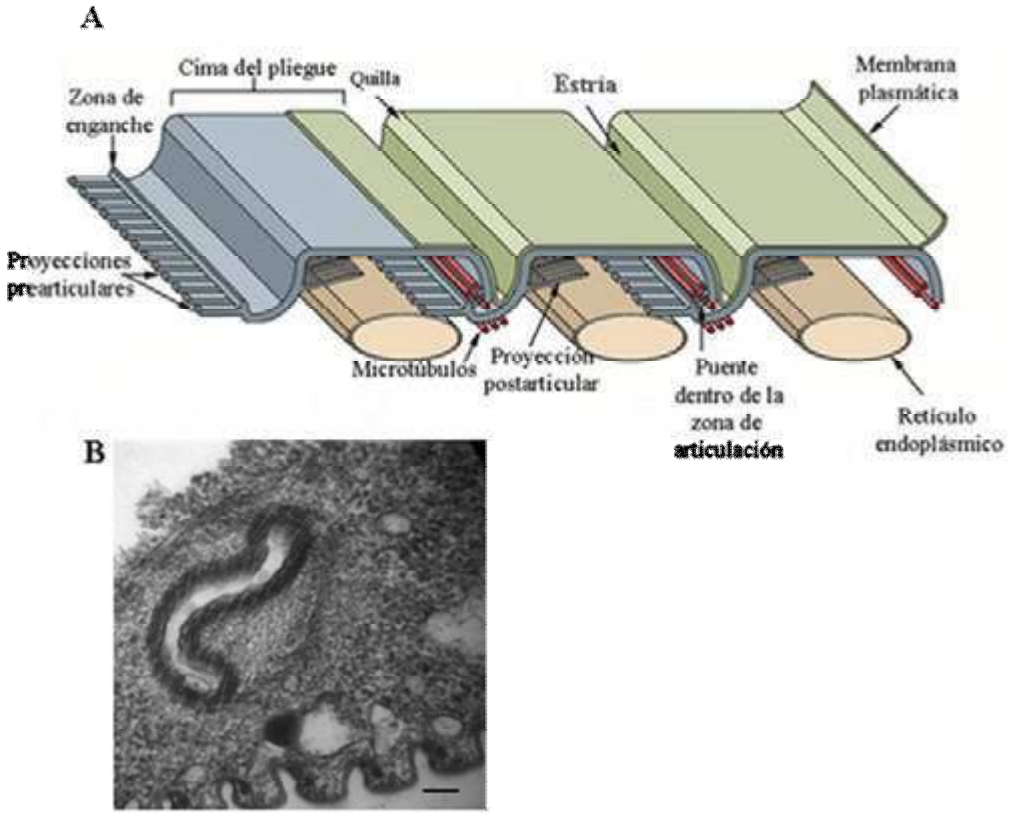


Figura 4. (**A**) Organización y componentes principales de la película de euglenofitos. Imagen adaptada de Leander *et al*. (2007). (**B**) Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de un corte transversal de la película proteica. Escala: 100 nm.

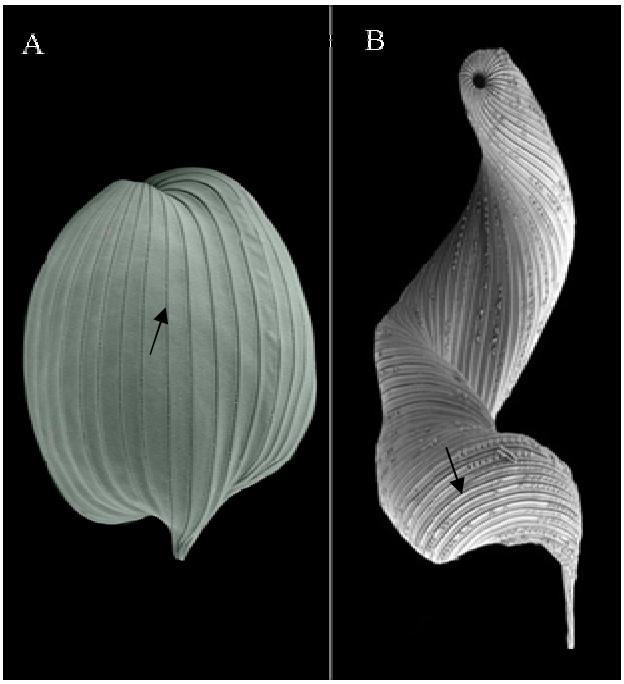


Figura 5. Microfotografías electrónicas de barrido que muestran el número relativo de bandas peliculares (flecha) de dos ejemplares de euglenofitos fotoautótrofos, uno rígido perteneciente al género *Phacus* (**A**), y uno metabólico perteneciente al género *Euglena* (**B**). Imagen A y B propiedad de © Brian S. Leander (http://tolweb.org/Eukaryotes/3/2009.03.12 y http://tolweb.org/Euglenida/97461/2012.11.10, respectivamente)

La importancia de la película como novedad evolutiva, radica en la compleja organización de sus bandas proteicas, la cual proporciona caracteres ultraestructurales útiles filogenéticamente (Leander y Farmer, 2001a; Leander, 2004; Esson y Leander, 2006; Leander *et al*., 2007). La morfología y organización de las bandas peliculares se correlaciona bien con el modo de nutrición y el movimiento celular (Leander y Farmer, 2000, 2001a, b). Se ha observado que las células con un menor número de bandas tienden a ser formas rígidas, como sucede en el género *Phacus* (**fig. 5 A**), mientras que aquellas con muchas bandas, suelen exhibir movimientos metabólicos como sucede en el género *Euglena* (**fig. 5 B**), entre otros.

Objetivo General

Sobre la base de la toda la información presentada en esta introducción, el objetivo general de esta tesis fue:

- evaluar el impacto de la contaminación sobre organismos del fitoplancton a nivel ecológico y a escala de laboratorio.

Para su estudio, se desarrollaron tres capítulos: en el primero, de carácter ecológico, se investigó el impacto de la calidad del agua de un arroyo periurbano sobre la comunidad fitoplanctónica; en dos capítulos posteriores, de carácter taxonómicos y ecofisiológicos, se estudió el efecto de dos contaminantes comunes en los cursos de agua bonaerenses, tales como el arsénico y la materia orgánica, sobre dos especies de microalgas fitoplanctónicas.

CAPÍTULO I

Estudio de las condiciones ambientales y sus efectos sobre la comunidad fitoplanctónica del arroyo Carabassa, Buenos Aires

I.1. Introducción

En la actualidad gran parte de los cursos de agua del mundo, tanto los que en su recorrido atraviesan zonas urbanas y rurales, como de zonas naturales protegidas, están sometidos a la acción antrópica como consecuencia del inadecuado desarrollo de las actividades productivas y la creciente urbanización (da Silva Nunes *et al*., 2014; Gerber *et al*., 2015).

En la Argentina la distribución de la población humana es muy heterogénea, localizándose el 46 % del total en la provincia de Buenos Aires, del cual el 39 % se concentra en el área metropolitana (INDEC, 2010). Numerosas cuencas hidrográficas atraviesan esta zona, en particular, la cuenca de arroyos número 36 (SSRH, 2016) localizada en el noreste de esta región (**fig. 1**). En ella se destacan el río Areco, el arroyo de la Cruz, el río Luján y el río Reconquista. Las transformaciones antrópicas en esta cuenca son intensas, principalmente debido al reemplazo de comunidades naturales por sistemas agrarios que generan una incorporación importante de agroquímicos al ambiente. Además, las grandes áreas urbanas y los sectores industriales distribuidos alrededor de esta cuenca, emplean sus redes fluviales como recurso y como receptoras de sus aguas residuales que, en la mayoría de los casos, son tratadas ineficientemente.

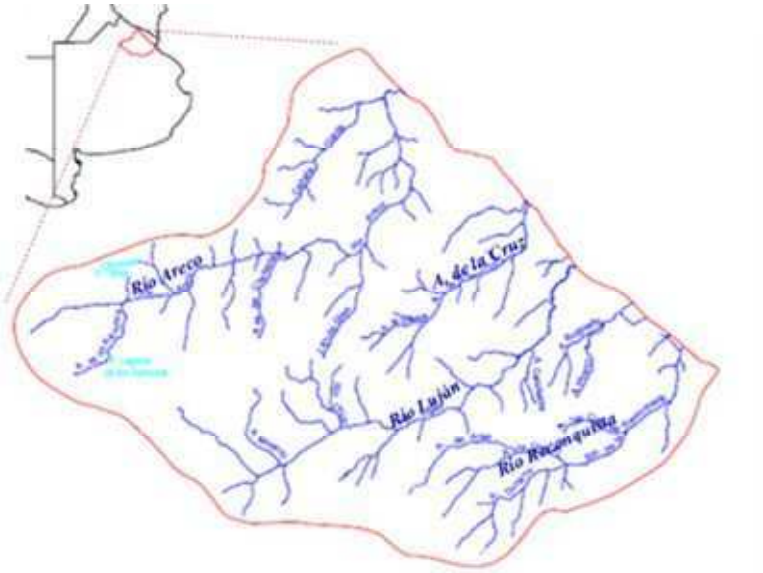


Figura 1. Mapa de los principales cursos de agua que forman la cuenca de arroyos del noreste de la provincia de Buenos Aires.

El Río Lujan es un curso de agua de llanura cuyo régimen hidrológico es controlado principalmente por la escorrentía subterránea local. A lo largo de su recorrido ocurren variaciones en la calidad del agua que se explican por la presencia de componentes naturales (sales solubles y metales), los ingresos no puntuales (nutrientes) y la incorporación de contaminantes antrópicos originados en sus márgenes (metales pesados, compuestos orgánicos, bacterias) cuyas concentraciones se incrementan aguas abajo (Momo *et al*., 2003; Castañé, *et al*., 2015). En esta zona de la cuenca es donde se encuentran los afluentes más deteriorados (Feijoó *et al*., 1999) tales como los arroyos Carabassa y Claro, a los cuales se les asignó una calificación del estado ecológico "muy malo", entre otros arroyos calificados con un estado "regular" y "bueno" (Momo *et al*., 2003). La calidad del agua de estos cursos fue determinada directamente por los niveles de los parámetros fisicoquímicos del agua (Feijoó *et al*., 1999; Giorgi *et al*., 1999; Lombardo *et al*., 2010), e indirectamente, por ejemplo, por las variaciones progresivas de la estructura del fitpolancton (Giorgio *et al*., 1991; O'Farrell *et al*., 2002; Gómez y O'Farrell, 2014).

I.1.1 Calidad del agua

El concepto de calidad del agua es relativo y adquiere importancia si está relacionado con los usos a los que se destina el recurso hídrico. Por lo tanto, se dice que el agua está contaminada cuando sufre cambios que afectan su uso real o potencial. En relación a los usos asignados al agua de los ambientes naturales, ella puede considerarse apta para consumo humano, para la preservación de la vida acuática, para bebida de especies de producción animal, para irrigación de cultivos y para distintos niveles de actividades recreativas humanas. Los criterios de uso consisten en establecer rangos permitidos y niveles guía para diferentes parámetros ambientales.

Existen numerosos trabajos realizados en cursos de agua bonaerense referidos a la evaluación de la calidad del agua en relación a la preservación de la vida acuática. Estos se basan en el monitoreo de distintas variables fisicoquímicas (Ventura *et al*., 1997; Giorgi *et al*., 1999; Mercado, 2000; de Cabo *et al*., 2000; O'Farrell *et al*., 2002; Momo *et al*., 2003; Plataroti, 2010; Gómez y O'Farrell, 2014) las cuales son útiles, en una primera

aproximación, para conocer el estado del agua, al ser comparadas con los niveles guía correspondientes.

Particularmente, los niveles guía para la protección de la vida acuática definidos legalmente en cada país, tienen un alcance limitado, ya que las características naturales propias de las aguas continentales son muy variables, tanto espacial como temporalmente y muchas de las formas de vida que sustentan se encuentran adaptadas a éstas (Branco, 1984). Ante este inconveniente, se han desarrollado índices de calidad de aguas (ICAs) adaptados a las características locales o regionales de los sistemas acuáticos. Estos son números adimensionales que engloban las magnitudes de los parámetros individuales y que permite definir los posibles usos a los que puede estar destinada. En el nivel local, existe un ICA, desarrollado principalmente para el estudio de la contaminación cloacal e industrial (Berón, 1984).

En la actualidad se dispone de poca información, desarrollada en el país, sobre los efectos de las sustancias presentes en el agua sobre organismos acuáticos autóctonos. La Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (SSRH) es un organismos oficial que estableció valores de referencia para una gran cantidad de variables ambientales, que se emplean en el manejo de cuencas nacionales (SSRH, 2005). En los casos en que no se dispone de información pertinente, se recurre a valores de referencia calculados para otras regiones, por ejemplo los desarrollados por el Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata (CIC) (CIC, 1999) integrado por Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay; el Consejo Nacional de Medio Ambiente del Brasil (CONAMA, 2005); el acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua de México (DOF, 1989), la Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (US EPA, 2006), el Anuario de estadísticas Agrícolas de Puerto Rico (2003), entre otros.

I.1.2. Interpretación ecológica de los parámetros fisicoquímicos

Las variables que definen la calidad del agua para la protección de la vida acuática abarcan principalmente características fisicoquímicas y bacteriológicas.

Del total de variables químicas que caracterizan el estado del agua, un grupo de ellas son consideradas de interés para la protección de la biota acuática. Entre éstas se

encuentran: el nitrógeno amoniacal (N-amoniacal), nitratos, nitritos, fósforo, sustancias fenólicas, tensioactivos, metales y metaloides (cromo hexavalente, plomo, cadmio, mercurio, arsénico), aceites y grasas, sulfuros, cianuro, hidrocarburos totales.

A continuación se describen diferentes parámetros fisicoquímicos empleados para caracterizar la calidad del agua del arroyo que es objeto de estudio de este trabajo de tesis.

a) Turbiedad

La turbiedad es una medida del grado de pérdida de transparencia del agua debido a la presencia de partículas en solución y coloides con tamaños de 0,1 a 1000 nanómetros (Bloomfield, 2001). Éstas pueden ser sedimentos que provienen de la erosión en la cuenca de drenaje, sustancias coloidales procedentes de la descarga de efluentes o de las escorrentías de aguas residuales, microorganismos, etc., cuya presencia aumenta el nivel de partículas en suspensión y consecuentemente la turbiedad. Estos materiales en la columna de agua absorben y dispersan la luz incidente, disminuyendo su penetración en el agua y aumentando su temperatura. En consecuencia, decrece la actividad fotosintética y la concentración de oxígeno en el agua afectando o limitando la capacidad de desarrollo de algunas comunidades biológicas. Por otro lado, las partículas suspendidas pueden adherir metales pesados y compuestos orgánicos tóxicos, lo que determina una disminución de sus efectos nocivos sobre una gran parte de la biota acuática.

El valor máximo establecido para la protección de la vida acuática es de 50 Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU) (Anuario de Estadísticas agrícolas de Puerto Rico, 2003).

b) Conductividad

La conductividad eléctrica refleja el grado de mineralización del agua. Constituye un indicador del grado de salinidad del agua, de la presencia de fertilizantes inorgánicos (cloruros, sulfatos y potasio), y es una de las variables que mejor discrimina la calidad del agua entre los puntos de muestreo afectados por alteraciones antropicas (Primavesi, *et al.*, 2002). Sus valores en aguas continentales superficiales oscilan entre 15 y 3300 µS/cm. Se

ha establecido como límite máximo para el sostenimiento de la vida acuática 750 µS/cm (US EPA, 1986; Pérez-Castillo y Rodríguez, 2008; Escribano y De Frutos 1987).

c) Temperatura

La temperatura es reconocida como un factor ambiental fundamental en ecosistemas acuáticos y terrestres por su rol esencial en el desarrollo de la actividad biológica. Son dependientes de la temperatura, por ejemplo, las constantes de equilibrio y reacciones químicas, solubilidades, entre otras (CCME, 1999). En los ecosistemas acuáticos la temperatura afecta notablemente la calidad del agua, principalmente porque influye en la solubilidad del oxígeno, lo cual repercute en el retardo o aceleración de la actividad biológica. Por ejemplo, a nivel del mar, el agua a una temperatura de 15 °C contiene 10 mg/l de oxígeno, mientras que a valores de 30 °C puede contener 8 mg/l (Lewis, 2006).

Al aumentar la temperatura, disminuye la solubilidad del oxígeno (Henry y Heinke, 1999), ocasionando disminución del pH, además de la aceleración de los procesos de descomposición de la materia orgánica, inactivación de enzimas, cambios en el contenido de lípidos, aumento de la permeabilidad a través de la membrana celular y desnaturalización de proteínas. En tanto que la exposición de los organismos acuáticos a bajas temperaturas puede ocasionar, entre otras consecuencias, ineficiencia en los procesos metabólicos, insuficientes velocidades de liberación de energía y cambios en los balances de agua y minerales.

d) Potencial de hidrógeno (pH)

Generalmente, las aguas naturales (no contaminadas) presentan unidades de pH que varían dentro de un amplio rango de valores. Por ejemplo, en lagos alcalinos puede ser mayor a 10 u 11 unidades, mientras que en algunas ciénagas o pantanos puede ser menor de 4. La variación del pH del agua puede tener efectos importantes sobre la biota acuática, provocando marcados efectos sobre cada uno de los niveles de organización de la materia viva, desde el celular hasta el de ecosistemas (Atlas y Bartha, 1992). Por un lado, el pH regula los procesos biológicos mediados por enzimas (fotosíntesis, respiración, etc.), ya que

según sus valores puede resultar modificada su forma iónica y por lo tanto la velocidad de reacción. A su vez, también determina la disponibilidad de nutrientes esenciales que limitan el crecimiento microbiano en muchos ecosistemas (NH_4^+, PO_4^{-3} y Mg^{2+}). Por ejemplo, la movilidad de metales pesados tales como el cobre, que es tóxico para muchos microorganismos, puede afectar o regular la estructura y función de ácidos nucleicos y proteínas estructurales. El control de esta variable resulta de suma importancia, dado que, por ejemplo, elevados valores de pH, en conjunción con otros factores ambientales como la luz, la velocidad del agua y la disponibilidad de nutrientes, entre otros, favorecen el desarrollo de cianobacterias que pueden ocasionar serios inconvenientes en la calidad del agua.

Se considera que para asegurar la protección de las comunidades acuáticas el rango de pH debe estar comprendido entre 6 y 9 unidades de pH (CONAMA, 2005).

e) Sólidos totales

Los sólidos totales se definen como la materia que queda como residuo después de la evaporación y secado a 103 - 105 °C. Su valor incluye materiales no disueltos que corresponden a sólidos suspendidos totales, porción retenida por un filtro de 0,45 μm de diámetro de poro (CAN, 2005), y sólidos disueltos totales, porción que pasa a través del filtro. Sus concentraciones determinan la turbiedad y la transparencia del agua. En el caso particular de la comunidad fitoplanctónica, los efectos de los sólidos suspendidos se asocian a la reducción de la productividad por inhibición de la fotosíntesis debida a la disminución de la penetración de luz. El valor máximo de sólidos totales en el agua que se establece para la protección de la vida acuática es de 10 mg/l (CCME, 2002).

f) Oxígeno disuelto

Generalmente, las aguas de mejor calidad para la preservación de la vida acuática presentan niveles de oxígeno disuelto (OD) por encima de los 5 mg/l (SSRH, 2005). Éste proviene del generado por fotosíntesis, sumado al que se incorpora al medio por difusión desde la atmósfera. Este último, será mayor en aguas turbulentas que en calmas, en donde

la concentración de OD es más baja. Otros factores como la salinidad y la temperatura del agua influyen relacionándose de manera inversa con los valores de OD. Por ejemplo, cómo se mencionó más arriba un aumento de temperatura disminuye la concentración de oxígeno disuelto.

Además, la contaminación del agua por materia orgánica favorece el crecimiento de bacterias que la descompone, disminuyendo con esta acción los niveles de oxígeno del ambiente.

g) Materia orgánica

La materia orgánica presente en las aguas, proviene del lavado de los suelos o del metabolismo y de los organismos que viven en ellas, además de aquella de origen antrópico como la procedente de desechos domésticos o industriales. Por lo general, las aguas naturales (no contaminadas) presentan cantidades mínimas de materia orgánica, excepto las que se encuentran en zonas boscosas o las aguas estancadas. Como es muy difícil determinar analíticamente la presencia de materia orgánica en el agua, se han establecido métodos indirectos de determinación tales como la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO). La DBO corresponde a la cantidad de oxígeno necesario para descomponer la materia orgánica por acción bioquímica aerobia, y la DQO equivale a la cantidad de oxígeno requerido para oxidar por medios químicos la materia orgánica en una muestra de agua. El nivel guía para la protección de la vida acuática estipulado para la DBO es de 3 mg/l (SSRH, 2005) y para la DQO de 5 mg/l (ACUMAR, 2011).

Las aguas pueden contener componentes orgánicos con diferentes niveles de biodegradabilidad. Una aproximación cuantitativa de esta característica va a estar dada por la relación DBO/ DQO denominada Índice de Biodegradabilidad del Agua. Cuando su valor resulta menor que 0,2 nos indica la presencia de materiales poco biodegradables, entre 0,2 y 0,4 serían biodegradables, y mayor de 0,4 corresponden a muy biodegradables (Wang *et al*., 2003; Novelo *et al*., 2002). En el caso de un agua residual que contenga materia orgánica natural, la degradación es relativamente fácil, aunque hay elementos excepcionales como las grasas y aceites que presentan baja o nula biodegradabilidad.

h) Nitrógeno

El nitrógeno presente en el agua se encuentra en cuatro formas diferentes: nitrógeno orgánico, N-amoniacal, nitritos y nitratos. En condiciones naturales, los compuestos nitrogenados del agua provienen fundamentalmente de la degradación de la materia orgánica muerta. Si las aguas están contaminadas, los aportes adicionales de nitrógeno proceden mayoritariamente de los vertidos urbanos e industriales, de aguas residuales de la actividad ganadera, así como de los fertilizantes y pesticidas empleados en la agricultura. En el agua residual sin tratar, se encuentra fundamentalmente nitrógeno orgánico y amoniacal, siendo este último producto de la descomposición del primero por acción bacteriana. De igual modo, el N-amoniacal en un medio aeróbico es oxidado a nitritos y éste a nitratos. La presencia de amoníaco en el agua indica una degradación parcial de la materia orgánica que se da cuando el ambiente es pobre en oxígeno. El valor del nivel guía establecido para el N-amoniacal es de 0,6 mg/l (Cal EPA, 2012) y para nitritos y nitratos es de 0,05 y 5 mg/l respectivamente (SSRH, 2005, DOF, 1989).

El nitrógeno total (N total) involucra la suma de las concentraciones del nitrógeno orgánico y del amonio. Con este parámetro se estima la cantidad de N total en condiciones de ser nitrificado a nitritos y nitratos, resultando un valor indicativo de contaminación por aguas residuales y fertilizantes (Khademikia *et al*., 2013; Septory y Triyatmo, 2016.

i) Fósforo

El fósforo presente en el agua puede proceder naturalmente de la erosión de las rocas, o del lavado de los suelos, pudiendo tener su origen en pozos sépticos o en zonas con actividad ganadera y agrícola. Además, puede proceder de la descarga de desechos industriales y aguas domiciliarias en los cursos de agua. Estas últimas son depositarias de grandes cantidades de detergentes, entre los cuales se encuentran los fosfatados. Más del 90 % del fósforo inorgánico está asociado a materia orgánica, a través de procesos biológicos en los que se forman fosfatos orgánicos y constituyentes celulares, o asociado a otras formas inorgánicas. Por un lado, el fosfato es esencial para el desarrollo de la biota

acuática, sin embargo, su presencia en elevadas concentraciones, al igual que la de nitratos, está asociada con la eutrofización de las aguas, con el consecuente desarrollo de cianobacterias, algas y plantas que pueden dominar y cambiar la dinámica de los ecosistemas acuáticos (Smith y Schindler, 2009; Franco *et al*., 2010). Aunque el nivel guía para el fósforo se establece en un máximo de 50 µg/l (SSRH, 2005), se ha visto que con valores a partir de un umbral de 20 µg/l existe un riesgo potencial de que se desencadene el proceso de eutrófización (Sande *et al*., 2005).

j) Tensioactivos

Los agentes tensoactivos son sustancias anfipáticas cuya presencia en el agua se debe principalmente a los residuos de los detergentes domésticos más comunes (alquil-sulfonato lineal y alquil-sulfonato bencénico ramificado). Algunos de estos son biodegradables (no ramificados) por lo cual pueden ser metabolizados por microorganismos (Silveira Duarte *et al*., 2015). En cuanto a los detergentes ramificados, su acción más importante en las aguas superficiales está relacionada con la interferencia en el poder autodepurador de los recursos hídricos, debido a la inhibición de la oxidación química y biológica. En este último caso, las bacterias en presencia de detergentes quedan rodeadas por una película que las aísla del medio e impide su acción sobre la materia orgánica (Zografi *et al*., 1990; Pérez *et al*., 2002), disminuyendo mucho el poder autodepurador de los sistemas acuáticos. Como consecuencia de ello, la determinación de la DBO en aguas que contienen tensioactivos suele presentar valores bajos (Barrenechea, 2008). Además, la solubilidad del oxígeno en aguas que contienen detergentes es menor que en aguas libres de ellos (Espina *et al*., 1986). Estos se determinan mediante una reacción con Azul de Metileno (NMX-AA-039-SCFI-2001) y el límite máximo establecido para este parámetro es de 0,1 mg/l (DOF, 1989).

k) Arsénico

El arsénico puede estar presente en el agua de forma natural, o ser aportado a través de desechos provenientes de actividades humanas que lo involucran. Se encuentra

en forma trivalente As (III) o pentavalente As (V), tanto en compuestos inorgánicos como orgánicos. Se ha visto, además, que las concentraciones de arsénico en aguas naturales usualmente son menores de 10 µg/l, sin embargo, en diferentes zonas rurales bonaerenses se han reportado niveles elevados de arsénico en aguas superficiales (<10-198 µg/l) (Schenone *et al*., 2007; Rosso *et al*., 2011). Si bien, su toxicidad es compleja, pues depende del estado de valencia (III o V) y de la forma química del compuesto (inorgánico u orgánico), se ha determinado que las formas trivalentes inorgánicas (arsenito) son las más tóxicas para la biota acuática (Miot *et al*., 2008; Wang *et al*., 2015). Al igual que los metales pesados, el arsénico induce la formación de radicales libres, pudiendo desencadenar procesos de estrés oxidativo (Flora, 1999) La US EPA indica que, excepto para áreas específicas con especies muy sensibles, el nivel de arsenito presente no debería producir efectos adversos sobre los organismos acuáticos, en tanto que no establece criterios para el arsenato (arsénico V) por no contar con datos suficientes. De todas maneras, independientemente de su especiación, el nivel máximo permitido de arsénico para la protección de la vida acuática es de 150 µg/l (US EPA, 2006).

l) **Cloro**

Los niveles guía para el cloro en aguas destinadas a la preservación de la vida acuática no presentan restricciones. Por el contrario, para el uso del agua destinado para consumo humano, se propone un nivel de restricción de cloro (5 mg/l, OMS, 1996) por encima del cual se pueden afectar el sabor, el olor y la apariencia del agua, de modo que su restricción se establece más por una cuestión estética que por toxicidad.

En esta investigación, el contenido de cloro en las distintas muestras de agua se evaluó de modo comparativo, teniendo en cuenta que el crecimiento de un grupo de microalgas como las como las euglenofitas, se favorece en presencia de este elemento (Munawar, 1972).

I.1.3. Variables bacteriológicas

Las bacterias presentan diferentes adaptaciones fisiológicas que les permiten explotar los distintos recursos energéticos ofrecidos por las condiciones físicoquímicas del ambiente. Las poblaciones bacterianas difieren en su número y calidad, según la procedencia del agua, su composición de elementos nutritivos y las condiciones biológicas, climatológicas y geográficas. El análisis de esta variable en el monitoreo ambiental, se limita específicamente a la detección de bacterias coliformes totales que son indicadoras de contaminación orgánica, y de coliformes fecales que dan información sobre la procedencia del contaminante, siendo en este último caso excretas de humanos y/o animales. La recomendación del CIC no establece límites para la presencia de bacterias coliformes fecales en el agua, por lo cual se ha tomado como referencia el nivel guía para el agua potable sugerido por la SRHN (2005) según el método del número más probable (NMP) de 1000 NMP/100 ml.

I.1.4. Contaminación, fitoplancton y estrés oxidativo

A nivel de los ecosistemas acuáticos, las alteraciones inducidas por la contaminación son demasiado complejas y en general se omiten de la lista de los indicadores empleados para la detección precoz y la predicción del estrés ambiental (Depledge *et al*., 1993). Por ello, para estudiarlas se procede caracterizando "señales de alerta", que se miden cuantitativamente, se exteriorizan a través de cambios en los niveles celulares, y proporcionan un pronóstico temprano de la disminución del rendimiento fisiológico y reproductivo en los niveles ecológicos más altos (Moore *et al*., 2004).

Por ser uno de los primeros eslabones de la cadena alimenticia en los ecosistemas acuáticos, el fitoplancton resulta de interés en los estudios de monitoreos ambientales, ya que los efectos de los xenobióticos sobre esta comunidad van a repercutir en los niveles superiores. Por un lado, porque los organismos que emplean microalgas como fuente de alimento, incorporan los contaminantes que fueron absorbidos, y acumulados por ellas, aumentando la posibilidad de toxicidad (Okay *et al*., 2000), y biomagnificación a lo largo de la cadena trófica (Binelli y Provini, 2003). Por el contrario, para los organismos que no

consumen microalgas éstas pueden reducir la exposición a los contaminantes ya sea directa o indicrectamente. Por ejemplo se ha informado una reducción considerable del nivel de metales pesados en suspensión (20-75%) por sedimentación de las microalgas que los incorporaron (Luoma *et al*., 1998). Además la comunidad fitoplanctónica constituye un buen bioindicador de contaminación por su gran sensibilidad a los tóxicos lo cual permite una pronta respuesta a los cambios ambientales al ser estos detectados rápidamente. Entre los atributos que se estudian en la comunidad fitoplanctónica, se encuentran frecuentemente la biomasa total, el contenido de pigmentos, la actividad fotosintética de la fracción autótrofa y las alteraciones en la estructura de la comunidad (composición taxonómica, abundancia de especies, etc.) (Fairchild y Sappington, 2002; Blanck *et al*., 2003; Guasch *et al*., 2003; Guasch *et al*., 2007; Blanck *et al*., 2009; Debenest *et al*., 2009; Vera *et al*., 2010; Bakar *et al*., 2015; Płachno *et al*., 2015). Son mucho menos frecuentes los estudios dedicados al análisis de otras propiedades funcionales de esta comunidad. Los biomarcadores bioquímicos, tales como actividades de enzimas clave para el metabolismo de la comunidad, constituyen un abordaje distinto que puede complementar los estudios clásicos para analizar el estado del fitoplancton, tal como ha sido propuesto para perifiton (Bonnineau *et al*., 2014). En particular, la evaluación de parámetros de estrés oxidativo, tales como la actividad de las defensas antioxidantes enzimáticas catalasa, glutation peroxidasa y ascorbato peroxidasa, pueden informar sobre el grado de estrés de una comunidad (Bonnineau *et al*., 2014).

En Argentina, es poco frecuente el uso de la biota para el seguimiento de la calidad de los ambientes acuáticos, limitándose el monitoreo al análisis de variables químicas y bacteriológicas empleadas en la elaboración de índices de calidad del agua. Los estudios de contaminación más importantes en los que se utilizaron las asociaciones fitoplanctónicas como indicadoras de los impactos externos y por lo tanto de la calidad del agua, se han llevado a cabo en cursos de agua ubicados en la Provincia de Buenos Aires, entre ellos el río Reconquista (Loez y Salibián, 1990; Loez *et al*., 1995, 1998), el Matanza-Riachuelo (Conforti *et al*., 1995; Magdaleno *et al*., 2001), el Samborombón (Mercado y Gómez, 1998), el Luján (Plataroti, 2010).

Dentro de este contexto, en el presente capítulo, se caracterizó a nivel bioquímico, la respuesta del fitoplancton perteneciente al arroyo Carabassa, Buenos Aires, un ambiente

natural sometido a una mezcla de contaminantes de diversos orígenes, y se lo relacionó con la diversidad a nivel de los grupos que lo conforman, buscando posibles asociaciones entre las condiciones del medio y los organismos presentes como indicadores de contaminación.

I.1.5. Objetivos

- Evaluar la calidad del agua del arroyo Carabassa por medio de la determinación de parámetros fisicoquímicos generales y específicos.

- Tratar de establecer las relaciones existentes entre la diversidad y abundancia de los grupos fitoplanctónicos del arroyo Carabassa y sus características fisicoquímicas.

- Analizar biomarcadores de estrés oxidativo en el fitoplancton y su relación con alguna característica ambiental.

I.1.6. Hipótesis

- La calidad del agua del arroyo Carabassa se deteriora como consecuencia de la presencia de emprendimientos económicos y urbanísticos desarrollados en sus proximidades.

- La diversidad de los grupos fitoplanctónicos del arroyo Carabassa está asociada a las condiciones fisicoquímicas del agua.

- La calidad del agua puede provocar alteraciones del estado oxidativo del fitoplancton induciendo respuestas antioxidantes.

I.2. Materiales y Métodos

I.2.1. Área de estudio y diseño del muestreo.

El arroyo Carabassa es un cuerpo de agua de llanura ondulada que pertenece a la cuenca del Río Lujan, la cual se extiende de suroeste a noroeste de la provincia de Buenos Aires (34° 25’ 5’’ S, 58° 32’ 2’’ O). Esta cuenca hídrica nace en el partido de Suipacha y recorre una superficie de 2.690 km^2, atravesando el área metropolitana de la Provincia de Buenos Aires, abarcando los partidos de Mercedes, San Andrés de Giles, Gral. Rodríguez, Luján, Pilar, Moreno, Exaltación de la Cruz, Campana, Escobar, Tigre, San Isidro y San Fernando, en donde desemboca en el Río de la Plata. El río Luján se divide en tres tramos de diferentes longitudes, superior (40 km), medio (30 km) e inferior (60 km). Se caracteriza por ser la cuenca con mayor densidad de drenaje de la provincia, pese a su escasa pendiente, principalmente en el último tramo (0.05–0.016 m/km) (Giorgi, 2001; Blasi *et al*., 2010).

La región tiene un clima templado subhúmedo. La media de las temperaturas del verano y del invierno son 22 °C en el mes de enero, y 9,5 °C en el mes de julio, respectivamente. La precipitación media anual es de 950 mm, alcanzando los 1400 mm en años excepcionalmente húmedos (Lombardo *et al*., 2010). El final del verano, el otoño y la primavera son los meses más lluviosos (Andrade, 1986).

El arroyo Carabassa (**fig. 2)** nace de la confluencia de dos arroyos entre las localidades de Gral. Rodríguez y Pilar correspondientes a la zona media-baja de la cuenca del Río Luján, y se extiende en sentido noreste unos 5,2 km. hasta su desembocadura en dicho río. A lo largo de su recorrido atraviesa zonas urbanas con una alta densidad poblacional y gran desarrollo industrial (O´Farrell *et al*., 2002, Castañé *et al*., 2015).

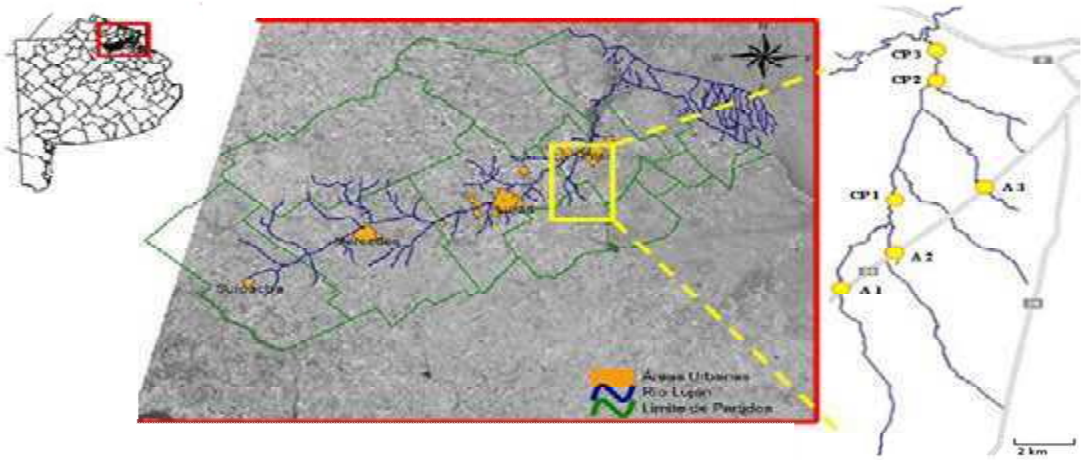


Figura 2. Cuenca del Río Luján y detalle del arroyo Carabassa y sus áreas de estudio. A1-A3, y CP1-CP3 corresponden a los sitios de muestreo sobre afluentes (A) y sobre el cauce principal (CP) respectivamente.
Imagen adaptada (http://www.delriolujan.com.ar/estudioina.html).

Los sitios de muestreo sobre el cauce principal del arroyo y sus afluentes se seleccionaron teniendo en cuenta la cercanía a probables fuentes de contaminación puntual (**fig. 2**). Estos fueron:

-el sitio **A 1** (34° 31’ 46,6’’ S, 58° 58’ 59,8’’O) en cuyas proximidades se encuentra instalada una empresa láctea (“La Serenísima”) que vierte en este afluente parte de las aguas residuales de su planta de tratamiento.

-el sitio **A 2** (34° 31’ 8,1’’ S, 58° 58’ 13,5’’ O) localizado en una zona contigua a un frigorífico ubicado a la vera de este efluente.

-el sitio **CP 1** (34° 30’ 8,0’’ S, 58° 58’ 9,5’’ O) ubicado en el cauce principal del arroyo a unos 500 metros río abajo de la unión de los afluentes A1 y A2

-el sitio **A 3** (34° 30’ 0,6’’ S, 58° 56’ 44,6’’ O) ubicado en un tercer afluente luego de que este atraviese un barrio privado que posee campos de golf (“Golfer´s”)

-el sitio **CP 2** (34° 27’ 52,5’’ S, 58° 57’ 27,4’’ O) ubicado en el cauce principal del arroyo luego de la desembocadura del A3, en una zona en la que atraviesa un barrio privado (“Estancias del Pilar”)

-el sitio **CP 3** (34° 27' 19,3'' S, 58° 57' 28,6'' O) ubicado en el cauce principal del arroyo, aguas abajo del CP2, luego de una descarga de efluentes de una empresa alimenticia ("Molinos Río de la Plata").

Se realizaron dos muestreos estacionales, uno realizado en otoño (25 de abril de 2012) y otro en primavera (27 de septiembre de 2012).

I.2.2. Determinación de variables ambientales

Se determinaron *in situ* algunas variables morfométricas como el ancho y la profundidad del curso y la velocidad de la corriente, con las que se calculó el caudal del arroyo en cada punto de muestreo. Éste se determinó por el método del flotador, para lo cual se eligió un tramo del arroyo en donde la profundidad y el ancho se mantuvieron parejos. El caudal se determinó mediante la fórmula:

$$Q = V \times S$$

donde **Q** es el caudal (m^3/s), **V** es la velocidad promedio que alcanza el flotador (m/s) y **S** es el área de la sección transversal del tramo del río seleccionado (m^2). Luego el caudal se multiplicó por un coeficiente de fricción, en este caso de 0,9, por considerar que el tipo de suelo del arroyo era liso y suave.

Además se determinaron algunas variables fisicoquímicas tales como la temperatura, por medio de un termómetro de vidrio con precisión 0,1 °C, el pH y la conductividad con un potenciómetro y un conductímetro marca "Hanna instruments" respectivamente, el OD con un oxímetro "Oxi 330/SET WTW", la concentración de cloro medida con un equipo portátil "LaMotte", y la turbiedad y transparencia con el disco de Secchi (Tyler, 1968).

Además, se recolectaron muestras de agua subsuperficial para realizar otras determinaciones químicas en el laboratorio. Estas se tomaron en cada sitio en la zona central del curso, y se colocaron en recipientes estériles de plástico. El análisis fisicoquímico de las muestras de agua se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por APHA (2005). Se determinó nitratos por reducción de cadmio (SM 4500 NO_3-E), nitritos por un método colorimétrico (SM 4500 NO_2-), N-amoniacal por el electrodo de ión

selectivo de amonio (SM 4500-NH_3D), nitrógeno total por el método Macro-Kjeldahl y volumetría (SM 4500-NOrg B), y fósforo total (P total) por digestión persulfato–ácido ascórbico (SM 4500-P E). Además se determinaron sólidos totales por el método gravimétrico a 103-105 ºC (SM 2540 B), tensioactivos por sustancias activas al azul de metileno (SAAM´s) (NMX-AA-039-SCFI-2001), arsénico por digestión ácida (SM 21-3113 AyB AA-Homo), demanda química de oxígeno (DQO) en reflujo cerrado y por colorimetría (SM 5220 –D), demanda biológica de oxígeno a los 5 días (DBO_5) (SM 5210).

Los resultados de las variables fisicoquímicas fueron comparados con los niveles guía de calidad de agua aptas para la preservación de la vida acuática nacionales e internacionales ajustados particularmente según las condiciones de un cuerpo de agua nacional: la Cuenca del Río Matanza-Riachuelo y la Franja Costera del Río de la Plata (SSRH, 2005).

I.2.3. Parámetros Biológicos

I.2.3.1. Fitoplancton

Para realizar los análisis cuali y cuantitativos del fitoplancton se recolectaron muestras de agua subsuperficial. Éstas también se emplearon para la determinación en esta comunidad, de marcadores de estrés oxidativo tales como: la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para el análisis cualitativo, el agua del río se filtró con una red cónica de 15 µm de poro y se observaron especímenes vivos y fijados con formaldehído al 3 % v/v. La observación de las muestras y la identificación de los organismos pertenecientes a los grandes grupos se realizaron utilizando un microscopio óptico Olympus BX50 con aumentos de 400x y 1000x. Para el estudio cuantitativo se recolectaron muestras de 250 ml de agua sin filtrar y se las fijó con una solución de Lugol al 2%. La estimación cuantitativa se realizó según el método de Utermöhl (1958), para ello las muestras se colocaron en cámaras de sedimentación de 5 ml por el término de 24 horas. Luego, el material sedimentado se observó utilizando un microscopio invertido marca Olympus CK40 con aumento de 400x y se determinó la densidad algal (individuos/ml)

para las clases más representativas (Bacillariophyta, Chlorophyta, Cyanobacteria, Dinophyta y Euglenophyta). El número de recuentos en cada cámara se realizó hasta obtener un error estimado (α: 0,05) que no superó el 10%. Este error se calculó según la fórmula de Venrick (1978):

$$e\ (\%) = \frac{S / \sqrt{n}}{X} \cdot t_{(\alpha,\ n-1)}$$

donde **e (%)** es el error porcentual, **S** el desvío estándar, **n** el número de campos observado, **X** es la media muestral y $\mathbf{t}_{(\alpha,\ n-1)}$ el t de Student.

I.2.3.2. Análisis bacteriológico

La densidad de bacterias coliformes totales y fecales se estimó por el método del número más probable (NMP). Las determinaciones de nutrientes y los análisis bacteriológicos fueron realizados con la colaboración del personal técnico del laboratorio de análisis ambientales "ABIA" dependiente de la municipalidad de Pilar, Buenos Aires (http://www.abia.org.ar/).

I.2.4. Índice de calidad del agua (ICA)

Con los resultados de las variables: temperatura, OD, DBO_5, cloruros y N-amoniacal, se calculó para cada sitio un **índice de calidad de aguas** (ICA) (Berón, 1984) que estima el grado de contaminación por materia orgánica de las aguas del río. La fórmula que se aplica para el cálculo de este índice es:

$$ICA = \sum_{i=1}^{n} qi \ / \sum_{i=1}^{n} wi$$

en donde **n** es la cantidad de variables utilizadas (5 en este caso), **qi** es un valor asignado a cada variable según su peso relativo y su valor (**tabla 1**), y **wi** es el peso relativo de la variable de acuerdo a su importancia en relación a la calidad de las aguas. Para la temperatura y los cloruros el valor de **wi** es igual a 1, para el OD y la DBO_5 es igual a 2, y para el N-amoniacal es igual 3.

Tabla 1. Tabla de clasificación de calidad.

INDICE DE CONTAMINACION ACUATICA (ICA)					
TEMPERATURA		CLORUROS		N-AMONIACAL	
ºC	clas	mg/1	clas	mg/1	clas
0-17,5	10	0-50	10	0-0,2	30
>17,5-19,5	9	>50-150	8	>0,2-0,5	24
>19,5-21,5	7	>150-300	5	>0,5-1,0	18
>21,5-23,0	5	>300-620	3	>1,0-2,0	12
>23,0-25,0	3	>620	0	>2,0-5,0	6
>25,0	1	-	-	>5,0-10,0	3
D.B.O.		OXIGENO DISUELTO			
mg/1	clas	% saturación	clas	mg/1	clas
0-2,0	30	>90-105	10	>9,0	10
>2,0-4,0	27	>89-90	8	>8,0-9,0	8
-	-	>105-120	-	-	-
>4,0-6,0	24	-		>6,0-8,0	6
>6,0-10,0	18	>60-80	6	>4,0-6,0	4
-	-	>120	-	-	-
>10,0-15,0	12	-		>1,0-0,4	2
>15,0-25,0	6	>40-60	4	>0-1,0	0
>25,0-50,0	3	>10-40	2	-	-
>50,0	0	0-10	0	-	-

Temperatura, cloruros, N-amoniacal, DBO y OD son los parámetros seleccionados para el cálculo del ICA. Para cada uno de ellos se designan intervalos de concentraciones de acuerdo al grado de polución, y asociados a estos un valor **qi**.

Este índice emplea una escala numérica que varía entre 0 y 10 según el grado de contaminación. El valor 10 indica pureza original, los valores entre 8-10 contaminación leve, entre 6-8 contaminación intermedia, entre 3-6 contaminación elevada, y entre 0-3 contaminación muy elevada, considerándose al valor 0 como indicativo de calidad de agua semejante a un cloacal crudo y séptico.

