



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Evaluación ecotoxicológica del efecto del arsénico sobre la
interacción entre el biofilm y *Cnesterodon decemmaculatus*
(Poeciliidae, Cyprinodontiformes)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires, área Ciencias Biológicas

Lic. Mauro Javier Palacio

Director/a de Tesis: Dra. Natalia Ossana

Consejero/a de Estudios: Dra. Fabiana Lo Nostro

Lugar de trabajo: Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA-INEDES,
UNLu- CONICET)

Fecha de defensa: Buenos Aires, 02 de septiembre de 2025

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca doctoral que me permitió dedicarme plenamente a la realización de esta investigación. Además, deseo destacar el importante rol que cumple como institución en el apoyo al crecimiento científico y en la generación de oportunidades para que muchas personas puedan desarrollarse como investigadores y profesionales comprometidos con el avance del conocimiento.

A la Universidad Nacional de Luján (UNLu), donde me formé y crecí como profesional, no solo como una institución educativa, sino una comunidad que va creciendo día a día con una gran calidad de personas. Le agradezco por brindarme el espacio de trabajo y el equipamiento necesarios para llevar adelante este proyecto, así como el financiamiento a través del programa PI2+ que hizo posible la concreción de muchos aspectos de esta investigación. Y quiero destacar el apoyo constante de los técnicos del Laboratorio Central, quienes siempre estuvieron dispuestos a resolver los problemas que pudieran surgir.

A la Universidad de Buenos Aires (UBA), por permitirme formar parte de su prestigiosa comunidad académica, donde cursé la mayor parte de las actividades de formación doctoral que complementaron y enriquecieron mi desarrollo académico.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por el financiamiento otorgado a través de los subsidios PICT 2015-2636 y PICT 2020-00655, que permitieron sostener y potenciar las actividades de investigación de este proyecto.

A mi directora, Natalia Ossana, con quien he compartido este largo recorrido profesional desde mis primeros pasos en la ciencia, brindándome orientación, conocimientos y apoyo constantes. Agradezco su compromiso en guiar mi crecimiento profesional a lo largo de estos años, incentivándome a desarrollar mis capacidades y a enfrentar cada desafío con responsabilidad y dedicación. Y que, a pesar de las adversidades (epidemiológicas, económicas o climáticas) que se presentaron en el camino, siempre se mantuvo firme y me ayudó a seguir avanzando.

A Fabiana Lo Nostro, por haberme acompañado como consejera de estudios y por su valiosa guía a través del doctorado y su burocracia. Agradezco especialmente su generosa disposición para ayudarme y resolver cada problema con la energía y entusiasmo que la caracterizan.

A Andrés Pighín, por su colaboración en la medición de las numerosas e interminables muestras de metales que le entregué, demostrando siempre una gran disposición y profesionalismo.

A todo el PRODEA: Bettina Eissa, Patricia Castañé, Martina Mastrángelo, Nicolás Benavente, Juan Pablo Ferro y Rolando Caraballo, por transformar este espacio de trabajo en una segunda casa, donde nunca faltaron las risas, las charlas, las enseñanzas y, sobre todo, el cotillón y las tortas. Gracias por los congresos, las experiencias compartidas y por ser parte fundamental de este recorrido. En especial, quiero agradecer a todos los pasantes (presentes y pasados) que son el pilar del laboratorio y que, con su dedicación y entusiasmo, hacen posible su funcionamiento mientras aprenden en el proceso. Actualmente: Mónica Martín, Emilia Latessa, Mailén Anselmo, Sofía Liguori, Leandro Esquibel, Martín Sandoval y Francisco Carro.

Aunque estos son integrantes del PRODEA también, merecen un párrafo aparte. Primero a Belén Campos y Ayelén González Núñez; que decirles, por todos estos años en los que nuestras locuras encajaron completamente. Gracias por todo el apoyo mutuo, las experiencias, las risas, los papelones y todas las anécdotas de las que nos vamos a reír siempre. Siento que este camino no hubiera sido tan especial si no lo hubiéramos compartido entre los tres. Y a Luis Trípoli, por ser un confidente y compartir payasadas, risas, anécdotas y por tanto *“derramar el té”*.

A mi familia, por confiar siempre en mis capacidades y estar cuando lo necesité; en especial, a mi abuela Gladys Casas, por haberme brindado las oportunidades y el sostén a lo largo de mi vida que hicieron posible que hoy esté donde estoy.

A mis amigos de la vida: Nicolás Ibáñez, Yair Casale, Federico Santi, Hernán Silva, Evelyn Aguirre y Abril Méndez; por todos los momentos compartidos, las anécdotas, las charlas y su presencia constante a lo largo de estos años. Agradezco haber crecido rodeado de ustedes, lo que me ayudó a convertirme en la persona que soy hoy y, aunque pasen los años, seguimos riendo y apoyándonos juntos.

Índice

Resumen	6
Abstract	9
Glosario de abreviaturas	12
Introducción general	13
La contaminación acuática y relevancia del arsénico	14
Peces nativos como bioindicadores de la contaminación	16
El <i>Biofilm</i> en los ecosistemas acuáticos y su papel en la modulación de la toxicidad	17
Indicadores biológicos de contaminación	18
Bioindicadores	18
Biomarcadores	19
Morfométricos	20
Estrés oxidativo	20
Metabolismo intermediario	24
Sistema nervioso	25
Actividad extracelular	27
Hipótesis y objetivos generales	29
Materiales y Métodos generales	32
Modelos biológicos	33
Recolección y cultivo de <i>biofilm</i>	33
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	34
Parámetros fisicoquímicos	36
Bioensayos	37
Procesamiento de muestras biológicas (peces y <i>biofilm</i>)	38
Composición del <i>biofilm</i>	39
Biomarcadores	39
Morfométricos	40
Estrés oxidativo	40
Metabolismo intermediario	41
Sistema nervioso	44
Actividad extracelular	44
Bioacumulación de arsénico	45
Análisis estadístico	47
Capítulo 1: Ensayo de exposición a arsénico de <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> en presencia de <i>biofilm</i>	48
Introducción	49
Objetivos específicos	50
Materiales y métodos	51
Sitios de muestreo	51
Bioensayos	53
Biomarcadores	55
Análisis estadístico	56
Resultados	57

INDICE

Parámetros fisicoquímicos	57
Composición del <i>biofilm</i>	59
Biomarcadores en peces	61
Morfométricos	61
Estrés oxidativo	64
Metabolismo intermediario	73
Sistema nervioso	79
Análisis de componentes principales (PCA)	82
Bioacumulación de As en peces	93
Biomarcadores en <i>biofilm</i>	94
Estrés oxidativo	94
Enzimas extracelulares	95
Discusión y conclusiones	97
Capítulo 2: Ensayo de interacción directa entre <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> y <i>biofilm</i>	106
Introducción	107
Objetivos específicos	108
Materiales y métodos	109
Muestreo y cultivo de <i>biofilm</i>	109
Bioensayo	109
Biomarcadores	112
Resultados	114
Parámetros fisicoquímicos	114
Composición del <i>biofilm</i>	114
Biomarcadores	115
Morfométricos	115
Estrés oxidativo	116
Metabolismo intermediario	119
Sistema nervioso	120
Análisis de componentes principales (PCA)	121
Bioacumulación y transferencia de As	123
Discusión y conclusiones	127
Capítulo 3: Evaluación de comunidades naturales de <i>biofilm</i> en cuencas fluviales con diferentes grados de contaminación	130
Introducción	131
Cuenca del río Luján	131
Cuenca del río Reconquista	132
Objetivos específicos	135
Materiales y métodos	136
Sitios de muestreo	136
Parámetros fisicoquímicos	141
Recolección de muestras de <i>biofilm</i> y parámetros a determinar	142
Composición del <i>biofilm</i>	142
Índices de biodiversidad	142

INDICE

Biomarcadores	143
Análisis multivariados	144
Resultados	145
Perfiles fisicoquímicos de los sitios	145
Composición del <i>biofilm</i>	150
Biomarcadores	156
Estrés oxidativo	156
Enzimas extracelulares	158
Discusión y conclusiones	161
Consideraciones finales	167
Anexo	178
Técnicas fisicoquímicas	179
Complemento estadístico de PCA	185
Bibliografía	188