I.2.5. Evaluación de parámetros de estrés oxidativo y actividad detoxificante

I.2.5.1. Preparación de los homogenatos celulares

Los homogenatos para la determinaciones de proteínas, de cada actividad enzimática y de niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), se prepararon centrifugando 150 ml de muestra de agua subsuperficial a 12.000 x g durante 10 minutos. Luego se lavaron las células tres veces con agua destilada, y el pellet se resuspendió en *buffer* fosfato de potasio 30 mM pH 7,4 conteniendo KCl 120 mM. Posteriormente, se rompieron las células mediante sonicado con un homogeinizador ultrasónico Cole Parmer CP600 4710 aplicando tres pulsos de 15 segundos cada uno, manteniendo las muestras en hielo. Estos homogenatos se centrifugaron a 10.000 x g durante 30 minutos a 4° C. Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados, inmediatamente o luego de almacenamiento a -20 °C por 2 semanas como máximo.

El contenido de proteínas solubles se determinó de acuerdo con la metodología de Lowry (1951) utilizando seroalbúmina bovina (SAB) como estándar. Para ello se emplearon 5 µl y 10 µl de los sobrenadantes de homogenato obtenidos según lo descripto en el ítem anterior. La cuantificación de las proteínas se realizó por lectura de absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. El contenido de proteínas de las muestras se calculó a partir de la correspondiente curva de calibración.

I.2.5.2. Actividad de la enzima detoxificante GST

La actividad de la enzima GST se determinó en alícuotas del sobrenadante del homogenato de acuerdo con Habig *et al*. (1974). Este método se basa en la detección del producto de la reacción de conjugación del glutatión reducido (GSH) con el reactivo 1-cloro-2, 4-dinitrobenceno (CDNB). Esta conjugación es llevada a cabo por la enzima GST, y el conjugado resultante (GS-DNB) se detecta espectrofotométricamente a 340 nm.

$$\text{GSH} + \text{CDNB} \longrightarrow \text{conjugado GS-DNB}$$

La mezcla de reacción contenía GSH 1 mM, CDNB 1 mM, extracto enzimático y *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 6,5, en un volumen final de 0,8 ml. La cinética de formación del complejo GS-DNB se monitoreó a 340 nm durante tres minutos, en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. En base a las velocidades iniciales de formación del complejo y al coeficiente de absortividad molar del GS-DNB (9,6mM/cm a 25° C), se calcularon las cantidades de producto formado y las unidades GST presentes en cada muestra. Una unidad GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de GS-DNB por minuto a 25° C. Los resultados se expresaron como unidades GST/mg de proteínas.

I.2.5.3. Actividad de la enzima antioxidante SOD

La actividad de la enzima SOD se determinó siguiendo el método de McCord y Fridovich, 1969, basado en la reducción del citocromo ***c*** en presencia del anión superóxido (O_2^-), generado por el sistema xantina-xantina oxidasa.

Las determinaciones se realizaron en *buffer* fosfato de potasio 50 mM pH 7,8 conteniendo EDTA 100 μM , empleando citocromo ***c*** 21 μM y xantina 10 μM. La cantidad de xantina oxidasa fue ajustada de modo que se verificó un aumento en la absorbancia de 0,025 unidades por minuto a una longitud de onda de 550 nm, a temperatura ambiente (18-20 ºC). Los resultados se expresaron como unidades de SOD/mg de proteínas Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la velocidad de reducción de citocromo ***c***.

I.2.5.4. Actividad de la enzima antioxidante CAT

La actividad de esta enzima fue determinada según el método descripto por Aebi (1984). La enzima CAT cataliza la siguiente reacción:

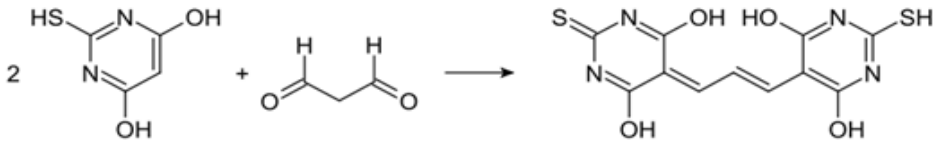
$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O + O_2$$

La medición de la actividad enzimática CAT en condiciones de saturación de sustrato no puede realizarse porque la enzima se inactiva con concentraciones de

H_2O_2 mayores a 100 mM. Sin embargo, trabajando a tiempos cortos y concentraciones de H_2O_2 entre 10 mM y 50 mM la velocidad de descomposición del H_2O_2 es proporcional a la cantidad de enzima activa. Por lo dicho, la determinación cuantitativa de la actividad catalasa, puede realizarse mediante la medición de la velocidad de descomposición del H_2O_2 por incubación del extracto celular en presencia de H_2O_2. Las mediciones se realizaron en cubeta de cuarzo en las que se colocaron en el siguiente orden: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 7, H_2O_2 15 mM y el sobrenadante enzimático. El consumo de H_2O_2 se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 240 nm durante 30 segundos (coeficiente de extinción (e)= 40 $M^{-1}cm^{-1}$), a temperatura ambiente (18-20º C). Para evaluar el correcto funcionamiento del sistema, previo a las determinaciones, se midió durante un minuto la estabilización del sistema. Una unidad CAT fue definida como la cantidad de enzima que degrada 1 mmol de H2O2 por minuto (ε peróxido de hidrógeno = 40 M-1 cm-1). Los resultados se expresaron como unidades CAT/mg de proteínas.

I.2.5.5. Daño oxidativo: Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso que comienza con la sustracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso conteniendo por lo menos 3 dobles enlaces conjugados, dando lugar a un radical lipídico. Luego de una serie de reacciones intermedias, los peróxidos lipídicos intermedios se degradan completamente formando una serie de productos finales entre los cuales el malondialdehído (MDA) es uno de los mayoritarios. Éste reacciona con el ácido tiobarbitúrico y da un complejo coloreado, como se muestra en la siguiente ecuación, el cual puede cuantificarse por espectrofotometría:



TBA **MDA** **complejo coloreado MDA-TBA_2**

La estimación de los niveles de peroxidación lipídica se realizó por determinación del contenido de TBARS de acuerdo a Buege y Aust, 1978.

Se incubaron alicuotas de sobrenadante de homogenato con 1 ml de reactivo conteniendo ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrco (TBA) 0,375% (p/v) e hidroxitolueno metilado 0,01% (p/v), durante 30 minutos en baño de agua a 95 - 100 ºC. Luego de enfriar las muestras, se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos y la absorbancia del sobrenadante clarificado, fue medida a 535 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. El contenido de TBARS fue estimado como equivalentes de MDA usando el coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA2 (156 mM^{-1} cm^{-1}). Los resultados fueron calculados como pmoles de TBARS/mg de proteínas y se expresaron como porcentaje con respecto al control.

I.2.6. Análisis estadístico

Para determinar la magnitud de la relación entre las variables ambientales, se realizaron correlaciones de Spearman de a pares de variables. A su vez, éstas se correlacionaron con las variables indicadoras de estrés oxidativo.

El ordenamiento de los sitios en las dos fechas de muestreo se realizó mediante un análisis de componentes principales (ACP) basado en las siguientes variables ambientales: caudal, OD, DQO, SAAM, N-amoniacal, nitratos, nitritos, N total y P total.

Los resultados de los parámetros indicadores de estrés oxidativo en el fitoplancton se informaron como la media ± el desvío estándar, y se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) de uno y dos factores (sitio y estación del año). Cuando se encontraron diferencias significativas ($p< 0,05$) se realizaron pruebas de comparaciones de a pares para determinar qué valores diferían significativamente, para ello se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey y la corrección de Bonferroni, respectivamente. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas se probaron utilizando las pruebas de Shapiro-Wilks y de Levene respectivamente (Sokal y Rohlf, 1999). Los *softwares* utilizados para los análisis estadísticos fueron *Graph Pad Prism 5* e *Infostat*

Para clasificar las muestras recolectadas en los diferentes sitios del arroyo Carabassa, se realizó un dendrograma basado en las densidades de los diferentes grupos

fitoplanctónicos mayoritarios, aplicando un análisis de conglomerados jerárquico, utilizando la distancia de Manhattan como medida de similitud, y ligamiento completo como criterio de agrupación.

I.3. Resultados

I.3.1. Variables ambientales

Entre los sitios establecidos sobre los afluentes, solo pudo determinarse su caudal en A1 tanto en el muestreo de otoño como en el de primavera (0,08 ± 0,0005 y 0,26 m^3/s ± 0,001 respectivamente) (**fig. 3**). Dado que consideramos despreciable el aporte de los afluentes A2 y A3 sus velocidades de corrientes fueron consideradas nulas (0 m/s). En otoño y primavera, se observó un leve aumento del caudal en el sitio CP1 (0,26 ± 0,004 y 0,59 m^3/s ± 0,0007 respectivamente), luego de la confluencia de los afluentes A1 y A2, seguida de una disminución en el sitio CP2 (0,07 ± 0,0007 y 0,14 ± 0,002 m^3/s respectivamente), y posteriormente un aumento en CP3 (0,26 ± 0,001 y 0,78 ± 0,003 m^3/s respectivamente). Los resultados obtenidos indican mayor caudal del arroyo durante la primavera.

Las velocidades de la corriente (**fig. 3**), en el muestreo de otoño en los sitios A1, CP1 y CP3 fueron 0,11 ± 0,005; 0,12 ± 0,004 y 0,11 ± 0,003 m/s respectivamente, mientras que en el sitio CP2 esta disminuyó considerablemente (0,02 ± 0,0007 m/s). En el muestreo de primavera, las velocidades de la corriente en A1 y CP1 fueron 0,24 ± 0,003 y 0,23 ± 0,001 m/s respectivamente, mientras que en CP2 disminuyó notablemente (0,04 ± 0,0007 m/s) y en CP3 se observó un leve aumento (0,14 ± 0,0007 m/s). Como se mencionó anteriormente, en los sitios A2 y A3 en las dos estaciones de muestreo la velocidad calculada fue nula (0 m/s).

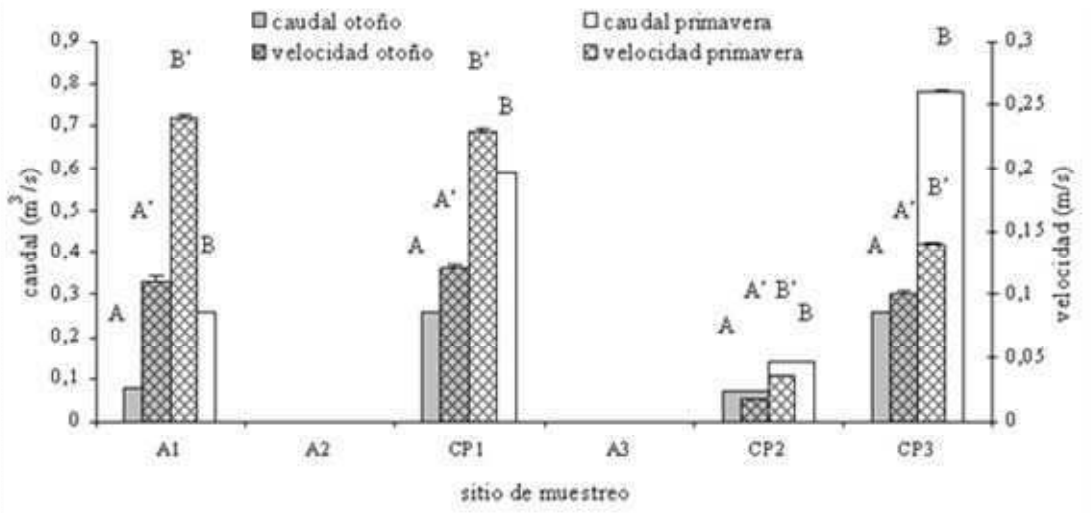


Figura 3. Caudal y velocidad de la corriente estimados en los sitios (A1, A2, CP1, A3, CP2, CP3) y períodos de muestreo (otoño-primavera) investigados. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas entre estaciones de muestreo de un sitio (A-B caudal, A'-B' velocidad).

Las precipitaciones ocurridas en la zona del arroyo (según Servicio Meteorológico Nacional) fueron registradas unos 13 días antes de la fecha del muestreo de otoño y unos 15 días antes del muestreo de primavera, resultando en 70 y 180 mm respectivamente.

Los resultados de las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos del agua en los sitios muestreados se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del agua de los sitios muestreados (A1-A3; CP1-CP3) en las dos estaciones de muestreo (otoño y primavera).

Parámetros físico-químicos	A 1	A 2	CP 1	A 3	CP 2	CP 3	Niveles Guía
Otoño							
Temperatura (°C)	15,60	13,70	15,4	14,30	13,90	13,50	
Oxígeno Disuelto (mg/l)	6,29	4,54	4,86	2,08	4,16	3,91	5 mg/l (SSRH, 2005)
Turbiedad (NTU)	301	178	260	195	154	151	50 NTU (AEA*, 2003)
pH (upH)	8,55	7,69	8,37	7,90	8,24	8,21	(6-9) CONAMA, 2005
Conductividad (µS/cm)	2440	1383	2340	1000	2140	2050	750µS/cm (EPA, 1986)
Sólidos Totales a 105 °C (mg/l)	1680	660	1540	640	670	1340	10 mg/l (CCME, 2002)
DBO (mg/l)	171	52	143	23	132	79	3 mg/l (SSRH, 2003)
DQO (mg/l)	414	122	334	69	353	198	5 mg/l (ACUMAR, 2011)
DBO/DQO	0,41	0,43	0,43	0,33	0,37	0,40	0,2-0,4 (Wang *et al.*, 2003)
Sustancias Activas Azul Metileno (mg/l)	0,29	< 0,05	0,14	0,10	0,08	0,07	0,1 mg/l (DPF, 1989)
Cloro (mg/l)	0,11	0,12	0,13	0,05	0,14	0,11	5 mg/l (OMS, 2006)
Arsénico (µg/l)	21,00	11,00	18,00	20,00	21,00	21,00	150 µg/l (US EPA, 2006)
Primavera							
Temperatura (°C)	16,20	15,70	14,80	12,60	18,20	13,20	
Oxígeno Disuelto (mg/l)	1,86	4,91	1,97	3,23	5,11	4,40	5 mg/l (SSRH, 2005)
Turbiedad (NTU)	294	117	254	202	180	159	50 NTU (AEA*, 2003)
pH (upH)	7,78	7,57	7,91	7,37	7,93	7,86	(6-9) CONAMA, 2005
Conductividad (µS/cm)	2230	594	2030	207	1157	1079	750µS/cm (EPA, 1986)
Sólidos Totales a 105 °C (mg/l)	1500	360	1260	200	900	670	10 mg/l (CCME, 2002)
DBO (mg/l)	161	40	125	38	41	38	3 mg/l (SSRH, 2003)
DQO (mg/l)	389	95	293	114	111	95	5 mg/l (ACUMAR, 2011)
DBO/DQO	0,41	0,42	0,43	0,33	0,37	0,40	0,2-0,4 (Wang *et al.*, 2003)
Sustancias Activas Azul Metileno (mg/l)	1,49	< 0,05	1,39	< 0,05	0,62	0,49	0,1 mg/l (DPF, 1989)
Cloro (mg/l)	0,20	0,16	0,00	0,01	0,16	0,22	5 mg/l (OMS, 2006)
Arsénico (µg/l)	16,00	20,00	15,00	12,00	16,00	19,00	150 µg/l (US EPA, 2006)

*AEA: Anuario de Estadísticas Agrícolas

La diferencia entre las temperaturas medias de ambos muestreos fue de 0,7 °C. La temperatura media durante el muestreo de otoño fue de 14,4 °C, con la máxima registrada en el sitio A1 (15,6 °C) y la mínima en el sitio CP3 (13,5 °C). En el muestreo de primavera la temperatura media fue de 15,1 °C, con la máxima registrada en el sitio CP2 (18,2 °C) y la mínima en el sitio A3 (12,6 °C).

La concentración de OD presentó variaciones en cuanto a los diferentes puntos y estaciones de estudio. En el muestreo de otoño se registró el máximo valor en la estación A1 (6,29 mg/l), en los sitios restantes los valores resultaron todos menores a 5 mg/l con el mínimo en la estación A3 (2,08 mg/l). En cuanto al muestreo de primavera el máximo valor se registró en la estación CP2 (5,11 mg/l), al igual que para el muestreo de otoño, los sitios

restantes presentaron valores menores al nivel guía, con el mínimo en la estación A1 (1,86 mg/l).

En todos los casos, los valores de turbiedad superaron a los establecidos para la protección de la vida acuática. Los mayores valores en ambos muestreos de otoño y primavera se registraron en el afluente A1 (301 y 294 NTU respectivamente). En el afluente A2 los valores resultaron menores (178 y 117 NTU respectivamente) que en A1. Luego de la confluencia de estos dos afluentes, en la estación CP1 se registró una disminución de la turbiedad respecto al sitio A1 (260 y 254 NTU respectivamente). Aguas abajo del sitio CP1, en las restantes estaciones de muestreo, la turbiedad presentó valores cada vez más bajos hasta el sitio CP3 que presentó los menores valores registrados para el cauce principal del arroyo (151 y 159 NTU respectivamente).

El pH se mantuvo aproximadamente constante en cada uno de los sitios estudiados en ambas estaciones, manteniéndose dentro del rango de pH básico. En el muestreo de otoño se registraron el valor máximo y el mínimo de pH en las estaciones A1 y A2 respectivamente (8,55 y 7,69 upH) con una diferencia entre estos de 0,86 upH. En el muestreo de septiembre los valores máximo y mínimo de pH se observaron en las estaciones CP2 y A3 respectivamente (7,93 y 7,37 upH) con una diferencia entre estos de 0,56 upH.

Tanto en el muestreo de otoño como en el de primavera, el menor registro de conductividad se detectó en el afluente A3 (1000 y 207 μS/cm respectivamente), y el mayor se registró en el sitio A1 (2440 y 2230 μS/cm respectivamente). En todos los sitios muestreados, los valores de conductividad tendieron a ser menores en el muestreo de primavera respecto a los de otoño. Valores menores a 750 μS/cm se han determinado en los afluentes A2 y A3 en el muestreo de primavera.

Los mayores valores de sólidos totales (ST) en ambos muestreos de otoño y primavera se registraron en el afluente A1 (1680 y 1500 mg/l respectivamente). En el A2 los valores determinados durante el otoño (660 mg/l) fueron mayores que los de primavera (360 mg/l). En ambos muestreos, luego de la confluencia de A1 y A2, en el sitio CP1, los ST disminuyeron respecto a los valores en A1 (1540 y 1260 mg/l respectivamente), y en A3 se registraron los valores de ST más bajos (640 y 200 mg/l respectivamente). Luego de la confluencia del A3 con el cauce principal del arroyo, en el sitio CP2, los ST disminuyeron

respecto a los valores en CP1, tanto en otoño como en primavera (670 y 900 mg/l respectivamente). Río abajo en CP3, en primavera los ST continuaron disminuyendo respecto a CP2 (670 mg/l), mientras que en otoño éstos aumentaron (1340 mg/l).

La DBO a lo largo del cauce principal, en ambos muestreos, disminuyó aguas abajo del sitio A1 (171 y 161 mg/l respectivamente) hasta el sitio CP3 (79 y 38 mg/l respectivamente). Los valores máximos de DBO fueron registrados en el afluente A1 en ambos muestreos (171 y 161 mg/l respectivamente), mientras que los valores mínimos, se registraron en A3 (23 y 38 mg/l respectivamente) y en CP3 en primavera (38 mg/l). Cabe destacar, que los valores de DBO en CP2 y CP3 obtenidos en otoño (132 y 79 mg/l respectivamente) fueron superiores a los de primavera (41 y 38 mg/l respectivamente).

La DQO a lo largo del cauce principal mostró un patrón similar al de la DBO. En ambos muestreos, los valores de DQO disminuyeron a partir del afluente A1 (414 y 381 mg/l respectivamente) aguas abajo de este punto hasta CP3 (198 y 95 mg/l respectivamente). Su máximo valor se observó en el sitio A1 tanto en otoño como en primavera (414 y 389 mg/l respectivamente). En otoño los mínimos valores de DQO se obtuvieron en A3 (69 mg/l), mientras que en primavera éstos se dieron en A2 y en CP3 (95 mg/l en ambos). Los valores de DQO en ambos muestreos superan en más del doble a los de la DBO en cada uno de los sitios analizados, por lo cual la relación DBO/DQO resulta siempre menor a 0,5.

Los valores de las sustancias activas al azul de metileno (SAAM) determinados en otoño y primavera, a lo largo del cauce principal, disminuyeron aguas debajo de A1 (0,29 y 1,49 mg/l respectivamente) hasta el sitio CP3 (0,07 y 0,49 mg/l respectivamente). Los valores máximos de SAAM se determinaron en A1 tanto en otoño como en primavera (0,29 y 1,49 mg/l respectivamente), y el mínimo se obtuvo en A2 en otoño ($p < 0,05$ mg/l), y en A2 y A3 en primavera ($p < 0,05$ mg/l). Además, se observó que los valores de las SAAM en el muestreo de primavera en los sitios sobre el cauce principal (CP1, CP2 y CP3), resultaron mucho más elevados (1,39, 0,62 y 0,49 mg/l respectivamente) que los de otoño para los mismos sitios (0,14, 0,08 y 0,07 mg/l respectivamente).

La concentración de cloro determinada en el muestreo de otoño en los diferentes sitios presentaron valores similares excepto en A3 donde se registró el valor más bajo (0,05 mg/l), y en CP2 donde se registró el máximo (0,14 mg/l). En el muestreo de

primavera en CP1 no se detectó cloro, y su valor mínimo fue medido en A3 (0,01 mg/l), en tanto que el máximo correspondió a CP3 (0,22 mg/l).

La concentración de arsénico determinada en los dos muestreos en todos los sitios estudiados fue inferior al valor guía establecido para la protección de la vida acuática (150 µg/l) (US EPA, 2006), no superando los 21 µg/l.

Los resultados de las determinaciones de nutrientes (N-amoniacal, nitratos, nitritos, N total y P total) presentes en el agua de los sitios muestreados se expresan en la **tabla 3**.

Tabla 3. Composición de los nutrientes del agua de los sitios muestreados (A1-A3, CP1-CP3) en las dos estaciones de muestreo (otoño-primavera).

Nutrientes	A 1	A 2	CP 1	A 3	CP 2	CP 3	Niveles Guía
	Otoño						
Nitrógeno Amoníacal (mg/l)	1,30	1,03	1,39	1,28	8,30	9,80	0,6 mg/l (Cal EPA, 2012)
Nitratos (mg/l)	8,37	15,73	9,98	37,02	11,36	12,48	5 mg/l (DOF, 1989)
Nitritos (mg/l)	0,26	3,59	0,35	5,76	2,84	3,66	0,05 mg/l (SSRH, 2005)
Nitrógeno total (mg/l)	115,61	68,40	39,52	51,73	72,55	32,45	
Fósforo total (mg/l)	9,70	9,75	11,55	3,65	7,80	7,25	0,05 mg/l (SSRH, 2005)
	Primavera						
Nitrógeno Amoníacal (mg/l)	43,90	2,77	43,50	0,71	14,70	12,80	0,6 mg/l (Cal EPA, 2012)
Nitratos (mg/l)	14,40	16,10	13,40	18,80	15,50	15,60	5 mg/l (DOF, 1989)
Nitritos (mg/l)	0,03	0,06	0,03	< 0,02	0,02	0,02	0,05 mg/l (SSRH, 2005)
Nitrógeno total (mg/l)	87,18	96,31	96,44	44,91	98,16	46,38	
Fósforo total (mg/l)	6,56	2,82	5,80	1,09	5,28	2,39	0,05 mg/l (SSRH, 2005)

La concentración de N-amoniacal aumentó aguas abajo de A1 (1,30 mg/l) en otoño sobre el cauce principal del arroyo hasta CP3 (9,8 mg/l), lugar donde se registró su valor máximo, mientras que el mínimo se obtuvo en A2 (1,02 mg/l). Contrariamente al muestreo de otoño, en el de primavera este nutriente disminuyó aguas abajo desde A1 (43,90 mg/l) en el cauce principal hasta CP3 (12,80 mg/l), registrándose los valores máximos en A1 y en CP1 (43,90 y 43,50 mg/l respectivamente), y un mínimo en A3 (0,71 mg/l). Los resultados anteriores muestran que los valores del N-amoniacal en primavera resultaron superiores a los de otoño en todos los sitios excepto en A3 (0,71 y 1,28 mg/l respectivamente).

La concentración de nitratos en los sitios muestreados aumentó en otoño sobre el cauce principal desde CP1 (9,98 mg/l) aguas abajo hasta el sitio CP3 (12,48 mg/l). El

máximo registrado se determinó en A3 (37,02 mg/l) y el mínimo en A1 (8,37 mg/l). En primavera las concentraciones de nitratos detectadas se mantuvieron relativamente constantes desde A1, aguas abajo sobre el cauce principal hasta CP3 (14,40 y 15,60 mg/l respectivamente), registrándose el mínimo en CP1 (13,40 mg/l) y el máximo en A3 (18,80 mg/l).

Los valores de concentraciones de nitritos registrados en otoño fueron superiores a los de septiembre en todos los sitios estudiados. En otoño el valor máximo se registró en A3 (5,76 mg/l) y el mínimo en A1 (0,26 mg/l). Sobre el cauce principal, los valores se incrementaron hacia CP3 (3,66 mg/l). La concentración de nitritos en primavera, se mantuvo relativamente constante desde A1 hasta CP3 aguas abajo (0,03 y 0,02 mg/l respectivamente), con un máximo en A2 (0,06 mg/l) y un mínimo en A3 (< 0,02 mg/l).

Las concentraciones de N total determinadas, fueron elevadas y no siguieron una tendencia clara. En otoño se registró un valor máximo en A1 (115,61 mg/l) y un mínimo en CP1 (39,52 mg/l). En primavera el valor máximo de N total se registró en CP2 (98,16 mg/l) y el mínimo en A3 (44,91 mg/l).

Los valores de las concentraciones de P total determinados en otoño resultaron más elevados que los de primavera. En el primero, se registró un máximo en CP1 (11,55 mg/l) y un mínimo en A3 (3,65 mg/l). Mientras que en primavera se registró su máximo valor en A1 (6,56 mg/l) y el mínimo en A3 (1,09 mg/l). En ambos muestreos, los valores disminuyen en los sitios sobre el cauce principal hacia CP3 (7,25 y 2,39 mg/l respectivamente).

I.3.2. Variables biológicas

I.3.21. Estructura y composición del fitoplancton

La densidad del fitoplancton total registrada en otoño fue de $3{,}6.10^6$ individuos/ml y en primavera de $2{,}6.10^6$ individuos/ml. Esta comunidad en el arroyo Carabassa estuvo compuesta por cuatro clases dominantes de microalgas, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae y Bacillariophyceae (**tabla 4**), y por otros dos grupos menos representados, que fueron Xantophyceae y Dynophyceae. La abundancia relativa de los

principales grupos, en el muestreo de otoño fue: Chlorophyceae (85 %), Cyanophyceae (12,2 %), Euglenophyceae (2,4 %) y Bacillariophyceae (0,4 %). En tanto que en el de primavera fue: Chlorophyceae (81,3 %), Cyanophyceae (3 %), Euglenophyceae (9,3 %) y Bacillariophyceae (6,4 %).

Tabla 4. Densidad del fitoplancton (individuos/ml) de las clases algales mayoritarias en cada estación de muestreo.

Otoño	Cyanophyceae	Chlopophyceae	Bacillariophyceae	Euglenophyceae
A1	253.485	1.074.809	13	59.730
A2	3.495	159.709	7.029	58
CP1	12.566	211.231	9	18
A3	62.596	389.515	5.890	668
CP2	24.544	600.039	24	25.015
CP3	81.170	615.198	107	55
Primavera				
A1	18.881	498.645	45	76
A2	35.021	136.564	86.982	88.985
CP1	22.219	943.256	10.253	110.073
A3	114	232.712	56.038	20.047
CP2	2.380	199.921	4.748	20.797
CP3	26	149.971	12.174	8.639

En las **figuras 4 y 5** se puede observar que, a excepción de las algas Chlorophyceae que dominaron en todos los sitios, la representatividad de los demás grupos (Cyanophyceae, Bacillariophyceae y Euglenophyceae) no fue homogénea.

Durante el muestreo de otoño, en A1 se registró la mayor densidad de individuos de Chlorophyceae ($1,1.10^6$ individuos/ml) en donde representaron el 77,4% del fitoplancton. Las Cyanophyceae y Euglenophyceae mostraron ser menos abundantes ($2,5.10^5$ y $6,0.10^4$ individuos/ml respectivamente), constituyendo el 18,3% y el 4,3% del fitoplancton, en tanto que las Bacillariophyceae fueron las que presentaron la menor densidad ($2,1.10^2$ individuos/ml) y representatividad con menos del 1% del total. Las menores densidades de Chlorophyceae se encontraron en los sitios CP1 y A2 ($2,1.10^5$ y $1,6.10^5$ individuos/ml respectivamente) representando la mayor parte del fitoplancton (94,4% y 93,8% respectivamente). En A3, CP2 y CP3, Chlorophyceae representó un 88 % aproximadamente del fitoplancton total, con densidades crecientes hasta alcanzar en CP3, $6,1.10^5$ individuos/ml. La máxima densidad de Bacillariophyceae se registró en A2

($7,0.10^3$ individuos/ml) seguido de A3 ($5,9.10^3$ individuos/ml) representando el 25% y 18% del fitoplancton total respectivamente, y la máxima densidad de Euglenophyceae se encontró en A1 ($6,0.10^4$ individuos/ml) seguido de CP2 ($2,5.10^4$ individuos/ml) constituyendo el 4,3% y 3,9% del fitoplancton respectivamente. La densidad de individuos de Cyanophyceae, Euglenophyceae y Bacillariophyceae oscilaron sin seguir un patrón definido en las diferentes estaciones de muestreo, resultando estos dos últimos taxones los menos representativos del fitoplancton.

En el muestreo de primavera, la participación de Chlorophyceae como grupo dominante del fitoplancton fue mayor en A1 (96,4%) con $5,0.10^5$ individuos/ml, aunque su mayor densidad se observó en CP1 con $9,4.10^5$ individuos/ml, representando el 86,9% del fitoplancton total. Coincidentemente, Euglenophyceae también presentó su mayor densidad en CP1 ($1,1.10^5$ individuos/ml) constituyendo el 10 % del fitoplancton. Las Bacillariophyceae y Cyanophyceae fueron los grupos menos representativos en CP1, mientras que en A2 presentaron sus máximas densidades ($8,7.10^4$ y $3,5.10^4$ individuos/ml respectivamente), representando el 25 y el 10 % del fitoplancton respectivamente. Además de en A2, las más altas densidades de Bacillariophyceae se encontraron en A3 ($5,6.10^4$ individuos/ml) representando el 18% del fitoplancton.

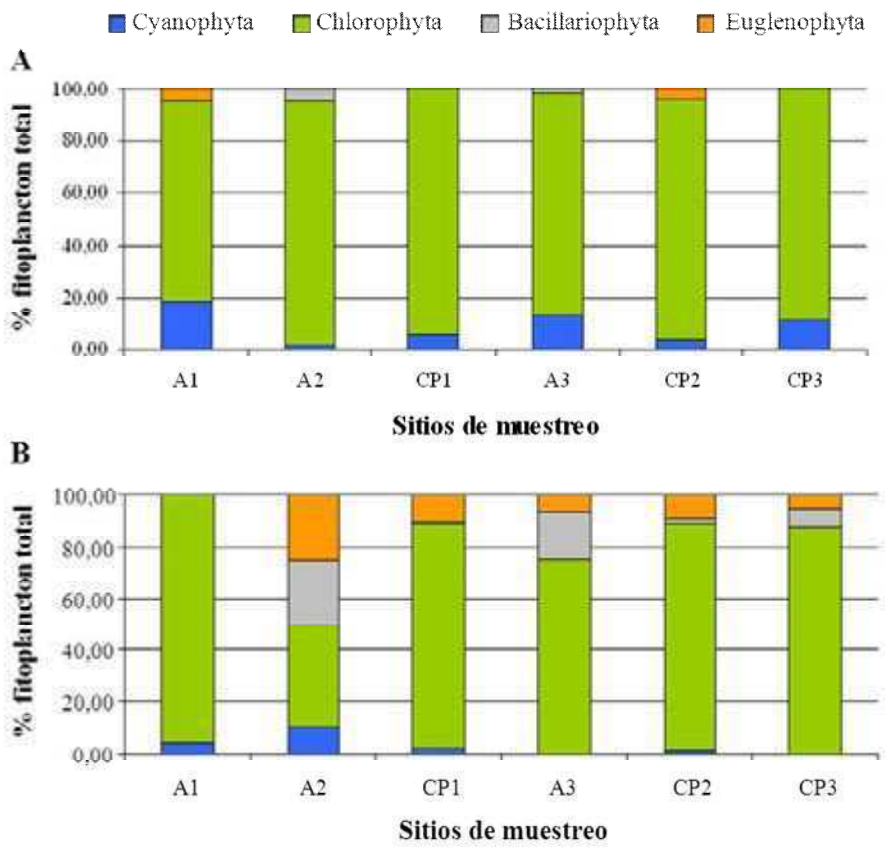


Figura 4. Porcentajes de los grupos mayoritarios del fitoplancton en los sitios muestreados (A1-A3, CP1-CP3) en otoño (**A**) y en primavera (**B**).

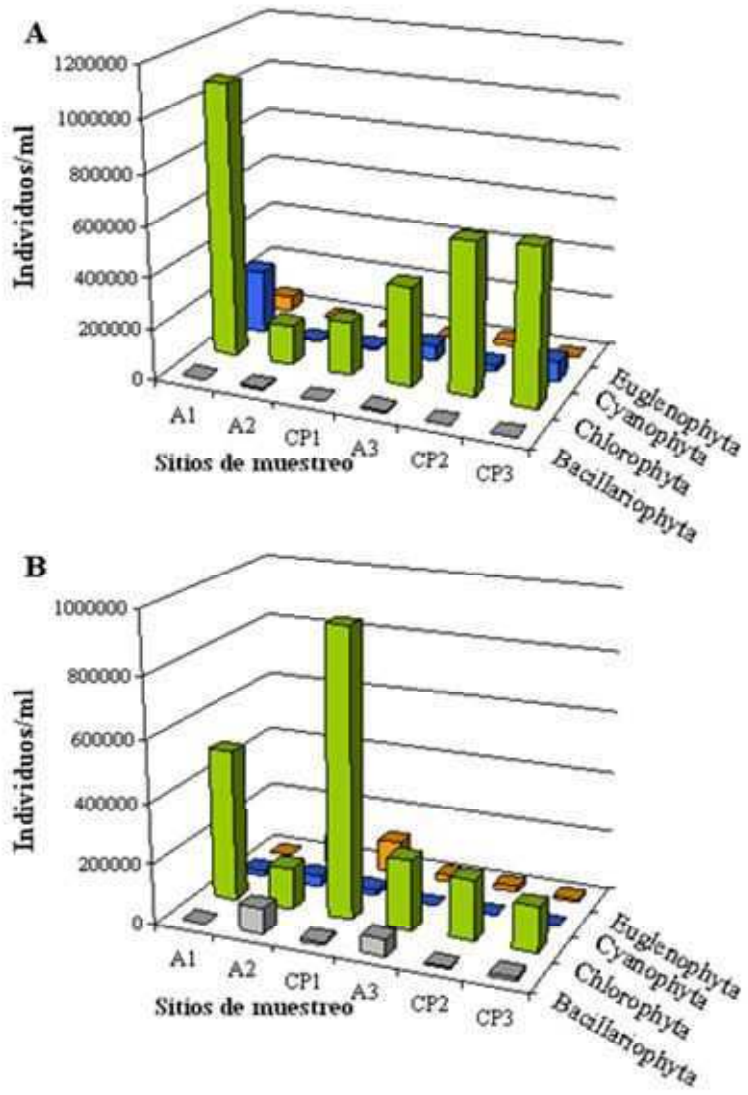


Figura 5. Densidades de los grupos mayoritarios del fitoplancton (individuos/ml) en los sitios muestreados (A1-A3, CP1-CP3) en otoño (**A**) y en primavera (**B**).

I.3.2.2. Análisis bacteriológico

La densidad de bacterias coliformes totales mostró un patrón de variación estacional (**fig. 6 A**) registrándose los mayores valores en las muestras de otoño. En el cauce principal se registró la mayor densidad en CP1 (22000 NMP/100 ml), para luego disminuir en CP2 (9000 NMP/100 ml) y aumentar levemente en CP3 (17000 NMP/100

ml). De los afluentes, en A3 fue donde se registró la mayor densidad de bacterias coliformes totales (21000 NMP/100 ml) mostrando valores similares a los de CP1. Densidades del mismo orden se registraron en A1 (12000 NMP/100 ml), y los menores valores se obtuvieron en A2 (670 NMP/100 ml). En primavera se registraron las mayores densidades de bacterias coliformes totales sobre el cauce principal en CP1 y CP3 (1800 y 1200 NMP/100 ml respectivamente) y en A3 (1600 NMP/100 ml). Las menores densidades fueron medidas en A2 y en CP2 (350, 170 NMP/100 ml respectivamente).

La densidad de bacterias coliformes fecales (**fig. 6 B**) presentó idéntico patrón de variación estacional y espacial que las coliformes totales, con sus mayores valores en otoño, a excepción del sitio A2, el cual presentó una mayor densidad en primavera. El valor más alto en el muestreo de otoño se registró en CP1 (5100 NMP/100 ml), disminuyendo en CP2 (1700 NMP/100 ml) y aumentando al doble en CP3 (3500 NMP/100 ml). La máxima densidad en los afluentes se registró en el sitio A3 (4000 NMP/100 ml), y en el mismo orden que el anterior en el sitio A1 (2700 NMP/100 ml), mientras que las mínimas densidades se registraron en A2 (97 NMP/100 ml). En primavera se detectó la mayor densidad de bacterias coliformes totales en A1 (3000 NMP/100 ml) y los mínimos en A2 y A3 (275 y 240 NMP/100 ml respectivamente). Sobre el cauce principal el máximo registrado fue en CP1 (360 NMP/100 ml), disminuyendo un orden en CP2 (30 NMP/100 ml) y aumentando un orden nuevamente en CP3 (210 NMP/100 ml).

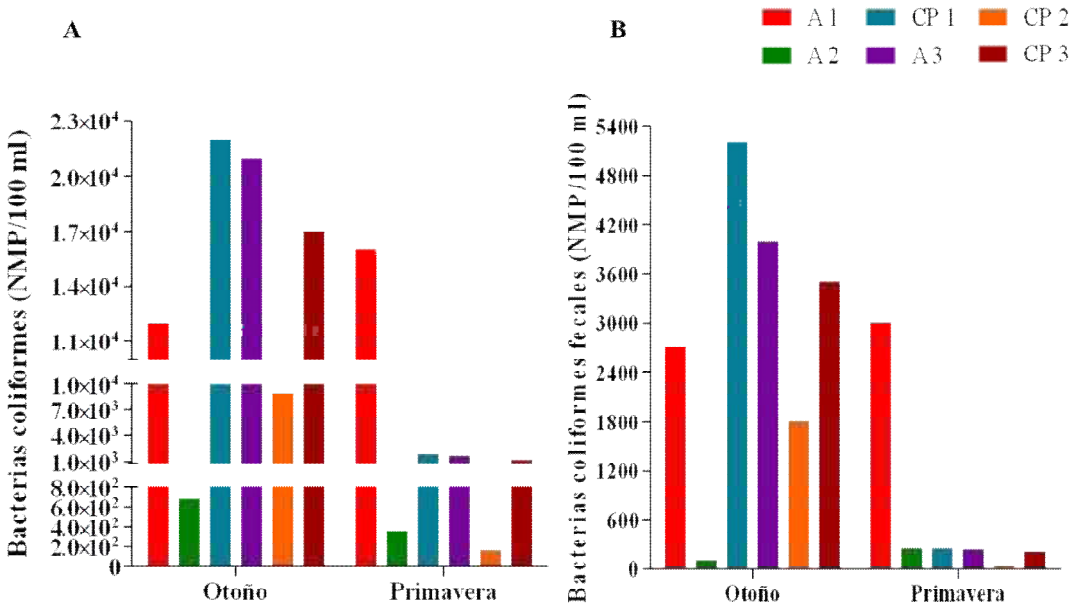


Figura 6: Densidad de bacterias coliformes totales (**A**) y fecales (**B**) presentes en las muestras de cada sitio (A1-A3, CP1-CP3) en las dos estaciones muestreadas (otoño-primavera).

I.3.3. Calidad del agua

Según los valores de los ICA obtenidos (**tabla 5**), la contaminación orgánica del arroyo evidenció una variación espacial y temporal. Ésta resultó elevada en todos los sitios excepto en CP2, donde fue muy elevada (2,9). Las mejores condiciones fueron las existentes en A3 (5,2). En ambos muestreos de otoño y primavera se observó un grado de deterioro de las aguas con un valor promedio del ICA de 3,94 y 3,20 respectivamente, indicando una contaminación elevada de las aguas.

Tabla 5. Resultados del Índice de Calidad de Agua (ICA, Berón, 1984), de cada sitio (A1-A3, CP1-CP3) en cada estación muestreada (otoño- primavera).

Sitio	ICA Otoño	ICA Primavera	ICA/ sitio
A1	4,22	2,44	3,30
A2	4,00	3,66	3,80
CP1	4,00	2,44	3,22
A3	5,66	4,77	5,20
CP2	3,00	2,88	2,90
CP3	2,75	3,00	3,00
ICA/ estación	3,94	3,20	

I.3.4. Análisis de componentes principales

El ordenamiento de las muestras tomadas en las dos estaciones del año se realizó con un análisis de componentes principales (ACP) basado en las características fisicoquímicas (**fig. 6**). Los dos primeros ejes explican el 61,4 % de la varianza total. El primer componente (eje x) explica un 35,8 % de la varianza total, con una correlación positiva con las variables SAAM (r= 0,84), N-amoniacal (r= 0,79), DQO (r= 0,68) y N total (r= 0,62), y negativa con nitritos (r= -0,67) y nitratos (r= -0,60). El segundo componente (eje y) explica un 25,6 % de la varianza total con una correlación positiva con OD (r= 0,89) y P total (r= 0,64). El primer eje organiza a los sitios de muestreo, separando a A1 y CP1 (lado derecho del eje) los cuales se encuentran asociados a valores elevados de SAAM, N-amoniacal, DQO y N total, de A2, A3 y CP3 (lado izquierdo del eje), de sitios donde estos parámetros se encontraron en bajas concentraciones, y asociados a elevadas concentraciones de nitratos y nitritos. En el segundo eje, A1, A2, CP1, CP2 y CP3 durante el otoño, y A2 y CP2 en primavera, se asociaron a elevados niveles de OD y P total, en tanto que A1, CP1, A3 y CP3, en primavera, y A3 en otoño se asocian con bajos niveles de estos parámetros.

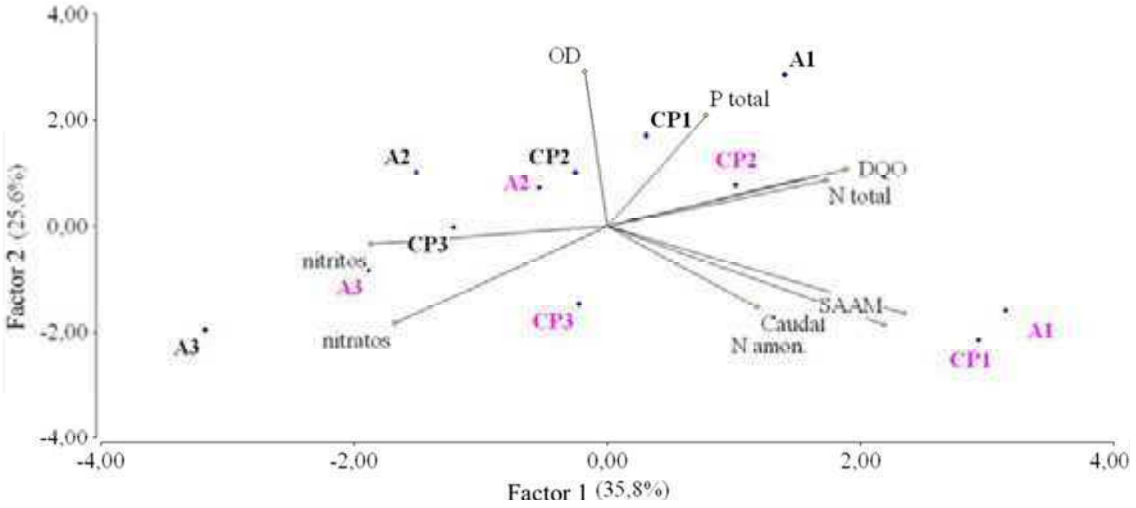


Figura 6. Ordenación resultante del análisis de componentes principales (ACP) basado en los parámetros fisicoquímicos de las muestras de los afluentes (A1-A3) y del cauce principal (CP1-CP3) del arroyo Carabassa, en las dos estaciones de muestreo, otoño (negro) y primavera (rosa). Factor 1: primer componente principal, Factor 2: segundo componente principal.

I.3.5. Análisis de conglomerados

En la **figura 7** se muestra el dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados, en base a los resultados de las abundancias de cada grupo fitoplanctónico en los sitios muestreados. En él se pueden distinguir tres grupos, el primero conformado por las muestras de A2 y A3 de primavera, sitios en los que se registraron las mayores densidades de Bacillariphyceae. El segundo grupo, se subdividió en un subgrupo "2a" que abarca a las muestras de A3, CP2 y CP3 de otoño, y el "2b" formado por las muestras de A1, CP2 y CP3 de primavera, más A2 y CP1 de otoño. Ambos subgrupos "2a" y "2b" se caracterizan por mostrar densidades medias y bajas de Chlorophyceae respectivamente. El tercer grupo estuvo conformado por las muestras A1 del muestreo de otoño y CP1 del muestreo de primavera, caracterizadas ambas, por presentar las más elevadas densidades de Chlorophyceae, Cyanophyceae y Euglenophyceae en comparación con todas las muestras tomadas en la misma época de muestreo.