Resumen

El arsénico (As) es uno de los principales contaminantes ambientales en los cuerpos de agua de la región pampeana. Su presencia en cursos de agua superficiales genera especial preocupación debido a su elevada toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación. Su llegada a los cuerpos de agua es principalmente de origen natural. Entre los organismos expuestos a este tipo de contaminación, los peces son utilizados frecuentemente como un modelo bioindicador, ya que integran en sus respuestas bioquímicas, fisiológicas y metabólicas las condiciones ambientales y los efectos acumulativos de los contaminantes presentes en el medio. Sin embargo, los peces no se encuentran aislados en estos ecosistemas, sino que conviven e interactúan con otros componentes bióticos clave, como el *biofilm*. El *biofilm* es una comunidad microbiana compleja adherida a las superficies sumergidas, que juega un papel fundamental en la retención, transformación y biodisponibilidad de contaminantes, incluyendo metales pesados y metaloides como el arsénico. Esta matriz microbiana no solo actúa como un filtro biológico, sino que puede servir como fuente de arsénico para los peces que lo consumen como parte de su dieta. Por lo tanto, las interacciones entre peces y *biofilm*, tanto directas (a través de la alimentación) como indirectas (compartiendo el mismo medio), podrían influir significativamente en la exposición al arsénico y en las respuestas toxicológicas de los peces. En este contexto, la presente tesis tuvo como objetivo general evaluar cómo la interacción (directa e indirecta) entre el *biofilm* y el pez *Cnesterodon decemmaculatus* modula la exposición y los efectos tóxicos del arsénico, mediante un enfoque multibiomarcador que incluyó la medición de parámetros de estrés oxidativo, neurotoxicidad y metabolismo intermediario en diferentes órganos, junto con la evaluación de la bioacumulación y la respuesta bioquímica del *biofilm*. Además, se analizaron comunidades naturales de *biofilm* provenientes de dos cuencas fluviales pampeanas con distinto grado de impacto ambiental, para evaluar cómo las condiciones ambientales de cada cuenca moldean la estructura y funcionalidad de estas comunidades microbianas y su respuesta a los tóxicos.

Para abordar estos objetivos, se llevaron a cabo tres estudios complementarios. En el primer capítulo, se expusieron de manera subcrónica (8 días) y crónica (21 días) ejemplares hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* a concentraciones subletales de arsénico (0,2; 0,5 y 1 mg As/L) en presencia y ausencia de *biofilm* proveniente de dos cuencas fluviales (Río Luján y Río Reconquista). Se evaluó la bioacumulación de arsénico y la respuesta a una batería de biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo en hígado y branquias: contenido de

glutación reducido (GSH), actividades de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión-s-transferasa (GST) y la peroxidación lipídica medida mediante la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); neurotoxicidad en cerebro y músculo: actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE); y metabolismo intermediario en músculo: contenido de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, y el gasto energético a través de sistema de transporte de electrones (ETS). Además, en el *biofilm*, se analizaron biomarcadores de estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) y enzimas extracelulares (fosfatasa alcalina y β -glucosidasa). En el segundo ensayo (capítulo 2), se evaluó la interacción directa entre peces y *biofilm*, mediante la alimentación de los peces con *biofilm* previamente expuesto a arsénico. Luego de 8 días de exposición, se evaluaron los efectos fisiológicos mediante la misma batería de biomarcadores, y se determinó la transferencia del metaloide a través de la dieta, analizando la bioacumulación. Finalmente, en el tercer estudio (capítulo 3), se caracterizaron las comunidades naturales de *biofilm* recolectadas en distintos sitios de las cuencas de los ríos Luján y Reconquista. Se analizó la calidad fisicoquímica del agua, la estructura y composición del *biofilm* y se midieron biomarcadores de estrés oxidativo y actividades enzimáticas extracelulares.

Los resultados indicaron que la presencia de *biofilm* modula significativamente la respuesta de los peces al arsénico, con diferencias según el origen del *biofilm*. En términos generales, en presencia de *biofilm*, las respuestas oxidativas tendieron a ser menores, especialmente a concentraciones bajas y, los indicadores metabólicos, mostraron cambios en el balance energético, observándose en general mayores reservas y menor gasto energético. Esto sugiere que la interacción entre el pez y el *biofilm* afecta la biodisponibilidad y toxicidad del arsénico, probablemente debido a procesos de adsorción, bioacumulación y biotransformación dentro de la comunidad microbiana. Por otro lado, al realizar una exposición alimentaria, el *biofilm* actuó como vector de As, permitiendo la transferencia dietaria del contaminante. A nivel fisiológico, hubo respuestas oxidativas y metabólicas diferenciales entre ambos tipos de exposición, y se observó que el arsénico incorporado a través de la alimentación genera un impacto menor en comparación con la exposición directa en el medio, reflejando la importancia de la vía de exposición en la toxicidad final. Al analizar la transferencia del arsénico mediante la bioacumulación, se observó que el *biofilm* tiene una gran capacidad para bioacumular y magnificar la concentración del metaloide, mientras que los peces poseen un sistema eficiente de eliminación del tóxico que les permite mantener niveles internos muy por debajo de los de exposición. Finalmente, al evaluar las comunidades naturales del *biofilm* se observó que las comunidades de *biofilm* reflejan las condiciones ambientales locales y presentan diferencias desde su estructura hasta su funcionamiento según el nivel de contaminación del sitio de origen.

RESUMEN

En sitios más impactados, los *biofilms* mostraron mayores actividades enzimáticas y alteraciones en los biomarcadores de estrés oxidativo, sugiriendo mecanismos de adaptación o tolerancia frente a condiciones de estrés crónico derivado de la contaminación.

En conjunto, los resultados de esta tesis evidencian que el *biofilm* no solo funciona como un reservorio de arsénico, sino que también modula activamente su biodisponibilidad y los efectos tóxicos sobre *C. decemmaculatus*. Esta interacción pez-*biofilm* es un factor importante a tener en cuenta para entender la dinámica de los contaminantes en ecosistemas fluviales. El *biofilm*, tanto como matriz biótica como componente de la dieta, desempeña un papel clave en la exposición y en las respuestas fisiológicas del pez, resaltando la importancia de considerar este componente en evaluaciones ecotoxicológicas integrales. Estos hallazgos aportan información valiosa para el monitoreo y la gestión ambiental en cuencas urbanas impactadas.

Palabras claves: *Cnesterodon decemmaculatus*; *biofilm*; arsénico; biomarcadores; río Reconquista; río Luján.

Ecotoxicological evaluation of the effect of arsenic on the interaction between biofilm and *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes)

Arsenic (As) is one of the main environmental pollutants in water bodies of the Pampas region. Its presence in surface water bodies is of particular concern due to its high toxicity, persistence, and bioaccumulation capacity, as well as its primarily natural origin. Among the exposed organisms, fish are frequently used as bioindicator models, as their biochemical, physiological, and metabolic responses integrate environmental conditions and the cumulative effects of contaminants present in their habitat. However, fish do not exist in isolation within these ecosystems; they coexist and interact with other key biotic components, such as *biofilm*. This is a complex microbial community attached to submerged surfaces that plays a fundamental role in the retention, transformation, and bioavailability of contaminants, including heavy metals and metalloids such as arsenic. This microbial matrix not only acts as a biological filter but may also serve as a source of arsenic for fish that consume it as part of their diet. Therefore, interactions between fish and *biofilm*, both direct (through feeding) and indirect (sharing the same environment), could significantly influence arsenic exposure and the toxicological responses in fish. In this context, the present thesis aimed to evaluate how the interaction (direct and indirect) between *biofilm* and the fish *Cnesterodon decemmaculatus* modulates arsenic exposure and its toxic effects, using a multibiomarker approach. This included measuring oxidative stress parameters, neurotoxicity, and intermediary metabolism in different organs, along with evaluating bioaccumulation and the biochemical response of the *biofilm*. Additionally, natural *biofilm* communities from two Pampas river basins with different levels of environmental impact were analyzed to assess how the environmental conditions of each basin shape the structure and functionality of these microbial communities and their response to toxicants.

To address these objectives, three complementary studies were conducted. In the first chapter, female specimens of *Cnesterodon decemmaculatus* were exposed subchronically (8 days) and chronically (21 days) to sublethal arsenic concentrations (0.2, 0.5, and 1 mg As/L), in the presence and absence of *biofilm* from two river basins (Luján and Reconquista rivers). Arsenic bioaccumulation was assessed along with a battery of biomarkers. Oxidative stress was evaluated in liver and gills through the measurement of reduced glutathione content (GSH), the activities of catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST)

enzymes, and lipid peroxidation levels determined by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Neurotoxicity was assessed in brain and muscle by measuring acetylcholinesterase (AChE) activity. Intermediary metabolism in muscle was evaluated by quantifying carbohydrate, lipid, and protein contents, as well as energy expenditure through the activity of the electron transport system (ETS). In the *biofilm*, oxidative stress biomarkers (GSH, CAT, GST, and TBARS) and extracellular enzymes (alkaline phosphatase and β -glucosidase) were analysed. In the second experiment (chapter 2), the direct interaction between fish and *biofilm* was evaluated by feeding fish with *biofilm* previously exposed to arsenic. After 8 days of exposure, physiological effects were assessed using the same biomarker battery, and dietary transfer of the metalloid was determined by analysing bioaccumulation. Finally, in the third study (chapter 3), natural *biofilm* communities collected from different sites along the Luján and Reconquista River basins were characterized. Water physicochemical quality, *biofilm* structure and composition, oxidative stress biomarkers, and extracellular enzymatic activities were measured to analyse how local environmental conditions shape the structure, functionality, and sensitivity of microbial communities in response to toxicants.