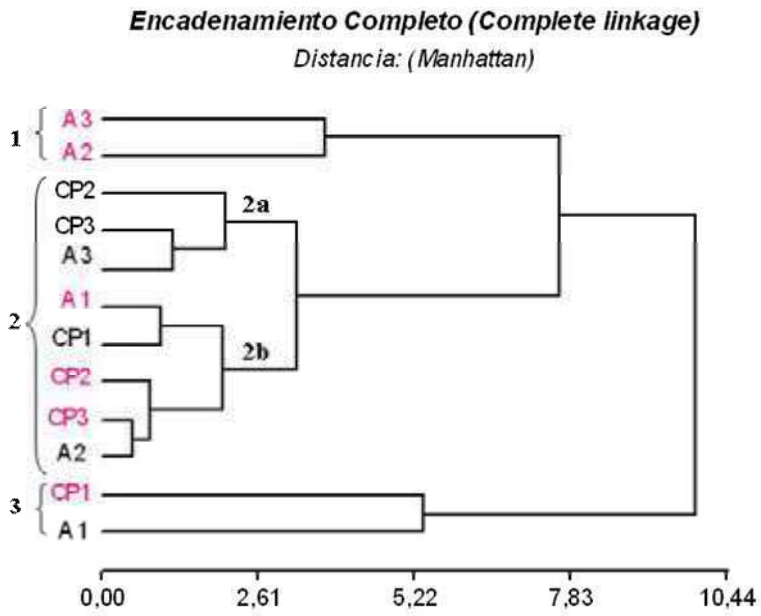


Figura 7: Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados de las muestras de A1, A3, CP1 y CP3, tomadas en otoño (negro) y en primavera (rosa).

I.3.6. Parámetros de estrés oxidativo y actividad detoxificante

Los resultados de las determinaciones de los marcadores de estrés oxidativo y de actividad detoxificante en el fitoplancton se muestran en la **figura 8.**

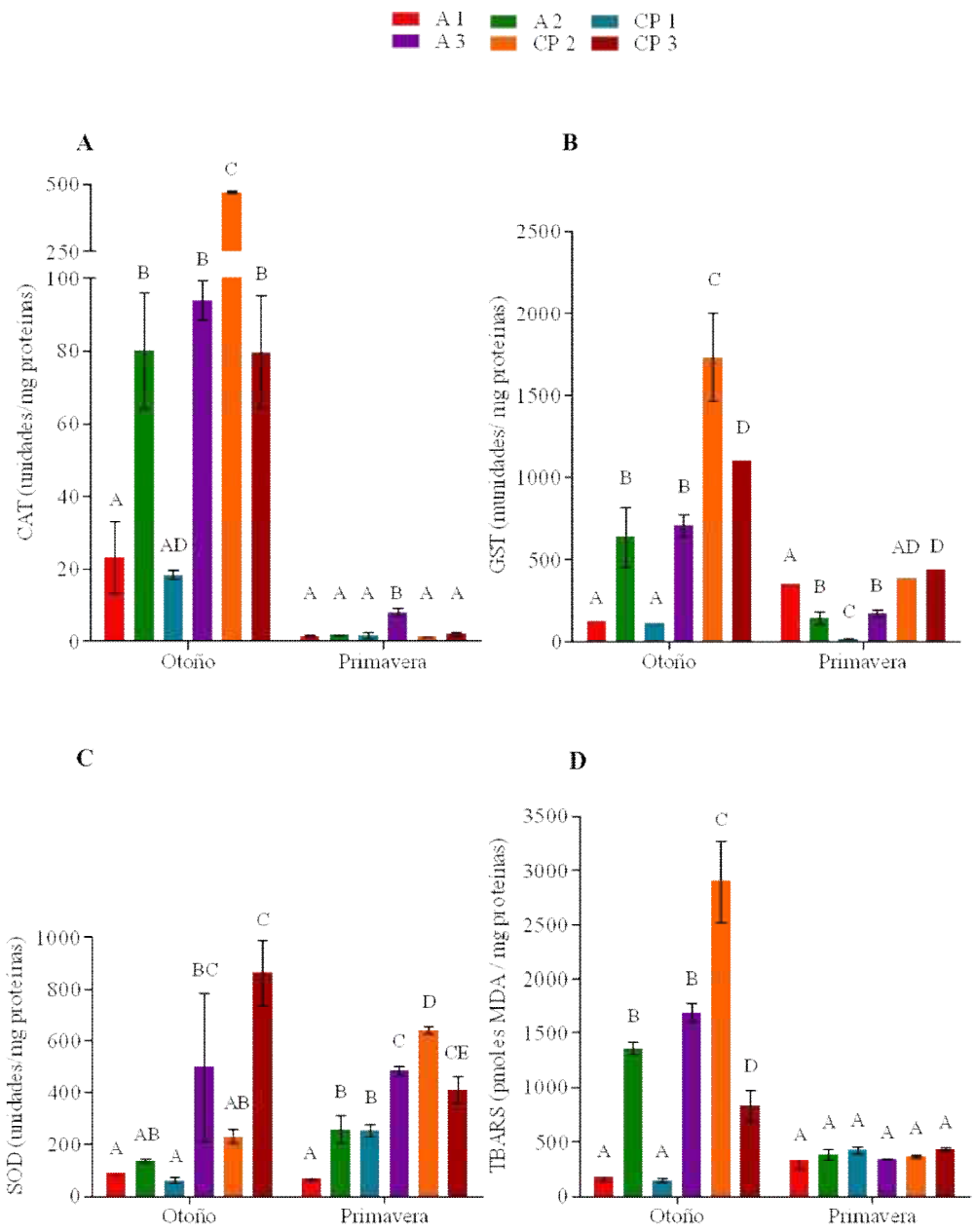


Figura 8. (**A**) Actividad Catalasa (CAT), (**B**) actividad glutatión-S-transferasa (GST), (**C**) actividad superóxido dismutasa (SOD) y (**D**) niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en las muestras de fitoplancton de los diferentes sitios (A1, A2, CP1, A3, CP2, CP3) en otoño y primavera. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas entre los sitios en cada una de las estaciones de muestreo.

La actividad CAT mostró un patrón de variación estacional (p< 0,0001) y espacial (p< 0,0001) (**fig. 8 A y tabla 6**), detectándose su mayor actividad en las muestras de otoño (p< 0,001). En esta estación, el fitoplancton de A1 y CP1 presentó el menor valor de actividad CAT. Aguas abajo, en CP2, se registró la actividad más elevada de todos los sitios muestreados, mientras que en CP3 los niveles fueron altos pero menores que en CP2. En lo que respecta a los afluentes, las mayores actividades se registraron en el fitoplancton de A3 y A2, y la mínima en A1. En primavera el fitoplancton de todos los sitios mostró actividades significativamente menores que las de otoño. Se registró una actividad CAT más elevada en A3, respecto a los otros sitios, entre los cuales no se observaron diferencias significativas de actividad.

Tabla 6. Resumen de los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores.

Parámetro	Sitio	Estación	Sitio x Estación
CAT	< 0,0001, CP 2 > otros	< 0,0001, O > P	< 0,0001
SOD	< 0,0001, A3-CP 2- CP 3 > otros	ns	< 0,0001
TBARS	< 0,0001, CP 2 > otros	< 0,0001, O > P	< 0,0001
GST	< 0,0001, CP 2 > otros	< 0,0001, O > P	< 0,0001

Sitios de muestreo: A1-A3, CP1-CP3. Estaciones del año: otoño (O) y primavera (P). ns: no significativo.

La actividad GST también mostró un patrón de variación estacional (p< 0,0001) y espacial (p< 0,0001) (**fig. 8 B y tabla 6**). Los valores más elevados de este parámetro se registraron en otoño, excepto para el fitoplancton de A1 que tuvo valores de actividad mayores en primavera. Al igual que para CAT, en esta estación, el valor significativamente más bajo de actividad GST se determinó en el fitoplanton de CP1 y el máximoen el del sitio CP2, registrándose un valor significativamente alto en CP3 pero menor que el de CP2. Si consideramos los afluentes, la actividad GST fue mínima en A1 y se obtuvieron valores máximos en A2 y A3 En primavera, en líneas generales, también se obtuvieron valores más bajos de actividad que en la otra estación. El valor más bajo de actividad GST se registró en

CP1, para aumentar aguas abajo en el cauce principal en CP2 y CP3. La máxima actividad en los afluentes se registró en el fitoplancton de A1, y las menores en el de A2 y A3.

Al considerar los datos obtenidos de la actividad SOD se pudo evidenciar que estos mostraban un patrón de variación espacial ($p < 0,0001$) (**fig. 8 C y tabla 6**). Durante el otoño, en el cauce principal del arroyo, se registró la menor actividad en el fitoplancton de CP1, aumentando aguas abajo en CP2 y en CP3 donde se presentó su mayor valor. Respecto a los afluentes, el fitoplancton del afluente A1 mostró el menor nivel de actividad, mientras que el de A3 fue significativamente mayor. En primavera, en el fitoplancton de CP1 se registró el valor más bajo de actividad SOD en el cauce principal, aumentando aguas arriba en CP2 y disminuyendo respecto al sitio anterior en CP3. De los 3 afluentes, el nivel más bajo de actividad SOD se obtuvo en el fitoplancton de A1, en el de A2 los valores fueron mucho más elevados, y lo mayores niveles se registraron en el de A3.

Los niveles de TBARS (índice de peroxidación lipídica) mostraron un claro patrón de variación estacional ($p< 0,0001$) y espacial ($p< 0,0001$) (**fig. 8 D y tabla 6**). Los mayores valores se registraron en otoño, excepto para el fitoplancton de A1 y CP1 en los que se detectaron niveles más altos en primavera. En el cauce principal se registró el menor valor en el sitio CP1, mientras que aguas abajo (en CP2 y CP3) el fitoplancton mostró niveles de TBARS significativamente más altos, con un máximo en CP2. En los afluentes, el máximo nivel de TBARS se dio en el fitoplancton del sitio A2 y A3. En primavera, no se registraron diferencias en el contenido de TBARS entre los sitios.

A través de la aplicación de la correlación de Spearman entre pares de variables fisicoquímicas ambientales y parámetros indicadores de estrés oxidativo (**tabla 7**) se pudo establecer la existencia de algunas correlaciones positivas tales como: GST con CAT ($r= 0,99$), TBARS con CAT y GST ($r= 0,85$ y $r= 0,88$ respectivamente), Nitratos con GST y TBARS ($r= 0,64$ y $r= 0,71$ respectivamente), y una negativa como la de SOD con DQO ($r= -0,58$). El resto de las variables no presentaron correlaciones significativas.

Tabla 7. Coeficientes de correlación de Spearman determinados entre las variables fisicoquímicas ambientales y bioquímicas (CAT, GST, SOD y TBARS).

Parámetro	CAT	GST	SOD	TBARS
CAT	1			
GST	**0,99**	1		
SOD	0,2	0,3	1	
TBARS	**0,85**	**0,88**	0,06	1
T°	-0,32	-0,32	-0,16	-0,34
OD	4,1E-0,3	-0,04	-0,1	-0,16
Turbidez	-0,37	-0,48	-0,55	-0,41
pH	0,38	0,25	-0,14	0,11
Conductividad	0,31	0,19	-0,39	0,07
S. totales	-0,08	-0,17	-0,28	-0,34
DBO	0,16	-0,03	**-0,61**	-0,08
DQO	0,24	0,04	**-0,58**	-0,02
SAAM	-0,33	-0,33	-0,23	-0,33
Cl	-0,06	0,15	-0,29	0,18
As	0,45	0,36	0,15	0,21
N amoniacal	-0,16	-0,17	-0,14	-0,21
Nitritos	-0,1	0,06	0,32	0,28
Nitratos	0,51	**0,64**	0,37	**0,71**
N total	-0,23	-0,31	-0,41	-0,17
P total	0,22	0,14	-0,47	0,1

Los números en negritas indican correlaciones significativas $p < 0,0001$.

I.4. Discusión

El análisis de los resultados obtenidos de las características ambientales, los cuales incluyeron variables hidrometeorológicas, fisicoquímicas y biológicas, nos permitió establecer alguna de las causas del deterioro que presentaban las aguas del arroyo Carabassa. Una de ellas se atribuye al ingreso de sustancias generadas por acción antrópica, y otra a la estacionalidad, que influyó a través de la variación de las precipitaciones y del caudal pudiendo aumentar el efecto antrópico. La primer situación había sido observada por Momo *et al*., 2003, quienes emplearon el concepto de *estado ecológico* (Pollard y Huxham, 1998) para clasificar la calidad de las aguas de los arroyos de la cuenca del Río Luján, asignándole al arroyo Carabassa la calificación de un estado ecológico "muy malo",

principalmente como consecuencia de efluentes orgánicos y nutrientes provenientes del desarrollo urbano e industrial.

I.4.1 Variables ambientales

El caudal exhibió un patrón de variación estacional y espacial. El primero se evidenció al registrarse sus mayores valores en el muestreo de primavera, justamente 15 días después de haberse registrado precipitaciones en la zona. A estos aportes, se le deben sumar las masas de aguas subterráneas (caudal basal) que también contribuyen al caudal superficial del arroyo Carabassa. Éstas provienen de dos acuíferos subterráneos, uno más superficial (Pampeano) contaminado por aguas residuales (Santa Cruz, 1995), y el otro más profundo (Puelchense) con aguas de mejor calidad. La escasa pendiente del arroyo (0,05–0,016 m/km) (Giorgi, 2001; Blasi *et al*., 2010) justifica sus bajos valores de velocidad de corriente. En lo que respecta al aporte de aguas desde los afluentes al caudal principal, se consideró que éste estuvo incrementado solamente por la contribución del afluente A1, dado que los otros dos (A2 y A3) presentan aguas quietas, por lo que puede considerarse que sus aportes al caudal principal no serían significativos. El patrón espacial del caudal sobre el cauce principal mostró un aumento en dirección aguas abajo, excepto en el sitio CP2 en donde disminuyó considerablemente. Esto podría deberse a un proceso natural de infiltración hacia el nivel freático que se da en la zona por la presencia de sedimentos porosos, o a un proceso artificial por bombeo de las aguas hacia lagunas de urbanización.

En la mayoría de los sitios muestreados los niveles de oxígeno disuelto, tanto en otoño como en primavera, resultaron inferiores al nivel guía establecido para el desarrollo de la vida acuática, excepto en A1 durante el otoño, donde resultó levemente superior. Para los valores de temperatura determinados, característicos de climas templados (10 a 20 °C, Cravero *et al*., 1991), la solubilidad del oxígeno es de 10 a 11 mg/l, por lo que se esperarían mayores niveles de oxígeno que los registrados (máximo valor de 6,29 mg/l). Esos bajos niveles detectados en el arroyo Carabassa, resultan característicos de cuerpos de agua poco profundos. Dada las bajas velocidades de corriente de este curso, el intercambio de gases entre las aguas que están por debajo de la superficie y la atmósfera es menor, por lo que se reduce la oxigenación del agua.

Además de la temperatura y la velocidad de la corriente, la descomposición de la materia orgánica por microorganismos también influye en la cantidad de oxígeno disuelto en el agua (Martínez y Donato, 2003). Al analizar los valores de la DBO, en todos los sitios y en las dos estaciones de muestreo, los resultados obtenidos superan el nivel guía establecido para la protección de la vida acuática. Esto nos indica que las aguas presentan una fuerte contaminación orgánica, perjudicial para los organismos que las habitan. Además, de acuerdo a los valores de la relación DBO/ DQO obtenidos (la mayoría de ellos superiores a 0,4), parte de esa materia orgánica sería biodegradable. Por lo tanto, el déficit de OD encontrado se debería al alto consumo de oxígeno por parte de la comunidad microbiana aeróbica para oxidar la materia orgánica presente. Ese consumo excede a su incorporación por flujo desde la atmósfera (como se ha comentado anteriormente), o por productividad fotosintética, la cual podría estar afectada por los elevados niveles de turbiedad observados (mayores a los valores establecidos para la protección de la vida acuática) que disminuyen la penetración de la luz con la consecuente disminución del rendimiento fotosintético. A su vez, la actividad microbiana aumenta la concentración de dióxido de carbono disuelto en el agua generando la formación de ácido carbónico y sus productos de disociación (bicarbonato y carbonato), determinando un aumento de la concentración de protones que lleva a una acidificación del medio. A pesar de ello, el pH fluctuó entre valores ligeramente elevados pero sin exceder aquellos aceptados para la protección de la vida acuática. Esto nos estaría indicando que esta tendencia a la alcalinidad detectada se debería a la influencia de la composición química del sustrato subyacente (postpampeano) que contiene carbonato de calcio en los depósitos de limos y arcillas (Andrade, 1986).

La DBO y la DQO mostraron un patrón de variabilidad espacial semejante en ambos muestreos, exhibiendo en A1 los registros más altos de todos los afluentes y, en el cauce principal, CP1 fue el sitio que mostró el máximo valor. Esto era esperable ya que el afluente A1 recibe la descarga de la planta láctea “La Serenísima” y su corriente arrastra aguas contaminadas hacia el cauce principal del arroyo que desemboca cerca de CP1. Aguas abajo de este sitio los valores de ambas variables disminuyen, aunque siempre se mantienen por encima de aquellos establecidos para la protección de la vida acuática. La dinámica de estas variables muestra que aguas arriba, el arroyo recibe una importante

cantidad de materia orgánica, la cual va disminuyendo su concentración aguas abajo a medida que se aleja del foco contaminante. La causa de los elevados valores de DBO y DQO determinados, probablemente se deba al vuelco de los efluentes de la planta de tratamiento de dicha empresa láctea.

La turbiedad y la conductividad en los diferentes sitios muestreados también fueron menores aguas abajo de CP1. Esto era esperable, debido a que ambos parámetros dependen de las partículas en suspensión y disueltas, y de las sales y iones disociados, cuyas concentraciones varían en gran medida debido a factores tales como los aportes de sustancias provenientes de la actividad agrícola (cloruros, sulfatos, nitratos, etc.) y de la contaminación de origen doméstico principalmente (jabones y detergentes, alimentos, deyecciones, etc.) (Lombardo *et al*., 2010). Así, el ingreso de las aguas residuales de la empresa láctea, las excretas de los animales de pastoreo que frecuentan el arroyo aguas arriba de CP1, explicarían los mayores valores registrados en este sitio.

Los niveles de nitrógeno amoniacal presentaron un patrón de variación estacional, resultando mayores durante la primavera superando en ambas estaciones el nivel guía establecido para la protección de la vida acuática. En el muestreo de otoño las concentraciones de nitrógeno amoniacal aumentaron sobre el cauce principal aguas abajo de A1 hacia CP3, mientras que ocurrió lo contrario en primavera en donde se registraron sus máximos en A1 y CP1, para disminuir aguas abajo hacia CP3. El patrón espacial observado en otoño, podría tener relación con el comportamiento del OD en esta estación, el cual disminuyó aguas abajo hacia CP3. Como consecuencia de ello, el proceso de nitrificación resultaría afectado por la falta de oxígeno que permite la oxidación del amonio, por lo cual el nivel de este ión se incrementa aguas abajo. No se descarta la posibilidad de que tal aumento, además, se debiera a las fuentes de contaminación exógena. En primavera, en cambio, se incrementó el OD aguas abajo en el cauce principal, lo cual debe haber facilitado la oxidación del amonio con su consecuente disminución, lo cual explicaría sus bajos niveles en CP3.

Cabe destacar, la elevada concentración de nitrógeno amoniacal registrada en el muestreo de primavera en el afluente A1 y en el sitio CP1 sobre el cauce principal. Estas concentraciones deben estar asociadas a una fuente puntual de contaminación antrópica proveniente de la empresa láctea que se halla en las cercanías del sitio A1 y que vierte los

efluentes de sus plantas de tratamiento. Estos resultados podrían constituir una evidencia del ineficiente manejo que la empresa hace de sus residuos y de la falta de control de las aguas tratadas que se vierten en este curso de agua.

Los nitritos también presentaron, al igual que el nitrógeno amoniacal, un patrón de variación estacional, registrándose sus concentraciones más elevadas en el muestreo de otoño, las cuales superaron ampliamente los niveles máximos establecidos para la protección de la vida acuática. Además, estos valores aumentaron en dirección aguas abajo sobre el cauce principal. Siendo el nitrito una molécula inestable, cabe destacar el máximo valor determinado en otoño en el sitio CP3, localizado aguas abajo de una zona destinada a las prácticas de golf. Esta alta concentración de nitritos, podría ser consecuencia del uso de fertilizantes nitrogenados (especialmente los amoniacales) empleados en el cuidado del césped (Barton y Colmer, 2006), y del vertido de los efluentes cloacales provenientes de las aguas residuales del barrio situado en este mismo predio, los cuales constituirían una fuente de contaminación de nitrógeno orgánico, juntamente con el aporte de microorganismos nitrificantes. En primavera, las concentraciones de nitritos fueron inferiores al nivel máximo permitido en la mayor parte de las muestras, con valores que se mantuvieron casi constantes, salvo en el sitio A2 donde resultó levemente superior. Con los resultados obtenidos en esta experiencia no podemos explicar cuáles son las causas del patrón estacional observado para los nitritos y consideramos que sería necesario un muestreo extendido en el tiempo para establecer si este perfil de variación responde a características naturales o a factores antrópicos.

En aguas superficiales en condiciones naturales, el ión nitrato rara vez excede de 0,45 mg/l, y una concentración de 0,9 mg/l ya es indicativa de una posible condición eutrófica (Chapman, 1996). Los acuíferos presentes en la zona de estudio son portadores de agua de calidad aceptable, pero presentan excepciones según el área en que se encuentren. En la zona de estudio, esta fracción del nitrógeno (nitrato) es un contaminante natural, que se ha encontrado en niveles por encima de los indicadores de eutrofización leve en las aguas subterráneas que atraviesan áreas urbanas y rurales de la cuenca del río (Sala, 1981). En la región muestreada, se detectaron niveles de nitratos que no sólo superan los 0,9 mg/l, sino que exceden la concentración máxima establecida para la protección de la vida acuática (10 mg/l), indicando la presencia de efluentes contaminados. Esta situación es

coincidente con el aumento de nitratos aguas abajo sobre el cauce principal en donde se asienta un barrio privado (CP2) fuente de desechos cloacales, y una industria alimenticia (CP3) procesadora de carnes, en cuya actividad se emplean conservantes nitrogenados (Antón y Lisazo, 2001).

Los valores determinados de nitrógeno total, en todos los sitios, en ambos muestreos de otoño y primavera, resultaron muy superiores a los de nitrógeno amoniacal. Esto deja entrever que gran parte de este elemento estaría conformado por nitrógeno orgánico, proveniente principalmente de la contaminación antrópica. Debido a la falta de bosques y a la escasa vegetación herbácea en las inmediaciones del arroyo (Feijoó, 1999), la contribución de materia orgánica autóctona no sería comparable a los niveles aportados por contaminación exógena.

Las concentraciones de fósforo en todos los sitios muestreados resultaron superiores a la establecida como nivel guía para la protección de la vida acuática.

Las concentraciones de cloro y arsénico en todos los sitios muestreados resultaron inferiores a las establecidas como niveles guía para la protección de la cida acuática.

En un estudio realizado por Plataroti (2010) en la cuenca del Río Luján, en donde se emplea también el ICA (Berón 1984), se concluye que el cuerpo de agua que presentaba el mayor deterioro era el arroyo Carabassa, con un valor de ICA promedio de 1,5. Sobre la base de nuestros resultados, podemos decir que las aguas de este cuerpo continúan afectadas por la contaminación orgánica, aunque los valores de ICA obtenidos resultaron más elevados (3,20-3,94) que los del 2010. Comparando nuestros datos de las variables fisicoquímicas empleadas en el cálculo del índice, con los del trabajo de Plataroti (2010), observamos que el valor promedio de DBO de ese año resultó mucho más bajo (33 mg/l) que los determinados en este trabajo (87 mg/l). Esto indica que en el transcurso de dos años se produjo un aumento de la carga orgánica del arroyo. Los menores valores del ICA en 2010 se debieron a los registros más elevados de temperatura promedio y concentración de cloruro, que los determinados en el presente trabajo.

Algunas actividades productivas desarrolladas a lo largo del arroyo Carabassa en los sitios estudiados, corresponden a industrias manufactureras de alimentos (A1: lácteos, A2: carnes, CP3: procesados de pollo y otros). Entre las diferentes causas del impacto ambiental generado por estas industrias, se encuentran los efluentes líquidos conformados

por aguas con desechos propios del proceso productivo y con los tensioactivos (detergentes) empleados en el lavado de las instalaciones como parte del protocolo de control de higiene y seguridad alimentaria (Codex Alimentarius, 2004). En el sitio A1 en ambos muestreos, se detectaron los más altos niveles de SAAM, cuya procedencia podría atribuirse a líquidos residuales volcados al afluente, provenientes de la industria láctea ubicada aguas arriba de este punto de muestreo. Estos contribuyen aumentando en un 60 % el caudal del arroyo (ABIA, com. pers.)

A través de los resultados del análisis de componentes principales, queda demostrado el deterioro de la calidad del arroyo Carabassa, los cuales muestran un ordenamiento de los sitios en función de la calidad físico-química del agua.

El primer componente principal ordenó a los sitios siguiendo un gradiente de variación espacial, asociado a un aumento de la contaminación orgánica y estado trófico de las aguas. Estas condiciones estarían dadas por un incremento de las variables DQO, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total y SAAM en A1 y CP1; y de nitritos y nitratos en A2, A3 y CP3. Como se mencionó anteriormente, el afluente A1 recibe efluentes de la industria láctea conteniendo materia orgánica y detergentes, los cuales llegan arrastrados por la corriente a CP1. Por otro lado, A2 recibe efluentes del frigorífico y al sitio A3 llegan los fertilizantes empleados en el campo de golf, los cuales posiblemente incrementaron los niveles de nitratos y nitritos en sus aguas.

El segundo componente principal, al igual que el primero, agrupó a A2 y CP2, y a los sitios A3 y CP3 según un patrón de variación espacial, donde la calidad del agua está más deteriorada en A3 y CP3 al asociarse estos con las menores concentraciones de oxígeno disuelto. Por otro lado, este componente distingue un segundo ordenamiento según un patrón de variación estacional para A1 y CP1, en donde la calidad del agua disminuye en primavera al asociarse con los menores niveles de oxígeno disuelto.

I.4.2. Parámetros Biológicos

I.4.2.1. Análisis del fitoplancton

La abundancia del fitoplancton en el arroyo Carabassa mostró un patrón de variabilidad estacional, presentando las mayores densidades durante el muestreo de otoño.

En ambas estaciones de muestreo, Chlorophyceae fue el grupo con mayor representatividad en el fitoplancton total, siguiendo en orden descendente las Cyanophyceae, Euglenophyceae y Bacillariophyceae. Este resultado concuerda con la alternancia de grupos registrada a largo de la cuenca del río Luján por Gómez y O´Farrell (2014). Con excepción de las Chlorophyceae, que contribuyeron con más del 80 % de la biomasa en ambas estaciones de muestreo, el resto de los grupos exhibieron diferencias estacionales. Las mayores densidades de Cyanophyceae se detectaron en otoño, no superando el 20 % de la abundancia total del fitoplancton, en tanto que las de Euglenophyceae y Bacillariophyceae se observaron en primavera (26 y 25 % respectivamente).

En el dendograma obtenido a partir del análisis de conglomerados basado en la abundancia de los grupos más representativos del fitoplancton, se establecen tres grupos de clasificación. En el primer grupo, conformado por los sitios A2 y A3 del muestreo de primavera, se observa una dominancia de Chlorophyceae, incluyendo también las mayores abundancias de Bacillariophyceae obtenidas en todos los sitios. Este primer grupo coincide además, con las mayores concentraciones de nitratos, y menores valores de conductividad y DQO. Los mayores valores de abundancias de las Bacillariophyceae, especialmente en A2 y A3 en primavera, podrían estar determinados por el factor nutricional (altos niveles de nitratos detectados). Prieto *et al*. (2005) informaron un aumento de la tasa de crecimiento de distintas especies de este grupo al ser cultivadas en medios enriquecidos con nitrógeno, lo cual podría explicar las mayores densidades encontradas en el arroyo en primavera. El segundo grupo, dividido en dos subgrupos, también presentó dominancia de Chlorophyceae y se diferenciaron en cuanto a su abundancia. El subgrupo “a” presentó abundancias intermedias de esta fracción del fitoplancton (A3, CP2 y CP3 del muestro de otoño), mientras que el subgrupo “b” bajas (A1, CP2 y CP3 de primavera, y A2 y CP1 de otoño).

El subgrupo “a” se relacionó con condiciones de eutrofización de las aguas, presentó elevados niveles de nutrientes y altas densidades de Cyanophyceae, y con los menores niveles de variables indicadoras de la calidad del agua, tales como DQO, SAAM y nitrógeno total. Este grupo contiene a los sitios altamente impactados por contaminantes tales como fertilizantes empleados en el mantenimiento de campos con césped (A3: campos de golf, CP2: estancias parquizadas) y por efluentes de empresas procesadoras de alimentos (CP3). A su vez, el subgrupo “b” se asoció principalmente con condiciones de calidad del agua más deplorables. Éste se relaciona positivamente con los niveles más elevados de DQO, SAAM, nitrógeno total y nitrógeno amoniacal, además de los menores valores de nitratos, indicativos de condiciones de anoxia. Quizás esté influyendo algún factor, que escapa a los determinados en este trabajo, que afecte el desarrollo de este grupo. Seguramente, en un ambiente tan alterado existan otros contaminantes no detectados en nuestros análisis que pueden interferir con el desarrollo de estas algas. Es probable que, dada la cercanía a la planta frigorífica, el arroyo reciba sustancias de uso común en el tratamiento de sus aguas residuales, entre las que puede haber, por ejemplo, sales de aluminio (Rusten, *et al*., 1990; Al-Mutairi, *et al*., 2004), metal con efecto tóxico sobre la comunidad fitoplanctónica, (Lindeman, *et al*., 1990; Upreti, *et al*., 2013).

El grupo 3 (CP1 de primavera y A1 de otoño) se caracterizó por presentar las más elevadas densidades de Chlorophyceae, Cyanophyceae y Euglenophyceae, mostrando una mayor influencia del factor estacional. Respecto a esto, no se ha podido establecer una relación clara en base a los resultados de las variables fisicoquímicas e hidrometeorológicas determinadas en las diferentes estaciones de muestreo, ya que las aguas de CP1 están muy afectadas por el afluente A1. Éste contribuye con sus descargas al cauce principal, por lo que era esperable en ambos una distribución cualitativa y cuantitativa del fitoplancton similar en idéntica estación de muestreo. Para comprender la agrupación 3, sería necesario extender el período de observaciones a más de dos estaciones anuales de muestreo. Respecto a este tercer agrupamiento, puede decirse que las mayores abundancias de Chlorophyceae, Cyanophyceae y Euglenophyceae, están claramente relacionadas con altos niveles de DQO, SAAM, nitrógeno total, amoniacal, nitritos y nitratos.

Por último, era esperable una relación positiva entre la abundancia de Euglenophyceae y los valores de cloro, ya que se encontró que medios que contienen este

elemento permitieron un crecimiento exuberante de éste grupo (Munawar, 1972). Sin embargo esta relación no fue detectada, probablemente por hallarse enmascarada por algún otro parámetro ambiental existente.

I.4.2.2. Análisis bacteriológico

En los muestreos de otoño y primavera la densidad de bacterias coliformes totales y fecales presentaron igual patrón de variabilidad estacional y espacial, registrándose los valores más altos durante el muestreo de otoño en coincidencia con los más bajos niveles de caudales. La presencia de bacterias coliformes en el agua del arroyo es indicativa de la presencia de materia orgánica, y específicamente en el caso de las coliformes fecales de materia orgánica de origen humano o animal. No se pudo determinar específicamente el o los orígenes de su presencia en el agua del arroyo, aunque se estima que podrían ser de origen animal, las cuales serían aportadas por las aguas residuales de establos y corrales destinados a la cría de ganado vacuno, instalados en las cercanías del arroyo y sus afluentes (O´Farrell *et al*., 2002). Cabe destacar, que en el muestreo de otoño, la mayor parte de los sitios excedieron el nivel máximo permitido de bacterias coliformes fecales, excepto A2 en donde se registró un nivel dos órdenes menor, a pesar de recibir efluentes de un frigorífico asentado en sus proximidades. Como indica el programa de aseo y desinfección de estos establecimientos, en ellos se emplean para las distintas tareas de limpieza, detergentes y desinfectantes de amplio espectro (bactericidas, fungicidas, viricidas) (https://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File753-capitulos.pdf), los cuales claramente disminuyen el desarrollo de bacterias coliformes que pudiesen aportar los animales de pastoreo distribuidos a la vera del afluente.

I.4.3. Análisis de los parámetros de estrés oxidativo del fitoplancton

En general, las actividades de la enzima antioxidante CAT y de la enzima detoxificante GST, mostraron un patrón de variación estacional, encontrándose los valores superiores en el muestreo de otoño, estación en donde se registró la mayor abundancia del fitoplancton (excepto la actividad GST en A1 que resultó superior en primavera). El patrón de variación espacial entre los sitios, evidenció claramente cuatro picos de mayor actividad

(A2, A3, CP2, CP3) con el máximo en CP2. En A1 en otoño y CP1 en primavera, se dieron los registros de actividades CAT y GST más bajas. La diferencia de actividad máxima y mínima entre estos sitios, podría deberse a alguna condición específica en el agua de cada lugar, la cual estaría afectando la actividad enzimática CAT y GST. Justamente, el análisis de correlación entre las variables fisicoquímicas, muestra un resultado positivo de la actividad GST con los nitratos. Se ha informado que esta enzima participa en la detoxificación de nitratos orgánicos (ésteres de nitrato) contenidos en aguas residuales (Chronopoulou *et al*., 2011). Esto podría explicar que los sitios en donde se registró la mayor actividad de esta enzima (A2, A3, CP2 y CP3), coinciden con los mayores niveles de nitratos encontrados, tanto en otoño como en primavera. Mientras que en los sitios donde se detectó menor actividad de estas enzimas (A1 de otoño y CP1 de primavera), fueron aquellos en los que los valores de nitratos registrados resultaron ser los mínimos de cada estación. Además, como es sabido, muchos de los fertilizantes, entre ellos los nitrogenados, poseen metales que actúan como nutrientes y micronutrientes, además de metales pesados como plomo y cadmio (Martí *et al*., 2011; Möller y Schultheiß, 2015). Por esta razón, es probable que la variación de la actividad GST observada, se pueda deber también a la presencia de metales asociados a fertilizantes nitrogenados que llegarían a las aguas en los sitios A2, CP2, A3 y CP3.

La actividad de la enzima CAT, no se correlacionó con los parámetros ambientales estudiados, por lo cual la variación de su actividad en los diferentes sitios no podría inferirse a partir de ellas.

Para la actividad de la enzima SOD no se evidenció un patrón de variación estacional, sino que sus diferentes niveles siguieron un patrón espacial, coincidente con el de las enzimas CAT y GST, excepto en CP2 en otoño. Su máxima actividad fue registrada en CP3. Contrariamente a lo esperado, se determinó una correlación negativa entre la actividad SOD y las variables DBO y DQO en A1 y CP1. Estos sitios fueron los que presentaron los mayores niveles de los parámetros indicadores de contaminación (turbiedad, conductividad, sólidos totales, DQO, DBO, SAAM) por lo cual era esperable encontrar una alta actividad SOD. Sin embargo, esto no ocurrió, lo cual podría deberse a dos posibles causas. Una de ellas, sería la presencia de elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno en el medio, debida a su fotoproducción a partir de materia orgánica

(Zhang *et al*., 2012), el cual puede inhibir a la enzima por retroalimentación negativa (Carmeli *et al*., 2004). La otra, podría ser una deficiencia de cobre y/ o de zinc en el ambiente, los cuales son cofactores de esta enzima (Podracka *et al*., 1999, Cakmak, 2000). El daño a lípidos medido como TBARS (expresado como pmoles de MDA/mg de proteínas) presentó un patrón de variación estacional, registrándose en otoño los mayores valores, excepto en los sitios A1 y CP1 en los que resultaron levemente superiores en primavera. Además, se observó un patrón de variación espacial que coincidió con el patrón de variación de las enzimas CAT, GST y SOD en el muestreo de otoño. La correlación positiva entre los niveles de TBARS y la actividad enzimática de CAT y GST indicarían que a pesar de las mayores actividades de estas últimas, la respuesta no fue suficiente para impedir el daño oxidativo a los lípidos. Por lo visto, la actividad enzimática registrada no logró revertir el nivel de EROs generado, lo cual sería la causa de los niveles de daño detectados. Por último, también se detectó una correlación positiva entre contenido de TBARS y los nitratos, lo cual evidenciaría que las elevadas concentraciones de estos compuestos crearían condiciones favorables para la producción de altas concentraciones de EROs en el fitoplancton. Se ha establecido que la fotólisis de nitratos origina radical hidroxilo en aguas naturales (Brezonik *et al*., 1998). Una alta producción de esta especie reactiva, capaz de desencadenar peroxidación de lípidos de membrana, podría explicar los mayores niveles de TBARS detectados.

En base a lo analizado, podemos decir que en líneas generales todos los parámetros relacionados a estrés oxidativo mostraron valores más bajos en primavera que en otoño. Si bien es difícil evaluar las respuestas bioquímicas de comunidades en ambientes naturales donde operan múltiples factores, los niveles más bajos detectado en primavera, podrían estar relacionados con los menores valores de oxígeno disuelto que presentaban la mayoría de los sitios en esa estación. Esta condición podría determinar la menor disponibilidad de este elemento para procesos oxidativos. Además, el mayor nivel de precipitaciones ocurrido en los días previos al muestreo de primavera, podría haber diluido la carga contaminante presente en los afluentes y cauce principal.

Por otro lado, el perfil de actividades enzimáticas y de niveles de TBARS puede reflejar la respuesta a los contaminantes presentes en los arroyos. Si analizamos los parámetros de estrés oxidativo del fitoplancton en los sitios del cauce principal, se ve que

en CP1 se presentan valores menores que en CP2 y CP3 en todos los parámetros. Nuevamente, la evaluación es compleja, pero podría decirse que dado que CP2 y CP3 se encuentran aguas abajo, reciben aportes provenientes de CP1 que a su vez los recibe de A1. Ello puede significar el ingreso de los contaminantes descargados por las distintas industrias en cada uno de los arroyos.

Además, los altos valores de los parámetros de estrés oxidativo detectados en algunos de los sitios, podrían relacionarse con la naturaleza de las descargas de las industrias asociadas. Se ha demostrado que distintos contaminantes pueden generar daño oxidativo e inducir respuestas antioxidantes en microalgas (Pinto *et al*., 2003; Romero *et al*., 2011). Por lo que los valores altos de estos parámetros, detectados en el fitoplanton, podrían explicarse por la compleja mezcla de compuestos potencialmente contaminantes provenientes de las industrias lindantes. Los altos niveles de CAT, GST y TBARS del fitoplancton del sitio A2 se deberían a la liberación de desinfectantes y detergentes por parte de la actividad del frigorífico. Los mayores valores de CAT, GST, SOD y TBARS en el fitoplancton del sitio A3 se relacionarían al uso de fertilizantes (que generalmente contienen metales) en el mantenimiento del césped del campo de golf. El fitoplancton de CP2 y CP3 es el que presentó los valores más altos de los parámetros de estrés oxidativo: CAT y GST en ambos sitios, SOD en CP3 y TBARS en CP2. A estos sitios, por estar ubicados aguas abajo, le llegan aportes de la empresa láctea, y aguas con desechos provenientes del barrio privado "Estancias" y de la empresa procesadora de alimentos "Molinos", por lo que la compleja carga contaminante podría explicar los altos niveles de estos parámetros.

Los resultados obtenidos muestran que el fitoplancton de estos arroyos presenta una respuesta antioxidante y detoxificante que podría estar inducida por los contaminantes presentes en los cursos de agua. Sin embargo, dado los altos niveles de TBARS detectados en casi todos los sitios, estas respuestas parecerían no ser suficientes para contrarrestar el daño oxidativo a lípidos.

Como hemos dicho anteriormente, los parámetros de estrés oxidativo han sido utilizados para evaluar el estrés provocado por distintos contaminantes en algas (Pinto *et al*., 2003, Qian *et al.,* 2009; Romero *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta el momento existen pocos trabajos en que se los empleen en comunidades complejas, así como también son

muy escasos los estudios en los que fueron evaluados para la comunidad fitoplanctónica (Vega-López *et al*., 2013). En esta tesis, hemos podido aplicar las técnicas de determinación de estos parámetros con buenos resultados, mediante la modificación de las técnicas inicialmente puestas a punto para cultivos unialgales. Evidentemente, el uso de estos indicadores, constituye una herramienta útil para poder complementar la información obtenida por los criterios de evaluación clásicos, tales como el análisis de la biomasa, de la composición de especies, etc. (Bonnineau *et al.,* 2014).

I.5. Conclusiones

De nuestros resultados se desprende que el deterioro de la calidad del agua del arroyo Carabassa fue causada por diversos factores antrópicos que determinaron fuertes variaciones espaciales, fundamentalmente debidas al ingreso de materia orgánica y nitrógeno orgánico. Esta alteración, queda claramente evidenciada a través del registro de los bajos valores de OD, así como también por los altos niveles de nitrógeno total, de DBO y de la relación DBO/DQO, detectados en las aguas de todos los sitios muestreados.

Las altas densidades del fitoplancton encontradas a lo largo del arroyo y sus afluentes revelaron condiciones de eutrofización de las aguas.

Respecto a la composición fitoplanctónica, ésta estuvo representada principalmente por la clase Chlorophyceae que predominó en todos los sitios muestreados. La mayor abundancia de esta clase la hemos encontrado en los sitios más contaminados por exceso de materia orgánica y nitrógeno orgánico, a saber A1 en otoño y CP1 en primavera. En ambos sitios, se pudo observar que este grupo codominaba junto a las clases Euglenophyceae y Cyanophyceae, muchas de cuyas especies son indicadoras de alta carga orgánica y condiciones de eutrofización respectivamente.

El fitoplancton del arroyo mostró signos indicativos de daño oxidativo y activación de defensas antioxidantes, lo que sugiere que esta comunidad estaría sufriendo una situación de estrés oxidativo, el cual podría relacionarse con la calidad de las aguas.

Los valores obtenidos del índice de calidad de aguas aplicado en este estudio, alertan sobre la inminente necesidad de implementar planes de gestión y de monitoreo ambiental en el arroyo Carabassa, antes de que sus condiciones alcancen un deterioro irreversible.

Finalmente, en base a todo lo analizado consideramos que hemos obtenido importante información respecto del estado actual del cuerpo de agua. Sin embargo, consideramos que sería conveniente en futuros estudios, ampliar el período de muestreo con la finalidad de lograr una mejor comprensión de las variaciones temporales, incluyendo de este modo un mayor número de registros climatológicos e hidrológicos. Además, esto también permitiría, tener una mejor comprensión de las variaciones espaciales observadas en los factores fisicoquímicos, y en la abundancia y distribución del fitoplancton.

CAPÍTULO II

Estudio de la toxicidad del arsénico sobre *Euglena gracilis*

II. 1. Introducción

Con el transcurso de los años, el desarrollo de las actividades antrópicas ha contribuido notablemente a la acumulación de contaminantes tóxicos en casi todos los ambientes naturales del planeta. La incorporación de pesticidas, de descargas de desechos provenientes de la actividad industrial, de la combustión de carbono, y sobre todo de las aguas residuales producto de la actividad minera, son responsables del incremento de los niveles de metales y metaloides (incluyendo el arsénico) en muchos ecosistemas acuáticos, lo cual ha conducido al deterioro de la calidad de sus aguas y de su biodiversidad.

Como toda actividad productiva, la minería genera residuos propios del procedimiento de extracción (materiales inertes y minerales), otros derivados de reactivos que se usan en el tratamiento de los minerales que se extraen (xantatos, ditiofosfato, etc.), además de aquellos asociados a la maquinaria utilizada en esas operaciones (aceites y grasas, ácido y plomo provenientes de baterías, líquidos hidráulicos, etc.). Si bien existen normativas que controlan y previenen la contaminación de las aguas respecto a esta actividad, existe un pasivo medioambiental derivado de las explotaciones abandonadas que constituye un riesgo para la salud de los ecosistemas. Entre los contaminantes tóxicos que se generan en la explotación minera se encuentra el arsénico, que se origina de la erosión de la pirita arsenical y se acumula junto a otros residuos en presas o depósitos denominados "diques de cola", en concentraciones de hasta 350 ppm (Casiot *et al*., 2004; Morin y Calas, 2006). La típica concentración de arsénico natural en agua dulce es menor a 0,01 ppm y frecuentemente menor a 0,001 ppm (Smedley y Kinniburgh, 2002).

La elevada concentración de arsénico y el pH ácido de los depósitos mineros, constituyen condiciones que son tóxicas para la biota (Casiot *et al*., 2004; Das *et al*., 2009). Sin embargo, algunos microorganismos tales como las eubacterias, arqueobacterias, hongos y algas unicelulares son capaces de vivir en las condiciones extremas de los relaves mineros (Zettler *et al*., 2002; Yang y Zhu, 2009). En particular, algunas especies de microalgas del género *Euglena* se encuentran entre los pocos eucariotas que habitan estos sitios (Das *et al*., 2009; Miot *et al*., 2009; Pires-Freitas *et al*., 2011). Respecto a la presencia de estas microalgas en las condiciones extremas de los drenajes ácidos de las minas, se llevaron a cabo investigaciones en las que se analizaron los mecanismos celulares por los cuales los

efectos tóxicos del arsénico podrían ser atenuados. Por ejemplo, en el trabajo de Casiot *et al*. (2004) se expuso a arsénico la especie fotosintética bentónica *Euglena mutabilis*, demostrándose que esos mecanismos involucraban la transformación, adsorción y acumulación del tóxico. Por otro lado, Miot *et al*. (2008, 2009) investigaron la ruta de desintoxicación de arsénico en la especie fitoplanctónica *Euglena gracilis*. En este estudio, se propone que ocurre una activación de los mecanismos de respuesta antioxidante, y sus observaciones indican, además, que el arsénico no se acumula dentro de la célula sino que puede ser exportado fuera de ella.

La biota de los sistemas acuáticos, sometidos a contaminación crónica por metales pesados, se encuentra expuesta a ellos permanentemente. Se ha visto que los efectos de estos tóxicos son menos nocivos en estos organismos expuestos crónicamente que en aquellos, de igual especie, pero que nunca lo han estado. Una explicación posible a esta respuesta diferencial, implicaría que los primeros han sido capaces de aclimatarse a las condiciones de esos sistemas contaminados (Aguilera y Amils, 2005). El mecanismo que determinaría esta "mayor resistencia" podría ser, en parte, debido a las adaptaciones genéticas. Varios estudios realizados en ríos contaminados por desechos industriales, han demostrado que la contaminación por metales puede ejercer una presión de selección que podría modificar la composición de especies de las comunidades microbianas llevándola hacia el enriquecimiento de especies más tolerantes (Gustavson y Wängberg, 1995; Blanck *et al*., 1988, 1998; Rocchetta *et al*., 2003).

En este contexto, se decidió llevar a cabo una investigación con el fin de comparar y analizar los efectos causados por el arsenito de sodio en dos cepas de la microalga de agua dulce *Euglena gracilis* (**fig. 1**). Una cepa proviene del río Matanza-Riachuelo que es un sistema altamente contaminado con materia orgánica y metales como cromo, cobre, plomo, cinc, cadmio, niquel (Magdaleno *et al*., 2001; Rendina y Iorio, 2012) y arsénico (ACUMAR, 2012). La otra adquirida de una colección de cultivos comercial, mantenida bajo condiciones óptimas de cultivo.

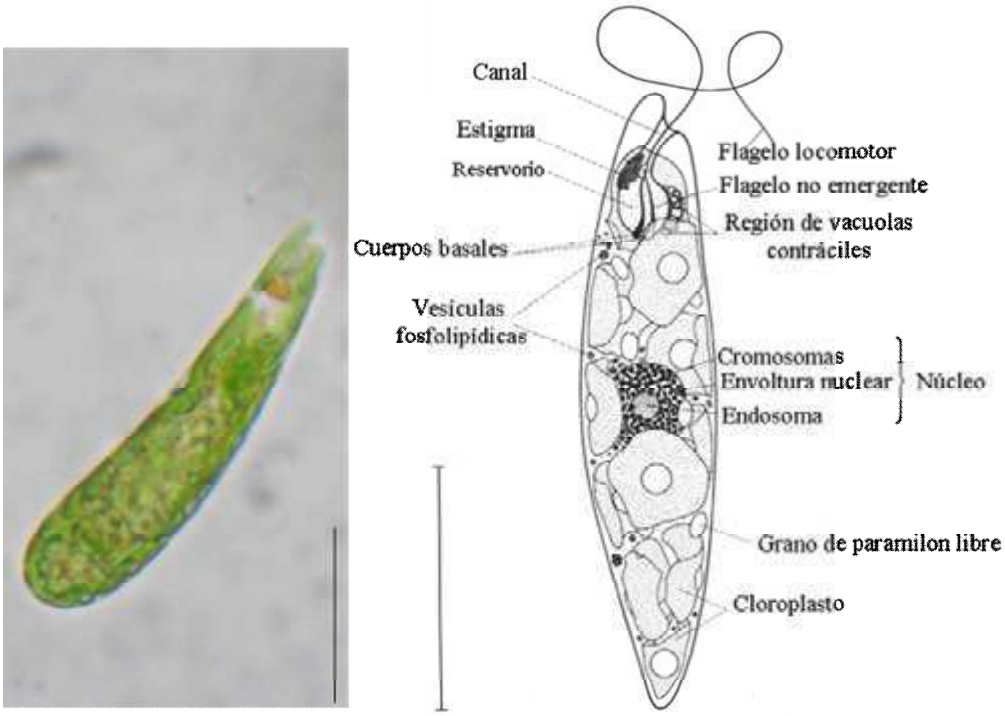


Figura 1. *Euglena gracilis* Klebs, (**A**) imágen de microscopía óptica, (**B**) dibujo adaptado del trabajo de Leedale (1968). Escala 20 μm.

II.1.1. Arsénico

El arsénico (As) es un elemento ubicuo, clasificado en el grupo V de la tabla periódica de los elementos, como un metaloide. En estado oxidado puede encontrarse con valencia +3 (As (III)) y +5 (As (V)), estados denominados arsenito y arsenato respectivamente, con propiedades fisicoquímicas diferentes (Bahar *et al*. 2013a). El As (III) es más reactivo que el As (V) debido a que posee un par de electrones no compartidos, lo que le permite establecer uniones formando complejos; a esta especie se la considera generalmente la forma de As más tóxica (Mudhoo *et al*., 2011). Por consiguiente, el efecto tóxico del As en los organismos acuáticos dependerá, además de su concentración, de su especie química (Whaley-Martin *et al*., 2012). A su vez, la especie química depende del potencial redox (Eh), del pH (**fig. 2**) y de la mineralogía de los sedimentos (La Force *et al*., 2000).

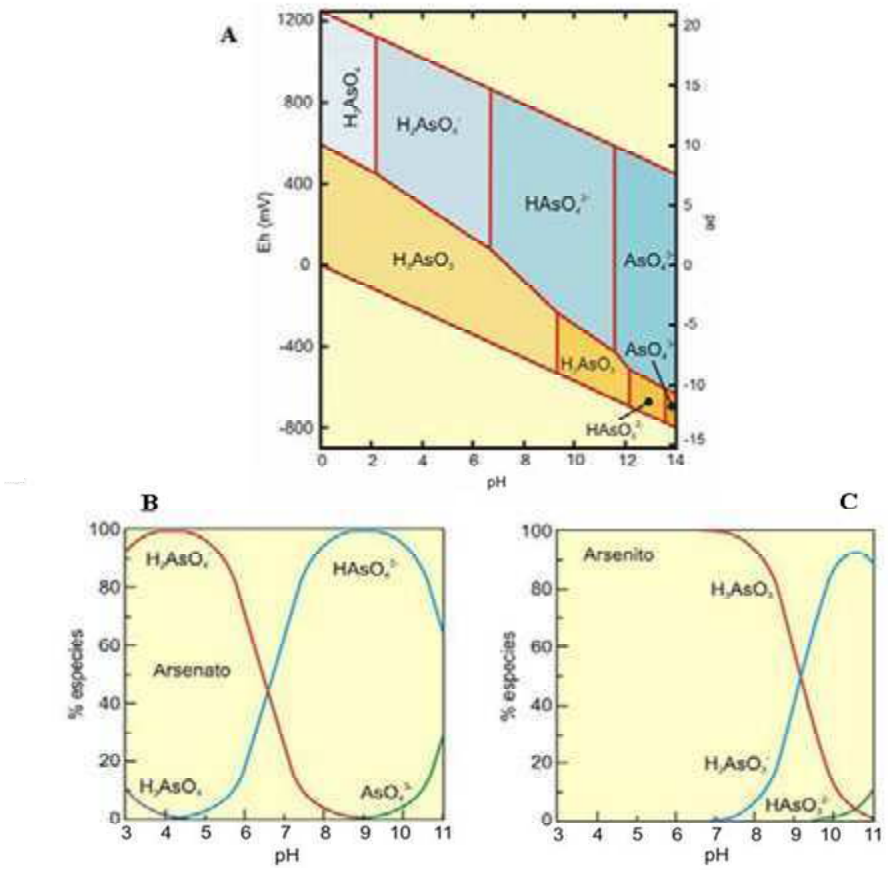


Figura 2. (**A**) Diagrama de Eh en función del pH de especies acuosas de arsénico en el sistema As–O_2–H_2O a 25ºC y 1 bar de presión total. (Eh = 1, 234 – 0,058 pH + 0,0145 log (10) Po, siendo Po la presión parcial de oxígeno expresada en atmósferas). (**B y C**) Especies de As (V) y As (III) en función del pH, respectivamente. Imagen adaptada de Smedley y Kinniburgh (2002).

La presencia de este metaloide en el ambiente se debe a causas naturales, como su liberación por la actividad volcánica y la erosión de depósitos naturales. El As contenido en los minerales de las rocas puede liberarse al medio acuático mediante la acción de factores abióticos, tales como el pH y la presencia de determinadas sustancias con las que co-precipita. Por otro lado, la movilización del As también implica la acción de factores bióticos, como es el caso de los microorganismos que por reducción de sulfatos y óxidos de hierro, por oxidación de minerales sulfurosos, o por reducción de arsenato y oxidación de

arsenito, pueden liberarlo de las rocas que lo contienen (Gihring *et al*., 2001, Stoltz *et al*., 2002, Campos *et al*., 2007).

En Argentina existen principalmente dos regiones (Cuyo y llanura Chaco Pampeana) en donde las aguas subterráneas y superficiales presentan elevados niveles de arsénico natural, cuyo origen se atribuye a la hidrogeología de los arroyos (Farías *et al*., 2003; Bundschuh *et al*., 2004). Por ejemplo, en aguas superficiales de varios arroyos de Buenos Aires, se han detectado valores muy elevados de arsénico (en promedio114 µg/l) (Rosso *et al*., 2011).

Como se mencionó anteriormente, la concentración de arsénico en el ambiente puede incrementarse enormemente debido al aporte proveniente del desarrollo de algunas actividades humanas (García *et al*., 2007) (**fig. 3**).

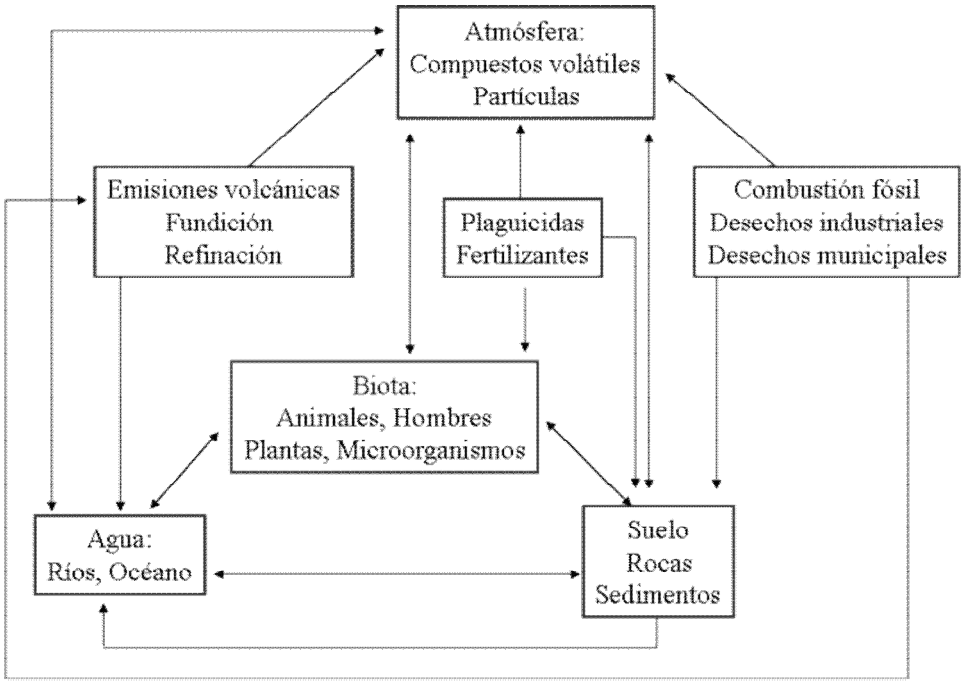


Figura 3. Ciclo del arsénico en el ambiente. Imagen de Albores *et al*. (1997).

II.1.2. Los microorganismos y el arsénico

Los microorganismos autotróficos juegan un rol importante en el ciclo del As (Maeda *et al*. 1990, 1993; Lee, 2008; Duncan *et al*., 2015) transformando formas

inorgánicas a orgánicas de este elemento. En algunas investigaciones con microalgas, se ha encontrado As (III) y As (V) como las principales especies inorgánicas de As presentes en fracciones celulares citosólicas y de membranas (Yamaoka *et al*. 1999; Foster *et al*., 2008; Karadjova *et al*., 2008; Duncan *et al*., 2010, 2013a, b, 2015; Zhang *et al*., 2013b). Por otro lado, las formas orgánicas de As, tales como arsenoazúcares y arsenolípidos constituyen las formas mayoritarias de As en las fracciones citosólicas y lipídicas (Wrench y Addison, 1981; Edmonds, *et al*., 1997; Foster, *et al*., 2008; Duncan, *et al*., 2013a). Mientras que las formas de As metiladas, tales como el ácido monometil-arsónico, ácido dimetil-arsínico y trimetil-arsina son relativamente menores o están por debajo del límite de detección (Lai *et al*., 1997; Levy *et al*., 2005; Karadjova *et al*., 2008; Miyashita *et al*., 2011). Otras formas de As tales como las arsenobetaínas y arsenocolinas, presentes en animales, no han sido detectadas en microalgas (Caumette *et al*., 2012; Duncan *et al*., 2013a, 2015).

La especiación del As en el metabolismo de las microalgas es determinante del mecanismo de desintoxicación que seguirá la célula. En general, éste implica: 1) adsorción en la superficie celular (Wang *et al*., 2013a; Zhang *et al*., 2013b), 2) metabolismo intracelular incluyendo la oxidación del As (III) y la reducción de As (V) a As (III), 3) formación de complejos con grupos tiólicos y su secuestro en vacuolas (Levy *et al*., 2005; Olguín y Sánchez-Galván, 2012), 4) metilación y transformación a formas orgánicas menos tóxicas tales como arsenoazúcares o arsenolípido, y 5) excreción fuera de la célula (Pawlik-Skowronska *et al*., 2004; Levy *et al*., 2005; Morelli *et al*., 2005; Jiang *et al*., 2011).

Cuando en el agua prevalecen las condiciones oxidantes, la especie As (V) es la dominante por ser la más estable termodinámicamente (Smedley y Kinnburgh, 2002). Su importancia toxicológica para las microalgas radica en que la molécula de arsenato es muy similar a la molécula de fosfato, con la que compite y puede sustituirla en reacciones catalizadas por enzimas e inhibir la fotofosforilación y la fosforilación oxidativa (Scott *et al*., 1993; Fujiwara *et al*., 2000; Bhattacharjee *et al*., 2008). De este modo se afecta la síntesis de ATP, sin embargo su contribución tóxica es difícil de evaluar pues, en las células, el As (V) se reduce a As (III) como parte del proceso de desintoxicación de este metal. Por otro lado, la toxicidad del As (III) está dada principalmente por su unión y bloqueo a los grupos sulfhidrilos de proteínas celulares, tales como la piruvato

deshidrogenasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, por lo que se altera el ciclo de Krebs con la consecuente alteración en la síntesis de ATP (Lloyd y Oremland, 2006) (**fig. 4**).

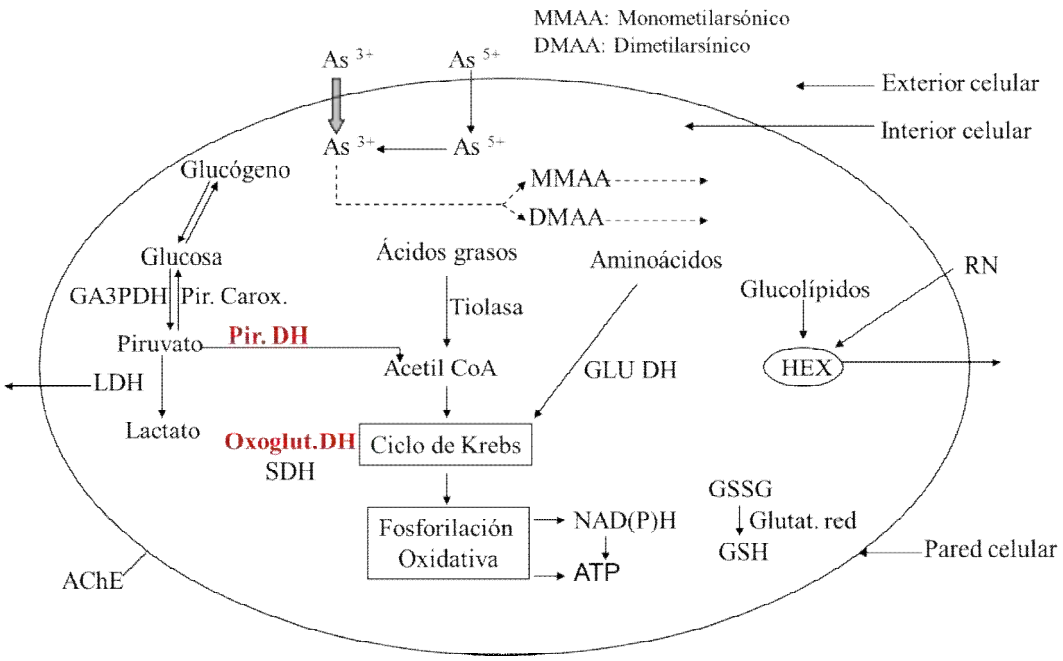


Figura 4. Mecanismos de acción de los iones arsénico. Imágen adaptada del trabajo de Repetto Gimenez y Repetto Kuhn (2009).

Se ha informado que el arsénico puede tener efectos adversos sobre las microalgas pudiendo, por ejemplo, disminuir su tasa de crecimiento (Ferrari *et al*., 2013; Levy *et al*., 2005, Miot *et al*., 2008, 2009) disminuir su eficiencia fotosintética (Rodríguez-Castro *et al*., 2015), y afectar su morfología celular y la movilidad de los flagelos (Bottino *et al*., 1978). Se ha visto que en condiciones de toxicidad crónica por metales pesados y arsénico, las células algales los acumulan (Foster *et al*., 2008; Rahman *et al*., 2012), y de este modo, pueden transferirlos a los organismos de otros niveles tróficos (Okamoto *et al*., 1996, 2001; Pinto *et al*., 2003).

II.1.3. Arsénico y estrés oxidativo

Como se detalló en la introducción general, la presencia de contaminantes en el medio, puede generar en las células una mayor producción de EROs e inducir un aumento de sus defensas antioxidantes. Aunque el arsénico no es un metal redox, existen evidencias de que la exposición a especies inorgánicas de arsénico induce la generación de EROs a través de la conversión del arsenato en arsenito, proceso que ocurre en plantas y algas (Flora, 1999) y además se vio que específicamente el arsenito es capaz de generar peróxido de hidrógeno induciendo la apoptosis celular (Chen *et al*., 1998)

La duración de la exposición, el tipo de contaminante y su concentración determinan el mecanismo de respuesta antioxidante que se activará ante la generación de EROs. Es así que bajo condiciones de estrés agudo generado por altas concentraciones de un metal en tiempos relativamente cortos, se da una alta producción de EROs que podría exceder la capacidad antioxidante. Cuando la respuesta antioxidante es deficiente y no alcanza a revertir los elevados niveles de EROs, el balance entre los antioxidantes y prooxidantes se inclina hacia estos últimos y, como se comentó anteriormente, la célula entra en un estado de estrés oxidativo, que conduce a daño celular. En esta instancia, son afectados los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Por otro lado, en este estado de estrés crónico generado por bajas concentraciones de metales durante un tiempo prolongado, los niveles de EROs generados podrían ser contrarrestados por niveles basales de antioxidantes de modo que las células podrían aclimatarse y vivir bajo estas condiciones.

Si bien se ha informado la participación de estrés oxidativo en el mecanismo de toxicidad del arsénico en líneas celulares humanas (Flora *et al*., 2011), plantas (Hartley-Whitaker *et al*., 2001; Nath *et al*., 2014) y algunas cianobacterias (Ferrari *et al*., 2013), existen muy pocos antecedentes sobre la alteración de parámetros relacionados a estrés oxidativo en microalgas eucariontes. Por ejemplo, un estudio de transcriptómica y metabolómica ha informado una disminución de los niveles de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa) y aumento de glutatión reducido en una cepa de *Coccomyxa* (Chlorophyta) aislada de un relave minero (Koechler *et al*., 2016). Asimismo, Walliwalagedara *et al* (2012) informaron un aumento en la expresión de superóxido dismutasa en *Chlamydomonas reinhardtii* expuesta a arsenato.

II.1.4. Objetivos

II.1.4.1. Objetivo general

- Estudiar la toxicidad del arsenito de sodio sobre el metabolismo, crecimiento y morfología de dos cepas de *Euglena gracilis* provenientes de dos ambientes distintos: una cepa aislada de un río altamente contaminado de la provincia de Buenos Aires (Río Matanza) y otra proveniente de una colección de cultivos internacional (nunca expuesta a ambientes contaminados o a contaminantes).

II.1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de concentraciones crecientes de arsenito de sodio en las dos cepas en estudio, a nivel morfológico, ultraestructural y bioquímico.

- Evaluar la participación del proceso de estrés oxidativo en la toxicidad del arsenito de sodio.

- Analizar y comparar el efecto del tóxico según las condiciones de cultivo, y las cepas expuestas.

II.1.5. Hipótesis

- El arsenito de sodio es tóxico para *Euglena gracilis.*
- La toxicidad del metaloide en las células expuestas depende de las condiciones de cultivo.
- La toxicidad del arsenito involucra la alteración de parámetros indicadores de estrés oxidativo en *E. gracilis.*
- Distintas cepas de *E. gracilis* tienen distinta sensibilidad al arsenito de sodio
- La cepa aislada de un río altamente contaminado posee mayor resistencia que la cepa de colección a los efectos tóxicos del arsénico.

II.2. Materiales y Métodos

II.2.1. Cultivos y crecimiento

En esta investigación se emplearon dos cepas de *Euglena gracilis*, una de ellas fue la cepa UTEX 753 adquirida de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Texas, EEUU, y la otra fue aislada de las aguas del Río Matanza-Riachuelo, ubicado en Buenos Aires, Argentina (35°06'34°38'S y 58°49'-58°21'O) (Ruiz *et al*., 2004). Las dos cepas se mantuvieron en condiciones axénicas en tubos pico de flauta (cultivos *stock*), en medio de cultivo orgánico *Euglena gracilis* (EGM) (CCAP, 2001) (**tabla 1**) agarizado (1,5% p/v), a 24 ± 1 °C y con un fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad (70 µE m^{-2}. s^{-1}). A partir de los cultivos *stock*, se iniciaron cultivos en el medio orgánico EGM a pH 7 y en medio mineral Cramer y Myers (Buetow, 1982) a pH 4,5 (**tabla 1**), los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones antes descriptas y se utilizaron como inóculos para los ensayos de crecimiento y de toxicidad. Periódicamente se realizaron controles de axenicidad, por inoculación en medio Agar Triptosa Soya y se verificó ausencia de crecimiento bacteriano entre las 24 h y los 10 días.

Se caracterizó el crecimiento de ambas cepas en los dos medios para establecer el tiempo en el cual los cultivos alcanzan la fase de crecimiento exponencial. Para ello, a partir de los inóculos, se iniciaron cultivos con una densidad inicial de 5. 10^4 células/ml. Las condiciones de incubación fueron las descriptas con anterioridad, y cada ensayo se realizó por triplicado. Diariamente se realizaron recuentos celulares hasta que estos se mantuvieron constantes en el tiempo.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados.

	Cramer y Myers ($mg\ l^{-1}$)	EGM ($mg\ l^{-1}$)
Na Acetato	-	1000
Na Citrato	800	-
$(NH_4)_2SO_4$	1000	-
KH_2PO_4	-	-
$(NH_4)_2HPO_4$	1000	-
$MgSO_4$	200	-
$CaCl_2$	20	-
$Fe(SO_4)_3$	3	-
$ZnSO_4$	0,4	-
$MnCl_2$	1,8	-
Na_2MoO_4	0,2	-
$CoCl_2$	1,3	-
$CuSO_4$	0,02	-
Tiamina HCl	0,01	-
Vitamina B_{12}	5.10^{-4}	-
Extracto de carne	-	1000
Extracto de levadura	-	2000
Triptona	-	2000
Cl_2Ca ($10 mg\ l^{-1}$)	-	10 ml
pH	4,5	7

II.2.2. Bioensayos

Se realizaron ensayos de toxicidad exponiendo ambas cepas de *E. gracilis* a diferentes concentraciones de arsenito de sodio ($NaAsO_2$) en medio orgánico e inorgánico (**tabla 1**). Para ello, se prepararon erlenmeyers de 500 ml de capacidad, con los medios de cultivos mencionados anteriormente, a los que se les agregaron concentraciones crecientes de $NaAsO_2$, a partir de una solución madre de 13 g/l. Estas variaron para cada cepa según el

medio empleado, con el fin de obtener la concentración que inhibe en un 50% el crecimiento de los cultivos (CI_{50}). En medio Cramer y Myers las concentraciones nominales de $NaAsO_2$ usadas fueron 0, 50, 100, 200 y 300 mg/l, y en medio EGM fueron 0, 25, 50, 100, y 250 mg/l. La concentración efectiva de arsénico en estos medios se determinó por espectrofotometría de emisión atómica, ICP-OES en el Centro de Estudios Transdisciplinario del Agua (CETA) aplicando los métodos normalizados APHA, AWWA, WPCF, 1993. Los valores reales fueron del 98 ± 9,8% de los valores nominales.

Los ensayos de exposición se realizaron en un volumen de 250 ml, con una densidad celular inicial de 5.10^4 células/ml. Los cultivos fueron incubados durante 96 horas a una temperatura de 24 ± 1 °C y luz continua con una irradiación de 70 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, con agitación manual 2 veces por día. Luego de 96 horas, se fraccionaron en distintas alícuotas para realizar la determinación de los distintos parámetros (densidad celular, hidratos de carbono, pigmentos, proteínas, peroxidación lipídica, antioxidante no enzimático y determinaciones enzimáticas). La experiencia se realizó por duplicado con tres réplicas por cada ensayo (US EPA, 1994).

II.2.2.1. Determinación de la densidad celular

La densidad celular (número de células/ml) de los cultivos, se determinó mediante recuentos al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Los recuentos se realizaron con un error estándar inferior al 10 % (Venrick, 1978).

A partir de los recuentos celulares se calculó la densidad celular y se estimó la tasa de crecimiento (r), de a cuerdo con la siguiente fórmula:

$$r = (\ln N - \ln N0) / (\text{días})$$

Donde N es la densidad celular final y N0 es la densidad celular inicial, ambos parámetros expresados en células/ml.

La concentración de arsenito que produce 50% de inhibición del crecimiento (IC_{50}) se estimó por el método de interpolación lineal (US EPA, 2002).

II.2.2.2. Determinación de carbohidratos

Los hidratos de carbono totales se determinaron mediante el procedimiento colorimétrico del fenol-sulfúrico (Dubois *et al*., 1956), realizando una curva de calibración con glucosa. Las células de 5 ml de cultivo se recogieron por centrifugación durante 20 minutos a 3.500 x g, se lavaron tres veces con *buffer* fosfato de potasio 0,154 M, pH 7, y al finalizar se llevaron a un volumen final de 2 ml con agua destilada. Luego se agregaron 50 µl de fenol 80% (p/v) y, posteriormente, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se colocaron en un baño a 28 ºC con agitación durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a 490 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. La cantidad de azúcares totales se obtuvo por extrapolación a partir de la curva estándar. Los resultados se expresaron como miligramos de glucosa en 10^6 células.

II.2.2.3 Determinación de pigmentos

La determinación del contenido de pigmentos se realizó de acuerdo a Lichtenthaler, (1987). Para ello se cosecharon 5 ml de cada cultivo por centrifugación a 3.500 x g durante 20 minutos en tubos de vidrio con tapa de baquelita. A su término, se descartó el sobrenadante y se realizó la extracción de pigmentos con 5 ml de acetona 80 % (v/v), en solución saturada de carbonato de magnesio), lisando las células con varilla de vidrio. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 4-10º C en oscuridad. Los extractos se clarificaron por centrifugación a 3.000 x g durante 10 minutos, y se leyó la absorbancia a 663,2, 646,8 y 470 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. El contenido de clorofila *a* (Clf *a*), clorofila *b* (Clf *b*) y carotenos se calculó usando las siguientes ecuaciones:

Clorofila *a* (µg/ml extracto)= 12,25 . Abs. 663,2 - 2,79 . Abs. 646,8

Clorofila *b* (µg/ml extracto)= 21,5 . Abs. 646,8 – 5,1 . Abs. 663,2

Carotenos totales (µg/ml extracto)= (1000 . Abs. 470 – 1,82 . Clf *a* – 85,02 . Clf *b*) / 198

El contenido de pigmentos se calculó como µg de pigmento por célula y además se calculó la relación clf *a*/clf *b*.

II.2.2.4. Preparación de homogenatos

Para la preparación de los homogenatos celulares, se centrifugaron 145 ml de cada cultivo a 10.000 x g durante 10 minutos. Las células cosechadas se lavaron tres veces con *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7 y se resuspendieron en 800 µl del mismo *buffer* conteniendo los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM y benzamidina 0,2 mM. Posteriormente, se rompieron las células mediante sonicado con un homogeinizador ultrasónico Cole Parmer CP600 4710, aplicando tres pulsos de 15 segundos cada uno y manteniendo las muestras en hielo. Estos homogenatos se centrifugaron a 11.000 x g durante 30 minutos a 4° C. Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados, inmediatamente o luego de almacenamiento a -20°C por 2 semanas como máximo, para las determinaciones de proteínas y actividades enzimáticas.

II.2.2.5. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas solubles se determinó de acuerdo a la técnica de Bradford (1976) especificada en el ítem **I.2.3.1** del **capítulo1** de ésta tesis. Éste se calculó a partir de la correspondiente curva de calibración y los resultados se expresaron como µg de proteínas/10^6 células.

II.2.2.6. Actividad detoxificante: glutatión S-transferasa (GST)

La actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) se determinó de acuerdo con Habig *et al*. (1974). Este método se basa en la detección del producto de la reacción de conjugación del glutatión reducido (GSH) con el reactivo 1-cloro-2, 4-dinitrobenceno (CDNB). Esta conjugación es llevada a cabo por la enzima GST, y el conjugado resultante (GS-DNB) se detecta espectrofotométricamente a 340 nm. La mezcla de reacción contuvo GSH 1 mM, CDNB 1 mM, extracto enzimático y *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 6,5, en un volumen final de 0,8 ml. La cinética de formación del complejo GS-DNB se monitoreó a 340 nm durante tres minutos, en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. En base a las velocidades iniciales de formación del complejo y al coeficiente de absortividad molar del GS-

DNB (9,6mM/cm a 25° C), se calcularon las cantidades de producto formado y las unidades GST presentes en cada muestra. Una unidad GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de GS-DNB por minuto a 25° C. Los resultados se expresaron como unidades GST/mg de proteínas.

II.2.2.7. Actividad antioxidante enzimática: superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima SOD se determinó de acuerdo con el método de Beauchamp y Fridovich (1971), basado en la capacidad de esta enzima para inhibir la reducción del *Nitro blue tetrazolium* (NBT).

El ensayo consiste en la generación del anión superóxido ($^{\cdot}O_2^-$) como resultado de la siguiente reacción fotoquímica:

$$\text{Rivoflavina} + \text{luz} \longrightarrow {}^{\cdot}O_2^-$$

En presencia de $^{\cdot}O_2^-$ el NBT forma un compuesto color azul (azul fromazan) y la SOD, al atrapar $^{\cdot}O_2^-$, inhibe la formación de este compuesto coloreado:

$$^{\cdot}O_2^- + {}^{\cdot}O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

La mezcla de reacción contuvo *buffer* fosfato de potasio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, EDTA 0,1 mM, NBT 75 μM, Riboflavina 2 μM y extracto enzimático (se ensayaron tres alícuotas de volumen creciente por muestra: 5 μl, 10 μl y 15μl). Se realizaron controles sin muestra, que corresponden al 100% de reducción del NBT (control positivo, máxima coloración). Adicionalmente se realizaron controles negativos sin exposición lumínica para descartar posibles interferencias.

Luego de 10 minutos de exposición lumínica a dos tubos fluorescentes de 15W, colocados a una distancia de 30 cm por encima de los tubos de ensayo, se leyó la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. Se graficó el porcentaje de inhibición en función del volumen de extracto enzimático utilizado (**fig. 5**).

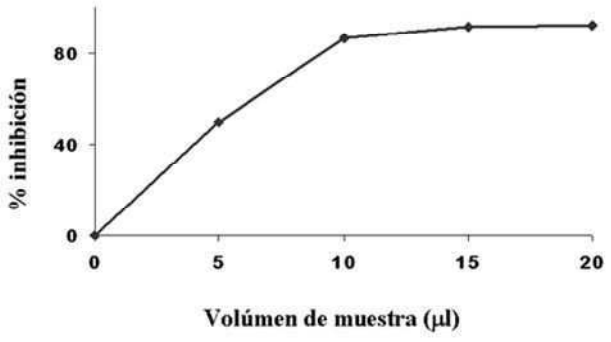


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la formación de azul de formazan en función del volumen de muestra enzimática

A partir de este gráfico se obtuvo la pendiente que relaciona el porcentaje de inhibición con la alícuota utilizada y, a partir de ella, se pudo estimar el volumen de muestra que contiene una unidad SOD. Se definió una unidad de SOD, como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la velocidad de reducción de NBT. El método se controló mediante el uso de un estándar de SOD comercial. Los resultados se expresaron como unidades SOD/mg de proteínas.

II.2.2.8. Antioxidante no enzimático: glutatión reducido (GSH)

Se cosecharon las células provenientes de 50 ml de cada cultivo por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a 4° C. Se lavaron con *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7 y se rompieron por sonicado durante 30 segundos (en baño de hielo), utilizando un homogeinizador ultrasónico Cole Parmer CP600 4710. Los homogenatos obtenidos fueron desproteinizados con ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v). Luego se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 x g y el contenido de GSH se determinó en el sobrenadante según la técnica descripta por Okamoto *et al.* (2001) por reacción con ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB), midiendo la absorbancia a 412 nm. Para ello, se colocaron alícuotas de 60 µl del sobrenadante junto a 335 µl de DTNB 6 mM y se llevó a 1 ml con *buffer* fosfato de sodio 0,143 M, pH 7,5, conteniendo EDTA 6,3 mM. Luego se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro

Shimadzu UV/vis. Para determinar el contenido de GSH se realizó una curva de calibración con 0, 10, 20 30, 40 y 50 nmoles de GSH. Los resultados se expresaron como nmoles de GSH/10^6 células.

II.2.2.6. Daño oxidativo: Peroxidación lipídica

Los niveles de peroxidación lipídica se estimaron mediante la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo a Vavilin *et al.* (1998). Para ello se fraccionaron 100 ml de cada cultivo y se subdividieron en alícuotas de 50 ml cada una. Se cosecharon las células por centrifugación a 3.500 x g durante 20 minutos a 4 °C, y se lavaron tres veces con *buffer* fosfato 100 mM pH 7. De esa manera, se obtuvieron dos fracciones equivalentes de células para cada cultivo. A una de las fracciones se le agregó 1,5 ml de reactivo conteniendo TBA (TBA+) y a la otra fracción el reactivo sin TBA (TBA-):

TBA+: Acido tiobarbitúrico (TBA) 0,3 % (p/v); ácido tricloroacético (TCA) 4 % (p/v); hidroxitolueno butilado (BHT) 0,01 % (p/v).

TBA-: Acido tricloroacético (TCA) 4 % (p/v); hidroxitolueno butilado (BHT) 0,01 % (p/v).

Paralelamente se prepararon blancos de reactivos conteniendo únicamente 1,5 ml de reactivo TBA+/- y se incubaron, junto con las muestras, por 30 minutos a 95º C. Luego de dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 11.000 x g por 15 minutos para clarificar los sobrenadantes. A continuación se midió la absorbancia de cada sobrenadante a 440, 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. La concentración de TBARS se estimó como equivalentes de malondialdehído (MDA), utilizando las ecuaciones de Hodges, *et al.* (1999):

A=((Abs.532 TBA+) – (Abs.600 TBA+)) – ((Abs.532 TBA-) – (Abs.600 TBA-))

B= ((Abs.440 TBA+) – (Abs.600 TBA+)) . 0,0571

(MDA (nmol/ml))= (A – B) / (0,157 . fd)

donde fd es el factor de dilución (volumen final de mezcla de reacción/volumen de cultivo cosechado). Las lecturas a 440 y 600 nm permiten corregir la interferencia debida principalmente a pigmentos fotosintéticos y azúcares (Hodges *et al*., 1997). Los resultados se expresaron como nmoles de MDA/10^6 células.

II.2.3. Análisis estadístico

Los resultados de los distintos parámetros se expresaron como la media ± desvío estándar y se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) de uno y dos factores, a continuación, se utilizaron las pruebas de comparación múltiple de Dunnett´s y de Bonferroni respectivamente. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas se probaron utilizando las pruebas de Shapiro-Wilks y de Levene respectivamente (Sokal y Rohlf, 1999). Los *softwares* utilizados para los análisis estadísticos fueron *Graph Pad Prism 5* e *Infostat*.

II.2.4. Morfología y ultraestructura celular

La morfología y la ultraestructura de las cepas de *E. gracilis* cultivadas en los dos medios de cultivo (controles y tratados con $NaAsO_2$), se analizaron por medio de su observación en microscopio óptico y en microscopio electrónico de transmisión.

II.2.4.1 Microscopía óptica

La observación de la morfología celular se realizó sobre células vivas y fijadas con formol al 4 % con un microscopio óptico Olympus BX 50, equipado con cámara fotográfica.

II.2.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Con el fin de analizar la ultraestructura celular por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se recogieron las células por de centrifugación a 3.500 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se descartó y el *pellet* celular se sometió al siguiente tratamiento:

- Se fijó durante toda una noche en 2,5% de glutaraldehído preparado en *buffer* cacodilato de sodio 0,1 M a pH 7,4 en frío (4° C).
- Ese material se post fijado durante 2 horas en tetróxido de osmio 1% preparado en el mismo *buffer* de fijación, se centrifugó a baja velocidad y se descartó el sobrenadante. El *pellet* celular se lavó durante 10 minutos con el *buffer* cacodilato de sodio, centrifugando 4 minutos a 3.000 x g (este procedimiento se repitió tres veces).
- Luego se deshidrataron las células en una serie de concentraciones crecientes de acetona (30 % 50 %, 70 %, 95 %, 2 x 100%).
- Se realizaron inclusiones planas en portaobjetos y en cápsulas Beem en resina Spurr (Spurr, 1969) por goteo según la técnica descripta por Reymond y Pickett-Heaps (1983). Se comenzó con Spurr 25 %, y luego de una primera inclusión en Spurr 100 %, se dejaron las muestras toda la noche a temperatura ambiente, antes de la polimerización a 60-70º C durante 9-12 horas.
- Los tacos y preparados se cortaron con un ultramicrótomo con cuchilla de vidrio.
- Los cortes se montaron sobre grillas de cobre reticuladas y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% en la fase acuosa durante 45 minutos y citrato de plomo al 5% durante 5 minutos (Reynolds, 1963). El tipo de rejilla utilizado fue de 200 mallas de cobre.
- Luego fueron examinados por observación en un microscopio electrónico de transmisión Opton EM 109, del servicio de microscopía electrónica de la Facultad de Medicina, UBA.

II.3. Resultados

II.3.1. Crecimiento

Las curvas de crecimiento de las cepas UTEX y MAT obtenidas mostraron algunas diferencias dependiendo del medio de cultivo empleado. En el medio EGM ambas cepas tuvieron mayor crecimiento en comparación con el medio mineral (**fig. 6**). Partiendo de cultivos con una densidad celular de 5. 10^4 células/ml, en medio EGM se mantuvo la fase de crecimiento exponencial hasta los 4 y 5 días en los cultivos de las cepas MAT (5,80. 10^5 ± 0,370 células/ml) y UTEX (5,74. 10^5 ± 0,247 células/ml), respectivamente. Mientras que en medio Cramer y Myers esta fase se mantuvo hasta el día 5 tanto para la cepa MAT (2,68. 10^5 ± 0,249 células/ml) como para la cepa UTEX (2,64. 10^5 ± 0,415 células/ml) (**fig. 6).**

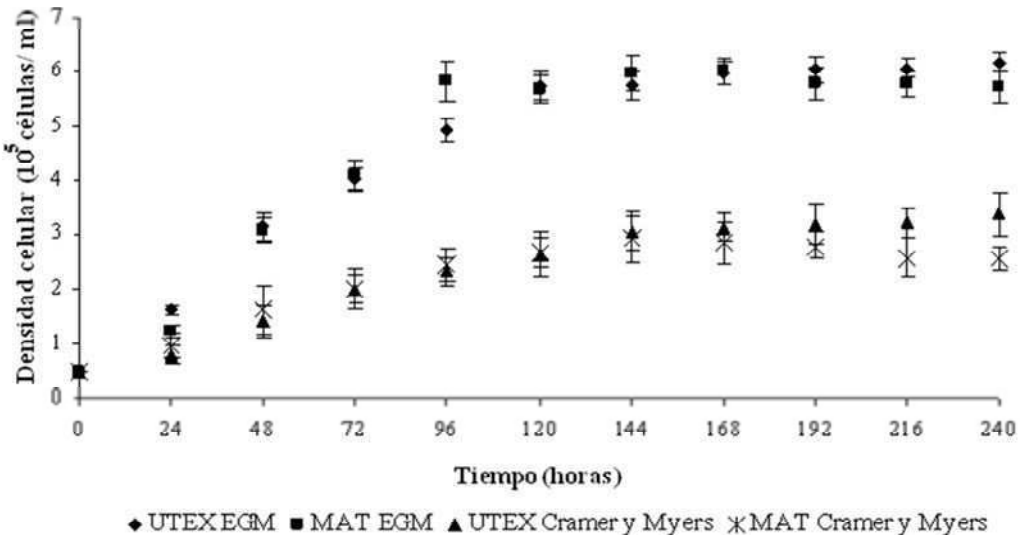


Figura 6. Curvas de crecimiento de las cepas UTEX y MAT de *E. gracilis* en un medio mineral (Cramer y Myers) y en uno orgánico (EGM). Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar.

La tasa de crecimiento (r) en la fase de crecimiento exponencial fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en medio EGM para ambas cepas (**fig. 7 A y B**), excepto en el día 1 para la cepa MAT que no fue significativa la diferencia (**fig. 7 B**).

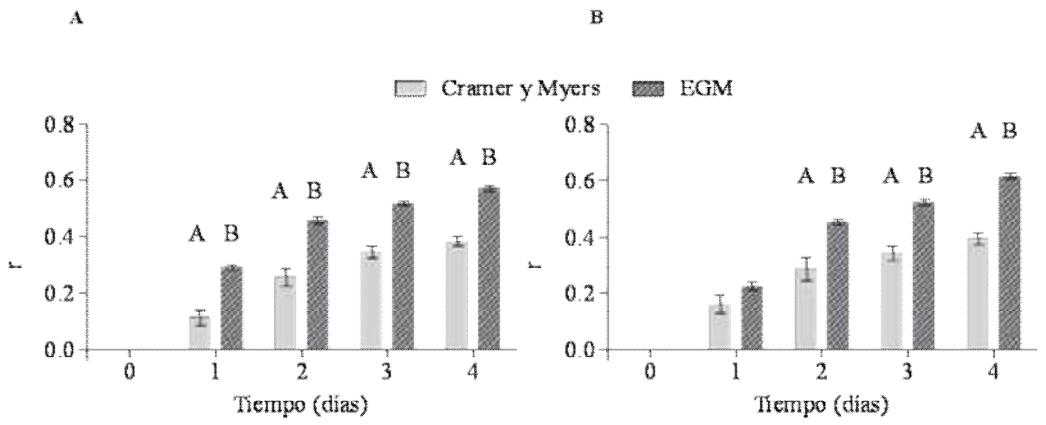


Figura 7. Tasa de crecimiento (r) de la cepa UTEX (**A**) y MAT (**B**) en los medios mineral (Cramer y Myers) y orgánico (EGM), durante la fase de crecimiento exponencial. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los medios.

Durante la fase de crecimiento exponencial, en medio mineral, no se observaron diferencias significativas de r entre las cepas UTEX y MAT (**fig. 8 A**), mientras que en medio orgánico r resultó significativamente mayor ($p < 0,001$) en el día 1 para la cepa UTEX (**fig. 8 B**).

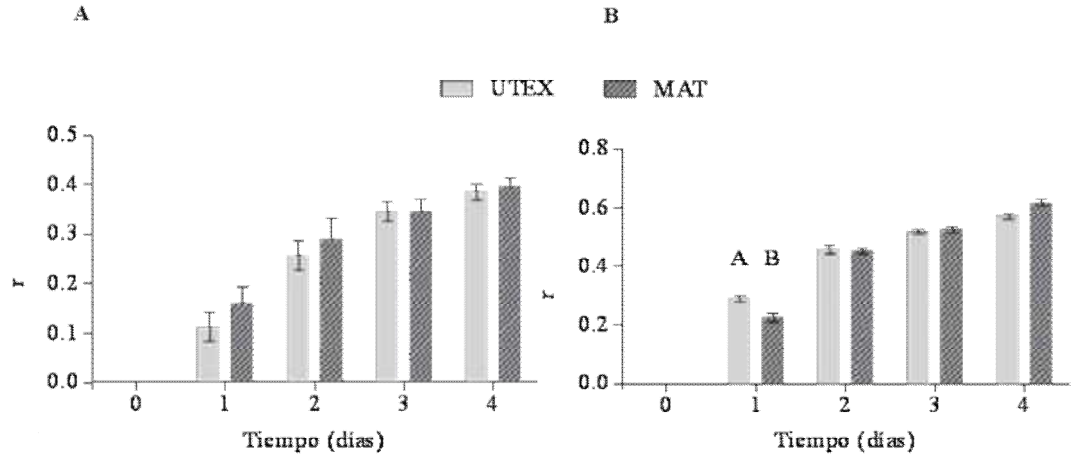


Figura 8. Tasa de crecimiento (r) de las cepas UTEX y MAT en medio mineral (Cramer y Myers) (**A**) y medio orgánico (EGM) (**B**), durante la fase de crecimiento exponencial. Los

resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa entre las cepas.

II.3.2. Crecimiento en medio con arsénico

El arsenito de sodio produjo una inhibición del crecimiento de las cepas UTEX y MAT en los dos medios de cultivo, al observarse una disminución del crecimiento con el aumento de la concentración del tóxico (**figs. 9 y 10**). En medio mineral la densidad celular de la cepa UTEX resultó significativamente superior ($p<0,001$) a la densidad celular de la cepa MAT en 50 y 100 mg/l de $NaAsO_2$, mientras que con 200 y 300 mg/l de $NaAsO_2$ no se observaron diferencias significativas (**fig. 10 A**). En medio orgánico en todas las concentraciones de $NaAsO_2$ ensayadas no se observaron diferencias significativas entre las densidades celulares (**fig. 10 B**). Los cultivos de la cepa UTEX mostraron una disminución de crecimiento estadísticamente significativa ($p< 0,0001$) respecto del control a los 100, 200 y 300 mg/l de arsenito en el medio mineral (**Fig. 10 A**), estimándose una CI_{50} de 127 ± 16 mg/l $NaAsO_2$. La cepa MAT en el mismo medio mostró una disminución significativa del crecimiento ($p< 0,0001$) respecto al control en todas las concentraciones de arsenito de sodio empleadas (**fig. 10 A**), estimándose una CI_{50} de 160 ± 19 mg/l $NaAsO_2$. En medio orgánico la cepa UTEX mostró una disminución significativa del crecimiento ($p< 0,0001$) a los 100 y 250 mg/l de $NaAsO_2$ respecto al control (**fig. 10 B**), estimándose una CI_{50} de 98 ± 9 mg/l $NaAsO_2$, mientras que la cepa MAT presentó una disminución significativa del crecimiento ($p< 0,0001$) en 50, 100 y 250 mg/l de arsenito de sodio respecto al control (**fig. 10 B**) estimándose una CI_{50} de 71 ± 4 mg/l $NaAsO_2$.