The results indicated that the presence of *biofilm* significantly modulates the fish's response to arsenic, with differences depending on the *biofilm's* origin. In general, in the presence of *biofilm*, oxidative responses tended to be lower—especially at low concentrations—and metabolic indicators showed changes in energy balance, generally reflecting higher reserves and lower energy expenditure. This suggests that fish-*biofilm* interaction affects the bioavailability and toxicity of arsenic, likely due to processes such as adsorption, bioaccumulation, and biotransformation within the microbial community. On the other hand, in the dietary exposure experiment, *biofilm* acted as a vector for arsenic, enabling dietary transfer of the contaminant. At the physiological level, oxidative and metabolic responses differed between the two types of exposure, suggesting that arsenic ingested through the diet has a lower impact compared to direct exposure in water, highlighting the importance of the exposure route in overall toxicity. Regarding arsenic transfer through bioaccumulation, *biofilm* demonstrated a high capacity to bioaccumulate and magnify the concentration of the metalloid, while fish exhibited an efficient system for eliminating the pollutant, maintaining levels below those of exposure. Finally, when evaluating natural *biofilm* communities, it was observed that they reflect local environmental conditions and exhibit differences in structure and function depending on the contamination level at their site of origin. In more impacted sites, *biofilms* showed higher enzymatic activities and alterations in oxidative stress biomarkers, suggesting adaptation or tolerance mechanisms to chronic stress conditions caused by pollution.

ABSTRACT

Overall, the results of this thesis demonstrate that *biofilm* not only functions as a reservoir for arsenic but also actively modulates its bioavailability and toxic effects on *C. decemmaculatus*. This fish-*biofilm* interaction is an important factor for understanding contaminant dynamics in fluvial ecosystems. *Biofilm*, both as a biotic matrix and as a dietary component, plays a key role in exposure and physiological responses in fish, highlighting the importance of considering this component in comprehensive ecotoxicological assessments. These findings provide valuable information for monitoring and environmental management in impacted urban basins.

Keywords: *Cnesterodon decemmaculatus*, *biofilm*, arsenic, biomarkers, Reconquista River, Luján River

Glosario de abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterasa
AP	Agua potable
As	Arsénico
BAF	Factor de bioacumulación
CAT	Catalasa
CEA	Asignación de energía celular
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ESM	Error estándar de la media
ETS	Sistema de transporte de electrones
FC	Factor de condición
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-s-transferasa
ICA	Índice de calidad de agua
IHS	Índice hepatosomático
L1	M.J.García
L2	Las Tropas
L3	Ruta 6
Lab	Laboratorio
MDA	Malondialdehído
Nav	Arroyo Naveira
OD	Oxígeno disuelto
PRS	Fósforo reactivo soluble
R1	Represa Roggero
R2	Puente Martín Fierro
SOD	Superóxido dismutasa
SPM	Sobrenadante post-mitocondrial
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Introducción general

La contaminación acuática y relevancia del arsénico

La contaminación de los cuerpos de agua constituye un problema ambiental y de salud pública de alta prioridad en varias regiones del mundo, especialmente en zonas de países en desarrollo. En particular, el arsénico (As) es uno de los contaminantes más relevantes en esta región debido a su alta toxicidad y a su capacidad de persistencia y bioacumulación en los ecosistemas acuáticos. Este metaloide se encuentra de forma natural en la corteza terrestre y puede ser liberado al ambiente acuático por procesos geológicos, como la erosión de algunos minerales. El As en el ambiente acuático es una amenaza particularmente preocupante por su toxicidad tanto para organismos acuáticos como para los humanos (Rodríguez Castro *et al.*, 2017; Bundschuh *et al.*, 2021). Al ingresar en los ecosistemas, el As puede presentarse en varias formas químicas, siendo el arsenito (As(III)) y el arseniato (As(V)) las más comunes y de mayor impacto ambiental. Estas especies difieren en su toxicidad, movilidad y capacidad de penetrar en las células de los organismos, lo que afecta la forma en que el As se bioacumula y se biomagnifica en la cadena trófica (Oremland y Stolz, 2003; Villaamil Lepori *et al.*, 2020). Sin embargo, su presencia en el agua también se ve incrementada por actividades humanas como, por ejemplo, la minería, la agricultura y los vertidos industriales, que contribuyen a la liberación de As (Smedley y Kinniburgh, 2002; Bhattacharya *et al.*, 2007) (Figura 1).

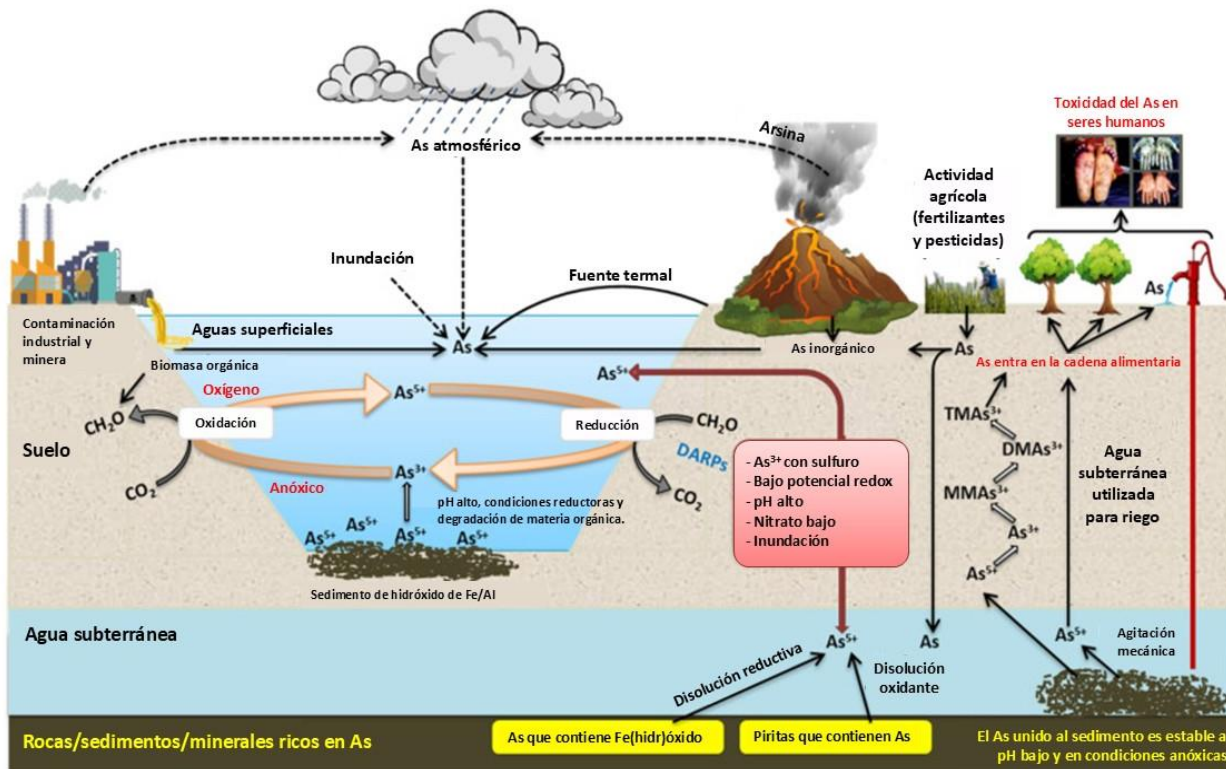


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del arsénico. Se muestran las principales fuentes y transformaciones del arsénico en el ambiente, incluyendo su movilización desde fuentes naturales y antropogénicas (minería, industria, agricultura), sus cambios químicos, y su impacto en los ecosistemas. Además, se muestra cómo el arsénico puede ingresar a la cadena alimentaria y representar un riesgo para la salud humana. (Modificado de Sevak y Pushkar, 2024).

En Argentina, la presencia de As en el agua ha sido ampliamente documentada. Estudios realizados en la región pampeana y en zonas del noroeste argentino han revelado que las concentraciones de As en muchos cuerpos de agua superan los límites recomendados para la protección de la vida acuática y el consumo humano. Varios autores registraron concentraciones superiores a 0,1 mg As/L en ambientes lóticos y lénticos (Schenone *et al.*, 2007; Puntoriero *et al.*, 2015; Rodríguez Castro *et al.*, 2017). Rosso *et al.* (2011) reportaron una concentración promedio de 0,114 mg As/L en aguas superficiales de 39 arroyos no perturbados de la llanura pampeana de la provincia de Buenos Aires y sugirieron que estos eran alimentados por un acuífero con concentraciones entre 0,6 y 4,9 mg As/L. En la laguna Chasicó (sudoeste de la provincia de Buenos Aires), Puntoriero *et al.* (2014) encontraron valores que oscilaron entre 0,195-0,315 y 0,048-0,413 mg As/L en las estaciones húmedas y secas, respectivamente. De las cuencas urbanas más importantes en extensión que atraviesan el área metropolitana de Buenos Aires, se han detectado concentraciones de As en el río Reconquista de hasta 0,12 mg As/L (Tiscornia *et al.*, 2017; Barrera *et al.*, 2020) y en el río Luján de hasta 0,116 mg As/L (Licursi *et al.*, 2021; Torremorell *et al.*, 2022; González Núñez *et al.*, 2024).

La situación se ve agravada por el contexto agrícola intensivo de estas cuencas y de toda la Pampa Húmeda, así como por la presencia de grandes conglomerados urbanos que se desarrollan en ellas, los cuales favorecen el arrastre y la circulación de múltiples contaminantes hacia los sistemas acuáticos. Entre ellos se incluyen no solo plaguicidas como el glifosato, sino también fertilizantes, nutrientes, metales, materia orgánica y partículas emergentes como los microplásticos. La coexistencia de As con estas sustancias puede dar lugar a interacciones complejas, muchas veces de tipo aditivo o sinérgico, que potencien sus efectos tóxicos (Wang *et al.*, 2017; Lajmanovich *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2020).

Estas concentraciones elevadas, en combinación con otros contaminantes presentes en el ambiente, no solo representan un riesgo para la vida acuática, sino que también exponen a la población a efectos tóxicos acumulativos a largo plazo, particularmente en aquellas comunidades que dependen de estas aguas para consumo, riego u otros usos domésticos. Esta situación adquiere especial relevancia en cuencas como las del río Luján y Reconquista, cuyos cursos desembocan en el Río de la Plata, un estuario binacional de gran relevancia ecológica y socioeconómica, que abastece de agua potable a la Ciudad de Buenos Aires y a gran parte de su área metropolitana.

Peces nativos como bioindicadores de la contaminación

Debido a su gran diversificación y presencia en diferentes niveles de la red trófica, los peces desempeñan un papel crucial en los ecosistemas acuáticos y son frecuentemente utilizados como organismos modelo para evaluar el impacto de contaminantes en ambientes fluviales. Su alta sensibilidad a cambios en la calidad del agua y su posición en la cadena trófica los convierte en excelentes bioindicadores, permitiendo detectar alteraciones ambientales tanto a nivel individual como poblacional (Okwuosa *et al.*, 2019). Los peces nativos son particularmente relevantes en estudios de ecotoxicología, dado que son especies adaptadas a los entornos locales y pueden reflejar de manera precisa los efectos de la contaminación en sus hábitats naturales. A diferencia de las especies exóticas o introducidas, los peces nativos han evolucionado en estos ecosistemas específicos y han desarrollado mecanismos de respuesta adaptados a sus condiciones ambientales y a los contaminantes presentes. Esto los convierte en modelos más representativos para evaluar los efectos de la contaminación sobre la fauna local (Carvalho, 1993; Whitehead *et al.*, 2017).

En Argentina, se han utilizado ensambles y diversas especies de peces para monitorear el estado de salud de ríos y arroyos contaminados, particularmente afectados por actividades humanas. En la cuenca del río Suquía (Córdoba), se han monitoreado las comunidades de peces a lo largo de la cuenca como indicadores de calidad de aguas (Hued y Bistoni, 2005) y se han utilizado especies como *Jenynsia multidentata* como bioindicadores, ya que exhibieron respuestas sensibles, como alteraciones enzimáticas y desequilibrios metabólicos, en campo y en exposiciones a agua de río (Maggioni *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.*, 2017). En la cuenca del río Salado (Santa Fe), *Prochilodus lineatus* fue utilizado como especie centinela, donde un abordaje multibiomarcador permitió identificar estrés fisiológico, demostrando la sensibilidad de esta especie para monitoreos ambientales (Cazenave *et al.*, 2009). En el estuario del Río de la Plata, *Micropogonias furnieri* y *Mugil liza* han sido utilizados para monitorear la bioacumulación de metales pesados, presentando alteraciones significativas en sus tejidos como reflejo de la contaminación industrial y portuaria (Marcovecchio, 2004). Por otro lado, en ambientes acuáticos antropizados de regiones semiáridas, investigaciones recientes han analizado especies como *Odontesthes bonariensis* mediante un enfoque multibiomarcador, identificando alteraciones fisiológicas y celulares relacionadas con plaguicidas y efluentes urbanos (Pérez-Iglesias *et al.*, 2023). En un estudio realizado en la cuenca alta-media del río Luján, los autores realizaron un estudio que incluyó análisis histológicos, genotóxicos, bioquímicos y fisiológicos para evaluar los impactos de la contaminación sobre el pez nativo

Cnesterodon decemmaculatus, proporcionando una visión integral del estado de salud de los organismos y su historia toxicológica (González Núñez *et al.*, 2024).

En este contexto, la elección de peces nativos como bioindicadores es fundamental para comprender las interacciones específicas entre contaminantes y organismos localmente adaptados. Además, estos estudios proporcionan una base científica sólida para implementar medidas de monitoreo y restauración ambiental en cuerpos de agua afectados, destacando la importancia de mantener la integridad ecológica de las cuencas fluviales frente a la creciente presión de actividades humanas (industrial, agrícola-ganadera, urbana, etc.).

El *biofilm* en los ecosistemas acuáticos y su papel en la modulación de la toxicidad

Otro de los componentes clave de los ecosistemas acuáticos es el *biofilm*. Se trata de una comunidad compleja de microorganismos, compuesta por bacterias, algas, hongos y protistas heterótrofos, entre otros, que se adhieren a superficies sumergidas mediante la producción de una matriz extracelular polimérica (EPS). Esta matriz, constituida principalmente por polisacáridos, proteínas y ADN extracelular, proporciona cohesión estructural a la comunidad y facilita la retención de nutrientes y también de contaminantes (Sabater *et al.*, 2007; Romani *et al.*, 2016). En estos ecosistemas, los *biofilms* desempeñan un papel fundamental al actuar como una interfaz que regula el flujo de nutrientes, la retención y transformación de contaminantes, y el procesamiento de la materia orgánica. Esta capacidad lo convierte en un mediador clave en la dinámica de la contaminación, particularmente para metales pesados y metaloides como el As que, mediante procesos de adsorción, bioacumulación y biotransformación, puede modificar su biodisponibilidad en el agua y, potencialmente, atenuar su toxicidad para los organismos acuáticos (Battin *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2022; Roy *et al.*, 2024).

En algunos estudios, se ha observado que el *biofilm* interactúa con contaminantes como el cadmio y el arsénico, inmovilizándolos o transformándolos en formas menos tóxicas gracias a su matriz EPS y a la actividad metabólica de los microorganismos que lo conforman. Esto no solo limita la dispersión de estos contaminantes en el medio acuático, sino que también puede disminuir su impacto directo en la biota que allí habite (Hua *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2024).

Además, la interacción entre el *biofilm* y los contaminantes puede influir en la composición microbiana del *biofilm* mismo, modificando su estructura y funcionalidad en respuesta a la exposición prolongada a tóxicos, como el As (Rodríguez Castro *et al.*, 2015). Estos cambios pueden afectar su capacidad para procesar nutrientes y contaminantes, alterando su

rol en el ecosistema y su función como modulador del impacto de los mismos en otros componentes de la red trófica (Barranguet *et al.*, 2000; Sabater *et al.*, 2007).

Debido a su sensibilidad a las condiciones del entorno, los *biofilms* pueden servir como indicadores tempranos de alteraciones ambientales, reflejando cambios en la calidad del agua y la presencia de sustancias tóxicas. Las modificaciones en su estructura comunitaria y sus respuestas fisiológicas pueden proporcionar información valiosa sobre el estado ecológico de un sistema acuático y sobre la presencia de contaminantes antes de que estos generen efectos adversos en niveles tróficos superiores (Burns y Ryder, 2001; Gómez *et al.*, 2009).

Indicadores biológicos de contaminación

En ecotoxicología y monitoreo ambiental, los organismos vivos se emplean como herramientas clave para evaluar los efectos de contaminantes en el ambiente. Estos indicadores biológicos se dividen en dos categorías principales: bioindicadores y biomarcadores, ambos con aplicaciones complementarias. Mientras que los bioindicadores permiten identificar cambios en la salud o estructura de comunidades y ecosistemas enteros, los biomarcadores permiten detectar alteraciones tempranas a nivel individual u orgánico, antes de que se evidencien impactos ecológicos más amplios.