Figura 9. Réplica del bioensayo de toxicidad luego de las 96 horas de experimentación. El cambio de coloración hacia la derecha, varía con el incremento de la concentración de $NaAsO_2$. La disminución de la gradación en color hacia las mayores concentraciones de $NaAsO_2$ mostrada en esta figura corresponde tanto para el medio Cramer y Myers como para el medio EGM.

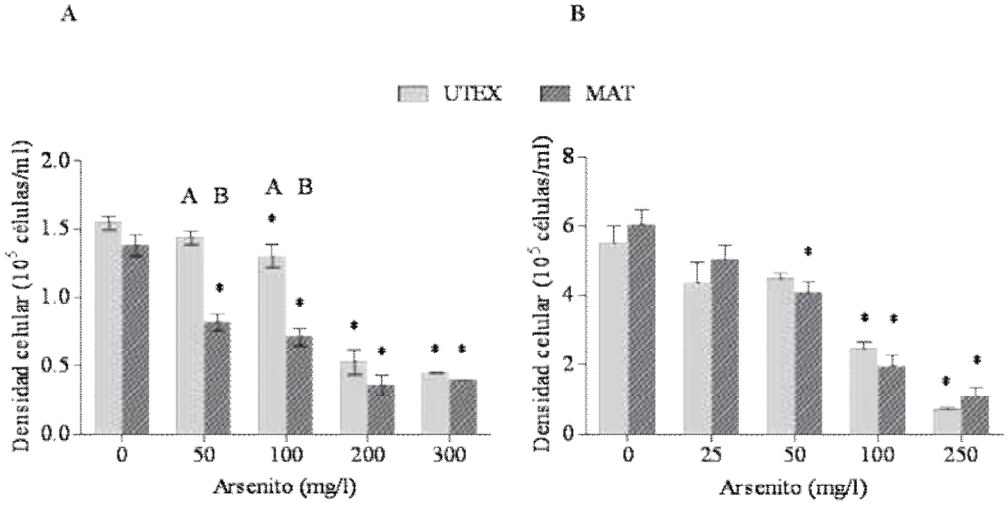


Figura 10. Densidad celular de las cepas UTEX y MAT en medio mineral (Cramer y Myers) (**A**) y orgánico (EGM) (**B**) para concentraciones crecientes de $NaAsO_2$. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. (*) Denota diferencia significativa con los respectivos controles (0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

El tratamiento con arsenito produjo una disminución del parámetro r en ambas cepas en los dos medios de cultivo empleados (**fig. 11 A y B**). En medio mineral, la cepa

UTEX expuesta a 200 y 300 mg/l de $NaAsO_2$ mostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) de la tasa de crecimiento, con respecto al control (**fig. 11 A**). La cepa MAT en el mismo medio, mostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) de este parámetro, con respecto al control a 100, 200 y 300 ppm de $NaAsO_2$ (**fig. 11 A**). También se observaron diferencias significativas entre los valores de r de las cepas UTEX y MAT, en los cultivos control y en todas las concentraciones de arsenito empleadas, (**fig. 11 A**), resultando los valores de la cepa MAT significativamente inferiores (0 mg/l $NaAsO_2$: $p < 0,05$; 200 mg/l $NaAsO_2$: $p < 0,01$; 50, 100 y 300 mg/l $NaAsO_2$: $p < 0,001$) a los de la cepa UTEX.

En medio orgánico la cepa UTEX mostró una disminución estadísticamente significativa de la tasa de crecimiento con 100 y 250 ppm de $NaAsO_2$, mientras que en la cepa MAT ésta disminuyó significativamente con 50, 100 y 250 ppm de $NaAsO_2$ (**fig. 11 B**). También, al igual que para el medio mineral, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de r de las cepas UTEX y MAT con 250 mg/l de arsenito de sodio (**fig. 11 B**).

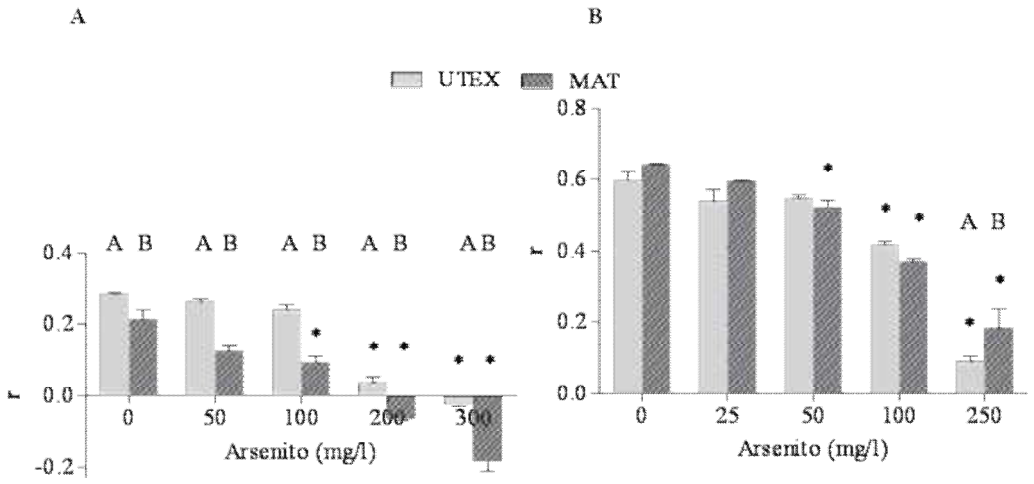


Figura 11. Tasa de crecimiento (r) de los cultivos de las cepas UTEX y MAT en medio Cramer y Myers (**A**) y en medio EGM (**B**) para concentraciones crecientes de $NaAsO_2$. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. (*) Denota diferencias

significativas con los respectivos controles (0). Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.2.2. Proteínas

El contenido proteico de la cepa UTEX en el medio Cramer y Myers, presentó un aumento significativo ($p < 0,05$) con 300 mg/l de $NaAsO_2$ respecto al control, y en la cepa MAT un aumento significativo de dicho parámetro con 100 y 200 mg/l, y una disminución significativa ($p < 0,05$) en 300 mg/l respecto al control (**fig. 12 A**). Además, en el medio Cramer y Myer el contenido de proteínas fue significativamente diferente (50 mg/l $NaAsO_2$: $p < 0,05$; 100, 200 y 300 mg/l $NaAsO_2$: $p < 0,01$) entre ambas cepas resultando superior para la cepa MAT en 50, 100 y 200 mg/l $NaAsO_2$ e inferior en 300 mg/l de $NaAsO_2$ respecto a la cepa UTEX. En el medio EGM, las cepas UTEX y MAT mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) de proteínas totales con 100 y 250 mg/l de $NaAsO_2$ respecto a sus controles (**fig. 12 B**).

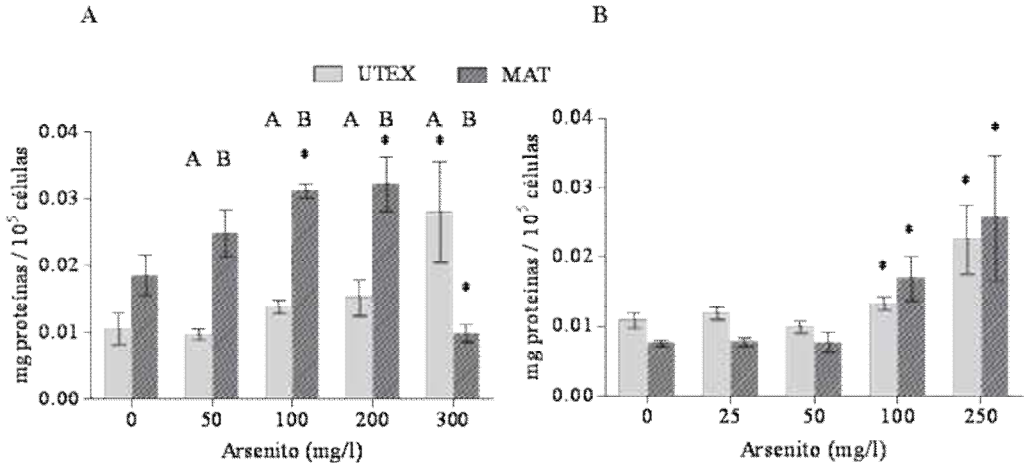


Figura 12: Proteínas totales en los cultivos de las cepas UTEX y MAT en los medios Cramer y Myers (**A**) y EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. (*) Denota diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.2.3. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos en la cepa UTEX, cultivada tanto en el medio mineral como en el orgánico en todas las concentraciones de arsenito ensayadas resultó significativamente más alto ($p< 0,001$ y $p< 0,01$ respectivamente) que el de sus respectivos controles, mientras que en la cepa MAT, esta tendencia se observó a partir de 100 mg/l en medio mineral y de 50 mg/l en medio orgánico (**fig. 13 A y B**). Además, en medio mineral los valores de carbohidratos de la cepa MAT fueron significativamente superiores a los de la cepa UTEX en todas las concentraciones de arsenito empleadas (50 y 200 mg/l $NaAsO_2$: $p< 0,01$; 100 y 300 mg/l $NaAsO_2$: $p< 0,05$) (**fig. 13 A**). Mientras que, en medio orgánico se observó una diferencia significativa del contenido de carbohidratos entre cepas en 250 mg/l de $NaAsO_2$ ($p< 0,05$) (**fig. 13 B**).

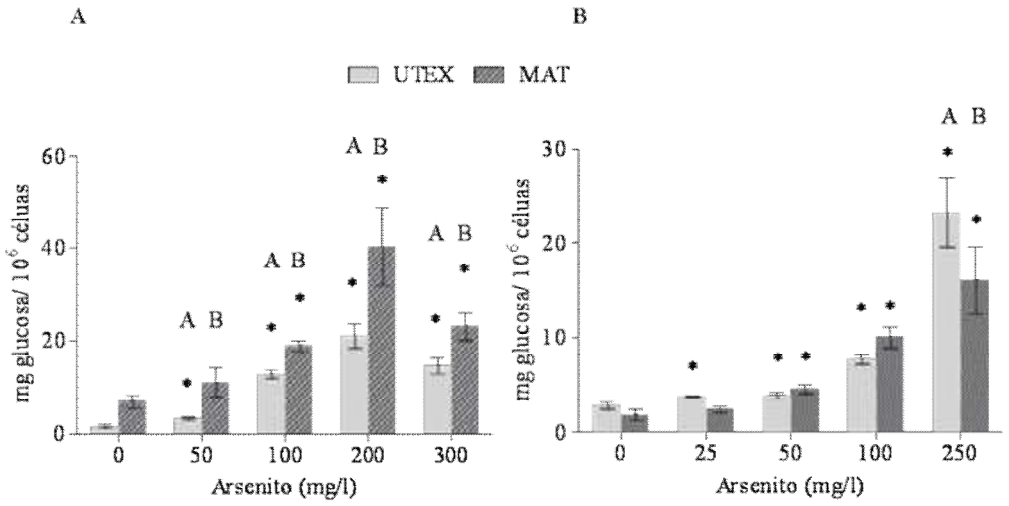


Figura 13. Carbohidratos en los cultivos de las cepas UTEX y MAT en medio Cramer y Myers (**A**) y EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. (*) Denota diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.2.4. Pigmentos

El contenido de clorofila por célula no mostró diferencias entre los cultivos controles y tratados con $NaAsO_2$ para ninguna de las cepas en los dos medios. La relación clf *a*/clf *b* de la cepa UTEX en medio mineral mostró una disminución significativa ($p< 0,05$) respecto al control en 100, 200 y 300 mg/l de $NaAsO_2$ y la cepa MAT en el mismo medio, mostró una disminución significativa en 50, 100, 200 y 300 mg/l $NaAsO_2$ respecto al control. Además, se observaron valores significativamente superiores de esta relación ($p< 0,01$) en la cepa MAT respecto a UTEX, en el control, y con 100 y 300 mg/l de arsenito (**fig. 14 A**). En medio orgánico, tanto la cepa UTEX como la cepa MAT, mostraron una disminución significativa ($p< 0,05$) de la relación clf *a*/clf *b* respecto de sus controles en la máxima concentración de $NaAsO_2$ empleada, 250 mg/l $NaAsO_2$ (**fig. 14 B**), resultando esta relación significativamente mayor para la cepa UTEX ($p< 0,05$). Además se observó un valor significativamente mayor de esta relación ($p< 0,01$) en la cepa MAT con 50 mg/l.

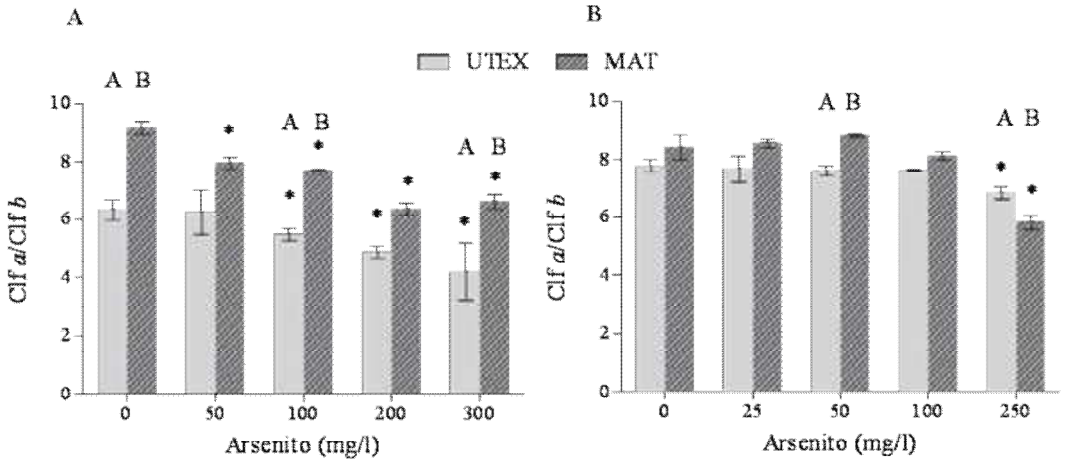


Figura 14. Relación clf *a* / clf *b* en los cultivos de las cepas UTEX y MAT de *E. gracilis* en medio Cramer y Myers (**A**) y en medio EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar. (*) Denota diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

En el medio mineral, el contenido de carotenos/células de la cepa UTEX, se incrementó significativamente ($p< 0,01$) con 50, 100 y 200 mg/l $NaAsO_2$, mientras que con 300 mg/l disminuyó significativamente ($p< 0,01$) respecto al control (**fig. 15 A**). La cepa MAT presentó aumentos significativos de este parámetro en todas las concentraciones empleadas (100 mg/l $NaAsO_2$: p (< 0,01); 100, 200 y 300 mg/l $NaAsO_2$: $p< 0,001$) respecto al control (**fig. 15 A**). En el medio orgánico, el contenido de carotenos/células se incrementó significativamente en la cepa UTEX con 50 y 100 mg/l de $NaAsO_2$, y disminuyó significativamente con 250 mg/l respecto al control (**fig. 15 B**). Mientras que la cepa MAT mostró un aumento significativo de esa relación con 100 y 250 mg/l $NaAsO_2$ respecto al control (**fig. 15 B**). En todos los casos el contenido de carotenos/células de la cepa MAT fue mayor que el de la UTEX mostrando diferencias significativas ($p< 0,001$) en 100 y 250 mg/l de arsenito.

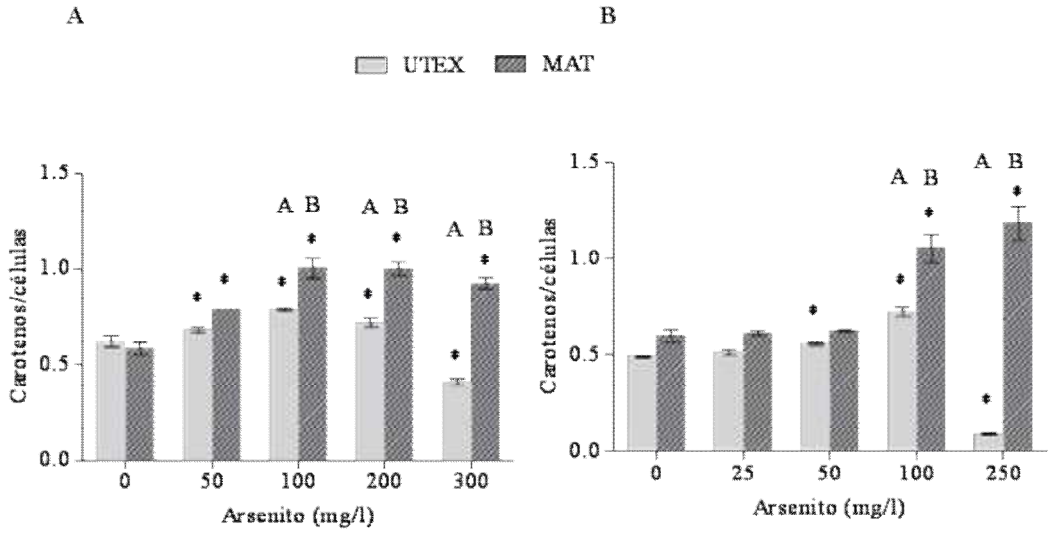


Figura 15. Carotenos/células en los cultivos de las cepas UTEX y MAT en medio Cramer y Myers (**A**) y en medio EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar. (*) Denota diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.2.5. Antioxidante no enzimático GSH

El contenido de GSH en la cepa UTEX en medio mineral aumentó significativamente respecto del control ($p< 0,01$) con 400 mg/l $NaAsO_2$, y en la cepa MAT con 100, 200 ($p< 0,01$ ambos) y 300 mg/l $NaAsO_2$ ($p< 0,05$) (**fig. 16 A**). El contenido de GSH de la cepa MAT en las tres concentraciones anteriores (100, 200 y 300 mg/l $NaAsO_2$) resultaron significativamente superiores a las de la cepa UTEX ($p< 0,05$, $p< 0,01$ y $p< 0,001$, respectivamente) (**fig. 16 A**). En medio orgánico con 100 mg/l $NaAsO_2$ el contenido de GSH en las cepas UTEX y MAT resultó significativamente mayor ($p< 0,05$) que sus respectivos controles (**fig. 16 B**). Además, en todas las concentraciones de arsenito de sodio empleadas el contenido de GSH resultó significativamente mayor en la cepa UTEX ($p< 0,001$) respecto a la cepa MAT.

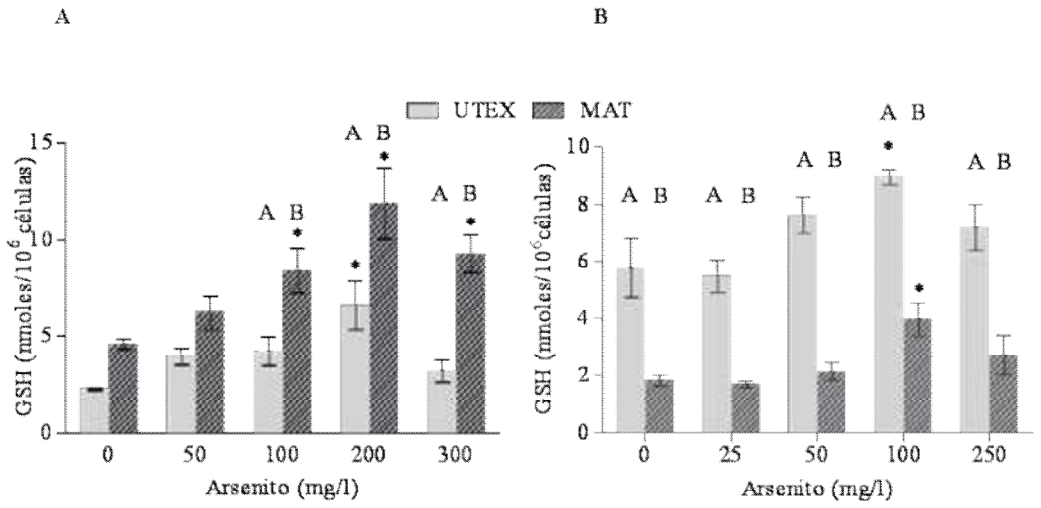


Figura 16. GSH en los cultivos de las cepas UTEX y MAT en medio Cramer y Myers (**A**) y EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar. (*) Denota diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.2.6. Actividad antioxidante enzimática SOD

La actividad SOD en medio mineral presentó un aumento significativo tanto para la cepa UTEX como para la cepa MAT con 200 y 300 mg/l $NaAsO_2$ respecto a sus controles ($p< 0,001$ y $p< 0,01$, respectivamente), siendo este valor significativamente superior ($p< 0,001$) para la cepa UTEX con 300 mg/l $NaAsO_2$ (**fig. 17 A**). En medio orgánico, la actividad SOD para las cepas UTEX y MAT se incrementó significativamente ($p< 0,05$ y $p< 0,01$, respectivamente) con respecto a los controles en 100 y 250 mg/l $NaAsO_2$ (**fig. 17 B**). En medio orgánico la actividad SOD resultó significativamente mayor para la cepa UTEX respecto a la MAT, en todas las concentraciones de $NaAsO_2$ empleadas ($p< 0,05$ para 0,25, 50 y 100 mg/l $NaAsO_2$, y $p< 0,01$ para 250 mg/l $NaAsO_2$)

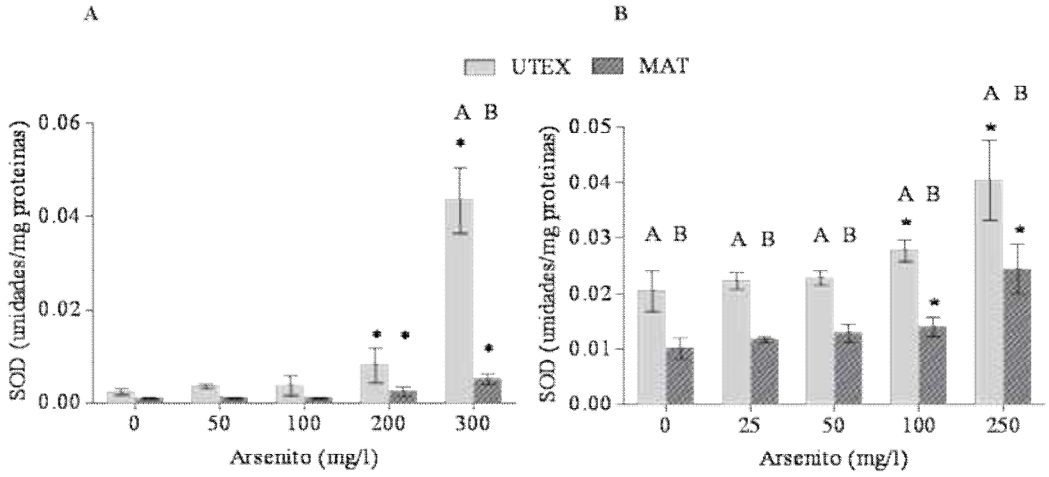


Figura 17. Actividad SOD en los cultivos de las cepas UTEX y MAT en los medios Cramer y Myers (**A**) y EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar. (*) Denota diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.2.7. Actividad detoxificante GST

La actividad GST para las cepas UTEX y MAT en medio mineral con 300 mg/l $NaAsO_2$, presentó un aumento significativo ($p< 0,001$ y $p< 0,01$, respectivamente) con respecto a los respectivos controles (**fig. 18 A**), además, ésta resultó significativamente

mayor (p< 0,01) para la cepa UTEX. En medio orgánico, la actividad GST para la cepa UTEX aumentó significativamente, con respecto al control (p< 0,01) con todas las concentraciones de $NaAsO_2$ ensayadas, mientras que para la cepa MAT se observó un aumento significativo de este parámetro, con respecto al control (p< 0,01) con las concentraciones de 25 y 50 mg/l de arsenito (**fig. 18 B**). Además, en medio orgánico, la actividad GST de la cepa MAT resultó significativamente mayor (p< 0,05) que la de UTEX en el control, y en los cultivos concomo con 25 y 50 mg/l $NaAsO_2$ (**fig. 18 B)**.

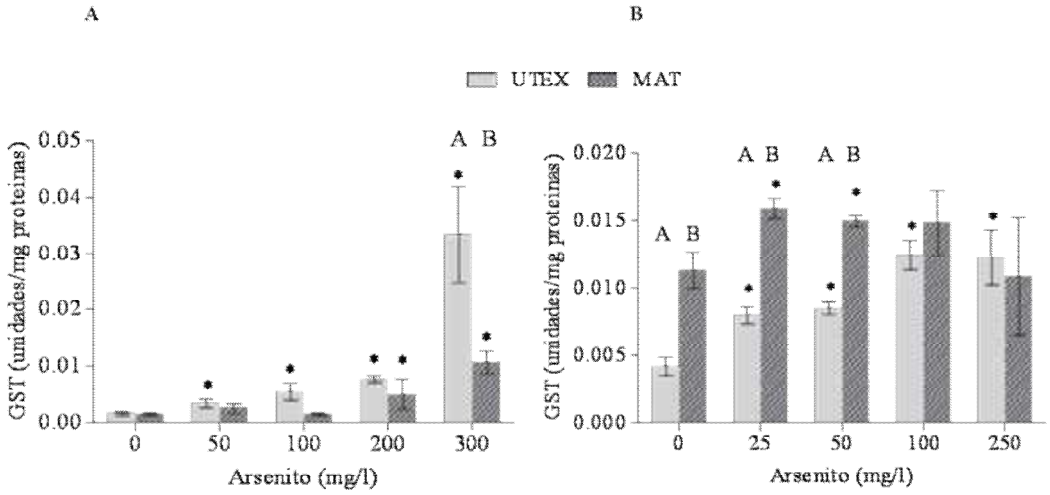


Figura 18. Actividad GST en los cultivos de las cepas UTEX y MAT en los medios Cramer y Myers (**A**) y EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar. (*) Denota diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.2.8. Daño oxidativo: Peroxidación lipídica

Los niveles de TBARS de las dos cepas en medio mineral, presentaron un aumento significativo respecto de sus controles (p< 0,01) en 100, 200 y 300 mg/l $NaAsO_2$. Además, en la cepa UTEX con la máxima concentración de arsenito de sodio, se observó un contenido significativamente superior de TBARS (p< 0,001) respecto a la cepa MAT (**fig. 19 A**). En medio orgánico, los niveles de TBARS se incrementaron significativamente con respecto a los controles (p< 0,001) en ambas cepas con 100 y 250 mg/l $NaAsO_2$ (**fig. 19B**).

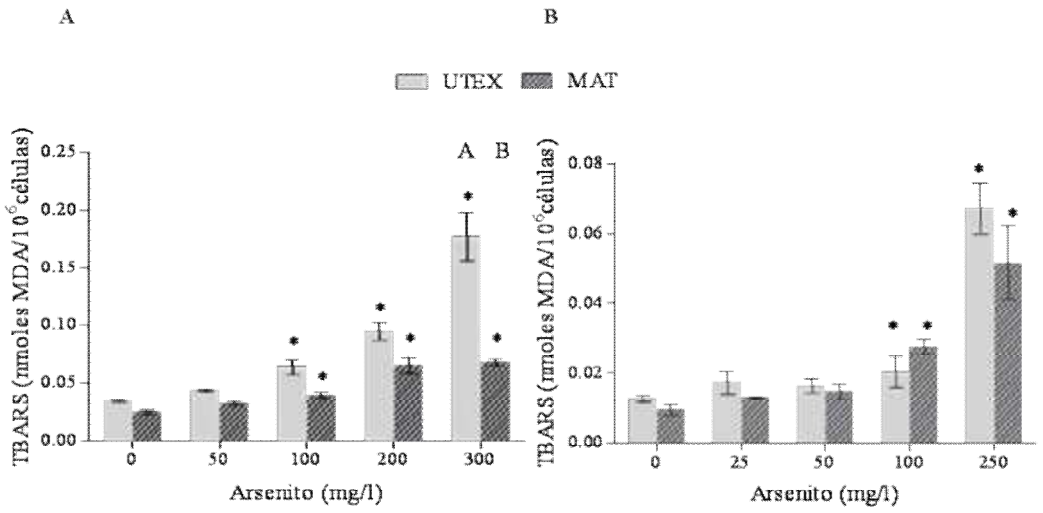


Figura 19. TBARS en los cultivos de las cepas UTEX y MAT en los medios Cramer y Myers (**A**) y EGM (**B**). Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar. (*) Indica diferencia significativa entre el cultivo control (0) y el tratado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas.

II.3.3. Morfología y ultraestructura

II.3.3.1. Microscopía óptica

La observación en microscopio óptico de los cultivos de las cepas UTEX y MAT, permitió distinguir la característica forma de *E. gracilis*, aplanada lateralmente y de contorno aproximadamente ovoide en vista frontal. Además, estructuras subcelulares tales como el flagelo locomotor que emerge del reservorio, el estigma, los cloroplastos con diplopirenoide, los gránulos de paramilon y el núcleo como una estructura circular más clara en el centro de la célula. No se detectaron diferencias entre las características morfológicas de ambas cepas, UTEX y MAT, cultivadas en el medio mineral y el orgánico (**figs. 20 A y C, y 21, A y D**). Además, en los preparados realizados con células vivas se observó el típico movimiento metabólico de esta especie.

Los cultivos de las dos cepas de *E. gracilis* sometidas a la menor concentración de $NaAsO_2$ empleada (25 y 50 ppm en los medios EGM y Cramer y Myers respectivamente), no presentaron cambios en las características morfológicas respecto a sus controles. Con la

concentración más alta del tóxico utilizada (250 y 300 ppm en los medios EGM y Cramer y Myers respectivamente) la mayoría de las células (80 %), perdieron el flagelo, su relación largo / ancho disminuyó tendiendo a formas redondeadas y se observaron algunas células totalmente esféricas (**fig. 21 C**). Además se incrementó el número de gránulos de paramilon y disminuyó la coloración (**figs. 20 B y D, y 21, B y E**) respecto a las células control (**figs. 20 A y C, y 21, A y D**), siendo este último cambio más acentuado en la cepa UTEX en medio mineral (**fig. 20 B**). Se observaron también, casos de ruptura celular con liberación del contenido citoplasmático en la cepa MAT crecida en medio mineral (**fig. 21 C**).

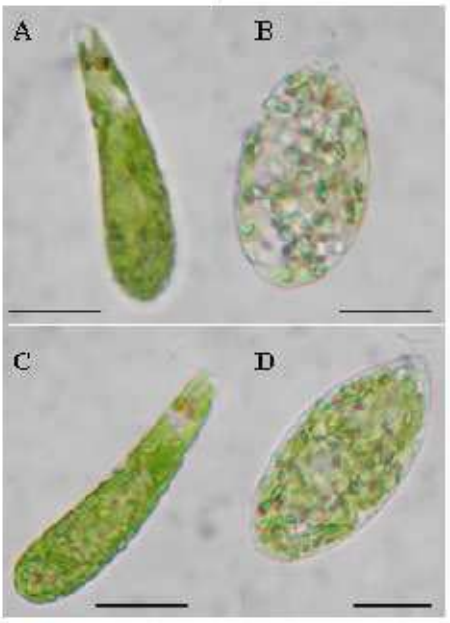


Figura 20. Imágenes de *E. gracilis* cepa UTEX, en medio Cramer y Myers control (**A**) y tratada con la máxima concentración de arsenito (**B**), y en medio EGM control (**C**) y tratada con la máxima concentración de arsenito (**D**). Escala 20 µm.

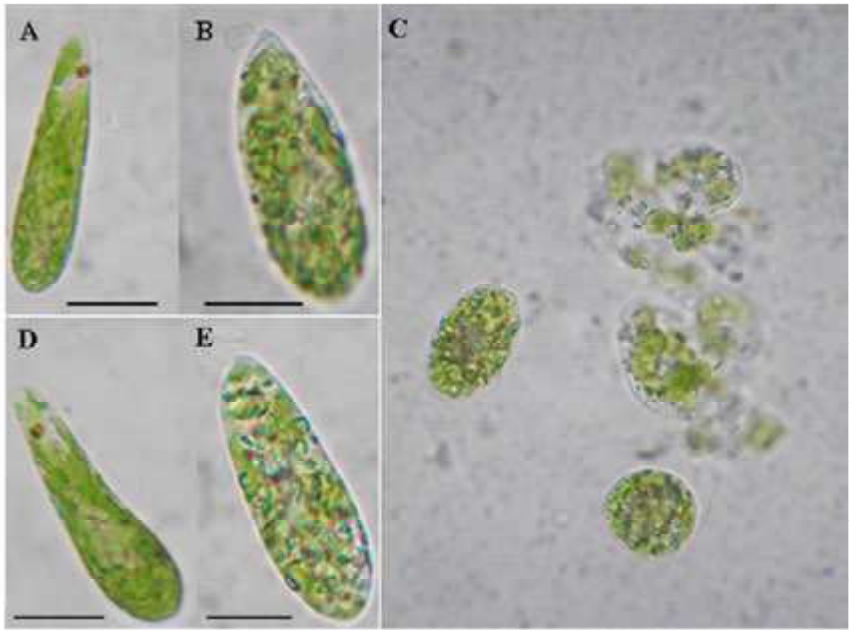


Figura 21. Imágenes de *E. gracilis* cepa MAT en medio Cramer y Myers control (**A**) y tratada con la máxima concentración de arsenito (**B y C**), y en medio EGM control (**D**) y tratada con la máxima concentración de arsenito (**E**). Escala 20 μm.

II.3.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las imágenes obtenidas con MET de los cultivos control de ambas cepas, cultivadas en los dos medios de cultivo, permitieron comparar la ultraestructura celular de UTEX y MAT, y determinar que no existieron diferencias entre ellas, manteniéndose las características típicas de la especie (**fig. 22)**.

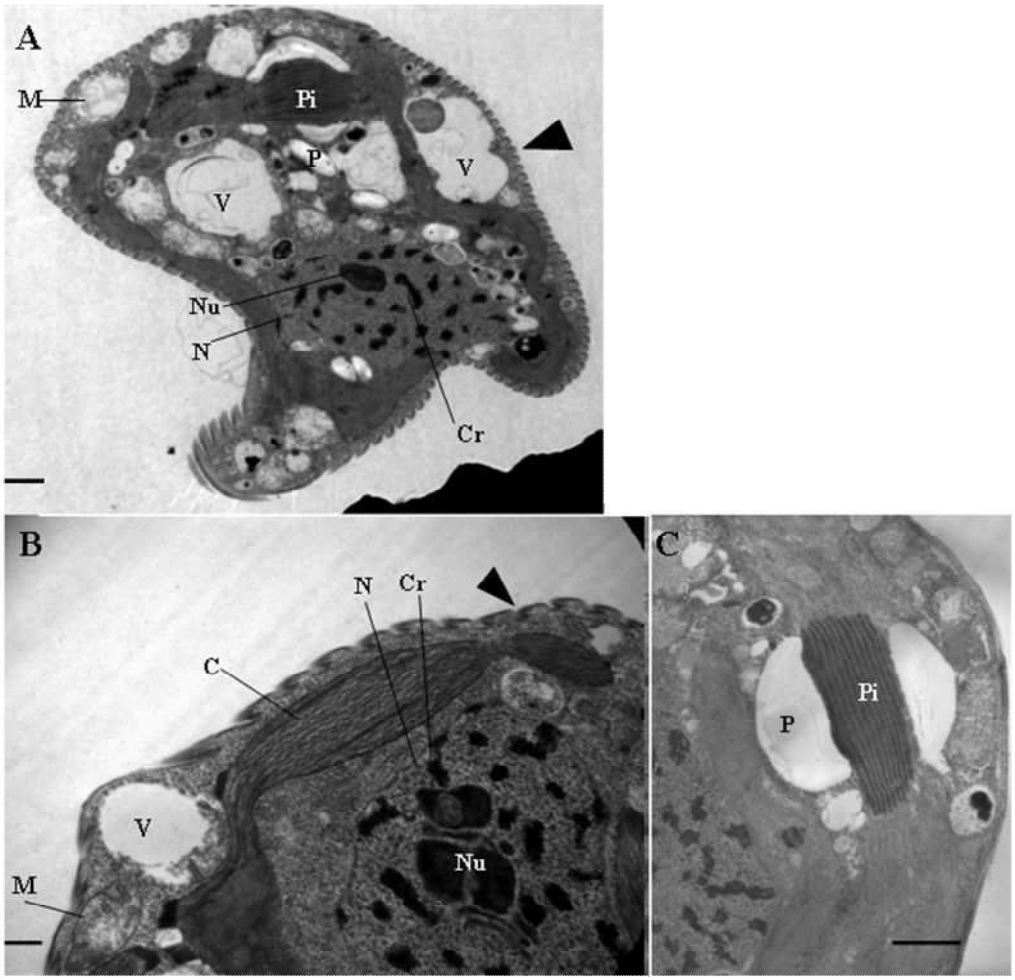


Figura 22. Imágenes de MET de cortes transversales de células de *E. gracilis* control. (**A**) Vista general de una célula. (B) Detalle de una porción de una célula donde se muestra el núcleo con cromosomas grandes y con nucleolo evidente, y cloroplastos con los tilacoides alineados. (**C**) Detalle de un cloroplasto con diplopirenoide. C- cloroplasto, Cr- cromosoma, M- mitocondria, N- núcleo, Nu- nucleolo, P- paramilon, Pi- diplopirenoide, Ti- tilacoide. La flecha señala la película proteica. Escalas 1, 0,5 y 0,1 µm respectivamente.

La ultraestructura de las células de ambas cepas expuestas a las mayores concentraciones de arsenito cambió considerablemente, respecto a la de los controles en los dos medios de cultivo empleados. En ambas cepas se observaron alteraciones en los cloroplastos, como disminución en el número y desorganización de los tilacoides (**fig. 23**), en comparación con la alineación regular que presentaron en los controles (**fig. 22**).

Además, se observó un aumento en la cantidad de gránulos de paramilon, presencia de cromosomas más pequeños y desaparición del nucleolo. Por otro lado, no se observaron diferencias en la estructura mitocondrial ni en la película proteica entre las células de los cultivos controles y tratados (**fig. 23**).

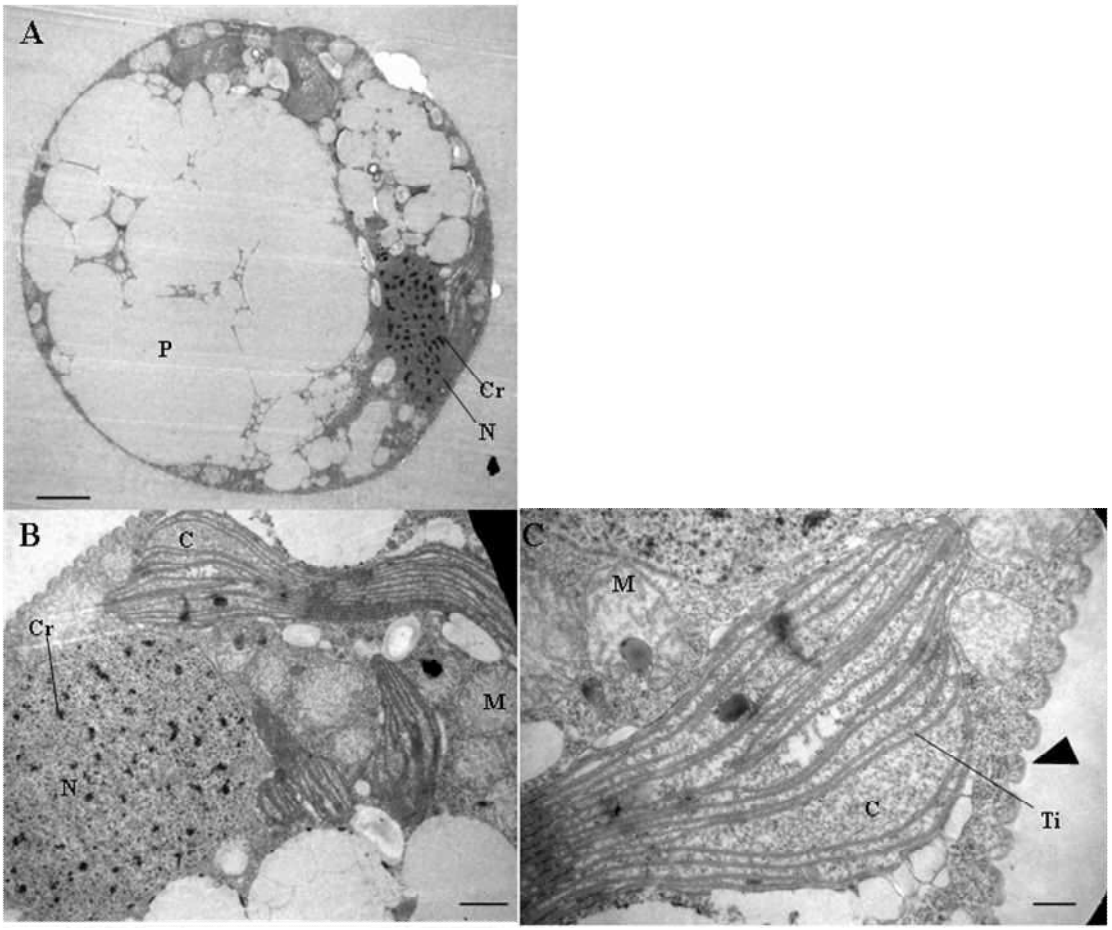


Figura 23. Imágenes de MET de cortes transversales de células de *E. gracilis* expuestas a la máxima concentración de arsenito de sodio. (**A**) Vista general de una célula. (**B**) Detalle de una porción de una célula donde se muestra el núcleo con cromosomas pequeños y cloroplastos con los tilacoides desalineados. (**C**) Detalle de un cloroplasto con sus tilacoides desalineados. C- cloroplasto, Cr- cromosoma, M- mitocondria, N- núcleo, Nu- nucleolo, P- paramilon, Pi- diplopirenoide, Ti- tilacoide. La flecha señala la película proteica. Escala 4, 1 y 0,4 μm respectivamente.

II.4. Discusión

Las euglenofitas son un grupo de microalgas que posee versatilidad metabólica, particularmente pueden fotosintetizar o utilizar fuentes de carbono exógenas (Buetow, 1989) dependiendo de su disponibilidad en el medio ambiente. Por consiguiente, la composición y concentración de la materia orgánica en el medio donde se desarrollan, constituye un factor determinante en la dinámica de crecimiento de este grupo (Ruiz *et al*., 2004 y Rocchetta *et al*., 2006). Respecto a esa condición, en esta investigación se ha observado una clara diferencia en el crecimiento de los cultivos de ambas cepas, UTEX y MAT, en relación a los medios de cultivo empleados, cuyas composiciones se diferencian principalmente en la carga orgánica. Por cierto, es en el medio orgánico EGM donde se obtuvieron las mayores densidades celulares y tasas de crecimiento para las dos cepas empleadas (**figs. 6 y 7**) lo cual concuerda con lo observado por Ruiz *et al*. (2004). Estos resultados indicarían que las mejores condiciones para un crecimiento óptimo serían las que ofrece el medio orgánico EGM, respecto al medio mineral Cramer y Myers.

Durante la fase de crecimiento exponencial, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre cepas en medio mineral (**fig. 8 A**). En medio orgánico la tasa de crecimiento de la cepa UTEX resultó significativamente superior que la de MAT, solamente en el día 1 de dicha fase (**fig. 8 B**). Esto indicaría que la alta disponibilidad de materia orgánica del medio EGM produciría una mayor estimulación inicial en esa cepa.

Algunas especies del género *Euglena* se encuentran entre los pocos eucariotas que habitan los relaves mineros que presentan una alta carga de metales pesados y arsénico (Das *et al*., 2009; Miot *et al*., 2009; Pires-Freitas *et al*., 2011). Si bien la especie *E. gracilis* no ha sido citada para este tipo de ambientes, si se sabe que habita sitios altamente contaminados con materia orgánica y/o metales (Conforti *et al*., 2005; Rocchetta *et al*., 2006; Hu *et al*., 2015). Acorde con esos antecedentes, las dos cepas de *E. gracilis* estudiadas en este capítulo mostraron cierta tolerancia al arsenito, lo cual se evidenció con sus con altas CI_{50}. De todas maneras, independientemente del medio de cultivo, las dos cepas de *E. gracilis* resultaron afectadas ante la exposición al arsenito de sodio, determinando una inhibición del crecimiento celular en grado dosis dependiente (**fig. 10**). Por otro lado, esperábamos diferencias entre las CI_{50} dependiendo del medio de cultivo

empleado. Respecto a ello, creímos factible dos posibilidades fundamentadas en la interacción entre los componentes del medio. Una de ellas consiste en la acción quelante de la materia orgánica, por lo cual, en medio EGM ésta podría retener al arsenito disminuyendo de este modo la cantidad del tóxico en estado libre, que es la forma que afecta a las células. La otra posibilidad, se basa en que, las sales disueltas en el medio mineral Cramer y Myers podrían retener al arsenito al establecerse uniones fuertes con los aniones que la componen. Considerando el primero de los casos, se esperarían en medio orgánico valores de CI_{50} superiores al del medio mineral. Si se considera el segundo de los casos, se esperarían mayores valores de CI_{50} en el medio mineral, que fue lo que ocurrió. Las CI_{50} resultantes en UTEX y MAT en el medio mineral (127 ± 16 y 160 ± 19, respectivamente) fueron superiores a las obtenidas en el medio orgánico (98 ± 9 y 71 ± 4, respectivamente) lo cual denotaría para ambas cepas, una mayor sensibilidad al arsenito en el medio orgánico.