Bioindicadores

Los bioindicadores son organismos, poblaciones o comunidades cuya presencia, ausencia, abundancia o estado reflejan condiciones ambientales específicas. A diferencia de los biomarcadores, que se enfocan en respuestas suborganísmicas, los bioindicadores permiten evaluar el impacto de contaminantes a escalas superiores, integrando efectos acumulativos y múltiples factores de estrés (Parmar *et al.*, 2016; Burger, 2006).

Su uso en monitoreo ambiental resulta valioso por su capacidad de reflejar alteraciones sostenidas en el tiempo, tanto a nivel fisiológico como estructural. En ambientes acuáticos, especies como peces, macroinvertebrados o algas bentónicas han sido ampliamente empleadas como bioindicadores de contaminación orgánica, eutrofización o presencia de metales pesados (Holt y Miller, 2011). La selección del organismo adecuado debe considerar su sensibilidad, ciclo de vida y rol ecológico, para asegurar una evaluación representativa del estado del ecosistema.

Frecuentemente, la evaluación del impacto de contaminantes en organismos acuáticos emplea el uso de biomarcadores, definidos como cualquier respuesta biológica medible que refleje la exposición a una sustancia química o muestra ambiental. Estas respuestas pueden manifestarse a distintos niveles de organización biológica, incluyendo cambios bioquímicos, fisiológicos, histológicos, morfológicos y/o comportamentales (Figura 2; Di Giulio y Hinton, 2008; Guasch *et al.*, 2012). Los biomarcadores permiten detectar alteraciones tempranas en los organismos antes de que se produzcan efectos adversos a nivel poblacional o ecosistémico, funcionando como herramientas sensibles en estudios de monitoreo ambiental y evaluación de riesgo ecológico. Su uso es clave para determinar no solo la presencia de un tóxico en el medio, sino también su biodisponibilidad y la capacidad de los organismos para responder a la exposición, proporcionando información sobre los mecanismos de acción del contaminante y su potencial impacto a largo plazo (Lam, 2009; De Castilhos Ghisi *et al.*, 2020; Amiard *et al.*, 2021).

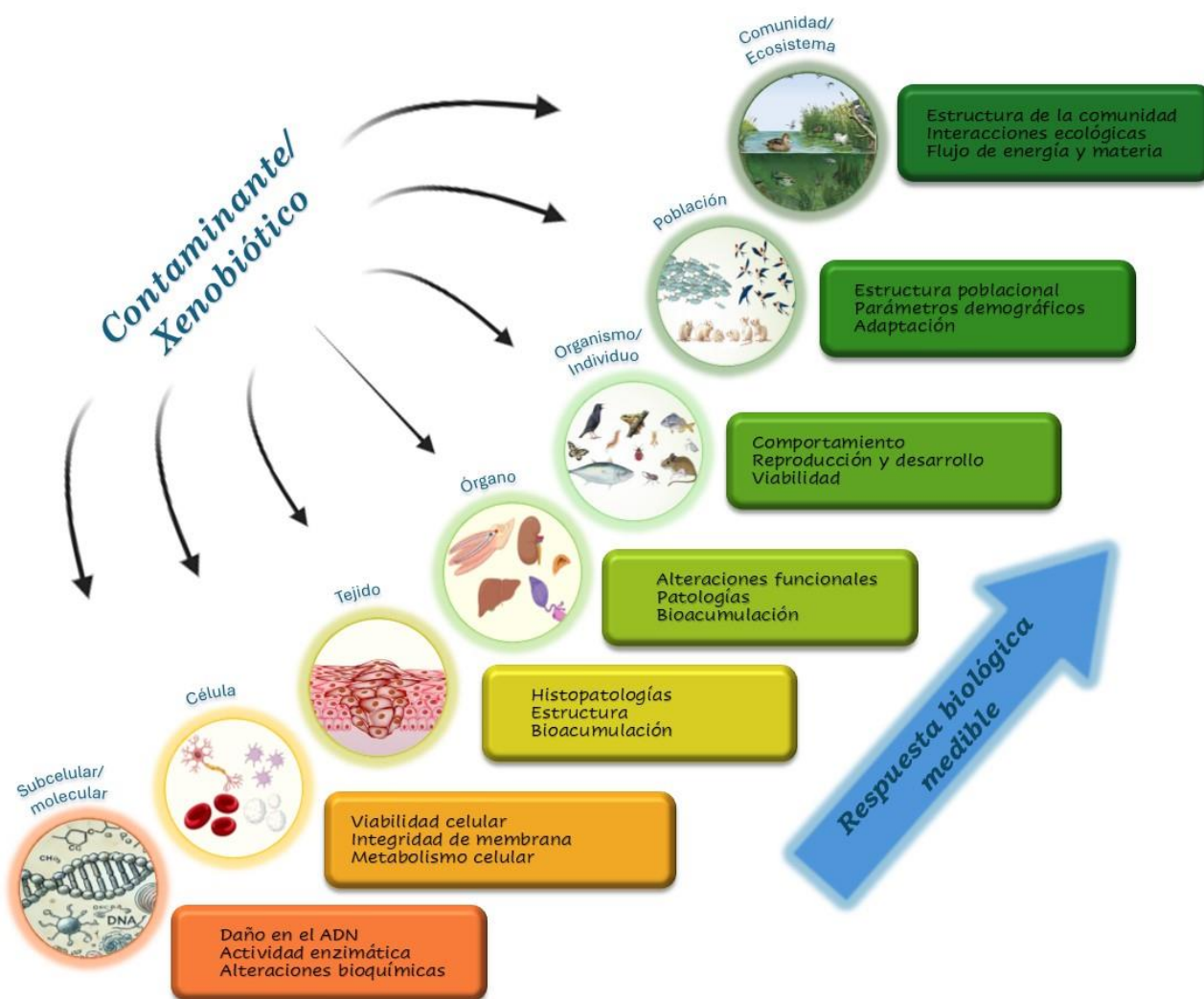


Figura 2. Niveles de organización y respuestas biológicas o “biomarcadores” que se ven afectados como consecuencia del impacto de un contaminante o xenobiótico en un ecosistema.

Biomarcadores morfométricos

Este tipo de biomarcadores pueden ser utilizados como indicadores del estado de salud general, debido a que el crecimiento corporal y de determinados órganos puede verse alterado como consecuencia de desórdenes metabólicos y endocrinos producidos por el estrés. Entre dichos biomarcadores se encuentran los índices morfométricos tales como el factor de condición (FC), que relaciona el peso y longitud corporal y el índice hepato-somático (IHS) el cual otorga información más específica al relacionar la masa de un determinado órgano (hígado) con la masa corporal, ofreciendo una ventaja al relacionar directamente los efectos por exposición a un tóxico sobre el órgano blanco (Di Giulio y Hinton, 2008). Dado que el hígado cumple una función muy importante en la desintoxicación, la exposición a contaminantes puede conducir a un aumento en el tamaño de dicho órgano debido a la hipertrofia (un aumento en el tamaño) o hiperplasia (un aumento en el número de hepatocitos) (Facey *et al.*, 2005).

Biomarcadores bioquímicos

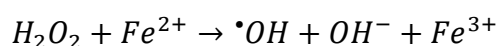
Si bien los biomarcadores morfométricos brindan información sobre el estado general del organismo, sus efectos pueden tardar en manifestarse, por lo que reflejan alteraciones en etapas más avanzadas de exposición al contaminante. En cambio, las respuestas bioquímicas permiten detectar cambios en el metabolismo celular antes de que se produzcan efectos visibles a nivel del crecimiento o la condición del organismo. De esta manera, el deterioro de funciones fisiológicas y bioquímicas puede ser una de las primeras señales de perturbación ambiental, y su monitoreo ofrece herramientas sensibles para la evaluación temprana del estrés tóxico en los organismos acuáticos (de la Torre *et al.*, 2005; Ossana, 2011; Baudou *et al.*, 2019).

❖ Estrés oxidativo

Muchos contaminantes ambientales ejercen su efecto tóxico a través de la inducción de estrés oxidativo, un fenómeno que ocurre cuando se genera un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad de los sistemas antioxidantes del organismo para neutralizarlas (Di Giulio y Hinton, 2008; Nishida, 2011).

Las EROs son moléculas altamente reactivas derivadas del oxígeno que pueden dañar componentes celulares esenciales, como lípidos, proteínas y ADN. Su generación es un proceso natural en organismos aeróbicos, principalmente como subproducto de la respiración mitocondrial (Livingstone, 2003). Sin embargo, la exposición a ciertos contaminantes puede aumentar significativamente la producción de estas especies reactivas a través de distintos mecanismos bioquímicos.

Entre las principales EROs se encuentran el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). De éstas, el radical hidroxilo es el más reactivo, tóxico y no puede ser eliminado por ninguna enzima antioxidante, por lo que puede provocar daño severo a biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN. Una de sus principales fuentes en el organismo es a través de la reacción de Fenton, en la cual el peróxido de hidrógeno reacciona con iones ferrosos (Fe^{2+}), produciendo radicales hidroxilos (Di Giulio y Hinton, 2008; Lushchak, 2011):



Este proceso puede verse amplificado por la presencia del anión superóxido, que regenera Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} , promoviendo la continuidad del ciclo redox y generando daño oxidativo de forma sostenida. El incremento de EROs puede generar peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y alteraciones en la expresión génica, lo que compromete la homeostasis celular y, en casos extremos, puede llevar a apoptosis o necrosis (Slaninova *et al.*, 2009).

Para contrarrestar estos efectos, los organismos poseen un sistema de defensa antioxidante compuesto por enzimas y moléculas de bajo peso molecular (Figura 3). Entre las enzimas antioxidantes más importantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno; la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), que eliminan el peróxido de hidrógeno; y la glutatión-S-transferasa (GST), involucrada en la detoxificación de compuestos electrofílicos. A su vez, el glutatión reducido (GSH) juega un papel clave en la defensa antioxidante no enzimática, actuando como sustrato en reacciones de detoxificación y manteniendo el equilibrio redox, dando como producto disulfuro de glutatión oxidado (GSSG).

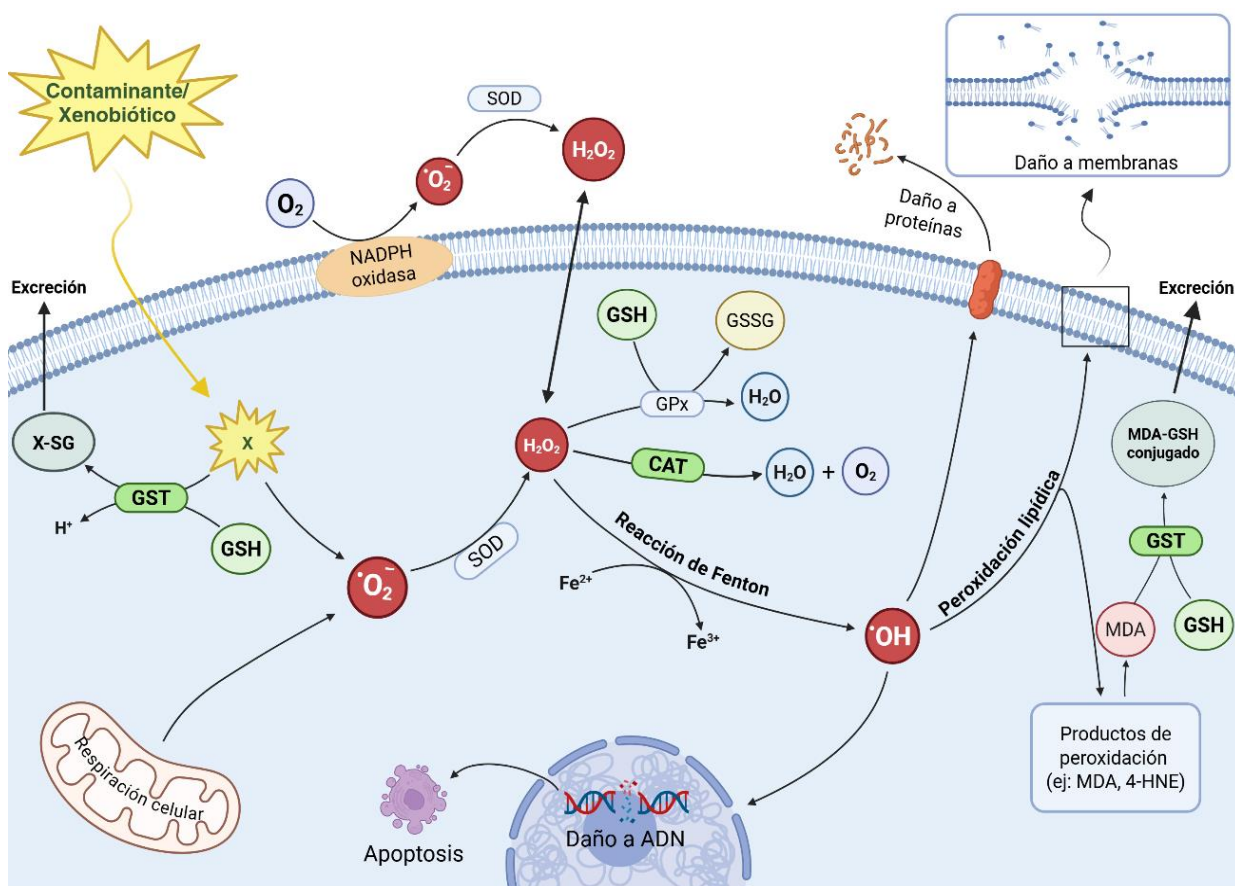
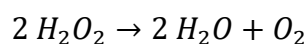


Figura 3. Reacciones químicas correspondientes a la generación y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (EROs). GST: glutatión-S-transferasa; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GPx: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: disulfuro de glutatión oxidado; MDA: malondialdehído; 4-HNE: 4-hidroxinonenal.

➤ *Catalasa (CAT):*

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante clave en la defensa celular contra el estrés oxidativo. Su principal función es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un subproducto del metabolismo celular, en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2), evitando así su acumulación y los daños asociados.

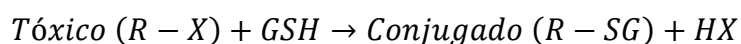


Si el H_2O_2 no es eliminado eficazmente, puede generar radicales hidroxilos ($\bullet OH$) altamente reactivos mediante la reacción de Fenton (con metales como el hierro) o la de Haber-Weiss (con el anión superóxido), lo que puede ocasionar daño celular severo. Debido a su capacidad para procesar grandes cantidades de H_2O_2 en poco tiempo, la catalasa es considerada una enzima de alta eficiencia en los mecanismos antioxidantes. Su localización subcelular en vertebrados es principalmente en los peroxisomas, organelos especializados en la degradación de peróxidos y otras sustancias tóxicas (Van der Oost *et al.*, 2003).

➤ *Glutación-S-transferasa (GST):*

La eliminación de tóxicos exógenos y de los productos derivados de las especies reactivas del oxígeno (EROs) ocurre en dos fases principales. En la fase I, los xenobióticos u otros tóxicos son transformados por enzimas (como las del complejo CYP450) en metabolitos más polares. En la fase II, estos metabolitos o los xenobióticos originales son conjugados con moléculas endógenas polares para su posterior eliminación. Dentro de estas vías de detoxificación, las glutatión-S-transferasas (GST) desempeñan un papel crucial en la protección celular contra compuestos electrofílicos, genotóxicos e intermedios reactivos generados en procesos oxidativos (Di Giulio y Hinton, 2008; Lushchak, 2011).

Las GST constituyen una familia multigénica de enzimas diméricas ampliamente distribuidas en el citosol de las células hepáticas. Su principal función es catalizar la conjugación del glutatión reducido (GSH), un antioxidante fundamental, con una amplia variedad de xenobióticos y productos del estrés oxidativo, facilitando su eliminación.



Además de su papel en la detoxificación, las GST también contribuyen a la protección celular al neutralizar productos de la peroxidación lipídica, ayudando a preservar la integridad de las membranas celulares.



Al hacer que los compuestos tóxicos sean más solubles en agua, la GST facilita su excreción a través de la bilis o la orina, lo que representa un mecanismo esencial en la defensa antioxidante y la homeostasis celular (Van der Oost, 2003).

➤ *Glutatión reducido (GSH):*

El glutatión es un tripéptido compuesto por glutamato, cisteína y glicina, que desempeña un papel central en la homeostasis redox y la defensa antioxidante. Éste existe en dos formas: glutatión reducido (GSH) y disulfuro de glutatión oxidado (GSSG). En condiciones fisiológicas normales, la relación GSH:GSSG es alta, lo que indica un ambiente celular con capacidad antioxidante eficiente, y la disminución en esta proporción puede servir como un marcador de estrés oxidativo (Di Giulio y Hinton, 2008).

El GSH actúa como donador de electrones, neutralizando especies reactivas de oxígeno (EROs) y evitando el daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además, cumple un rol clave en procesos de detoxificación al conjugarse directamente con xenobióticos para facilitar su eliminación. También es un cofactor esencial de enzimas antioxidantes y

desintoxicantes como la glutatión-S-transferasa (GST), que cataliza la conjugación del GSH con compuestos tóxicos, y la glutatión peroxidasa (GPx), que reduce hidroperóxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno, generando agua y alcoholes menos reactivos (Van der Oost, 2003).