Se esperaba que la cepa UTEX resultara más sensible al arsenito por el hecho de que nunca había sido expuesta a contaminantes tóxicos, a diferencia de la cepa MAT que provino de un río cuyas aguas contienen metales pesados y alta carga de residuos orgánicos, entre otros contaminantes (Magdaleno *et al.*, 2001, Conforti *et al.*, 1995). Aunque no se encontraron diferencias significativas en las CI_{50} de ambas cepas, podría considerarse que la cepa MAT resultó ser la más sensible al arsenito en los dos medios de cultivo, al presentar una disminución significativa del crecimiento con concentraciones del tóxico más bajas que las que afectaron a la cepa UTEX (**fig. 10 A y B**). Además, si bien las CI_{50} de ambas cepas en medio mineral resultaron similares, la disminución del r en la cepa MAT alcanzó valores inferiores a los de la cepa UTEX en todas las concentraciones del tóxico empleadas (**fig. 11 A**). Por otro lado, en medio orgánico, MAT presentó un valor inferior de CI_{50} (71 ± 4 mg/l) respecto al obtenido en UTEX (98 ± 9 mg/l). Por todos estos resultados, podríamos decir que la respuesta al arsénico es diferente entre cepas, y que a pesar de su origen, la MAT resultaría más sensible al arsenito que UTEX.

Respecto a las alteraciones morfológicas y ultraestructurales ocurridas en ambas cepas expuestas a las máximas concentraciones de arsenito ensayadas, tales como la decoloración de los cloroplastos y el cambio de la forma celular, se encontraron algunas diferencias entre cepas. Es así que, en la cepa UTEX crecida en medio mineral la

decoloración fue notoriamente más evidente que en la cepa MAT (**fig. 20 B y 21 B,** respectivamente), lo cual podría explicarse por el menor valor de la relación clf *a*/clf *b* (**fig. 14 A**) que presentó esta cepa comparada con el obtenido en la cepa MAT, lo que estaría indicando un nivel mayor de daño en este pigmento. Por otro lado, la cepa MAT crecida en medio mineral presentó muchas células totalmente redondeadas y casos de lisis celular (**fig. 21 E**). Esto sería una evidencia más de la mayor sensibilidad de esta cepa, que se agregaría a la anteriormente señalada en la evaluación de su crecimiento.

Respecto a la producción de carbohidratos, se determinó una tendencia de aumento en función de la dosis de arsenito empleada, en ambas cepas crecidas en los dos medios de cultivo (**fig. 13 A y B**). Esto también pudo observarse en las imágenes obtenidas por microscopía óptica y electrónica de transmisión, las cuales exponen muchos más granos de paramilon en las células tratadas con arsenito de sodio respecto a los controles (**figs. 20 y 21**). El incremento de este carbohidrato podría deberse a un aumento de su producción o a una inhibición de su degradación, lo cual sería consecuencia de alguna alteración en la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo de los hidratos de carbono, tal como fue citado para plántulas de arroz expuestas a arsénico (Jha y Dubey, 2004).

Aunque el incremento significativo de carbohidratos en el medio mineral ocurrió en la cepa UTEX desde concentraciones del tóxico inferiores a aquellas en las que se dio en la cepa MAT, los mayores valores de carbohidratos fueron detectados en esta última (**fig. 13 A**). Este aumento, se relaciona con la acumulación de paramilon y la presencia de células redondeadas observada en la cepa MAT en medio mineral, lo cual señala el transcurso de un estado de enquistamiento en el que son necesarias reservas energéticas. Resultados similares al anterior, se obtuvieron en el trabajo de Rocchetta *et al*., 2006, con cultivos de las mismas cepas UTEX y MAT, crecidas en medio mineral y expuestas a cromo hexavalente.

La clorofila *a* (pigmento activo responsable de la fotosíntesis), y la clorofila *b* (pigmento accesorio) fueron evaluados como parámetros del estado fisiológico de las cepas UTEX y MAT mediante la relación clf *a* / clf *b***,** la cual puede variar de acuerdo al estado de desarrollo de la célula y a factores externos causantes de estrés, ya sean físicos o químicos, que puedan afectar al "complejo captador de luz" LHC II (Ustin *et al*., 1998; Pinto *et al*., 2001; Pintilie *et al*., 2004). La disminución de la relación clf *a*/ clf *b* es un

indicador de alteración en los fotosistemas (Samuel y Bose, 1987). Esa disminución puede darse por aumento de la clorofila *b*, o disminución de clorofila *a* (Shafiqur *et al*., 2000). La disminución de la coloración celular, la desorganización de los tilacoides de los cloroplastos (**figs. 20 y 21 B y D, y 23 B y C**) y el menor crecimiento observados en las células expuestas a las mayores concentraciones de arsenito (**figs 10 y 11 A y B)** podrían considerarse señales tardías de daños en los pigmentos fotosintéticos. El análisis de los pigmentos corrobora que en ambas cepas la relación clf *a*/clf *b* resultó afectada por el arsenito principalmente en medio mineral, en el cual a partir de las dosis más bajas empleadas (50 y 100 ppm para las cepas MAT y UTEX respectivamente) comienza a disminuir significativamente respecto al control (**fig. 14 A**). En medio orgánico la disminución de la relación clf *a*/clf *b* se observó recién con la concentración más alta del tóxico empleada (250 ppm), lo cual indicaría que en este medio la acción del arsenito sobre estos pigmentos sería menor que en el mineral (**fig. 14 B**). Cabe recordar que *E. gracilis* posee un metabolismo fotoauxotrofo, de modo que al afectarse la actividad fotosintética, el crecimiento del alga resultaría mas perjudicado en medio mineral Cramer y Meyer. Mientras que éste parámetro sería mucho menos afectado en el medio orgánico EGM, donde obtiene directamente las moléculas energéticas para su desarrollo. Por esta razón, la alteración se pudo detectar recién en la concentración más alta del tóxico. Además, puede observarse que la cepa MAT posee una relación clf *a*/clf *b* mayor que UTEX, lo cual podría ser considerada una característica constitutiva de esa cepa. A su vez, la cepa UTEX en medio mineral presenta una relación clf *a*/ clf *b* menor que en medio orgánico, lo cual podría relacionarse con una interferencia de la coloración propia del medio EGM en la captación de luz.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que el arsenito de sodio indujo una alteración de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y la actividad detoxificante. SOD, GSH, carotenos, TBARS y GST aumentaron en las células de *E. gracilis* expuestas al tóxico.

Respecto a los antioxidantes no enzimáticos (carotenos y GSH), mostraron una tendencia de aumentar en respuesta a la dosis creciente de arsenito en ambos medios. Estos resultados indican la participación de carotenos y GSH en el mecanismo de defensa antioxidante frente al arsenito. Estos resultados son acordes con lo citado por Pawlik-

Skowrońska *et al*., 2004; Mishra *et al*., 2008; Sharma, 2015. Si bien se determinó un aumento significativo de GSH en la cepa UTEX expuesta a 200 mg/l de arsenito, en 300 mg/l este antioxidante presentó valores cercanos al control, lo cual pudo estar dado por su utilización en la formación del complejo GSH-As (III) involucrado en la detoxificación celular de arsénico (Miot *et al*., 2008). Además, esto coincide con una actividad muy elevada de la enzima GST, que cataliza la conjugación de GSH con tóxicos, lo cual determina una mayor demanda de este antioxidante.

El contenido de carotenos de la cepa MAT aumentó con el incremento de la concentración de arsenito y presentó mayores valores que los de la cepa UTEX (**fig. 15 A y B**). En esta última los carotenos aumentaron en todas las concentraciones de arsenito excepto en la más alta, en la que disminuyeron significativamente. Esto indicaría que el sistema de defensa antioxidante, mediado por carotenos en la cepa MAT, no se vería afectado por las altas concentraciones de arsenito como si ocurre en la UTEX. La disminución determinada en esta última podría deberse a un daño y/o interferencia en la síntesis de carotenos causada por el arsenito, como ha sido informado para otros contaminantes (Samuel y Bose, 1987; Romero *et al*., 2011). A pesar del aumento de los niveles de carotenos y de GSH detectados, la respuesta antioxidante fue ineficiente, dado que los lípidos resultaron dañados (**fig. 16 A y B**).

El arsenito de sodio produjo daño oxidativo en *E. gracilis*, el cual fue evidenciado por el aumento de peroxidación lipídica, esto concuerda con lo citado para plantas y algas (Sharma, 2015; Zutshi *et al*., 2014; Singh *et al*., 2007). Ese aumento puede relacionarse con un incremento de la producción de EROs inducido por el arsenito como lo registrado para plantas, algas y animales (Flora, 1999, 2011; Chen *et al*., 1998).

Además, en ambos medios, la cepa UTEX presentó el máximo aumento de TBARS al emplear la mayor concentración de arsenito (**fig. 16 A y B**). Este aumento podría relacionarse con la disminución de las defensas antioxidantes detectada (principalmente carotenos), dado que ante una respuesta antioxidante ineficiente, los lípidos pueden resultar afectados, con la consecuente ocurrencia de daño en las membranas celulares. El aumento de daño a lípidos puede explicar las alteraciones determinadas a nivel bioquímico y celular. Con el empleo de microscopía electrónica se pudo observar una clara desorganización de los tilacoides, con microscopía óptica se comprobó la decoloración celular, y por análisis

químicos la disminución de la relación clf *a* / clf *b*. Las membranas tilacoidales son susceptibles al daño oxidativo por tener una alta proporción de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, la peroxidación lipídica inducida por arsenito en *E. gracilis* podría haber provocado la desorganización de las membranas tilacoidales, afectando la estructura del complejo pigmento-proteína localizado en ellas (Juárez *et al*., 2008). Esto deja expuestos a los pigmentos a procesos de degradación, determinando su disminución y la consecuente decoloración celular.

El aumento de contenido de proteínas por célula observado en *E. gracilis* podría relacionarse a un aumento de proteínas quelantes del arsénico (Vasken Aposhian *et al*., 2004) así como al de enzimas metabolizantes y antioxidantes, en respuesta a la presencia de arsenito. Si bien no se determinó la concentración de las enzimas SOD y GST, sus actividades aumentaron significativamente en ambas cepas en presencia de arsenito de sodio.

La enzima GST está involucrada en la metabolización de especies metiladas de arsenato. El arsenito que ingresa en la célula puede ser transformado por metiltransferasas en especies metiladas de arsenito, y el sistema xantina oxidasa puede transformar estas especies en formas metiladas de arsenato y al arsenito en arsenato (Vasken Aposhian *et al*., 2004). Por lo tanto, el aumento de actividad GST registrado podría explicarse por su participación en la detoxificación del arsenito.

En medio orgánico, ambas cepas mostraron una actividad GST mayor que en medio mineral. Esta conducta podría deberse a su participación en la detoxificación de productos generados por la metabolización de las moléculas complejas que componen ese medio. A su vez en el medio orgánico, la actividad de la cepa MAT resultó significativamente superior a la de UTEX, lo cual podría estar relacionado con sus orígenes (ambiente con alta carga orgánica). Por otra parte, en medio mineral ambas cepas mostraron un pico máximo de actividad GST con 300 mg/l de arsenito siendo superior el de la cepa UTEX. Dado que se observó un pico coincidente de TBARs, la participación de la GST en la detoxificación de productos finales de peroxidación lipídica (4-hidroxinonenal, Kalinina *et al*., 2014)) podría explicar la máxima actividad de esa enzima.

El aumento de actividad de enzimas antioxidantes ha sido demostrado en plantas y algas expuestas a arsénico (Mishra *et al*., 2008; Sharma, 2015). En este capítulo *E. gracilis*

mostró un aumento de actividad SOD al aumentar la concentración de arsenito. Al igual que lo observado para GST, la actividad SOD de ambas cepas fue mayor en el medio orgánico. La alta tasa de metabolización que se da en este medio podría generar mayor concentración de EROs, con el consiguiente incremento de actividad antioxidante. Puede observarse que la cepa UTEX posee una actividad SOD mayor que MAT, lo cual podría ser una característica constitutiva de esa cepa. Esta diferencia se mantuvo en presencia de arsénico. Las máximas actividades SOD se dan con las concentraciones más altas de arsenito, las que inducirían una mayor producción de EROs. En particular, se ha informado sobre la capacidad del arsénico de inducir la producción del anión superóxido (Mishra *et al*., 2008; Tuan *et al*., 2008).

Estos resultados muestran que a pesar de tener activos los sistemas detoxificantes y antioxidantes, estos no resultarían suficientes para contrarrestar los efectos nocivos de las EROs celulares que se generarían bajo estas condiciones, todo lo cual conduce a las células a un estado de estrés oxidativo claramente reflejado en los elevados niveles de TBARS.

Aunque el daño a lípidos no pudo ser evitado, el aumento significativo de los niveles de carotenos y de GSH en la cepa MAT crecida en ambos medios de cultivo con las máximas concentraciones de arsenito, indicaría una prevalencia de la respuesta antioxidante no enzimática en esta cepa. En cambio la UTEX mostró una disminución de carotenos y de niveles basales de GSH, con una prevalencia de la respuesta enzimática tanto antioxidante como detoxificante.

II.5. Conclusiones

No existen diferencias en el crecimiento entre las cepas UTEX y MAT de *E. gracilis*.

El medio orgánico EGM proporcionó las condiciones óptimas para el crecimiento de ambas cepas de *E. gracilis*, las cuales mostraron mayores densidades celulares y tasas de crecimiento en comparación con las alcanzadas en el medio mineral Cramer y Myers.

El arsenito de sodio resultó tóxico para ambas cepas de *E. gracilis*, provocando alteraciones a nivel bioquímico, morfológico y ultraestructural.

El arsenito inhibió el crecimiento de las cepas UTEX y MAT de manera dosis dependiente, independientemente del medio de cultivo empleado.

El arsenito provocó un aumento del contenido de sustancia de reserva lo que llevó a una alteración de la morfología de *E. gracilis* (ensanchamiento celular).

El arsenito alteró los parámetros indicadores de estrés oxidativo evaluados. El aumento en los niveles de TBARS, GSH, carotenos y actividades SOD y GST en las células expuestas a arsenito, sugiere la participación de estrés oxidativo en la toxicidad de este metaloide. Si bien las defensas antioxidantes y detoxificantes aumentaron con la exposición al arsenito, éstas no fueron suficientes para prevenir el daño a lípidos, con la consecuente alteración en la estructura del sistema fotosintético, traduciéndose en una pérdida de pigmentación y en la alteración del arreglo de los tilacoides.

La respuesta al estrés provocado por la exposición al arsenito fue diferente en las dos cepas. En la MAT prevalecería una respuesta antioxidante no enzimática, en tanto que en la UTEX una enzimática detoxificante y antioxidante.

La cepa UTEX resultó ser más resistente al arsenito que la MAT. Esta mayor tolerancia podría estar relacionada con los mayores niveles constitutivos de GSH y de actividad SOD.

Por último, consideramos en base a nuestros resultados, que las respuestas adaptativas que pudo haber adquirido la cepa MAT en el ambiente contaminado de dónde provino, no le proporcionarían ventajas frente a la UTEX al ser expuesta al arsenito.

CAPÍTULO III

Alteraciones ultraestructurales en *Phacus brachykentron* (Euglenophyta) causadas por el exceso de materia orgánica en el medio de cultivo

III.1. Introducción

III.1.1. La contaminación por materia orgánica en los cuerpos de agua naturales y su efecto sobre la biota

El componente orgánico que se encuentra naturalmente en los cuerpos de agua se origina a partir de la descomposición de algas, plantas acuáticas, mudas, excreciones y restos de organismos que habitaron en ese sistema. Además, proveniente desde zonas litorales, puede incorporarse materia orgánica disuelta que llega por escorrentía, y restos de origen vegetal como hojas, ramas, polen y frutos que son transportados hasta allí por acción eólica.

El exceso de materia orgánica presente tanto en aguas superficiales como en subterráneas, procede principalmente de desechos producidos por actividades humanas los cuales ingresan al ecosistema acuático por diferentes vías. El comportamiento de estos compuestos en el agua y su acción sobre el medio ambiente dependen de su concentración, estructura molecular, tamaño, forma y de la presencia de distintos grupos funcionales tóxicos para los organismos vivos. Entre estos se encuentran los plaguicidas, empleados en la agricultura en gran escala que alcanzan los cuerpos de agua por escorrentía, y los compuestos orgánicos provenientes de la actividad ganadera y tambera intensiva, y de las industrias, los cuales son volcados indiscriminadamente en forma directa o luego de ser tratados en plantas depuradoras de modo ineficiente (Castañé *et al*., 1998; Giorgi A. y Malacalza, 2001, Rocchetta *et al.*, 2003; Salibián, 2006). Así mismo, la infiltración de excretas provenientes de tanques sépticos o redes cloacales mal mantenidas, junto a los vertidos urbanos como las aguas residuales domésticas, llegan a los ríos o lagos sin depurar. Bajo estas circunstancias, las características fisicoquímicas del agua de los ecosistemas acuáticos naturales se modifican, lo cual puede afectar directa o indirectamente la composición de su biota (Paul y Meyer, 2001; Meyer *et al*., 2005). En caso de que la perturbación que sufre el medio genere un impacto desfavorable para la vida, éste se verá reflejado en una modificación del balance natural de sus interacciones bióticas (Conforti *et al*., 1995; Dokulil, 1996; Conforti, 1998; O'Farrell *et al*., 2002; Paul y Meyer, 2008). Es por ello, que la contaminación del ecosistema acuático por materia orgánica biodegradable

es uno de los casos de polución más importantes y extendidos, y produce, fundamentalmente, el empobrecimiento del medio en oxígeno, el cual es consumido hasta su agotamiento en la oxidación de la materia orgánica.

La degradación de la materia orgánica de origen biológico, en los sistemas acuáticos, sigue la ruta de descomposición llevada a cabo por microorganismos (mayoritariamente bacterias) que emplean estos compuestos como sustrato para obtener carbono y energía (quimioorganoheterótrofos). Dependiendo de las condiciones de oxigenación, la degradación puede ser completa en presencia de oxígeno, generándose materia inorgánica (dióxido de carbono), o incompleta en su ausencia originándose intermediarios orgánicos (materia orgánica oxidada) que son utilizados por otros microorganismos. Además, durante este proceso de degradación, se genera el aporte de grandes cantidades de nutrientes, tales como fosfatos y nitratos, que quedan disponibles en el medio y son importantes para el crecimiento de la biomasa algal. Como consecuencia, se da un gran aumento de la productividad primaria lo que implica cambios en la composición, estructura y dinámica del ecosistema.

Ante la irrupción en el ecosistema acuático de materia orgánica en exceso, los organismos que integran la biota pueden responder de diferentes maneras, tales como adaptarse y sobrevivir, escapar, formar estados de resistencia o morir. Estas diferencias pueden ser de gran valor para emplearlos como indicadores de contaminación orgánica. La alta sensibilidad del fitoplancton a los cambios ambientales y su importancia ecológica como productores primarios, hacen de esta comunidad una herramienta muy valiosa para ser empleada como indicador biológico de este tipo de contaminación. Por esta razón, las algas son los organismos acuáticos que se emplean comúnmente en diferentes investigaciones ecológicas (Pringsheim, 1956; Ács *et al*., 2003; Torrisi y Dell 'Uomo, 2006; Falasco *et al*., 2009). La posibilidad de poder cultivarlas *in vitro* y sus altas tasas de reproducción hacen que sean adecuadas para ser utilizadas como organismos de prueba en estudios ambientales, en los que se puede evaluar su abundancia, su morfología y su eco-fisiología ante la exposición a diversos contaminantes (Dewez *et al*., 2005). En el caso de que resistan a la contaminación, sobreviven formando una comunidad biológica definida, indicadora de los impactos y, por lo tanto, de la calidad del agua. Si no la resisten, son sustituidos por otras especies que acaban constituyendo otra comunidad distinta (Conforti

et al., 2005). El proceso de sustitución de comunidades en relación con el gradiente de contaminación por materia orgánica ubica a los euglenofitos como un grupo indicador de contaminación orgánica excesiva (Sladeček & Perman, 1978), incluso en sitios donde se dan condiciones de anoxia (Conforti *et al*., 2005). Además de estas formas autotróficas, la totalidad de representantes del grupo se encuentran habitualmente en sitios ricos en materia orgánica (Lackey, 1968; Munawar, 1972; Sladeček y Perman, 1978; Wolowski, 1998, 1992, 1988; Rosowski, 2003). Bajo estas condiciones se ha visto, en cuerpos de agua naturales, que algunas especies de euglenofitos presentaban alteraciones morfológicas (Conforti, 1991; Conforti *et al*., 1995; Bauer *et al*., 2012) y, en bioensayos de toxicidad con materia orgánica como único contaminante, estas alteraciones fueron las respuestas frente a sus elevadas concentraciones (Conforti, 1998). Para investigar más a fondo este comportamiento, se aislaron ejemplares de *Phacus brachykentron* (Pochm.) del río Matanza (Buenos Aires, Argentina), el cual presenta alta contaminación de materia orgánica causada por los diferentes vertidos que recibe en especial de la industria cárnica.

III.1.2. *Phacus brachykentron*

Phacus Pochmann, es un género de microalgas unicelulares perteneciente al filo *Euglenozoa* (Adl *et al*., 2012). Están ampliamente distribuidas en aguas continentales, y muchas viven en lagos y ríos contaminados con materia orgánica y alta carga bacteriana. A igual que el resto de las euglenofitas su metabolismo es fotoauxotrófico, por lo que requieren, además de los productos generados por su fotosíntesis, incorporar otros componentes orgánicos. Las vitaminas B_1 y B_{12}, como los ácidos grasos de cadena corta son metabolitos excretados por las bacterias y resultan favorables para su crecimiento.

Phacus brachykentron presenta una forma celular dorso-ventralmente aplanada y frontalmente oval, con dimensiones que van desde los 24 a 36 μm de largo y 15 a 26 μm de ancho. En la cara dorsal posee un surco apical que recorre la célula hasta aproximadamente la mitad de su longitud. Su extremo anterior es redondeado, con una depresión conformada por un canal tubular que se extiende a lo largo de la célula hasta ensancharse y transformarse en una cámara llamada reservorio o citofaringe. De esta zona emerge un flagelo locomotor cuya extensión es aproximadamente un tercio de la longitud celular y

otro de longitud muy corta que queda encerrado en el interior del reservorio. En su extremo posterior, la célula termina con un apéndice caudal corto y curvo. La película proteica presenta bandas o estrías longitudinales. Posee numerosos cloroplastos que son pequeños y discoides, sin pirenoide. Presenta un disco grande de paramilon en posición central, y otro más pequeño en posición lateral, aunque también puede haber otros más pequeños diseminados en el citoplasma. En una zona adyacente al reservorio se encuentra el estigma de color rojizo formado por gránulos de carotenoides (Tell y Conforti, 1986, Huber-Pestalozzi, 1955) (**fig. 1**).

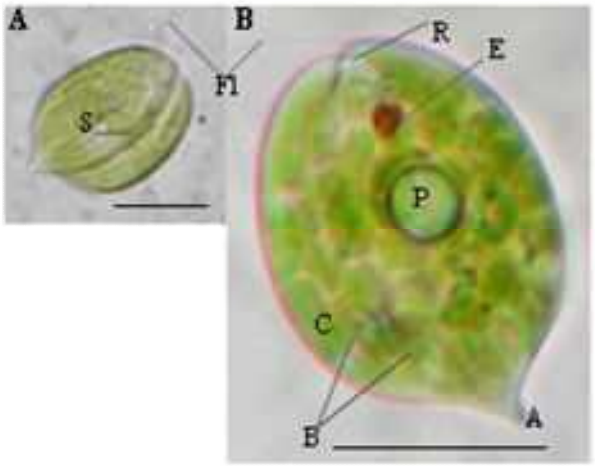


Figura 1. Imagenes de microscopía óptica de *P. brachykentron*. (**A**) Vista general mostrando el surco apical. (**B**) Magnificación mostrando las estructuras celulares. Escalas: 20 μm Fl- flagelo, S- surco apical, R- reservorio, E- estigma, P- paramilon, C- cloroplasto, A- apéndice caudal, B- bandas peliculares.

El desplazamiento celular de *P. brachykentron* en el medio acuático se produce únicamente por el movimiento del flagelo locomotor. Como su película proteica es rígida, no realizan movimientos metabólicos, que ayuden en la natación celular.

III.1.3. Objetivos

- Estudiar la respuesta de *P. brachykentron* a la presencia de diferentes concentraciones de materia orgánica en el medio de cultivo.
- Analizar las alteraciones en el crecimiento de la población, la morfología y la ultraestructura celular provocadas por esta sustancia.
- Evaluar si estos cambios tienen implicancias sistemáticas y/o ecológicas.

III.1.4. Hipótesis

- El exceso de materia orgánica en el medio de cultivo provoca cambios en el desarrollo, morfología y ultraestructura de las células de *Phacus brachykentron*.
- Las alteraciones generadas bajo estas condiciones pueden provocar dificultades para poder clasificar correctamente a los distintos especímenes originados.
- Las modificaciones pueden provocar la lisis celular.

III.2. Materiales y métodos

III.2.1. Cultivos

Los cultivos de *P. brachykentron* empleados en esta investigación se realizaron a partir de su aislamiento de las aguas del Río Matanza-Riachuelo, Buenos Aires Argentina (35°06'34°38'S y 58°49'-58°21'O). Las muestras recolectadas se filtraron con una red de plancton con tamaño de poro de la malla de 15 μm, se colocaron en frascos estériles y se mantuvieron a oscuras y en frío (5 a 10° C) durante su traslado hasta el laboratorio. Allí, se observó su biodiversidad empleando un microscopio invertido Olympus CK40, y se determinó taxonómicamente a *P. brachykentron* (Hüber-Pestalozzi 1955, Tell y Conforti, 1986). Para lograr su aislamiento se colocaron 2 ml de la muestra de agua de río en un vidrio de reloj ubicado en un microscopio invertido y se separaron algunas células mediante el uso de una pipeta Pasteur de vidrio. Para obtener el cultivo *stock* empleado en el experimento, las células seleccionadas se lavaron dos veces con solución de NaCl 0,9% pH 7. Con el fin de obtener cultivos clonales, se inocularon con una de la células aisladas, tubos de vidrio de 100 ml conteniendo medio de cultivo tierra agua (SWM Pringsheim, 1946) estabilizado con carbonato de calcio ($CaCO_3$). Estos se cultivaron durante dos meses en una cámara de cultivo a 24 ± 1° C con fotoperíodo 12/12 horas luz/oscuridad con luz blanca fría (25-35 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) proporcionada por tubos fluorescentes de 40-W. Al cabo de este tiempo se verificó el crecimiento de los cultivos.

III.2.2. Bioensayos

Se prepararon 24 tubos de vidrio conteniendo 5 ml de medio SWM. Del total, 4 se reservaron como controles, el resto se suplementaron con una solución a base de peptona (Bacteriological Peptone OXOID®) en las siguientes concentraciones: 3,3; 6,6; 10, 13 y 17 mg/ml, estableciendo 4 réplicas por concentración. Los tubos se inocularon con el cultivo unialgal clonal de *P. brachykentron* en una concentración de 10^4 células/ml y se incubaron durante 48 horas en iguales condiciones que el cultivo *stock*.

Transcurrido el tiempo de incubación, se prepararon los cultivos para analizar: densidad, morfometría y ultraestructura celular.

III.2.2.1. Recuento de células

Se realizaron recuentos de células alteradas de *P. brachykentron* según la técnica descripta por Utermöhl (1958). Para ello, se homogenizó bien cada tubo con el cultivo agitándolo manualmente, se tomaron 2 ml de cada uno y se lo fijó con una solución de lugol al 2%. Luego se colocaron en cámaras de sedimentación de 2 ml de capacidad. Inmediatamente se taparon las cámaras con una pieza de cristal circular evitando que queden burbujas de aire. Luego, se mantuvieron durante 24 horas en un lugar donde no llegaba luz solar directa, a temperatura ambiente y sobre una superficie plana, libre de vibraciones y bien nivelada para que la sedimentación se produzca de manera homogénea. Los recuentos de las células de *P. bracykentron* que mostraban alteraciones se realizaron en un microscopio invertido con un aumento de 400 x, con un error estimado de α=0,05. Se consideró una morfología alterada cuando las células presentaban sus márgenes con muescas, un espesor dorso-ventral incrementado, y cuerpos de paramilon muy desarrollados.

Para obtener una estimación cuantitativa del crecimiento celular, el número de células se determinó utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio óptico. Los recuentos de células en una muestra (células/ml) se repitieron hasta que el error estándar de la media fue menor al 10%(Venrick, 1978). La tasa de crecimiento se estimó con la siguiente ecuación:

$$r = (\ln N - \ln N0) / (\text{días})$$

donde N es el número de células finales y NO el de iniciales (Maclauso *et al*., 2009).

III.2.3. Morfología y ultraestructura

III.2.3.1. Microscopía óptica

Se determinó la longitud, el ancho y el espesor medio de las células de *P. brachykentron* de los cultivos controles y de los tratados con peptona. Para ello, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se la fijó con una solución al 3% de formaldehído. Se tomaron gotas del material fijado y fue observado entre porta y cubreobjeto y se tomaron imágenes empleando un microscopio óptico Olympus BX50 equipado con una cámara digital Olympus C-7070 Wide Zoom. Se midieron al menos 300 células provenientes de cada uno de los tratamientos empleando el programa informático *ImageJ*.

III.2.3.2. Estudios celulares con microscopía electrónica de transmición (MET)

Las células de los cultivos controles y tratados fueron colectadas mediante centrifugación a 3500 x g durante 20 minutos. Los *pellets* obtenidos se sometieron a los siguientes tratamientos:

1. Se fijaron durante toda una noche a 4°C en glutaraldehído 2,5% en *buffer* cacodilato 0,1 M pH 7,4.
2. El material fue post-fijado durante 2 horas en tetróxido de osmio 1% en *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,4. Se centrifugó a baja velocidad y los *pellets* se lavaron tres veces con *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,4.
3. Se deshidrataron empleando una serie de concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 95%, y dos de 100%).
4. Luego se embebieron en resina Spurr de baja densidad (Spurr, 1969).
5. Las secciones fueron cortadas con un ultramicrótomo con cuchilla de vidrio, se montaron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% en la fase acuosa durante 45 minutos y con citrato de plomo 5% durante 5 minutos (Reynolds, 1963).
6. Luego, los cortes fueron examinados usando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10 A/B del servicio de Microscopía Electrónica de FCEyN, UBA.

III.2.3.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de los granos de paramilon

Los granos de paramilon fueron extraídos de las células y purificados según la técnica de Kiss *et al*. (1988). Antes de la extracción, las células se lavaron tres veces con *buffer* fosfato 50 mM pH 7. Luego, se resuspendieron 100 ml del medio de cultivo se centrifugaron a 3700 x g. Los *pellets* se congelaron a -21° C durante la noche y luego se resuspendieron en SDS 2% (p/v) en *buffer* Tris 0,125 M pH 6,8. La suspensión celular se rompió por sonicado, empleando ciclos sucesivos de 10 segundos cada uno con intervalos de descanso de 50 segundos cada uno, a una frecuencia máxima de 20 KHz en un baño de hielo y luego se incubaron durante 60 minutos a 37° C. Los granos de paramilon se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 1014 x g. Luego se lavaron dos veces con agua destilada a 70°C en un recipiente de vidrio y se filtraron a través de filtros Millipore GSWP 04700 (0,20 μm de poro). Los filtros se adhirieron a tacos de carbono con cinta adhesiva doble faz y se secaron al aire para ser posteriormente revestidos con oro / paladio. Las muestras se examinaron y fotografiaron en un microscópio elecrónico de barrido AFM NanoScope III perteneciente al servicio de microscopía de la FCEyN, UBA.

III.2.4. Análisis estadístico

Se realizaron 4 réplicas de cada tratamiento. La densidad celular y las variables morfométricas: longitud, ancho y espesor, se analizaron por medio de un análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Los valores de $p<0,050$ se consideraron significativos.

III.3. Resultados

La **figura 2** muestra la frecuencia relativa de las células alteradas obtenida en cada tratamiento. Este parámetro aumentó de manera proporcional con la concentración de peptona empleada, hasta un punto en el que todas las células resultaron afectadas. Las células se consideraron alteradas cuando ellas mostraban un contorno celular con muescas, como se observa por ejemplo en la **figura 3 (b, d, f y g)**, un aumento de su grosor y/ o la presencia de cuerpos grandes de paramilon como se pueden ver en la **figura 3 (b y c)**.

La **figura 4A** muestra las variables morfométricas (longitud, ancho y espesor) medidas en los individuos tratados con la más alta concentración de peptona y sin ella. Las células expuestas al agregado orgánico disminuyeron significativamente su longitud, mientras que su ancho y espesor aumentaron significativamente. Muchas de ellas presentaron una coloración pardoverdosa. Por otro lado, la tasa de crecimiento de *P. brachykentron* en los cultivos con enriquecimiento orgánico fue significativamente menoral control en todas las concentraciones ensayadas (**figura 5**).

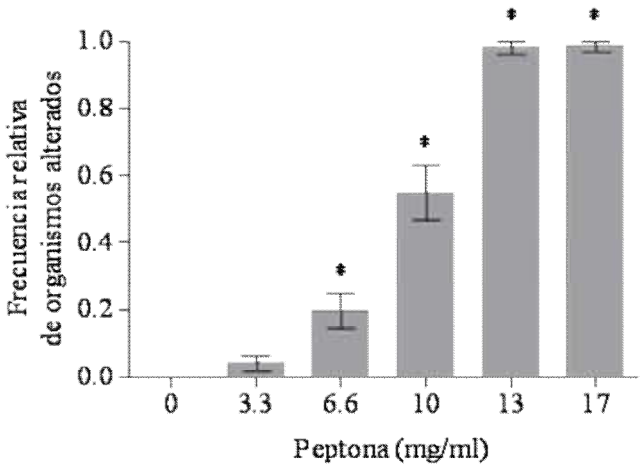


Figura 2. Frecuencia relativa de células deformadas observadas con las diferentes concentraciones de peptona empleada. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. (*) Denota diferencia significativa ($p < 0,05$) con el cultivo control, n= 4.

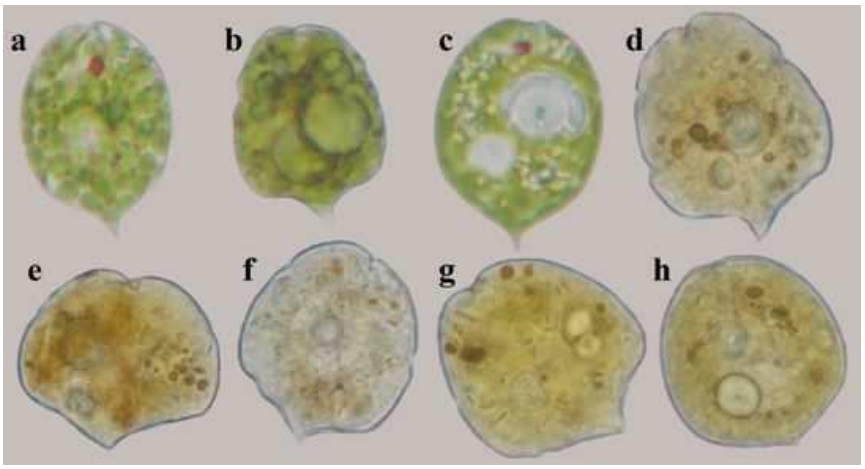


Figura 3. Imágenes de microscopía óptica de *P. brachykentron* de los cultivos control (a) y tratadas con peptona (d-h).

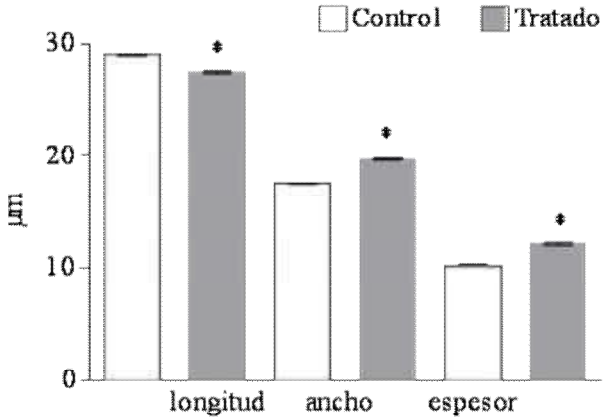


Figura 4. Longitud, ancho y grosor de las células de *P. brachykentron* provenientes del tratamiento con la mayor concentración de peptona, n= 301. Todos los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. (*) Denota diferencias significativas ($p < 0,05$) con el cultivo control.

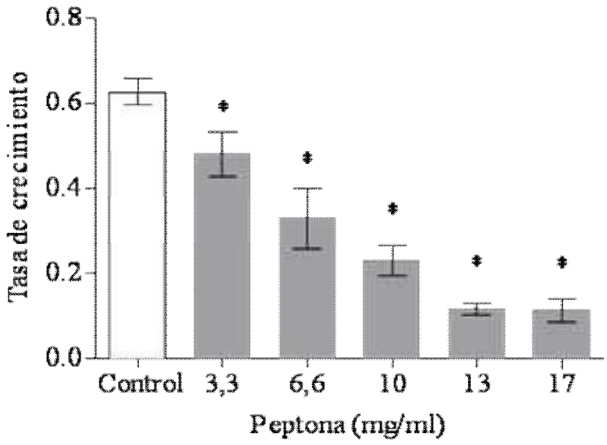


Figura 5. Tasa de crecimiento de *P. brachykentron* de los cultivos control y tratados con peptona, n= 4. Todos los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. (*) Denota diferencias significativas ($p < 0,05$) con el cultivo control.

Al observar las imágenes ultraestructurales de las células de *P. brachykentron* expuestas (**fig. 6A-D**) y las correspondientes al control (**fig. 6E y F**), se puede ver que aquellas tratadas con la mayor concentración de materia orgánica mostraron marcados cambios. Su vista apical resulta mucho más gruesa (**fig. 6A, B**) y la vista lateral también cambió de muy plana a globosa (**fig. 6C**), en ambos casos debido a un aumento en el volumen de los granos de paramilon.

Con respecto a la película, se pudo observar que algunas bandas mostraron un ensanchamiento notable (**fig. 6B y D**, ver flechas) con respecto a las dimensiones que tienen en las células controles (**fig. 6E**, ver flecha). El ancho medido en la banda pelicular de las células controles varió de 0,260 ± 0,01 μm a 0,416 ± 0,01 μm, mientras que en las células tratadas con la mayor concentración de peptona, este rango fue de 0,613 ± 0,01 a 1,654 ± 0.01 μm.

El núcleo se observó desplazado respecto de su ubicación central a lateral, como consecuencia del gran desarrollo del cuerpo de paramilon (**fig. 6D**). Algunas células tratadas mostraron cloroplastos con sus tilacoides desordenados (**fig. 7B**) respecto a los de las células controles (**fig. 7A**), lo cual coincide con el gran número de células decoloradas que se observaron con microscopía óptica (**fig. 3, d-h**).

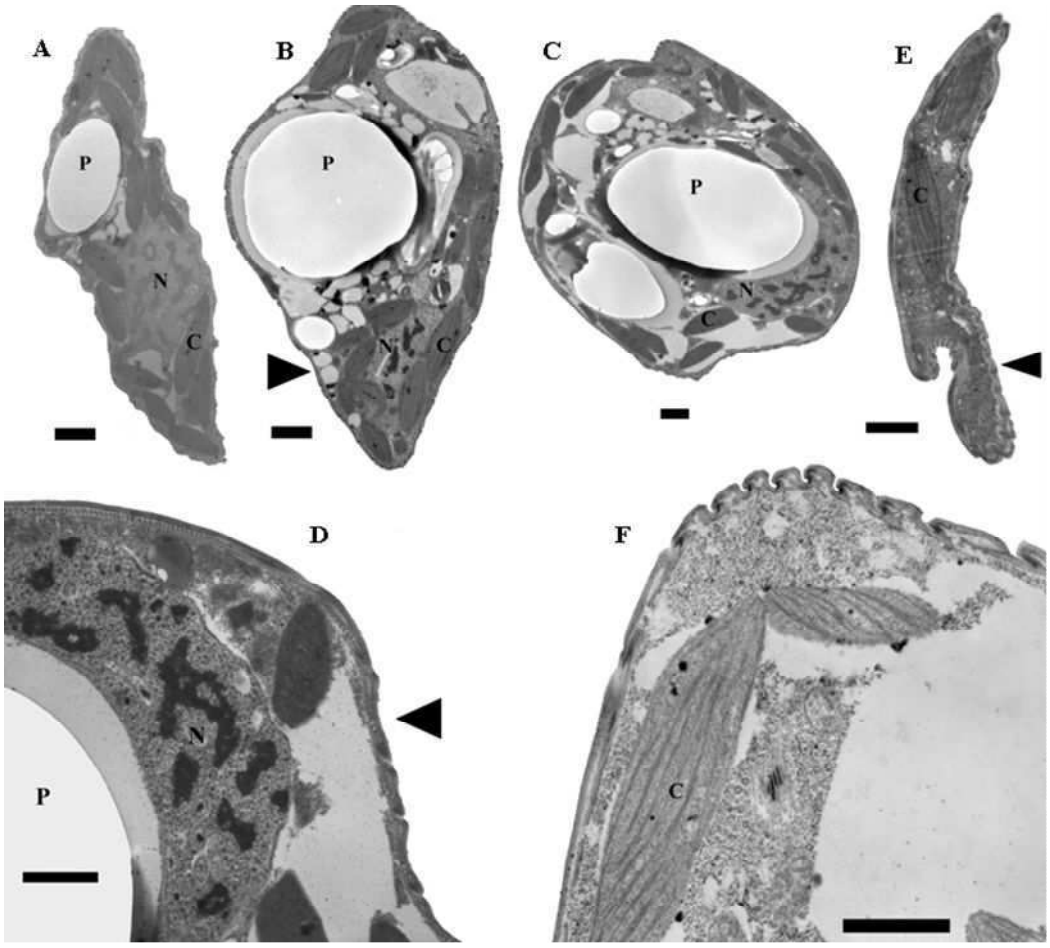


Figura 6. (A-D). Imágenes de MET de células de *P. brachykentron* tratadas con la mayor concentración de materia orgánica: (A) vista apical, (B) vista apical, la flecha apunta a las bandas peliculares ensanchadas, (C) vista lateral donde se evidencia el cambio del contorno celular, (D) detalle de una célula que presenta el núcleo ubicado lateralmente; la flecha señala las bandas ensanchadas. E-F. Imágenes de MET de células de *P. brachykentron* control: (E) vista apical, las flechas señalan las bandas peliculares. (F) Detalle de cloroplastos mostrando la organización característica de los tilacoides. Escala: 1 μm. C, cloroplasto; N, núcleo; P, paramilon.

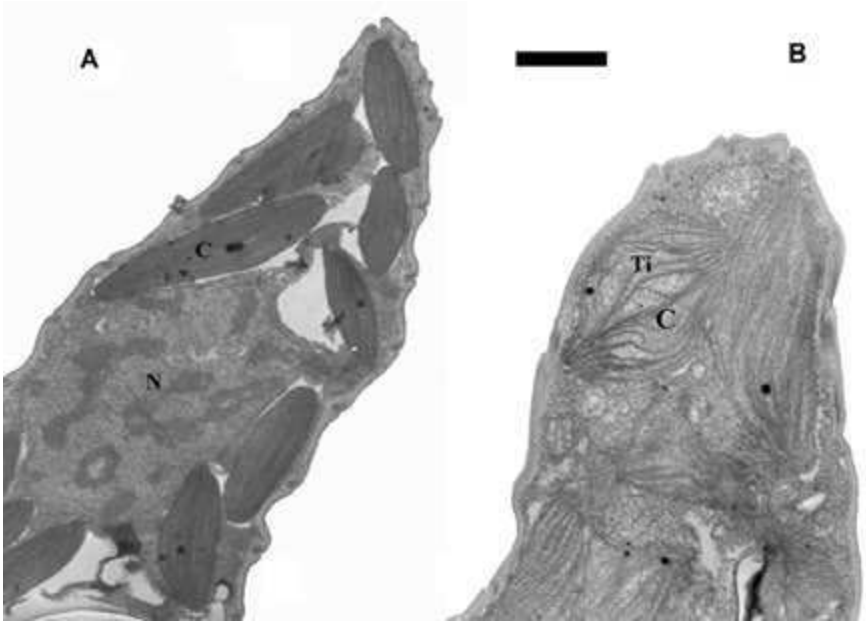


Figura 7. Imágenes de MET de dos células, una control (**A**) con cloroplastos con tilacoides dispuestos ordenadamente y otra tratada con peptona (**B**) en las que se observan los cloroplastos (C) con sus tilacoides desordenados (Ti). Escala 1 μm. N, núcleo.

La **figura 8** muestra imágenes de la forma y tamaño de los granos de paramilon obtenidos de los cultivos controles y tratados de *P. brachykentron*. Al comparar los granos provenientes de las células controles (**fig. 8A**) con aquellos correspondientes a las tratadas (**fig. 8B**), se observó en estos últimos un gran aumento del volumen por incremento del espesor del grano y una reducción de la luz de su anillo central, además de presentar formas totalmente alteradas.

Por último, en los cultivos ricos en materia orgánica se pudo determinar que la deformación causó, además, la ruptura celular, y la liberación al medio de un gran número de granos paramilon.

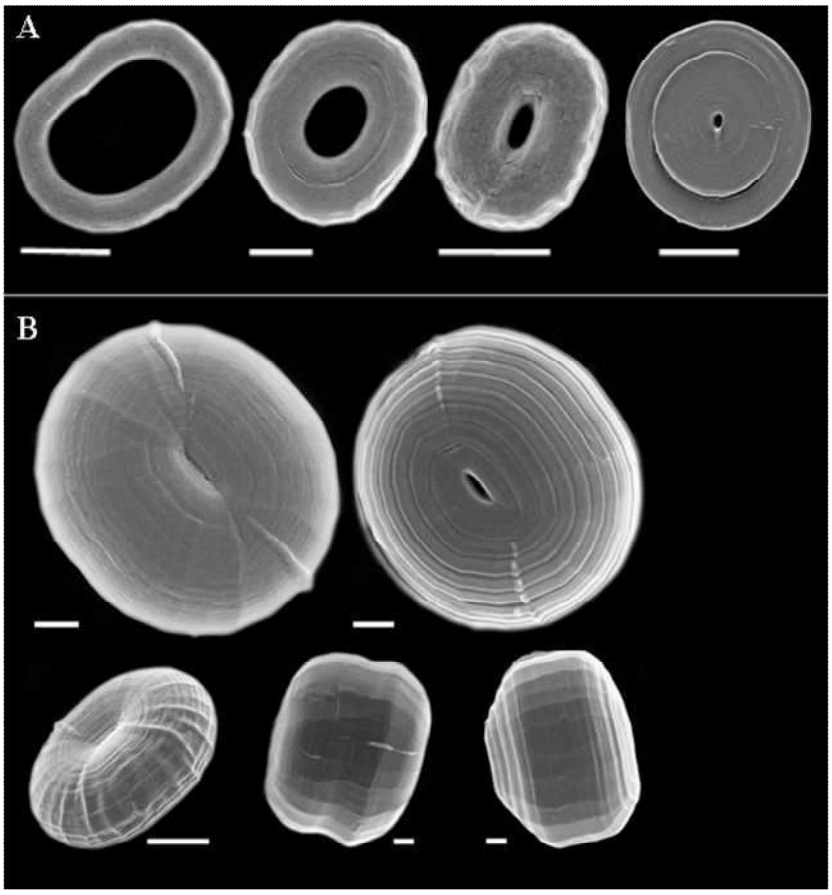


Figura 8. Imágenes de MEB de cuerpos de paramilon extraídos de células de cultivos de *P. brachykentron* control (A) y tratados con la mayor concentración de peptona (B). Escala: 1 μm.