Cuando los niveles de GSH se reducen mucho, ya sea por exposición a contaminantes o por un exceso de estrés oxidativo, los organismos se vuelven más susceptibles a la toxicidad de compuestos prooxidantes, lo que puede comprometer funciones celulares esenciales y aumentar el riesgo de daño estructural y muerte celular (Slaninova *et al.*, 2009).

➤ *Peroxidación lipídica*

Cuando los sistemas antioxidantes celulares fallan o resultan insuficientes para neutralizar el exceso de especies reactivas de oxígeno (EROs), se desencadenan procesos de daño oxidativo que comprometen la homeostasis celular. Uno de los principales mecanismos de daño es la peroxidación lipídica, un proceso en el cual los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las membranas celulares son oxidados por las EROs, particularmente por el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Girotti, 1985). Este proceso se inicia cuando un radical libre extrae un hidrógeno de un PUFA, generando un radical lipídico ($\text{L}\bullet$), el cual reacciona rápidamente con el oxígeno molecular formando un peróxido lipídico ($\text{LOO}\bullet$). La propagación de estas sustracciones de H lleva a la ruptura completa de los ácidos grasos hasta aldehídos, afectando la fluidez y funcionalidad de las membranas celulares, lo que puede llevar a la disrupción de procesos metabólicos y señalización celular (Yin *et al.*, 2011; Halliwell y Gutteridge, 2015).

Además de comprometer la integridad estructural de las membranas, la peroxidación lipídica genera productos secundarios altamente reactivos, como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), que pueden modificar proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, amplificando el daño celular (Ayala *et al.*, 2014). Uno de los métodos más empleados para cuantificar el daño por peroxidación lipídica es la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), que mide indirectamente los niveles de MDA y otros aldehídos reactivos generados en este proceso (Lushchak, 2011). Debido a su sensibilidad y aplicabilidad, el contenido de TBARS se ha convertido en un biomarcador ampliamente utilizado en estudios ecotoxicológicos para evaluar el estrés oxidativo inducido por contaminantes ambientales en organismos acuáticos.

❖ *Metabolismo intermediario*

Otro de los efectos medibles a nivel bioquímico ante la exposición a un tóxico es la alteración del metabolismo energético a nivel celular. Los organismos necesitan un equilibrio entre la energía que obtienen y la que gastan para mantener funciones esenciales como el

crecimiento, la reproducción y el mantenimiento celular. Sin embargo, el estrés ambiental puede generar un aumento en la demanda energética para sostener procesos de detoxificación y reparación, lo que puede comprometer otras funciones fisiológicas (De Coen y Janssen, 2003).

➤ *Asignación de energía celular (CEA):*

Para evaluar estos cambios, se puede emplear la asignación de energía celular (*Cellular Energy Allocation*, CEA), un enfoque que permite cuantificar bioquímicamente las reservas de energía disponibles (E_a) y el consumo energético (E_c) como indicadores de estrés metabólico. El consumo de energía (E_c) se estima mediante la actividad del sistema de transporte de electrones (*Electron Transport System*, ETS), que refleja la tasa de producción de ATP a nivel mitocondrial. Por otro lado, la energía disponible (E_a) se determina midiendo el contenido total de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, los principales macronutrientes utilizados en el metabolismo celular. La relación entre E_a y E_c define el valor del CEA, proporcionando información sobre la capacidad del organismo para mantener su equilibrio energético bajo condiciones de estrés ambiental (Verslycke *et al.*, 2004).

Una reducción en el CEA sugiere que el organismo está desviando recursos hacia el mantenimiento y defensa en detrimento de otros procesos biológicos clave, lo que puede afectar su desempeño fisiológico y su supervivencia a largo plazo. Dado su enfoque integrador y su sensibilidad a cambios ambientales, el CEA se ha consolidado como un biomarcador metabólico relevante en estudios de ecotoxicología y evaluación de impacto ambiental (Smolders *et al.*, 2004).

❖ *Sistema nervioso*

➤ *Acetilcolinesterasa (AChE):*

Otro de los efectos tempranos que pueden medirse a nivel bioquímico es la alteración del sistema nervioso, lo que puede reflejarse en cambios en la actividad de enzimas clave involucradas en la neurotransmisión. Dentro de estos biomarcadores, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) es ampliamente utilizada para evaluar el impacto de contaminantes neurotóxicos, especialmente organofosforados y carbamatos, que pueden inhibir su función normal (Fulton y Key, 2001).

Esta enzima pertenece a la familia de las esterasas y es responsable de la hidrólisis de la acetilcolina, un neurotransmisor clave en la transmisión de señales en sinapsis del sistema nervioso tanto en vertebrados como en invertebrados. Se la adopta como biomarcador de alteraciones en las uniones sinápticas del sistema nervioso central (SNC), así como en sinapsis

neuromusculares y simpáticas, pudiendo afectar funciones esenciales como la locomoción y el equilibrio (van der Oost *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2012).

Su inhibición impide la hidrólisis de la acetilcolina en ácido acético y colina, lo que provoca una acumulación excesiva de este neurotransmisor en las sinapsis. Como resultado, se genera una transmisión prolongada de impulsos que lleva a la sobreestimulación de las células nerviosas, desencadenando efectos neurotóxicos que pueden incluir espasmos musculares, parálisis y disfunción neuromuscular (Di Giulio y Hinton, 2008) (Figura 4). A nivel ecológico, estos efectos pueden traducirse en alteraciones del comportamiento, reducción de la capacidad de escape frente a depredadores y disminución del éxito reproductivo, comprometiendo la supervivencia de las poblaciones expuestas.

La medición de la actividad de la enzima AChE en tejidos como encéfalo y músculo es un biomarcador sensible y específico de exposición a ciertos contaminantes. Sin embargo, su interpretación debe considerar posibles variaciones fisiológicas y factores ambientales que pueden influir en los niveles basales de la enzima, como por ejemplo su variación estacional (Menéndez-Helman *et al.*, 2015). A pesar de estas consideraciones, la inhibición de la actividad enzimática de AChE sigue siendo un indicador bioquímico muy utilizado en estudios de ecotoxicología y monitoreo ambiental debido a su relevancia funcional y su fuerte asociación con efectos adversos en la fisiología de los organismos expuestos a contaminantes (Lionetto *et al.*, 2013).