III.4. Discusión

La mayor parte de la información sobre la ecología de euglenofitas proviene de estudios florísticos, donde el aspecto ecológico no es el tema principal. Por otro lado, la mayoría de las investigaciones hechas en este grupo se realizaron especialmente en el género *Euglena,* en particular en *E. gracilis*. En este capítulo se estudió una especie del género *Phacus,* del cual no existía información alguna sobre su empleo en estudios experimentales. Para esto se aisló *P. brachykentron* del río Matanza–Riachuelo que tiene alta contaminación orgánica. Al hacerla crecer con cantidades crecientes de materia orgánica se pudieron evaluar los efectos de este contaminante sobre su desarrollo.

Como se observó en otros euglenofitos expuestos a diferentes contaminantes, incluyendo varios metales pesados (Rocchetta *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2012), *P. brachykentron* también manifestó cambios en la morfología celular al ser cultivado con diferentes concentraciones de peptona. Las células expuestas sufrieron modificaciones significativas en sus dimensiones y forma, presentando muescas en su contorno producto de su deformación.

Los resultados obtenidos en este capítulo tienen implicancias sistemáticas importantes. La morfología globosa de las células tratadas no coincide con la descripción original del género *Phacus* hecha por Dujardin (1841), que describe a los integrantes de este taxón presentando células rígidas y más o menos aplanadas, ni con la descripción posterior de Marin *et al.* (2003), quién ratificó esta diagnosis, especificando una vez más que las células son comprimidas dorso ventralmente. Linton *et al.* (2010), sobre la base de evidencias moleculares, modificó la diagnosis del género, en donde si bien incluye la posibilidad de que las células podrían ser en forma de huso u ovoides en aspecto frontal, mantiene su forma plana lateral. Por lo cual, tampoco permite la inclusión de células alteradas en el género.

Cuando la secuenciación del ADN no está disponible, la determinación sistemática en organismos asexuales como los del el grupo euglenofita se basa únicamente en parámetros morfológicos. Siguiendo la taxonomía tradicional, según Huber-Pestalozzi (1955), algunas células encontradas en los cultivos tratados podrían ser consideradas por su morfología como otras especies. Por ejemplo, si observamos los ejemplares de la **figura 3**,

la célula de la imágen "**d**" correspondería a *P. unguis* la "**e**" a *P. acuminatus,* la "**f**" a *P. onyx*, la "**g**" a *P. brevicaudatus* y la "**h**" a *P. stokesii,* en lugar de poder ser identificadas como *P. brachykentron*. En base a estos resultados, muchos de los nuevos taxones que se describen en cuerpos de agua ricos en materia orgánica, podrían ser solo diferentes ecomorfos de una misma especie. Quedando claro también, que muchos de los taxones descriptos en la bibliografía, probablemente no sean especies diferentes y es necesario una fuerte revisión de la sistemática del grupo.

El análisis por MEB de los granos de paramilon extraídos de las células de *P. brachykentron* tratadas con peptona, evidenció un gran aumento en el volumen y un cambio en la forma de los granos de esta sustancia de reserva energética. Históricamente, el número, la forma y la morfología externa de estos cuerpos han sido ampliamente utilizados como un carácter de diagnóstico entre las especies de euglenofita (Gojdics, 1953; Conforti, 1998; Brown *et al*., 2003; Shin y Triemer, 2004; Ciugulea *et al.*, 2008; Monfils *et al*., 2011). Además el paramilon se puede utilizar a nivel de género para sostener grandes clados y relaciones genéricas, y puede dar una idea de la ubicación taxonómica al momento de la secuenciación (Monfils *et al*., 2011). En base a los cambios detectados en los granos de paramilon en este estudio y en estudios anteriores (Conforti, 1998), concluimos que ellos tienen poca utilidad diagnóstica como carácter sistemático dentro de euglenofitas, dado que su morfología es extremadamente sensible a los cambios ambientales.

Las modificaciones observadas bajo microscopía óptica en *P. brachykentron* en respuesta a la exposición a concentraciones crecientes de materia orgánica, fueron coincidente con aquellas observadas en otras especies de euglenofitas tales como *P. tortus, P. curvicaudus, Lepocinclis acus, L. spirogyra y Monomorphina pyrum* aisladas del río Matanza-Riachuelo (Conforti, 1998). En el análisis celular realizado bajo MET, se pudo evidenciar que algunas bandas de la película de las células tratadas sufrieron un ensanchamiento, el cual pudo haber permitido el aumento del volumen celular. Esto difiere de lo observado en *Lepocinclis acus* (Conforti *et al.*, en prensa) en donde en repuesta al exceso de materia orgánica las células mostraron una duplicación de las bandas peliculares. Por lo tanto, la deformación celular en euglenofita, hasta que no se demuestre alguna otra alternativa, puede ser facilitada al menos por dos mecanismos: un aumento en el número de bandas como se observó en *L. acus* o un ensanchamiento de las bandas peliculares, sin que

esto implique una alteración en la ultraestructura pelicular. En las células deformadas de *P. brachykentron* no se produjo un cambio de la orientación de las estrías, como se observó en otras especies como *L. acus* y *L. spirogyra* (Conforti, 1998), las cuales pasaron de longitudinales a espiraladas.

Como consecuencia del aumento de peptona se pudo evidenciar una disminución significativa de la tasa de crecimiento de *P. brachykentron* en todas las concentraciones ensayadas, lo que podría significar que, en ambientes naturales afectados por este tipo de contaminación, se podría reducir notablemente su abundancia. Aún así, los resultados analizados en esta investigación, no son suficientes para determinar cuál de los cambios que se dieron en el medio de cultivo por la adición de materia orgánica, fue el factor que desencadenó o tuvo más influencia para provocar la serie de alteraciones descriptas en *P. brachykentron*. Los organismos del grupo de las Euglenophyta se ven favorecidos en su crecimiento por el desarrollo de bacterias en su medio, ya que aprovechan sus metabolitos, en especial las vitaminas. El cultivo stock desarrollado en este estudio fue unialgal pero no axénico, por lo cual el incremento de la concentración de materia orgánica en los tratamientos propició el aumento de la población bacteriana y con ellas el contenido de vitaminas en el cultivo. Este factor, junto a la disminución de oxígeno, constituyen condiciones que estimulan el desarrollo de este grupo algal (Lackey, 1968). Debido al metabolismo bacteriano la concentración de oxígeno disuelto fue disminuyendo en el cultivo, al ser este utilizado por las bacterias para oxidar la materia orgánica. Por lo tanto, es probable que la combinación de estos dos factores (cantidad de metabolitos bacterianos y de oxígeno disuelto), que fueron cambiando en función de la concentración de materia orgánica, propicien las condiciones que estimulen la división celular con la consiguiente acumulación de paramilon. Sin embargo, por alguna razón, la célula se ve inhibida de reproducirse, lo cual concuerda con la disminución en la tasa de crecimiento observada. Esta imposibilidad conduce a que las células sufran deformaciones extremas, de tal grado que pueden llegar a provocar la lisis celular, liberando al medio de cultivo un gran número de cuerpos de paramilon. Este comportamiento nos estaría indicando que la alteración del cuerpo puede llegar sólo hasta un cierto punto. Este fenómeno también fue observado en otros bioensayos celulares realizados con euglenofitas (Conforti, 1998; Bauer, *et al*., 2012; Conforti *et al*., en prensa), por lo cual ésta podría ser la causa de la presencia de numerosos

granos de paramilon en aguas del río Matanza, en donde habitan varios géneros de euglenofitas.

III.5. Conclusiones

Se puede concluir que la deformación de la célula de *P. brachykentron* observada frente a un exceso de materia orgánica, se puede producir por un ensanchamiento de algunas bandas peliculares, sin que éstas sufran alteración de su ultraestructura normal. Cuando estas deformaciones superan un cierto grado, se produce la lisis celular.

En *P. brachykentron*, las dimensiones celulares y la estructura de los cuerpos de paramilon, caracteres que se utilizan normalmente en su determinación sistemática, fueron fuertemente afectados por el medio enriquecido, lo que sugiere que los organismos que se identifican como diferentes especies en ambientes con alta carga de materia orgánica, ya sea natural o por contaminación, pueden llegar a ser tan sólo ecomorfos del mismo taxón.

Es notable también, aunque no sabemos ciertamente la causa, que este tipo de cambio ambiental afectó la tasa de crecimiento celular de esta especie.

En organismos asexuales (como los estudiados en este capítulo), en los que la determinación sistemática se basa fundamentalmente sobre características morfológicas, estos cambios son particularmente preocupantes, quedando claro, una vez más, la necesidad de una revisión cuidadosa de la sistemática de este grupo.

La respuesta morfológica observada en este organismo, con el agregado de diferentes niveles de materia orgánica, fue rápida (dentro de las 48 horas de exposición al contaminante). Por consiguiente, podemos conjeturar que la frecuencia y el grado de alteración de las células deformadas, están relacionados con la magnitud del estrés al que fueron expuestas.

Sobre la base de estos resultados, todo indicaría que la presencia de células deformadas en muestras naturales y / o la observación de cuerpos voluminosos de paramilon intracelulares, serían parámetros a tener en cuenta para ser utilizados como posibles bioindicadores ambientales de ecosistemas acuáticos enriquecidos con materia orgánica.

CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis se abordó la problemática asociada a la contaminación de cursos de agua, estudiando su impacto a escala ecológica, escala de organismo y escala bioquímica. Con estos enfoques se pudo evaluar el impacto de la contaminación compleja sobre el fitoplancton de un arroyo y el impacto de dos tipos de contaminantes habituales en estos cursos de agua sobre dos especies fitoplanctónicas.

De todo lo analizado en esta tesis se desprende las siguientes conclusiones generales:

- La elevada contaminación del arroyo Carabassa se debió a una conjunción de factores antrópicos y naturales. La descarga de diferentes contaminantes en el arroyo tuvo un impacto en la calidad del agua que se reflejó en un alto grado de eutrofización, lo cual incidió sobre la comunidad fitoplanctónica y biomarcadores de estrés oxidativo en los sitios más comprometidos.
- El ingreso de materia orgánica y nitrógeno orgánico de origen antrópico constituyó una fuente de enriquecimiento de nutrientes que determinó un aumento de la densidad fitoplanctónica y un empobrecimiento de la biodiversidad.
- En los sitios con mayor carga orgánica dominó la clase Chlorophyceae con codominancia de Euglenophyceae y Cyanophyceae.
- Las condiciones eutróficas condujeron a un incremento de los procesos de oxidación de la materia orgánica con la consecuente disminución del oxígeno disuelto en el agua. Esta disminución se acentuó debido a factores naturales como la presencia de una escasa pendiente que impide una suficiente oxigenación del agua.
- El grado de deterioro de las aguas habrían inducido respuestas antioxidantes y detoxificantes en el fitoplancton. Sin embargo, esas respuestas de defensa no fueron suficientes para contrarrestar el daño oxidativo.
- El arsenito de sodio inhibió el crecimiento de *Euglena gracilis* y provocó alteraciones en la morfología y el metabolismo de la especie, particularmente en parámetros relacionados con estrés oxidativo, lo cual sugiere la participación de este mecanismo en la toxicidad del metaloide.

- El enriquecimiento orgánico en cultivos de *Phacus brachykentron* produjo una disminución significativa de su tasa de crecimiento. Ese efecto se vio acompañado, además, por alteraciones en la morfología y la ultraestructura celular.
- Las alteraciones incluyeron: ensanchamiento de algunas bandas de la película proteica celular, sin afectar su número, desorganización de los tilacoides plastidiales, y un gran desarrollo de los granos de paramilon.
- Algunos de los parámetros que se utilizan normalmente en su determinación sistemática, fueron fuertemente afectados por el medio enriquecido, lo que sugiere que los organismos que se identifican actualmente como diferentes especies pueden llegar a ser, en realidad, ecomorfos del mismo taxón.
- Todos los resultados obtenidos en el estudio del efecto del aumento de materia orgánica sobre *P. brachykentron,* dejan en claro que es necesaria una fuerte revisión sistemática de este grupo de microalgas.

Bibliografía

ABIA. Asociación Bonaerense de Investigaciones Ambientales. http://www.abia.org.ar/

Ács, É.; Borsodi, A.K.; Makk, J.; Molndr, P.; Mózes, A.; Rusznyák, A.; Reskóné, M.N.; Kiss, K.T.; 2003. Algological and bacteriological investigations on reed periphyton in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506–509: 549–557.

ACUMAR, 2012. Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo. Sistema de Indicadores. Publicación Anual 2012. http://www.acumar.gov.ar/content/documents/8/2048.pdf

ACUMAR, 2011. Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo. Monitoreo del A° Cañuelas. Informe N° 18/11. Informe 2004-Facultad de Ingeniería UNLP-Valor límite para cuerpos de agua no alterados.
http://www.acumar.gov.ar/Informes/Control/CalAmb/Enero2012/AGUA%20SUPERFICIAL/INFORMES/CA%C3%91UELAS/Monitoreo%20calidad%20de%20arroyos%20CA%C3%91UELAS_%20agosto%202011.pdf

Adams, S. M. 2005. Using multiple response bioindicators to assess the health of estuarine ecosystems: An operational framework. In Bortone, S.A. (ed.) Estuarine Indicators. Boca Raton, FL, CRC Press. 5–18 pp.

Adl, S. M; Simpson, A .G. B.; Lane C. E.; Lukes, J.; Bass, D.; Bowser, S. S.; Brown, M. W.; Burki, F.; Dunthorn, M.; Hampl, V.; Heiss, A.; Hoppenrath, M.; Lara, E.; Le Gall, L.; Lynn, D. H.; Mcmanus, H.; Mitchell, E. A. D.; Mozley-Standridge, S. E.; Parfrey, L. W.; Pawlowsky, J.; Rueckert, S.; Shadwick, L.; Schoch, C. L.; Smirnov, A.; Spiegel, F. W. 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol*. 59 (5): 429–493 pp.

Aebi, H. 1984. Methods in Enzymology. In: Catalase in Vitro. Colowick SP, Kaplan NO (eds). Florida: Acad. Press. 105: 114–121.

Aguilera, A. y Amils, R., 2005. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto river (SW, Spain). *Aquat. Toxicol.* 75 (4) 30: 316-329.

Al-Mutairi, N. Z.; Hamoda, N. F.; Al-Ghusain, I. 2004. Coagulant selection and sludge conditioning in a slaughtehouse wastewater treatment plant. *Bioresource Technol*. 95: 115-119.

Alba-Tercedor, J.; Jáimez-Cuéllar, P.; Álvarez, M.; Avilés, J.; Bonada, N.; Casas, J.; Mellado, A.; Ortega, M.; Pardo, I.; Prat, N.; Rieradevall, M.; Robles, S.; Sáinz-Cantero, C.; Sánchez-Ortega, A.; Suárez, M. L.; Toro, M.; Vidal-Abarca, M. R.; Vivas, S.; Zamora-Muñoz, C. 2002. Caracterización de cuencas mediterráneas españolas en base al índice español SBMWP como paso previo al establecimiento del estado ecológico de sus cursos de agua. Libro de Resúmenes del XI Congreso de la Asoc. Esp. Limnología. Madrid, España.

Albores, A.; Quintanilla, B.; Del Razo, L.; Cebrian, M. (1997). Arsénico. Introducción a la Toxicologıa ambiental. OPS, OMS, CPEHSPA. Metepec, 247-261.

Allen-Gil, S. M.; Gubala, C. P.; Wilson, R.; Landres, D. H.; Wade, T. L.; Sericano, J. L.; Curtis, L. R. 1997. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments and biota from four U.S. Artic lakes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33 (4): 378-387.

Andrade, M. I. 1986. Factores del deterioro ambiental de la cuenca del Río Luján. Contribución del Instituto de Geografía, Facultad de Filosofía y Letras. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Andrade, L. R.; Farina, M. y Amado Filho, G. M. 2004. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotox. Environ. Safe*. 58: 117-125.

Andrade, L. R.; Leal, R. N.; Noseda, M.; Duarte, M. E. R.; Pereira, M. S.; Mourão, P. A. S.; Farina, M.; Amado Filho, G. M. 2010. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Mar. Pollut. Bull*. 60 (9): 1482-1488.

Angel, B. M.; Vallotton, P.; Apte, S. C. 2015. On the mechanism of nanoparticulate CeO2 toxicity to freshwater algae. *Aquat. Toxicol*. 168: 90-97.

Antón, A. y Lisazo, J. 2001. Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. http://www.proyectopandora.es/wpcontent/uploads/Bibliografia/13181019_nitritos_nitratos.pdf

Anuario de Estadísticas agrícolas de Puerto Rico, 2003. Departamento de Agricultura (DA), 2004. Oficina de Estadísticas Agrícolas. Estado Libre Asociado de Puerto Rico, Departamento de Agricultura. 124 pp.

APHA, 1993. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewaters. 16th (ed). NW, Washington DC. 874 pp.

APHA, 2005. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewaters. 21st edn; Centennial Edition. American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington DC, USA.

Aposhian, H. V.; Zakharyan, R. A.; Avram, M. D.; Sampayo-Reyes, A.; Wollenberg, M. L. 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol. Appl. Pharm*. 198(3): 327-335.

Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol*. 50: 601 639.

Asselborn, V.; Fernández, C.; Zalocar, Y.; Parodi, E. R. 2015. Effects of chlorpyrifos on the growth and ultrastructure of green algae, *Ankistrodesmus gracilis*. *Ecotox. Environ. Safe*. 120: 334-341.

Atlas, R. M. y Bartha, R. 1992. Hydrocarbon biodegradation. *Mar. Pollut. Bull*. 31: 178-182.

Avilés, C.; Loza, H.; Terry, N.; Moreno-Sánchez, R. 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol*. 180:1-10.

Avilés, C.; Torres-Márquez, M. E.; Mendoza-Cózatl, D.; Moreno-Sánchez, R. 2005. Time-course development of the Cd2+- hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol*. 184:83-92.

Bahar, M. M.; Megharaj, M.; Naidu, R. 2013a. Toxicity, transformation and accumulation of inorganic arsenic species in a microalga *Scenedesmus* sp. isolated from soil. *J. Appl. Phycol*. 25: 913–917.

Bakar, L. A.; Amin, N. M.; Zakeri, H. A. 2015. Impact of mercury (II) nitrate on physiological and biochemical characteristics of selected marine algae of different classes. *Procedia Environ Sci*. 30: 222-227.

Baker, C. J. y Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol*. 33: 299-321

Baos, R.; Garcia-Villada, L.; Agrelo, M.; Lopez-Rodas, V.; Horaldo, F.; Costas, E. 2002. Short term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental

model analysing the resistence of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophycea) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur. J. Phycol.* 37: 593-600.
Barrenechea, A. 2008. Aspectos fisicoquímicos de la calidad del agua. Manual I, Teoría. (1): 2-55.

Barton, L.; Colmer, T. D. 2006. Irrigation and fertiliser strategies for minimising nitrogen leaching from turfgrass. *Agr. Water Manage*. 80 (1): 160-175.

Bartram, J. y Ballance, R. 1996. Water Quality Monitoring: A Practical Guide to the Design of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programme. CRC Press. 383 pp.

Bauer, D. E.; Conforti, V.; Ruiz, L.; Gómez, N. 2012. An in situ test to explore the responses of *Scenedesmus acutus* and *Lepocinclis acus* as indicators of the changes in water quality in low land streams. *Ecotox. Environ. Safe*. 77: 71-78.

Beauchamp, C. y Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*. 44: 276–286.

Becaro, A. A; Jonssonc, C. M; Putia, F. C; Siqueirab, M. C; Mattosob, L. H. C; Correaa, D. S.; Ferreiraa, M. D. 2015. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. *Environ. Nanotechnol., Monit. Manage*. 3: 22–29.

Bellinger, E. G. y Sigee, D. C. 2010. Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators. Wiley-Blackwell. 271 pp.

Berón, L., 1984. Evaluación de la calidad de las aguas de los ríos de la Plata y Matanza – Riachuelo mediante la utilización de índices de calidad de agua, Secretaría de Vivienda y Ordenamiento Ambiental, Ministerio de Salud y Acción Social, Buenos Aires.

Bhattacharjee, H.; Mukhopadhyay, R.; Thiyagarajan, S.; Rosen, B. P. 2008. Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids. *J. Biol*. 7:33.

Binelli, A.y Provini, A. 2003. The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere*. 53: 143–151.

Birungi, Z. S. y Chirwa, E. M. N. 2015. The adsorption potential and recovery of thallium using green micro-algae from eutrophic water sources. *J. Hazard. Mater*. 299: 67-77.

Blanck, H.; Admiraal, W.; Cleven, R. F. M. J.; Guasch, H.; Van den Hoop, M. A. G. T.; Ivorra, N.; Nystrom, B.; Paulsson, M.; Petterson, R. P.; Sabater, S.; Tubbing, G. M. J.; 2003. Variability in Zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 european river stretches. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 44: 17–29.

Blanck, H.; Eriksson, K. M.; Grönvall, F.; Dahl, B.; Martinez Guijarro, K.; Birgersson, G.; Kylin, H. 2009. A retrospective analysis of contamination and periphyton PICT patterns for the antifoulant irgarol 1051, around a small marina on the Swedish west coast. *Mar. Pollut. Bull*. 58: 230–237.

Blanck, H. y Wängberg, S. A. 1988. Induced community tolerance in marine periphyton established under arsenate stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 45: 1816-1819.

Blanck, H.; Wangberg, S. A.; Molander, S. 1998. Pollution-induced community tolerance. A new ecological tool. En: Cairns Jr., J., Pratt, J.R. (eds.). Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals. ASTM STP 988. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 219–230.

Blasi, A.; Castiñeira Latorre, C.; Del Puerto, L.; Prieto, A. R.; Fucks, E.; De Francesco, C.; Hanson, P. R.; García-Rodriguez, F.; Huarte, R.; Carbonari, J.; Young A. 2010. Paleoambientes de la cuanca media del Río Luján (Buenos Aires, Argentina) durante el último período glacial (EIO 4-2). *LAJSBA*. 17 (2): 85-111.

Bloomfield, M. M. 2001. Química de los organismos vivos. Ed. Limusa. México. D. F. 767 pp.

Bocanegra, O. C.; Bocanegra, E. M.; Álvarz, A. A. 2002. Arsénico en aguas subterráneas: su impacto en la salud.

Bonnineau, C.; Tlili, A.; Faggiano, L.; Montuelle, B.; Guasch, H.. 2014. The use of antioxidant enzymes in freshwater biofilms: Temporal variability vs. toxicological responses. *Aquat. Toxicol*. 136-137: 60-71.

Booij, P.; Sjollema, S. B.; Van der Geest, H. G.; Leonards, P. E. G.; Lamoree, M. H.; Pim de Voogt, W.; Admiraal, W.; Laane, R. W. P. M.; Vethaak, A. D. 2015. Toxic pressure of herbicides on microalgae in Dutch estuarine and coastal waters. *J. Sea Res*. 102: 48-56.

Bottino, N. R.; Newman, R. D.; Cox, E. R.; Stockton, R.; Hoban, M.; Zingaro, R. A.; Irgolic, K. J. 1978. The effects of arsenate and arsenite on the growth and morphology of the marine unicellular algae *Tetraselmis chui* (Chlorophyta) and *Hymenomonas carterae* (Chrysophyta). *J. Ex. Mar. Biol. Ecol*. 33: 153-168.

Boyle, T. P. 1984. The effect of environmental contaminants on aquatic algae. Algae as Ecological Indicators. Shubert, L. E. (ed.) Academic Press, London, 237-256 pp.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.

Brezonik, P. L. y Fulkerson-Brekken, J. 1998. Nitrate-induced photolysis in natural waters: controls on concentrations of hydroxyl radical photo-intermediates by natural scavenging agents. *Environ. Sci. Technol*. 32: 3401-3010.

Brown, P. J. P.; Zakryś, B.; Farmer, M. 2003. Plastid morphology, ultrastructure and development in *Colacium* and the loricate euglenophytes (Euglenophyceae). *J. Phycol*. 39: 115–121.

Buege, J. A.; Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid, Peroxidation. In: Flesicher, S.; Packer, L. (eds.). *Method. Enzymol*. Academic Press, New-York. 52: 302–310.

Buetow, D. E. 1982. The biology of *Euglena*. Academic Press., New York. 3: 200-201.

Buettner, G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys*. 300: 535-543.

Bundschuh, J.; Farias, B.; Martin, R.; Storniolo, A.; Bhattachary, P.; Cortes, J.; Bonorino, G.; Albouy, R. 2004. Groundwater arsenic in the Chaco-Pampean Plain, Argentina: case study from Robles country, Santiago del Estero Province. *Appl. Geochem*. 19: 231–243.

Cakmak, I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plants cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytolo*. 146: 185-205.

Cal EPA, 2012. California Environmental Protection Agency - State Water Resources Control Board. California Ocean Plan. http://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/ocean/docs/cop2012.pdf

Campbell, P. G. C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Tessier, A. y Turner, D. R. (eds.). Jhon Wiley. New York. 45-102.

Campos, V.; Valenzuela, C.; Alcorta, M.; Escalante, G.; Mondaca1, M. 2007. Isolation of arsenic resistance bacteria from volcanic rocks of quebrada Camarones, Parinacota Region. Chile. *Gayana*. 71 (2): 150-155.

CAN (Comunidad Andina) 2005. Manual de Estadísticas Ambientales. Santa Cruz de la Sierra. 31-45.

Capó Martí, M. A. 2002. Principios de Ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Mc Graw Hill, Madrid. 320 pp.

Carmeli, E.; Coleman, R.; Berner, Y. 2004. Activities of antioxidant scavenger enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) in erytrocytes in adult women with and without type II diabetes. *Exp. Diabesity Res*. 5: 171-175.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) 2105. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. 17° ed. Argentina, 1200 pp.

Castañé, P.M.; Loez, C. R.; Olguín, H. F.; Puig, A.; Rovedatti, M. G.; Topalián, M. L.; Salibián, A. 1998. Caracterización y variación especial de parámetros fiscioquímicos y del plancton en un río urbano contaminado (Río Reconquista, Argentina). *Rev. Int. Contam. Ambient.* 14 (2): 69-77.

Castañé, P. M.; Sánchez-Caro, A.; Salibián, A. 2015. Water quality of the Luján river, a lowland watercourse near the metropolitan area of Buenos Aires (Argentina). *Environ. Monit. Assess*. 187: 645.

Casiot, C.; Bruneel, O.; Personné, J-C.; Leblanc, M.; Françoise Elbaz- Poulichet, M. L. 2004. Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoule`s, France). *Sci. Total. Environ*. 320: 259–267.

Castelán Vega, R.; Tamariz Flores, V.; Linares Fleites, G.; Cruz Montalvo, A. 2014. Agresividad de las precipitaciones en la subcuenca del río San Marcos, Puebla, México. Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM ISSN 0188-4611. 83: 28-40.

Caumette, G.; Koch, I.; Reimer, K. J. 2012. Arsenobetaine formation in plankton: a review of studies at the base of the aquatic food chain. *J. Environ. Monitor*. 14: 2841–2853.

Cavalier-Smith, T. 1981. "Eukaryote Kingdoms: Seven or Nine?" *BioSystems* 14 (3–4): 461–481.

Cavalier-Smith, T.; Chao, E. E.; Snell, E. A.; Berney, C.; Fiore-Donno, A. M.; Lewis, R. 2014. Multigene eukaryote phylogeny reveals the likely protozoan ancestors of opisthokonts (animals, fungi, choanozoans) and Amoebozoa. *Mol. Phylogenet. Evol*. 81: 71–85.

CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa). 2001. Catalogue of Strains. En Natural Environment Research Council. (ed). Thompson, A. S.; Rhodes, J. C. y Pettman, I.

CCME, 1999. Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. 1-5.

CCME, 2002. Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Total Particulate Matter.1-13.

Cervantes, C.; Espino-Saldaña, A. E.; Acevedo-Aguilar, F.; León-Rodríguez, I. L.; Rivera-Cano, M. E.; Avila-Rodríguez, M.; Wróbel-Kaczmarczyk, K.; Wróbel-Zasada, K.; Gutiérrez- Corona, J. F.; Rodríguez-Zavala, J. S.; Moreno-Sánchez, R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Lat. Microbiol.* 48 (2): 203-210.

Chapman, D. 1996. Water Quality Assessments: A guide to use Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring. UNESCO/ WHO/UNEP University Press, Cambridge. 609 pp.

Chen, H.; Chen, J.; Guo, Y.; Wen, Y.; Liu, J.; Liu, W. 2012. Evaluation of the role of the glutathione redox cycle in Cu (II) toxicity to green algae by a chiral perturbation approach. *Aquat. Toxicol*. 120–121: 19-26.

Chen, Y. C.; Lin-Shiau, S. Y.; Lin, J. K. 1998. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol*. 177 (2): 324-33.

Chen, X.; Tian, D.; Kong, X.; Chen, Q.; Abd_Allah, E. F.; Hu, X.; Jia, A. 2016. The role of nitric oxide signalling in response to salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 1-19.

Chernova, E. N.; Potikha, E.V.; Nesterenko, O.E. 2015. The Content of Heavy Metals in Bottom Sediments of the Streams of the Sikhote-Alin Biosphere Reserve and the Streams Draining Mines of the Transit Zone of the Reserve. *Achievements in the Life Sciences* 9: 9–14.

Chronopoulou, E.; Axarli, I.; Nianiou-Obeidat, I.; Madesis, P.; Tsaftaris, A.; Labrou, N. E. 2011. Structure and antioxidant catalytic function of plant glutathione transferases. *Curr. Chem. Biol*. 5 (1): 64-74.

CIC, 1999. Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata. Grupo de Trabajo en Niveles Guía de Calidad del Agua.

Ciugulea, I.; Nudelman, M. A.; Brosnan, S.; Triemer, R. E. 2008. Phylogeny of the euglenoid loricate genera *Trachelomonas* and *Strombomonas* (Euglenophyta) inferred from Nuclear SSU and LSU rDNA. *J. Phycol*. 44: 406–418.

Cobbett, C. y Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol*. 53, 159–182.

Codex Alimentarius, 2004. Textos Básicos sobre Higiene de los Alimentos, Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma, segunda edición. http://www.fao.org/DOCREP/005/y1579s/y1579s00.

Cohen, J. E. 2003. Human population: the next half century. *Science* 302: 1172–1175.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução N° 357. 18/03/2005, Diário Oficial da União em 19/03/2005.

Conforti, V. 1991. Taxonomic study of the Euglenophyta of a highly polluted river of Argentina. *Nova Hedwigia*. 53 (1-2): 73-98.

Conforti, V. 1998. Morphological changes of Euglenophyta in response to organic enrichment. *Hydrobiologia*. 369: 277-285.

Conforti, V.; Alberghina, J.; Gonzalez Urda, E. 1995. Structural changes and dynamics of the phytoplankton along a highly polluted lowland river of Argentina. *J. Aquat. Ecosyst. Health*. 4: 59–75.

Conforti, V.; Lionardi, M.; Segura, M.; Rojo. C. 2005. Las Euglenófitas en Las Tablas de Daimiel como ejemplo de las limitaciones de los indicadores biológicos de la degradación ambiental. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 62 (2): 163-179.

Conforti, V.; Ruiz, L. B.; Leonardi, P. En prensa. Ultrastructural alterations in *Lepocinclis acus* (Euglenophyta) induced by medium enriched with organic matter.

Cordero, J.; Guevara1, M.; Morales, E.; Lodeiros, C. 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Rev. Biol. Trop.* (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744). 53 (3-4): 325-330.

Cosme, N.; Koski, M.; Hauschild, M. Z. 2015. Exposure factors for marine eutrophication impacts assessment based on a mechanistic biological model. *Ecol. Model*. 317: 50–63.

Cravero, M. F.; Domínguez E.; Murray H. H. 1991.Valores δO18 y δD en caolinitas, indicadores de un clima templado moderado durante el Jurásico Superior-Cretácico Inferior de la Patagonia,Argentina. *Rev. Asoc. Geol. Arg*. XLVI, 1-2: 20-25.

Da Silva Nunes, M. A.; Horn, A. H.; Rodriguês, W. F.; Bilal, E. 2014. Environmental conditions on the eastern part of the Caparaó Range National Park and its sourroundings, Espírito Santo State, Brazil. *Rom. J. Mineral Deposits*, *87*(2), 61-66.

Dao, L. H. T. y Beardall, J. 2016. Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. *Chemosphere*. 147: 420-429.

Das, B. K.; Roy, A.; Koschorreck, M.; Mandal, S. M.; Wendt-Potthoff, K.; Bhattachary, J. 2009. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Res*. 43: 883–894.

Deacon, J. R y Driver, N. E. 1999. Distribution of trace elements in streambed Sediment associated with mining activities in the upper Colorado River Basin, Colorado, USA, 1995-96. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 7-18.

Debenest, T.; Pinelli, E.; Coste, M.; Silvestre, J.; Mazzella, N.; Madigou, C.; Delmas, F. 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat. Toxicol*. 93:11-17.

De Cabo, L.; Arreghini, S.; Fabrizio de Iorio, A.; Rendina, A.; Bargiela, M.; Vella, R.; Bonetto, C. 2000. Impact of the Morón stream on water quiality of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.*, n.s 2 (2):123-130.

De Castro Carranza, C. 2013. En defensa de una teoría Gaia orgánica. *Ecosistemas*. 22 (2): 113-118.

De Gara, L.; Locato, V.; Dipierro, S.; de Pinto, M. C. 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Res. Physiol. Neurobi*. 173: S13 - S19.

Demidchik, V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot*. 109: 212-228.

Depledge, M. H.; Amaral-Mendes, J. J.; Daniel, B.; Halbrook, R. S.; Kloepper-Sams, P.; Moore, M. N.; Peakall, D. P. 1993. The conceptual basis of biomarker approach. En: D, P., Shugart, L.R. (eds.). Biomarkers—Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Advances in Marine Pollution. Springer, Berlin. 15–29.

Dewez, D.; Geoffroy, L.; Vernet, G.; Popovic, R. 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol*. 74: 150–159.

DOF, 1989. Acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. CE-CCA- 001/89. Diario Oficial de la Federación. México. 1989 (13 de diciembre).

Dokulil, M. 1996. Evaluation of eutrophication potential in rivers: the Danube example, a review. In: Rott, E., Whitton, B.A. (eds.). Use of Algae for Monitoring Rivers II. University Innsbruck, Innsbruck. 173–179.

Domenech, X. y Peral, J. 2008. Química Ambiental de Sistemas Terrestres. Editorial Reverté. Barcelona, España. 239 pp.

Dujardin, F., 1841. In: Histoire naturelle des Zoophytes. Infusoires Roret. Paris. Huber-Pestalozzi, G., 1955. Das phytoplankton des Süsswassers. Systematik und Biologie. Euglenophyceen, Stuttgart.

Duncan, E.; Foster, S.; Maher, W. 2010. Uptake and metabolism of arsenate, methylarsonate and arsenobetaine by axenic cultures of the phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Bot. Mar*. 53: 377–386.

Duncan, E. G.; Maher, W. A.; Foster, S. D. 2015. Contribution of arsenic species in unicellular algae to the cycling of arsenic in marine ecosystems. *Environ. Sci. Technol*. 49: 33–50.

Duncan, E. G.; Maher, W. A.; Foster, S. D.; Krikowa, F. 2013a. Influence of culture regime on arsenic cycling by the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta* and *Thalassiosira pseudonana*. *Environ. Chem*. 10: 91–101.

Duncan, E. G.; Maher, W. A.; Foster, S. D.; Krikowa, F. 2013b. The influence of arsenate and phosphate exposure on arsenic uptake, metabolism and species formation in the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Mar. Chem*. 157: 78–85.

Dubois, M.; Gills, K.; Hamilton, J.; Rebers, P.; Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem*. 28: 350-356.

Edmonds, J. S.; Shibata, Y.; Francesconi, K. A.; Rippington, R. J. Y Morita, M. 1997. Arsenic transformations in short marine food chains studied by HPLC-ICP MS. *Appl. Organomet. Chem*. 11: 281–287.

Elbaz, A.; Wei, Y. Y.; Meng, Q.; Zheng, Q.; Yang, Y. Z. 2010. Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicol*. 19: 1285–1293.

Errécalde, O. y Campbell, P.G. C. 2000. Cadmiunm and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): accidental metal uptake and toxicity in the precense of citrate. *J. Phycol*. 36: 473-483.

Escribano, M. y De Frutos, M. 1987. Impactos sobre la calidad de las aguas superficiales. 443-453. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes (eds.). La práctica de las estimaciones de impactos ambientales, tomo 3. Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid, España.

Espina, S.; Diaz F.; Rosas, C.; y Rosas, I. 1986. Influencia del detergente sobre el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* a través de un bioensayo crónico. *Rev. Int. Contam. Ambie*. 2 (1): 25-37.

Esson, H. J. y Leander, B.S. 2006. A model for the morphogenesis of strip reduction patterns in phototrophic euglenids: evidence for heterochrony in pellicle evolution. *Evol. Dev*. 8: 378-388.

Falasco, E.; Bona, F.; Badino, G.; Hoffmann, L.; Luc, E. 2009. Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*. 623: 1-35.

Fairchild, J. F.y Sappington, L. C.; 2002. Fate and effects of the triazinone herbicide metribuzin in experimental pond mesocosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 43: 198-202.

FAO. 1981. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4ª. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. *Doc. Téc. Pesca*.164: 34 pp.

Farías, S. S.; Casa, V. A.; Vázquez, C.; Ferpozzi, L.; Pucci, G. N.; Cohen, I. M. 2003. Natural contamination with arsenic and other trace elements in ground waters of Argentine Pampean Plain. *Sci. Total Environ*. 309:187–199.

Fernández Cirelli A. y Ojeda, C. 2008. Wastewater management in Greater Buenos Aires, Argentina. *Desalination*. 218: 52–61.

Feijoó, C. S.; Giorgi, A.; García, M. E.; Momo, F. 1999. Temporal and spatial variability in streams of a pampean basin. *Hydrobiologia* 394: 41–52.

Ferrari, S. G.; Silva, P.G. ; González, D. M.; Navoni, J. A.; Silva, H. J. 2013. La tolerancia de arsénico de cepas de cianobacterias con uso potencial en la biotecnología. *Rev. Argent. Microbiol*. 45 (3): 174-179.

Ferrera-Cerrato, R.; Rojas-Avelizapa, N. G.; Poggi-Varaldo, H. M.; Alarcón, A.; Cañizares-Villanueva, R. O. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol*. 48 (2): 179-187.

Flora, S. J. S. 1999. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of Nacetylcysteine and meso 2, 3-dimercaptosuccinic acid in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. P*. 26: 865–869.

Flora, S. J. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Bio. Med*. 51 (2): 257-281.

Foster, S.; Thomson, D.; Maher, W. 2008. Uptake and metabolism of arsenate by anexic cultures of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Chem*. 108: 172–183.

Franco, D. P. M.; Manzano, J. Q.; Cuevas, A. L. 2010. Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *ContactoS*, 78, 25-33. ISO 690.

Fujita, M.; Fujita, Y.; Noutoshi, Y.; Takahashi, F.; Narusaka, Y.; Yamaguchi-Shinozaki K.; Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current

view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 4: 436-442.

Fujiwara, S.; Kobayashi, I.; Hoshino, S.; Kaise, T.; Shimogawara, K.; Usuda, H.; Tsuzuki, M. 2000. Isolation and characterization of arsenate-sensitive and resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Cell. Physiol*. 41: 77–83.

García-Balboa, C.; Baselga-Cervera, B.; García-Sanchez, A.; Igual, J. M.; Lopez-Rodas, V.; Costas, E. 2013. Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquat. Toxicol*. 144–145 (15): 116-123.

García, M. G.; Sracek, O.; Fernández, D. S.; del Valle Hidalgo, M. 2007. Factors affecting arsenic concentration in groundwaters from Northwestern Chaco-Pampean Plain, Argentina. *Environ. Geol*. 52:1261–1275.

Gerber, R.; Smit, N. J.; van Vuren, J. H.; Nakayama, S. M.; Yohannes, Y. B.; Ikenaka, Y.; Ishizuka, M.; Wepener, V. 2015. Application of a Sediment Quality Index for the assessment and monitoring of metals and organochlorines in a premier conservation area. *Environ. Sci. Pollut. R*. 22 (24): 19971-19989.

Ghetti P. F. 1980. Biological indicators of the quality of running waters. *Boll. Zool*. 47: 381-390

Gibbs, S. 1978. The chloroplast of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot*. 56: 2883–2889.

Gihring, T. M.; Druschel, G. K.; McCleskey R. B.; Hamers, R. J.; Banfield, J. F. 2001. Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. *Environ. Sci. Technol*. 35 (19): 3857-3862.

Giorgi, A.; Banchero, M.; Rivelli, S.; Clarensio, O.; Cuevas, W. 1999 Algunas variables indicativas de la calidad del agua del tramo medio del Río Luján. En: VII Jornadas pampeanas de Ciencias Naturales, *COPROCNA*. 155-159.

Giorgi, A. 2001. Cost of remediation of the Lujan River (Argentina). *T. Ecol. Environ*. 46: 1743-3541.

Giorgi, A., y Malacalza, L. 2002. Effect of an industrial discharge on water quality and periphyton structure in a pampeam stream. *Environmental Monitoring and Assessment*, 75(2): 107-119.

Girotti, A.W. 2001. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol*. 63: 103-113.

Glaesener, A. G.; Merchant, S. S.; Blaby-Haas, C. E. 2013. Iron economy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front Plant Sci.* 4: 337.

Gojdics, M., 1953. The Genus *Euglena*. Madison, University of Wisconsin Press. 268 pp.

Gómez, N. y O'Farrell, I. 2014. Phytoplackton from urban and suburban polluted rivers. *Advanc. limnol*. 65: 127-142.

Guasch, H.; Admiraal, W.; Sabater, S. 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquat. Toxicol*. 64: 165-175.

Guasch, H.; Lehmann, V.; Van Beusekom, B.; Sabater, S.; Admiraal, W. 2007. Influence of phosphate on the response of periphyton to atrazine exposure. Arch. Environ. *Contam. Toxicol*. 52: 32-37.

Gustavson, K. y Wangberg, S. A. 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquat. Toxicol*. 32: 283–302.

Habig, W.; Pabst, M.; Jakoby, W. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem*. 249 (22): 7130-7139.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J*. 219: 1-14.

Halliwell, B.y Gutteridge, J. M. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3erd ed. Oxford University Press. New York. 936 pp.

Halter, D.; Casiot, C.; Heipieper, H. J.; Plewniak, F.; Marchal, M.; Simon, S.; Arsène-Ploetze, F.; Bertin, P. N. 2012. Surface properties and intracellular speciation revealed an original adaptive mechanism to arsenic in the acid mine drainage bio-indicator *Euglena mutabilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 93: 1735–1744.

Hartley - Whitaker, J.; Ainsworth, G.; Meharg, A. A. 2001. Copper - and arsenate - induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell Environ*. 24 (7): 713-722.

Hassan, H. M. y Scandalios, J. M. 1990. Superoxide dismutases in aerobic organisms. En Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatation Mechanisms. (eds.) Alscher, R. G. y Cumming, J. R. Wiley-Liss, New York. 175-199.

Hellawell, J. M. 1978. Biological surveillance of rivers. Water Research Center. Stevenage. 332 pp.

Hellawell, J. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Ed. Elsevier applied science London and New York 546 pp.

Henry, J. G. y Heinke, G. W. 1999. Ingeniería ambiental. Pearson Educación.

His, E.; Beiras, R.; Seaman, M. N. L. 1999. The Assessment of Marine Pollution - Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae. *Adv. Mar. Biol*. 37: 1-178.

Hodges, D. M; Andrews, C. J; Johnson, D. A; Hamilton, R. I. 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *J. Exp. Bot*. 48: 1105-1113.

Hodges, D. M.; Delong, J. M.; Forney, C. F.; Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and othes interfering compounds. *Planta*. 207: 604-611.

Hörcsik, Z.; Oláh, V.; Balogh, Á.; Mészáros, I.; Simon, L.; Lakatos, G. 2006. Effects of Chromium (VI) on growth, element and photosyntetic pigmento composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biológica Szegediensis.* 50 (1-2): 19-23.

Hu, C.; Wang, Q.; Zhao, H.; Wang, L.; Guo, S.; Li, X. 2015. Ecotoxicological effects of graphene oxide on the protozoan *Euglena gracilis*. *Chemosphere*. 128: 184-190.

Hüber-Pestalozzi, G. 1955. Das phytoplankton des sübwassers. Systematik und biologie. Ed. Schweizerbart´sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller). 5-399 pp.

Hüber-Pestalozzi, G. 1955. Die Binnengewässer. Das Phytoplankton des Süsswasser 16 (4). Verlag Schweizerbart, Stuttgart. 606 pp.

Huntsman, S.A. y Sunda, W.G. 1980. The role of trace metals in regulating phytoplankton growth, with emphasis on Fe, Mn and Cu. En The physiological ecology of phytoplankton. Morris, Blackwell Scientific Publications (ed.). Londres. 285-328 pp.

INDEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2010. Censo Nacional de Población Hogares y Viviendas 2010. 378 pp.

http://www.estadistica.sanluis.gov.ar/estadisticaWeb/Contenido/Pagina148/File/LIBRO/censo2010_tomo1.pdf

Ishida, K.; Cao, Y.; Hasegawa, M.; Okada, N.; Hara, Y. 1997. The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. *J. Mol. Evol*. 45: 682–687.

Jain, A., Murti Meena, R.; Naikc, R. K.; Gomesa, J.; Bandekara, M.; Bhatb, M.; Mesquitab, A.; Ramaiaha, N. 2015. Response of polar front phytoplankton and bacterial community to micronutrient amendments. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. Parte B, 197–208.

Jasrotia, S.; Kansal, A.; Kishore, V. V. N. 2014. Arsenic phyco-remediation by *Cladophora* algae and measurement of arsenic speciation and location of active absorption site using electron microscopy. *Microchem. J*. 114: 197–202.

Jha, A. B. y Dubey, R. S. 2004. Carbohydrate metabolism in growing rice seedling under arsenic toxicity. *J. Plant Physiol*. 161: 867-872.

Ji, J.; Long, Z. y Lin, D. 2011. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chem. Eng. J*. 170 (2–3): 525-530.

Jiang, Y.; Purchase, D.; Jones, H.; Garelick, H. 2011. Technical note: effects of arsenate (As^{5+}) on growth and production of glutathione (GSH) and phytochelatins (PCS) in *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Phytoremediat*. 13: 834–844.

Johnstone, C.; Day, J. G.; Staines, H.; Benson, E. E. 2006. An in vitro oxidative stress test for determining pollutant tolerance in algae. *Ecol. Indic*. 6: 770–779.

Juárez, A. B.; Schiariti, A.; Aldonatti, C.; Rodríguez, M. C.; Ríos de Molina, M. C. 2006. Estudios de toxicidad celular de contaminantes ambientales. 69-72. En: Jorge Herkovits

(ed.) 2° Libro de SETAC de América Latina (Proceedings). Instituto de Ciencias Ambientales y Salud, Fundación PROSAMA. 168 pp.

Juarez, A. B.; Barsanti, L.; Passarelli, V.; Evangelista, V.; Vesentini, N.; Conforti, V.; Gualtieri, P. 2008. In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. *J. Environ. Monitor*. 10(11): 1313-1318.

Jyothi, M.; Krishnakumar, G.; D'Silva, A. 2012. Removal of Pb2+ from aqueous system by live *Oscillatoria laete-virens* (Crouan and Crouan) Gomont isolated from industrial effluents. *World J. of Microbiol. Biotechnol*. 28 (10): 3053-3065.

Kalinina, E. V.; Chernov, N. N.; Novichkova, M. D. 2014. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry* (Moscow). 79(13): 1562-1583.

Karadjova, I. B.; Slaveykova, V. I.; Tsalev, D. L. 2008. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater. *Aquat. Toxicol*. 87: 264–271.

Khademikia, S.; Rafiee, Z.; Amin, M. M.; Poursafa, P.; Mansourian, M.; Modaberi, A. 2013. Association of nitrate, nitrite, and total organic carbon (TOC) in drinking water and gastrointestinal disease. *J. environ. public health*. 1-4.

Kiss, J.Z.; Roberts, E.M.; Brown, R.M.; Triemer, R.E., 1988. X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma* 146: 150–156.

Klerks, P. L. y Weis, J. S. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut*. 45: 173-205.

Kowaltowski, A. J.; de Souza-Pinto, N. C.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med*. 47: 333-343.

Kropat, J.; Gallaher, S. D.; Urzica, E. I.; Nakamoto, S. S.; Strenkert, D.; Tottey, S. 2015. Copper economy in *Chlamydomonas*: prioritized allocation and reallocation of copper to respiration vs. photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 112: 2644–2651.

Kumar, K. S; Dahms, H-U.; Lee, J-S.; Kim, H. C.; Lee, W. C.; Shin, K-H. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotox. Environ. Safe*. 104: 51-71.

Kumar, P.; Ramalingam, S.; Sathyaselvabala, V.; Kirupha, S.; Murugesan, A.; Sivanesan, S. 2012. Removal of Cd (II) from aqueous solution by agricultural waste cashew nut shell. Korean *J. Chemical. Engineering*. 29, 756-768.

Küpper, H.; Sétlik, I.; Spiller, M.; Küpper, F.; Prasil, O. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *J. Phycol.* 38(3): 429-441.

Lackey, J. B. 1968. Ecology of Euglena. In: Buetow, D. (ed.), The Biology of *Euglena*. General Biology and Ultrastructure, 1. Academic Press, New York. 27–44 pp.

La Force, M. J.; Hansel, C. M.; Fendorf, S. 2000. Arsenic speciation, seasonal transformations and co-distribution with iron in a mine waste-influenced palustrine emergent wetland. *Environ. Sci. Technol*. 34: 3937-3943.

Lage, O. M.; Parente, A. M.; Salema, R. 1994 a. Electrophoretic analysis of polypeptids of *Prorocentrum micans* Ehrenberg exposed to toxic levels of copper. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 84: 107-112.

Lai, V. W. M.; Cullen, W. R.; Harrington, C. F.; Reimer, K. J. 1997. The characterization of arsenosugars in commercially available algal products including a *Nostoc* species of terrestrial origin. *Appl. Organomet. Chem*. 11: 797–803.

Lam, P. K. S. y Gray, J. S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull*. 46: 182–186.

Lamontagne, M. P. y Provencher, M. 1977. Méthode de la détermination d'un indice d'appréciation de la qualité des aux selon différentes utilisations. Service de la qualité des eaux. Ministère des Richesses naturelles. Québec. W.E. 34 pp.

Leander, B. 2004. Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends Microbiol.* 12:251–258.

Leander, B. S. y Farmer, M. A. 2000a. Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. *J. Eukaryot. Microbiol*. 47: 469-79.

Leander, B. S. y Farmer, M. A. 2000b. Epibiotic bacteria and a novel pattern of strip reduction on the pellicle of *Euglena helicoideus* (Bernard) Lemmermann. *Eur. J. Protistol*. 36: 405-413.

Leander, B. S. y Farmer, M. A.. 2001a. Comparative morphology of the euglenid pellicle. II. Diversity of strip substructure. *J. Eukaryot. Microbiol*. 48: 202-217.

Leander, B. S. y Farmer, M. A. 2001b. Evolution of *Phacus* (Euglenophyceae) as inferred from pellicle morphology and SSU rDNA. *J. Phycol*. 37: 143-159.

Leander, B. S.; Esson, H. J.; Breglia, S. A. 2007. Macroevolution of complex cytoskeletal system in euglenoids. *Biessays* 29: 987-1000.

Lee, R. E. 2008. Phycology, 1st edn. Cambridge University Press, Oxford. 31pp.

Lee, C.M. y Allen, H.E. 1998. The ecological risk assessment of copper differs from that hydrophobic organic chemicals. *Hum. Ecol. Risk Assess*. 4: 605-617.

Leedale, G. F. 1967. Euglenoid Flagellates. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Leedale, G. F. 1968. Ultrtastructure. En: The Biology of Euglena, Vol. I. Ed. Buetow, D.E. New York, Academic Press. 1-25 pp.

Lei, A. P.; Wong, Y. S.; Tam, N. F. I. 2003. Pyrene-induced changes of glutathione-*S*-transferase (GST) activities in different microalgal species. *Chemosphere*. 50: 293-301.

Lenton, T. M. 1998. Gaia and natural selection. *Nature*. 394: 439-447.

Lenton, T. M. 2004. Clarifying Gaia: Regulation with or without Natural Selection. En: Schneider, S.H., et al. (eds.), Scientists Debate Gaia. MIT Press. Cambridge, MA. USA. 15-25.

Levy, J. L.; Stauber, J. L.; Adams, M. S.; Maher, W. A.; Kirby, J. K. ; Jolley, D. F. 2005. Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). Environ. Toxicol. Chem.
24: 2630–2639.

Lewis, M. E. 2006. Chapter 6.2 Dissolved Oxygen IN U.S. Geological Survey, (variously dated), National field manual for the collection of water-quality data: U.S. Geological Survey Techniques of Water-Resources Investigations, book 9, chaps. A1-A9. http://pubs.water.usgs.gov/twri9A.

Li, F.; Liang, Z.; Zheng, X.; Zhao, W.; Wu, M.; Wang, Z. 2015. Toxicity of nano-TiO2 on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquat. Toxicol*. 158: 1-13.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Method. Enzymol*. 148: 350-382.

Lindemann, J.; Holtkamp, E.; Herrmann, R. 1990. The impact of aluminium on green algae isolated from two hydrochemically different headwater streams, Bavaria, Germany. *Environ. Pollut.*, 67 (1): 61-77.

Linton, E.W.; Karnkowska-Ishikawa, A.; Kim, J.I.; Shin, W.; Bennett, M.; Kwiatowski, J. 2010. Reconstructing euglenoid evolutionary relationships using three genes: nuclear SSU and LSU, and chloroplast 16S rDNA sequences and the description of Euglenaria gen. nov. (Euglenophyta). *Protist*. 161: 603–619.

Lloyd, J. R. y Oremland, R. S. 2006. Microbial transformations of arsenic in the environment: from soda lakes to aquifers. *Elements*. 2: 85–90.

Loez, C. y Salibián, A. 1990. Premieres donneés sur le phytoplancton et les caractéristiques physico-chimiques de río Reconquista (Buenos Aires, Argentine): une riviere urbaine pollué. *Revue Hydrobiol. Trop*. 23, 283–296.

Loez, C.; Topalián, M. L.; Salibián, A. 1995. Effects of Zn on the growth andstructure of a natural autumn phytoplankton sample rearedin the laboratory. *Environ. Pollut*. 88: 275–281.

Lombardo, R. J.; O'Farrell, I; dos Santos Afonso, M. 2010. Spatial and temporal ion dynamics on a complex hydrological system: The Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina). *Aquat. Geochem*. 16: 293–309.

Lopez-Rodas, V.; Agrelo, M.; Carrillo, E.; Ferrero, L. M.; Larrauri, A.; Martin-Otero, L.; Costas, E. 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol*. 36: 179-190.

Lovelock, J. E. 1979. Gaia: a New Look at Life on Earth. Oxford University Press. UK. 157 pp.

Lovelock, J. E.y Margulis, L. 1974. Atmospheric homeostasis by and for the biosphere: The Gaia hypothesis. *Tellus*. 26: 2-10.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.

Luoma, S. N.; van Geen, A.; Lee, B. G.; Cloern, J. E. 1998. Metal uptake by phytoplankton during a bloom in South San Francisco Bay: implications for metal cycling in estuaries. *Limnol. Oceanogr*. 43: 1007–1016.

Machado, M. D.; Lopes, A. R.; Soares, E. V. 2015. Responses of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to long-term exposure to metal stress. *J. Hazard. Mater*. 269: 82-92.

Maclauso, A.L.; Mitchell, D.L.; Sanders, R.W. 2009. Direct effects of UV-B radiation on the freshwater heterotrophic nanoflagellate *Paraphysomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 13 (75): 4525–4530.

Maeda, S.; Ohki, A.; Tokuda, T.; Ohmine, M. 1990. Transformation of arsenic compounds in a freshwater food chain. *Appl. Organomet. Chem*. 4: 251–254.

Magdaleno, A.; Puig, A.; de Cabo, L.; Salinas, C.; Arreghini, S.; Korol, S.; Bevilacqua, S.; López, L.; Moretton, J. 2001. Water pollution in an urban Argentine river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 67: 408–415.

Malasarn, D.; Kropat, J.; Hsieh, S.I.; Finazzi, G.; Casero, D.; Loo, J.A. 2013. Zinc deficiency impacts CO_2 assimilation and disrupts copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 288: 10672–10683.

Mallick, N. 2004. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *J. Plant. Physiol*. 161 (5): 591-597.

Margalef, R. 1983. Limnología. Ed. Omega. S. A. Barcelona, 1010 pp.

Marques, A.; Pilo, D.; Araújo, O.; Pereira, F.; Guilherme, S.; Carvalho, S.; Santos, A. M.; Pacheco, M.; Pereira, P. 2016. Propensity to metal accumulation and oxidative stress responses of two benthic species (*Cerastoderma edule* and *Nephtys hombergii*): are tolerance processes limiting their responsiveness? *Ecotoxicology*. 4: 664-76.

Marschner, H. 1993. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 5ta. Ed. Londres, R.U. 674 pp.

Martí, L.; Filippini, M. F.; Salcedo, C.; Drovandi, A.; Troilo, S.; Valdés, A. 2011. Evaluación de metales pesados en suelos de los oasis irrigados de la Provincia de Mendoza: I. Concentraciones totales de Zn, Pb, Cd y Cu. Rev. FCA UNCuyo 43 (2): 203-221.

Martin, W.; Sommerville, C. C.; Loiseaux de Goer, S. 1992. Molecular phylogenies of plastid origins and algal evolution. *J. Mol. Evol*. 35: 385–403.

Martínez, L. F. y Donato, J. 2003. Efectos del caudal sobre la colonización de las algas en un río de montaña tropical. (Boyacá, Colombia). *Caldasia*. 25 (2): 337-354.

Marvá, F.; López-Rodas, V.; Rouco, M.; Navarro, M.; Toro, F. J.; Costas, E.; Flores-Moya, A. 2010. Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquat. Toxicol*. 96 (2): 130-134.

McCord, J. M. y Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem*. 244: 6019-6055.

McCormick, P.V. y Cairns Jr., J. 1994. Algae as indicators of environmental change. *J. Appl. Phycol.* 6: 509–526.

Mercado, L.; Gómez, N. 1998. Estudio de la calidad de agua del río Samborombón (Prov. De Buenos Aires) a partir del fitoplancton, variables físico-químicas. En: Anales del XVII Congreso Nacional del agua, Santa Fé. 344-351.

Mercado, L. M. y Gómez, N. 1999. Effects of a nuclear power plant on phytoplankton structure of the lower Paraná River. *Interciencia*. 24 (1): 36-41.

Meyer, J. L.; Paul, M. J.; Taulbee, W. K. 2005. Stream ecosystem function in urbanizing landscapes. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 24: 602–612.

Mignot, J.P. 1965. Ultrastructure des Eugleniens I. Etude de la cuticule chez differentes especies. *Protistologica* 1: 5-15.

Miot, J.; Morin, G.; Skouri-Panet, F.; Férard, C.; Aubry, E.; Briand, J.; Wang, Y.; Ona-Nguema, G.; Guyot, F. ; Brown, G. E. 2008. XAS study of arsenic coordination in *Euglena gracilis* exposed to arsenite.

Miot, J.; Morin, G.; Skouri-Panet, F.; Férard, C.; Poitevin, A.; Aubry, E.; Ona-Nguema, G.; Juillot, F.; Guyot, F.; Gordon, E. B. Jr. 2009. Speciation of Arsenic in *Euglena gracilis* Cells Exposed to As (V). *Environ. Sci. Technol.* 43: 3315–3321.

Mishra, S.; Srivastava, S.; Tripathi, R. D.; Trivedi, P. K. 2008. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. *Aquat. Toxicol.* 86(2): 205-215.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant. Sci.* 9: 405-410

Miyashita, S.; Fujiwara, S.; Tsuzuki, M.; Kaise, T. 2011. Rapid biotransformation of arsenate into oxo-arsenosugars by a freshwater unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci. Biotech. Bioch*. 75: 522–530.

Möller, K. y Schultheiß, U. 2015. Chemical characterization of commercial organic fertilizers. *Arch. Agron. Soil Sci*. 61 (7): 989-1012.

Momo, F.; Cuevas, W.; Giorgi, A.; Banchero, M; Rivelli, S.; Taretto, C.; Gómez Vázquez, A., Feijoó, C. 1999. Mapping the water quality of the Puelchense subaquifer in Lujan (Argentina). *Wit. Trans. Ecol. Envir*. 493- 501.

Momo, F.; Zaltz, A.; Hughes, E.; Ventura, A.; Macro, T.; Ceretti, H.; Ramírez, S. 2003. Estado ecológico de la cuenca del río Luján y utilidad de los indicadores biológicos para su control. En: Las aguas bajan turbias. CoEd, Al Margen y Universidad Nacional de General Sarmiento.

Monfils, A. K.; Triemer, R. E.; Bellairs, F., 2011. Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia* 50: 156–169.

Moore, M. N.; Depledge, M. H.; Readmen, J. W.; Leonard, D. R. P. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res*. 552: 247–268.

Morelli, E.; Mascherpa, M. C.; Scarano, G. 2005. Biosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in response to arsenate exposure. *Biometals*. 18: 587–593.

Morin, G. y Calas, G. 2006. Arsenic in soils, mine tailings, and former industrial sites. *Elements*. 2(2): 97-101.

Mudhoo, A.; Sharma, S. K.; Garg, V. K.; Tseng, C. H. 2011. Arsenic: an overview of applications, health, and environmental concerns and removal processes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*. 41: 435–519.

Munawar, M., 1972. Ecological studies of Euglenineae in certain polluted and unpolluted environments. *Hydobiologia* 39: 307–320.

Murgel, S. M. 1984. Limnología sanitaria, estudio de la polución de las aguas continentales, Monografía Nº 28, Universidad de Sao Paulo, Brasil. (No. F/570 B5/28) 120 pp.

Nannavecchia, P.; Tolivia, A.; Conforti, V. 2014. Ultrastructural alterations in *Phacus brachykentron* (Euglenophyta) due to excess of organic matter in the culture medium. *Ecotox. Environ. Safe*. 101: 36-41.

Nath, S.; Panda, P.; Mishra, S.; Dey, M.; Choudhury, S.; Sahoo, L.; Panda, S. K. 2014. Arsenic stress in rice: redox consequences and regulation by iron. *Plant Physiol. Bioch*. 80: 203-210.

Neal, C.; Neal, M.; Wickham, H.; Harrow, M. (2000a) The water quality of a tributary of the Thames, the Pang, souther England. *Sci. Total Environ.* 251-252: 459-475.

NMX-AA-039-SCFI-2001. Análisis de aguas. Determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Diario Oficial de la Federación. México. Agosto 1. 23 pp.

Nogueira, P. F. M.; Nakabayashi, D.; Zucolotto, V. 2015. The effects of graphene oxide on green algae Raphidocelis subcapitata. *Aquat. Toxicol.* 166: 29-35.

Novelo, R.; Sandoval, E. C.; Riancho, M. R. S.; Castillo, E. R. 2002. Influencia del material de cubierta en la composición de los lixiviados de un relleno sanitario. *Ingeniería*. 6 (2): 7-12.

Nowicka, B.; Pluciński, B.; Kuczyńska, P.; Kruk, J. 2016. Prenyllipid antioxidants participate in response to acute stress induced by heavy metals in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Exp. Bot*. 123: 98-107.

Nozaki, H. 2005. A new scenario of plastid evolution: plastid primary endosymbiosis before the divergence of the ‘‘Plantae,’’ emended. *J. Plant. Res*. 118: 247–255.

O’Farrell, I.; Lombardo, R.; De Tezanos Pinto P.; López, C. 2002. The assessment of water quality in the Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina): phytoplankton and algal bioassays. *Environ. Pollut*. 120 (2): 207-218.

Qian, H.; Chen, W.; Sun, L.; Jin, Y.; Liu, W.; Fu Z. 2009. Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and the response to oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology*, 18: 537-543.

Okamoto, O. K.; Asano, C. S.; Aidar, E.; Colepicolo, P. 1996. Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis. J. Phycol*. 32: 74-79.

Okamoto, O. K.; Pinto, E.; Latorre, L. R.; Bechara, E. J. H.; Colepicolo, P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 40: 18–24.

Okay, O.S.; Donkin, P.; Peters, L.D.; Livingstone, D.R.; 2000. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Environ. Pollut*. 110: 103–113.

Olguín, E. J.; Sánchez-Galvaán, G. 2012. Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnol*. 30: 3–8.

OMS, 1996. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for Drinking-Water Quality. Volume 2. Health criteria and other supporting information. Segunda edición. Ginebra (Suiza).

OMS, 2003. Organización Mundial de la Salud. Chlorine in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza), (WHO/SDE/WSH/03.04/45).

Patterson, D. J. 1986. The fine structure of *Opalina ranarum* (Family Opalinidae): opalinid phylogeny and classification. *Protistologica*. 21: 413-428.

Paul, M. J. y Meyer, J. L. 2001. Streams in the urban landscape. Annu. Rev. *Ecol. Syst.* 32: 333–365.

Paul, M. J. y Meyer, J. L. 2008. Streams in the urban landscape. In: Marzluff, J. M., Shulenberger, E.; Endlicher, W.; Alberti, M.; Bradley, G.; Ryan, C.; Simon, U. y Pringsheim, E. G. 1946. The biphasic or soil-water cultured method for growing algae and flagellates. *J. Ecol.* 33: 193–204.

Pawlik-Skowrońska, B.; Pirszel, J.; Kalinowska, R.; Skowroński, T. 2004. Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol*. 70: 201–212.

Peakall, D. B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*. 3: 157-60.

Perales, H. V. y González-Moreno, S. 2007. Crecimiento, fotosintéticos y respiratorias respuestas a las concentraciones de cobre subletales en *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) *Chemosphere* 67 (11): 2274-2281.

Pérez, L.; García, M. T.; Ribosa, I.; Vinardell, M. P.; Manresa, A.; Infante, M. R. 2002. Biological properties of arginine - based gemini cationic surfactants. *Environ. toxicol. chem*. 21 (6): 1279-1285.

Pérez-Castillo, A. G. y Rodríguez, A. 2008. Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Rev. Biol. Trop*. 56 (4): 1905-1918.

Petro Cardona, P. H. y Mercado Montero, G. D. C. 2014. Bioremediación de Suelos Contaminados por Derrames de Hidrocarburos Derivados del Petróleo en Colombia. Universidad de San Buenaventura, Colombia. Disponible en línea: http://hdl.handle.net/10819/2354

Pinilla, G. A. 2000. Inicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 67 pp.

Pintilie, M.; Oprica, L.; Surleac, M.; Dragut Ivan, C.; Creanga, D. E.; Artenie, V. 2004. Enzime activity in plants treated with magnetic liquid. *Biophysics-Magnetic Effects*. 239-244.

Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T. C. S.; Leitao, M. A. S.; Okamoto, O. K.; Morse, D.; Colepicolo, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol*. 39: 1008-1018.

Pinto, A.; Von Sperling, E.; Moreira, R. 2001. Chlorophyll-a determination via continuous measurement of plankton fluorescence: methodology development. *Water Res*. 35 (16): 3977-3981.

Pires Freitas, A. P.; Homrich Schneider, I. A.; Schwartzbold, A. 2011. Biosorption of heavy metals by algal communities in water streams affected by the acid mine drainage in the coal-mining region of Santa Catarina state, Brazil. *Miner. Eng*. 24: 1215–1218.

Pistocchi, R.; Mormile, A. M.; Guerrini, F.; Isani, G.; Boni, L. 2000. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J. Appl. Phycol.* 12: 469-477.

Pizarro, H. y Alemanni, M. E. 2005. Variables físico-químicas del agua y su influencia en la biomasa del perifiton en un tramo inferior del Río Luján (Pcia. De Buenos Aires). *Ecología Austral*. 15 (1): 73-88.

Płachno, B. J.; Wolowski, K.; Augustynowicz, J.; Lukaszek, M. 2015. Diversity of algae in a thallium and other heavy metals-polluted environment. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim*. 51: 139–146.

Plataroti, M. C. 2010. Caracterización de la calidad del agua de una sección del Río Luján: Efectos sobre el fitoplancton. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Podracka, L.; SAsinka, M.; Racz, O.; Sipulova, A.; Cayova, E.; Horska, M.; Boor, A.1999. Relation between metabolism of trace elements and the antioxidant defense system in chronic nephropathies. *Cas. Lek. Cesk*. 138: 337-339.

Pollard, P. y Huxham, M. 1998. The European Water Framework Directive: a new era in the management of aquatic ecosystem health? Aquatic Conservation: *Mar. Freshw. Ecosyst*. 8: 773-792.

Potikha, E. V. 2012. Hydrobiological Impact Monitoring of Small Streams in Transit Area of Sikhote-Alin Reserve//Sikhote-Alin Biosphere Area: The State of Ecosystems and their Components. Vladivostok: Dalnauka. 258–285 pp. (in Russian).

Powell, S. R. 2000. The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* 130: 1447S–1454S.

Prieto, G.; Mogollon, M.; Castro, A.; Sierra, L. 2005. Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *Rev. MVZ Córdoba*. 10: 544-554.

Primavesi, A. 1990. Manejo ecológico do solo: a agricultura em regioes tropicais. Sao Paulo, Brazil: Livraria Novel S.A.164 - 197.

Pringsheim, E. G. 1946. The biphasic or soil-water culture method for growing algae and flagellates. *J. Ecol*. 33: 193–204.

Queralt, R. 1982. La calidad de las aguas de los ríos. *Tecnología del agua*. 4: 49-57.

Quinn, J. M. y Stroud, M. J. 2002. Water quality and sediment and nutrient export from New Zealand hill-land catchments of contrasting land use. New *Zeal. J. Mar. Fresh.* 36: 409-429.

Rahman, M. A.; Hasegawa, H; Lim, R. P. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Ennnviron. Res.* 116: 118–135.

Rahman, M. A.; Hogan, B.; Duncan, E.; Doyle, C.; Krassoi, R.; Mahmudur Rahman, M.; Naidu, R.; Lim, R. P.; Maher, W. y Hassler, C. 2014. Toxicity of arsenic species to three freshwater organisms and biotransformation of inorganic arsenic by freshwater phytoplankton (*Chlorella* sp. CE-35). *Ecotox. Environ. Safe.*106: 126–135.

Rai, L. C.; Singh, A. K. y Mallick, N. 1991. Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metals stress. *J. Plant. Physiol.* 137: 419-424.

Ramanan, R.; Kim, B-H.; Cho, D-H.; Oh, H-M.; Kim, H-S. 2016. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol. Adv.* 34 (1): 14-29.

Rendina, A.y Iorio, A. F. D. 2012. Heavy metal partitioning in bottom sediments of the Matanza-Riachuelo River and main tributary streams. *Soil Sediment Contam: An International Journal*, 21 (1): 62-81.

Reymond, O. L. y Pickett-Heaps, J. D. 1983. A routine flat embedding method for electron microscopy of microorganims allowing selection and precisely oriented sectioning of single cells by light microscopy. *J. Microsc*. 130: 79-84.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 (1): 208–212.

Ríos de Molina, M. C. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. Revista Química Viva. Vol. 2, número 1. Argentina, ISNN 1666–7948. 1–13 pp. Disponible en línea: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86320104

Robles-Camacho, J. y Armienta, M. A. 2000. Natural chromium contamination of groundwater at Leon Valley, Mexico. *J. Geochem. Explor*. 68: 167-181.

Rocchetta, I.; Mazzuca, M.; Conforti, V.; Ruiz, L.; Balzaretti, V.; Ríos de Molina, M. C. 2006. Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environ. Pollut*. 141: 353-358.

Rocchetta, I.; Leonardi, P. I.; Amado Filho, G. M.; Ríos de Molina, M. D. C.; Conforti, V. 2007. Ultrastructure and X-ray microanalysis of *Euglena gracilis* (Euglenophyta) under chromium stress. *Phycologia*. 46 (3): 300–306.

Rocchetta, I.; Mazzuca, M.; Conforti, V.; Balzaretti, V.; Ríos de Molina, M. C. 2012. Chromium induced stress conditions in heterotrophic and auxotrophic strains of *Euglena gracilis*. *Ecotox. Environ. Safe*. 84: 147-154.

Rocchetta, I.; Mazzuca, M.; Conforti, V.; Ruiz, L.; Balzaretti, V.; Ríos de Molina, M. C. 2006 a. Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environ. Pollut*. 141: 353-358.

Rocchetta, I.; Ruiz, L.; Conforti, V.; Río de Molina, M. C. 2003. Estudio del estrés oxidativo en 2 cepas de *Euglena gracilis*. *Rev. Cubana Invest. Biomed*. 22 (2):105-8.

Rocchetta, I.; Ruiz, L. B.; Magaz, G.; Conforti, V. T. D. 2003. Effects of Hexavalent chromium in Two Strains of *Euglena gracilis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 70: 1045–1051.

Rocchetta, I.; Ruiz, L. B.; Rios de Molina, M. C.; Conforti, V. 2006 b. Chromium toxicity to *Euglena gracilis* strains depending on the physicochemical properties of the culture medium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 76:512–521.

Rodríguez, M. C.; Barsanti, L.; Passarelli, V.; Evangelista, V.; Conforti, V.; Gualtieri, P. 2007. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ. Res. 105(2): 234-239.

Rodriguez Castro. M. C.; Urrea, G.; Guasch, H. 2015. Influence of the interaction between phosphate and arsenate on periphyton's growth and its nutrient uptake capacity. *Sci. Total. Environ*. 503-504: 122-132.

Romero D.; Ríos de Molina M. C.; Juárez A. B.; 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotox. Environ. Safe*. 74: 741-747.

Rosowski, J. R. 2003. Photosynthetic euglenoids. In: Wehr, J. D. y Sheath, R. G. (eds.), Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. Acad. Press, New York. 383–422 pp.

Rosso, J. J.; Troncoso, J. J.; Fernández Cirelli, A. 2011. Geographic distribution of arsenic and trace metals in lotic ecosystems of the pampa plain, Argentina. *B. Environ. Contam. Tox*.86 (1): 129-132.

Ruggiero, M. A.; Gordon, D. P.; Orrell, T. M.; Bailly, N.; Bourgoin, T.; Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T.; Guiry, M. D.; Kirk, P M. 2015. A higher level classification of all living organisms. PLoS ONE 10 (4): e0119248.

Ruiz, L. B.; Rocchetta, I.; dos Santos Ferreira, V.; Conforti, V. 2004. Isolation, culture and characterization of a new strain of *Euglena gracilis*. New strain of *Euglena gracilis*. *Phycol. Res*. 52 (2): 168-174.

Rusten, B.; Eikebrokk, B.; Tharvaldrem, G. 1990. Coagulation as pretreatment of food industry wastewaters. *Water Sci. Technol*. 22 (9): 1-8.

Sabatini, S. E.; Juárez, Á. B.; Eppis, M. R.; Bianchi, L.; Luquet, C. M.; de Molina, M. D. C. R. 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotox. Environ. Safe*. 72 (4): 1200-1206.

Sala, J. M. 1981. Geología en cuencas de llanuras con énfasis en hidrogeología. Comité de Cuencas Hídricas del Gran Rosario, Rosario, 40 pp.

Salibián, A. 2006. Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. *Rev. Environ. Contam. T.* 185: 35-65.

Samuel, K. y Bose, S. 1987. Bleaching of photosynthetic pigments in *Chlorella protothecoides* grown in the presence of SANDOZ 9785 (4-chloro-5-dimethylamino-2-phenyl-3 (2H) pyridazinone). *J. Biosci*. 12 (4): 399-404.

Sande, P.; Mirás, J. M.; Vidal, E.; Paz, A. 2005. Formas de fósforo y su relación con la erosión en aguas superficiales bajo clima atlántico. Estudios de la zona no saturada del suelo. Vol. VII. Samper Calvete, F. J. y Paz González, A.126-131.

Santa Cruz, J. N. 1995. Tipología general de contaminación de las aguas subterráneas en el conourbano bonaerense. *Rev. Museo La Plata*. 1 (5): 68-71.

Satoh, A.; Vudikaria, L. Q.; Kurano, N.; Miyachi, S. 2005. Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strain to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. *Environ. Int*. 31 (5): 713-722.

Schäfer, R. B.; Pettigrove, V.; Rose, G.; Allinson, G.; Wightwick, A.; Von der Ohe, P. C.; Shimeta, J.; Kühne, R.; Kefford, B. J. 2011. Effects of Pesticides Monitored with Three Sampling Methods in 24 Sites on Macroinvertebrates and Microorganisms. *Environ. Sci. Technol*. 45: 1665–1672.

Schenone, N.; Volpedo, A. V.; Fernández Cirelli, A. 2007. Trace metal contents in water and sediments in Samborombón Bay wetland, Argentina. *Wetl. Ecol. Manag*. 15: 303-310.

Scheren, P.A.G. M.; Kreze, C.; Janssen, F. J. J. C.; Hordijk, L.; Ptasinski, K. J. 2004 Integrated water pollution assessment of the Ebrié Lagoon, Ivory Coast, West Africa. *J. Marine Syst.* 44: 1-17.

Schiariti, A.; Juárez, A. B.; Rodriguez, M. C. 2004. Effects of sublethal concentrations of copper on three strains of green microalgae under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Archiv Fur Hydrobiologie, Algological Studies*. 114: 143-157.

Scott, N.; Hatlelid, K. M.; MacKenzie, N. E.; Carter, D. E. 1993. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol*. 6: 102–106.

Semple, K. T.; Cain, R. B.; Schmidt, S. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 291-300.

Sengupta, A. K. 2002. Principles of Heavy Metals Separation', in Sengupta, A. K. (ed.), Environmental Separation of Heavy Metals: Engineering Processes, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, ISBN 1566768845

Septory, R. y Triyatmo, B. 2016. The utilization of aquacultures wastewater as nutrient sources in *Nannochloropsis oculata* cultivation to prevent waters contamination in coastal area. En: Adevances of science and technology for society: Proceedings of the 1st International Conference on Science and Technology 2015 (ICST-2015). AIP Publishing.

Servicio Meteorológico Nacional. Secretaría de Ciencia, Tecnología y Producción. Ministerio de Defensa. Presidencia de la Nación. http://www.smn.gov.ar/

Shafiqur, R. K.; Robin, R. D.; Thomas, E. S. 2000. Effects of shade on morphology, chlorophyll concentration and chlorophyll fluorescence of four Pacific Northwest conifer species. *New Forests*. 19: 171-186.

Shannon, C. E.; Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 pp.

Sharma, S. 2015. Arsenic contamination and its toxicity in algae. *Researcher*. 7 (4): 1-6. http://www.sciencepub.net/researcher

Shin, W. y Triemer, R. E. 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Euglena* (Euglenophyceae) with particular reference to the type species *Euglena viridis*. *J. Phycol.* 40: 759–771.

Sigg, L.; Behra, R.; Boiler, M.; Eggen, R.; Meier, W.; Sulzberger, B.; Xue, H. 1999. Relevance of copper inputs to natural waters. *EAWAG News* 46: 9-11.

Silveira Duarte, I. C.; de França, P.; Yukio Okada, D.; do Prado, P. F.; Varesche, A.; Bernadete, M. 2015. Anaerobic degradation of anionic surfactants by indigenous microorganisms from sediments of a tropical polluted river in Brazil. *Rev. Biol. Trop*. 63 (1): 295-302.

Singh, H. P.; Batish, D. R.; Kohli, R. K.; Arora, K. 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. Plant Growth Regul. 53(1): 65-73.

Smedley, P. L. y Kinniburgh, D. G. 2002. The review of source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem*. 17: 517-568.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. 1984. Introducción a la bioestadística. En Serie de Biología Fundamental. Ed. Reverté, S. A. España. 90-126 pp.

Smith, V. H. y Schindler, D. W. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends. Ecol. Evol*. 24 (4): 201-207.

Spurr, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res*. 26: 31–43.

SSRH, 2005. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente. República Argentina. http://www.hidricosargentina.gov.ar/base_niveles_guia.xls.

SSRH, 2016. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Descripción de cuencas hídricas. http://www.hidricosargentina.gov.ar/documentos/referencias_i8/36.pdf

Srivastava, A.; Ahn, C.-Y.; Asthana, R. K.; Lee, H.-G.; Oh, H.-M. 2015. Status, alert system, and prediction of cyanobacterial bloom in South Korea. *BioMed Res. Int.* 2015: 1-9.

Stoltz, J.; Basu, P.; Oremland, R. 2002. Microbial trasformation of elements: the case of arsenic and selenium. *Internat. Microbiol*. 5: (4): 201-207.

Strayer, L; Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. 2003. Bioquímica. Ed. 5. Editorial Reverté, S. A. 974 pp.

Stumm, W. y Morgan, J. J. 1996. Aquatic chemistry. Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. Tercera Edición. Wiley, J. y Sons Ltd. (ed.). New York.1022 pp.

Suman, T. Y.; Radhika Rajasree, S. R.; Kirubagaran, R. 2015. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity andoxidative stress analysis. *Ecotox. Envirnon. Safe.* 113: 23-30.

Suresh Kumar, K.; Dahms, H-U.; Lee, J-S.; Kim, H. C.; Lee, W. C.; Shin, K-H. 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 104: 51-71

Swaminathan, M. S., 2003. Bio-diversity: an effective safety net against environmental pollution. *Environ. Pollut.* 126: 287–291.

Tai, P.; Zhao, Q.; Su, D.; Li, P.; Stagnitti, F. 2010. Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere*. 80 (9): 1031-1035.

Telfer, A.; Dhami, S.; Bishop, S. M.; Philips, D.; Barber, J. 1994. Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolates photosystem II reaction center. *Biochemistry* 33: 14469–14474.

Tell, G. y Conforti, V. 1986. Euglenophyta pigmentadas de la Argentina. *Bibliotheca Phycologica* 75.301 pp.

Tikoo, V.; Scragg, A. H.; Shales, S. W. 1997. Degradation of pentachlorophenol by microalgae. *J. Chem. Tech. Biotech*. 68: 425-431.

Torres, E.; Cid, A.; Fidalgo, C.; Herrero, P.; Abalde, J. 1997. Long chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol*. 39: 231–246.

Torres, E.; Cid, A.; Herrero, C.; Abalde, J. 2000. Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Wate., Air. Soil Poll*. 117: 1–14.

Torrisi, M. y Dell' Uomo, A. 2006. Biological monitoring of some apennine rivers (central Italy) using the diatom-based eutrophication/pollution index (EPI-D) compared to other European diatom indices. *Diatom. Res.* 21 (1): 159–174.

Triemer, R. E. y Zakryśz, B. 2015. Photosynthetic Euglenoids. En Wehr, J. D.; Sheath, R. G y Kociolek, J. P. (eds.). Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification. 459-483.

Tuan, L. Q.; Huong, T. T. T.; Hong, P. T. A.; Kawakami, T.; Shimanouchi, T.; Umakoshi, H.; Kuboi, R. 2008. Arsenic (V) induces a fluidization of algal cell and liposome membranes. *Toxicol. in Vitro*. 22 (6): 1632-1638.

Tyler, J. E. 1968. The Secchi disc. *Limnol. Oceanogr*. 13: 1-6.

UNESCO, 2006. Water a shared responsibility, The United Nations World Water Development Report 2. 7, place de Fontenoy, 75007 Paris, France and Berghan Books, 150 Broadway, Suite 812, New York, NY 10038, United States of America.

Upreti, N.; Sharma, S.; Sharma, S.; Sharma, K. P. 2013. Toxic effects of aluminium and fluoride on planktonic community of the microcosms. *Nat. Env. Poll. Tech*. 12 (3): 523 pp.

US EPA, 1986. United States Environmental Protection Agency. Quality criteria for water. Office of Water Regulations and Standards. EPA 440/5-86-001. Washington DC.

US EPA, 1994. United States Environmental Protection Agency. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/7-91-002. Washington, DC.

US EPA, 2002. United States Environmental Protection Agency. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organism, 4th ed. EPA-821-R-02-013. Washington, DC.

US EPA, 2006. United States Environmental Protection Agency. National Recommended Water Quality Criteria. Office of Water, Office of Science and Technology. Washington, D. C. https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table#table

Ustin, S. L.; Roberts, D.; Pinzon, J.; Jacquemoud, S.; Gardner, M.; Scheer, G.; Castaneda, C. M.; Palacios-Orueta, A. 1998. Estimating canopy water content of chaparral shrubs using optical methods. *Remote Sens. Environ*. 65: 280–291.

Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Verein. Limnol.* 9: 1-38.

Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E.. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 13: 57–149.

Vavilin, D. V.; Ducruet, J. M.; Matorin, D. N.; Venediktov, P. S.; Rubin, A. B. 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 42: 233-239.

Vega-López, A.; Ayala-López, G.; Posadas-Espadas, B. P.; Olivares-Rubio, H. F.; Dzul-Caamal, R. 2013. Relations of oxidative stress in freshwater phytoplankton with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Comp. Biochem. Phys A*: Molecular & Integrative Physiology. 165(4): 498-507.

Venrick, E. L. 1978. How many cells to count? In: Sournia, A. (ed.), Phytoplankton Manual, Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO Press, Paris, 167–180.

Ventura, A. S.; Macro, T. A.; Momo, F. R. 1997. Contaminación del Río Luján (Buenos Aires, Argentina). Caracterización física y química de la calidad del agua. En: Resúmenes II Congreso Argentino de Limnología, Buenos Aires, 157 pp.

Vera, M. S.; Lagomarsino, L.; Sylvester, M.; Pérez, G. L.; Rodríguez, P.; Mugni, H.; Sinistro, R.; Ferraro, M.; Bonetto, C.; Zagarese, H.; Pizarro, H.. 2010. New evidences of Roundup ® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freswwater ecosystems. *Ecotoxicology*. 19: 710-721.

Volk, T. 2009. How the Biosphere Works. En: Crist, E.,Rinker, B. (eds.) Gaia in Turmoil: Climate Change, Biodepletion, and Earth Ethics in an Age of Crisis. MIT Press. Cambridge, MA. USA. 27-40

Walne, P. y Kivic, P. A. 1990. Phylum Euglenida, p. 270-287. In Handbook of Protoctista.. Margulis, L.; Corliss, J. O.; Melkoniann, M. y Chapman, D. J. (eds.). Jones Bartlett Publ., Boston, MA, 914 pp.

Wang, F.; Smith, D.; El-din, M. 2003. Application of advanced oxidation methods for landfill leachate treatment . A review. *Environmental Eng. Sci*. 2: 413.127.

Wang, N-X.; Li, Y.; Deng, X-H.; Miao, A-J.; Ji, R.; Yang, L-Y. 2013. Toxicity and bioaccumulation kinetics of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes. *Water Res*. 30: 1-10.

Wang, Y.; Wang, S.; Xu, P.; Liu, C.; Liu, M.; Wang, Y.; Wang, C.; Zhang, C.; Ge, Y. 2015. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*., 14 (3): 427-451.

Wang, S.; Zhang, D.; Pan, X. 2012. Effects of arsenic on growth and photosystem II (PSII) activity of *Microcystis aeruginosa*. *Ecotox. Environ. Safe*. 84: 104-111.

Watanabe, M.; Henmi, K.; Ogawa, K.; Suzuki, T. 2003.Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol*. Part C. 134: 227-234.

Watanabe, M. y Suzuki, T. 2002. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol*. Part C 131: 491-500.

Watanabe, M. y Suzuki, T. 2004. Cadmium-induced synthesis of HSP70 and a role of glutathione in *Euglena gracilis*. *Redox Rep*. 9 (6): 349-353.

Whaley-Martin, K. J.; Koch, I.; Moriaty, M.; Reimer, K. J. 2012. Arsenic speciation in blue mussels (*Mytilus edulis*) along a highly contaminated arsenic gradient. *Environ. Sci. Technol*. 46: 3110–3118.

Wheaton, F. W. 1982. Acuacultura. Diseño y Construcción de sistemas. AGT Editor, S. A. México, D. F. 461-595.

Whitton, B. A. 1984. Algae as monitors of heavy metals in freshwaters. En Algae as Ecological Indicators. Shubert, L.E. (ed.) Academic Press, London. 257-280.

Whitton, B. A. y Kelly, M. G. 1995. Use of algae and others plants for monitoring rivers. *Aust. J. Ecol*. 20: 45-56.

WHO—World Health Organization, 1993. International Programme on Chemical safety (IPCS) Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. World Health Organization, Geneva. 57 pp.

Wolowski, K. 1988. Euglenophyta from the sewage treatment plant of the kliny housing development in cracow poland. *Fragm. Florist. Geobot*. 2: 217–226.

Wolowski, K., 1992. Occurrence of Euglenophyta in the Třeboň Biosphere Reserve (Czechoslovakia). *Algol. Stud*. 66: 73–98.

Wolowski, K. 1998. Taxonomic and environmental studies on euglenophytes of Kraków–Częstochowa Upland (Southern Poland). *Fragm. Florist. Geobot*. 6: 1–192.

Wong, S. L.; Nakamoto, L. y Wainwright, J. F. 1994. Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of waste water. *J. App. Phycol.* 6: 405-414

Woodiwiss, F. S. 1964. The biological system of stream classification used by the Trent River Board. *Chemistry Industry*. 11: 443- 447.

Wrench, J. J. y Addison, R. F. 1981. Reduction, methylation, and incorporation of arsenic into lipids by the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Can. J. Fish. Aquat*. Sci. 38: 518–523.

Xue, H., Nhat, P.H., Gachter, R. y Hooda, P.S. 2003. The transport of Cu and Zn from agricultural soils to surface water in small catchment. *Adv. Environ*. Res. 8: 69-76.

Yamaguchi, A.; Yubuki, N.; Leander, B. 2012. Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evol. Biol*. 12-29.

Yamaoka, Y.; Takimura, O.; Fuse, H. y Murakami, K. 1999. Effect of glutathione on arsenic accumulation by *Dunaliella salina*. *Appl. Organomet. Chem*. 13: 89–94.

Yang, S.; Wa, R. S. S. y Kong, R. Y. C. 2002. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2, 4-dichlorophenol. *Aquatic Toxicol.* 59: 191-200.

Yang, J. y Zhu, Y. G. 2009. Progress in study of mechanisms of microbial arsenic transformation in environment. *Asian J. Ecotox*. 4: 761–769.

Zhang, S. Y.; Delvecchio, R.; Blough, N. V. 2012. Investigating the mechanisms of hydrogen peroxide photoproduction by humic substances. *Environ. Sci. Technol*. 46: 11836-11843.

Zhang, S. Y.; Sun, G. X.; Yin, X. X.; Rensing, C. y Zhu, Y. G. 2013b. Biomethylation and volatilization of arsenic by the marine microalgae *Ostreococcus tauri*. *Chemosphere*. 93: 47–53.

Zettler, L. A.A., Gomez, F.; Zettler, E.; Keenan, B. G.; Amils, R.; Sogin, M. L. 2002. Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nat-Lond*. 417(6885): 137.

Zografi, G.; Schott, H.; Swarbrick, J. 1990. Interfacial phenomena. En: Remington's Pharmaceutical Sciences. Gennaro, A. R. (ed.). Mack, Easton, PA. 257-272.

Zorrilla, G.; Adonis, E. y Izquierdo E. 2004. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev. Cubana Invest. Biomed*. 23: 51-57.

Zutshi, S.; Bano, F.; Ningthoujam, M.; Habib, K.; Fatma, T. 2014. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in hapalosiphon fontinalis-339. *Int. J. Inn. Res. Sci. Eng. Technol*. 3(2): 9386-94.