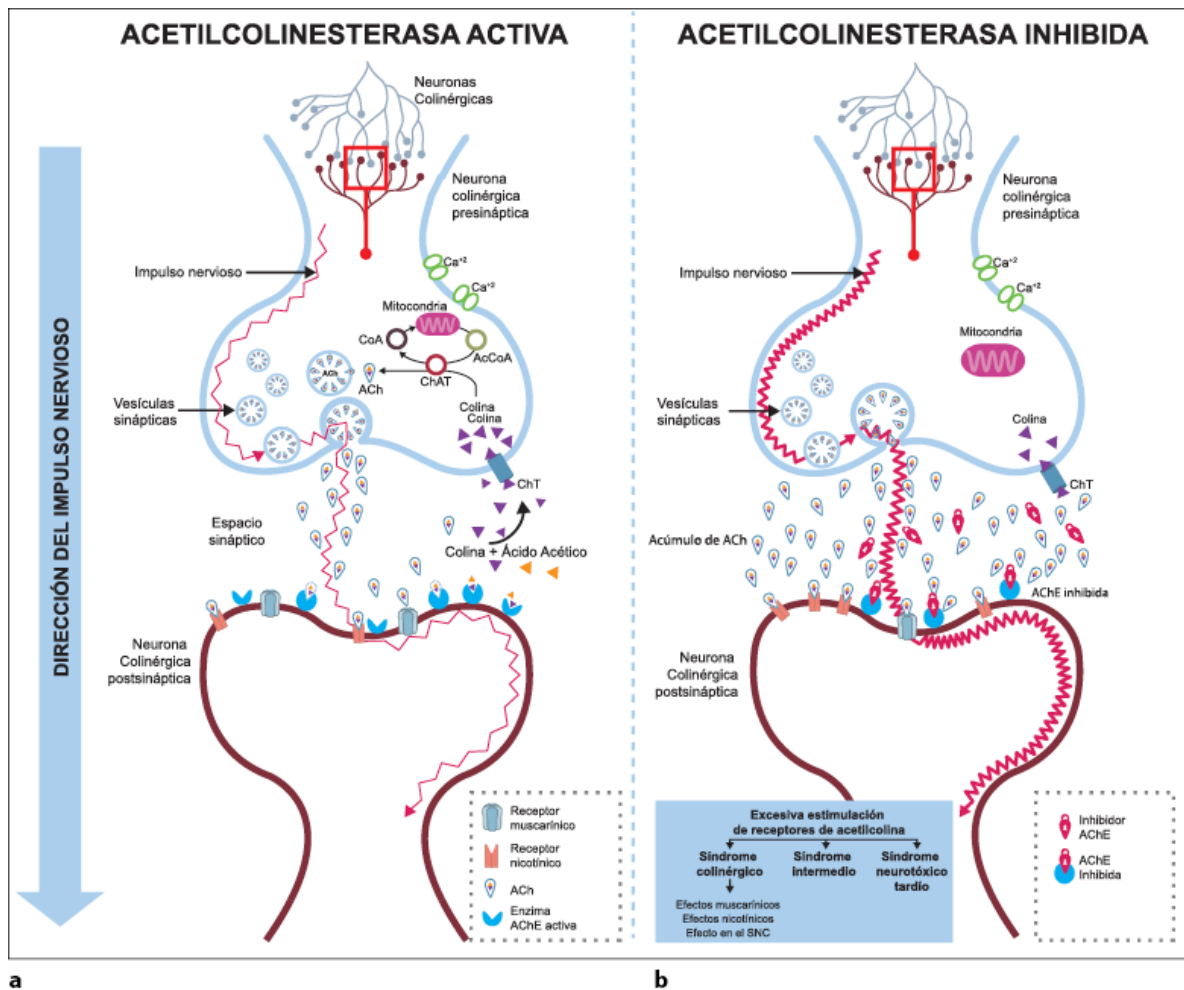


Figura 4. Actividad de la acetilcolinesterasa. La parte a) muestra el mecanismo de acción biológica de la enzima acetilcolinesterasa en estado activo y la parte b), la afectación de este mecanismo cuando la enzima está inhibida. Abreviaciones: AChE: acetilcolinesterasa, ACh: neurotransmisor acetilcolina, Ca^{+2} : Ion calcio, CoA: enzima acetiltransferasa, AcCoA: acetil coenzima A, ChAT: enzima colinaacetiltransferasa, ChT: transportador de colina. (Fuente: Caro-Gamboa *et al.*, 2020).

❖ Actividad extracelular

Las enzimas extracelulares desempeñan un papel clave en la degradación de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes en los ecosistemas acuáticos. Son producidas por microorganismos y participan en la descomposición de compuestos complejos en formas más simples y biodisponibles, permitiendo así la incorporación de materia y energía en la red trófica (Romaní *et al.*, 2006; Sinsabaugh *et al.*, 2009). La actividad de estas enzimas está influenciada por factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y la contaminación, lo que las convierte en indicadores sensibles de perturbaciones ecológicas (Burns y Dick, 2002; Babaniyi *et al.*, 2023).

➤ *Fosfatasa alcalina (FA):*

La fosfatasa alcalina es una enzima extracelular producida por los organismos de los *biofilms* microbianos, donde desempeña un papel clave en la adquisición de fósforo al hidrolizar compuestos orgánicos fosforilados y liberar fosfato inorgánico utilizable por los microorganismos. Su actividad es particularmente importante en ambientes donde la disponibilidad de fósforo es limitada, ya que permite a las comunidades microbianas acceder a este nutriente esencial para el metabolismo celular (McComb *et al.*, 2013; Babaniyi *et al.*, 2023).

La contaminación por arsénico puede interferir con la actividad de la fosfatasa alcalina debido a la similitud estructural entre el arseniato (AsO_4^{3-}) y el fosfato (PO_4^{3-}). Dado que ambos aniones compiten por los mismos transportadores y sitios activos enzimáticos, el arseniato puede inhibir la hidrólisis de los compuestos fosforilados al actuar como un análogo del sustrato natural de la fosfatasa alcalina. Como resultado, la presencia de arsénico en el ambiente puede alterar la disponibilidad de fósforo en los *biofilms*, afectando su metabolismo y estructura comunitaria (Oremland y Stolz, 2003; McComb *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017).

El monitoreo de la actividad de la fosfatasa alcalina en *biofilms* ha sido propuesto como un biomarcador de alteraciones en la disponibilidad de fósforo y de la exposición a contaminantes como el arsénico, permitiendo evaluar el impacto de la contaminación sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas (Sabater *et al.*, 2007; Banaee, 2020).

➤ *β - glucosidasa:*

La β -glucosidasa es una enzima extracelular clave en la degradación de la materia orgánica, ya que participa en la hidrólisis de oligosacáridos y celobiosa, liberando glucosa disponible para el metabolismo microbiano. Esta enzima desempeña un papel fundamental en el ciclo del carbono dentro de los ecosistemas acuáticos, facilitando la descomposición de polisacáridos complejos como la celulosa, permitiendo la remineralización de la materia orgánica y su incorporación a las redes tróficas (Arnosti, 2003; Amer *et al.*, 2017). Su actividad puede ser utilizada como un biomarcador de la funcionalidad microbiana en estos ecosistemas, ya que responde a cambios en la disponibilidad de materia orgánica, temperatura y alteraciones en la comunidad microbiana causadas por el estrés ambiental. La contaminación por xenobióticos o metales pesados puede afectar su actividad, comprometiendo el flujo de carbono (Artigas *et al.*, 2009).

Hipótesis y objetivos generales

Hipótesis general

El presente trabajo plantea como **hipótesis** básica que “el *biofilm* interactúa con los contaminantes, afectando secundariamente su biodisponibilidad en el medio y, por ende, el efecto tóxico que tienen sobre un representante de la ictiofauna pampeana *Cnesterodon decemmaculatus*”. En ese sentido se plantean las siguientes hipótesis particulares:

H1: La respuesta de los biomarcadores (de estrés oxidativo, metabólicos y neurotóxicos) y la bioacumulación en los peces expuestos al As, al interaccionar de manera directa e indirecta con el *biofilm* en un sistema de microcosmos, será diferente a la de los peces expuestos al tóxico en ausencia de *biofilm*.

H2: Frente a una exposición a As, el *biofilm* bioacumulará el tóxico y presentará diferencias en sus parámetros biomarcadores analizados.

H3: La capacidad del *biofilm* para responder al estrés y su capacidad para modular el efecto de contaminantes dependerá de su origen, dado que su estructura y funcionalidad están moldeadas por las condiciones ambientales y su historia adaptativa.

H4: El *biofilm* recolectado de sitios con diferente grado de impacto antrópico, en las cuencas de los ríos Luján y Reconquista, puede ser utilizado como bioindicador de contaminación, al presentar variaciones en su composición comunitaria y en la respuesta de biomarcadores de estrés oxidativo y actividad extracelular.

Objetivos generales

- Comparar la respuesta y sensibilidad de una batería de biomarcadores (de estrés oxidativo, neurotóxicos y metabólicos) en diferentes órganos de ejemplares de *C. decemmaculatus* (provenientes de cultivo de laboratorio) al ser expuestos a As en presencia y ausencia de *biofilm*.
- Evaluar en los peces y *biofilm* el efecto de distintos tiempos de exposición (subcrónico y crónico) y distintas concentraciones subletales de As.
- Comparar la respuesta y sensibilidad de una batería de biomarcadores en el *biofilm* al ser expuesto a distintas concentraciones de As y su variación en presencia de peces.

- Evaluar la dependencia de la respuesta del *biofilm* frente a una exposición a As en función de su origen de procedencia y su historia toxicológica.
- Evaluar los efectos, en los peces, de una exposición a As por medio de la alimentación con *biofilm* previamente expuesto al tóxico.
- Determinar en peces y *biofilm* la bioacumulación del tóxico.
- Determinar la composición y biomarcadores de estrés oxidativo y actividad extracelular en *biofilm* recolectado de distintos sitios de la cuenca del río Luján y Reconquista.

Materiales y métodos generales

Para el desarrollo de esta tesis, se trabajó con microcosmos experimentales para evaluar de manera más representativa los efectos del arsénico sobre un ecosistema acuático, considerando las interacciones biológicas y los procesos ecológicos que ocurren en condiciones más cercanas a la naturaleza. En este caso, se empleó un sistema *biofilm*-pez, en el que ambos componentes interactúan en presencia del tóxico, permitiendo una evaluación más integrada de sus efectos en distintos niveles biológicos.

Recolección y cultivo de *biofilm*

En cada muestreo, se rasparon las superficies o recolectaron rocas, plantas u objetos que se encontraran colonizados por *biofilm*, y se colocaron en un recipiente con agua del sitio (Figura 5a). De esta manera, se disminuye la perturbación del *biofilm*, evitando que se seque y/o sufra otro tipo de estrés. Una vez en el laboratorio, las muestras colectadas fueron cepilladas y raspadas (con un bisturí estéril) dentro de un recipiente pequeño (2-4L) lleno con agua potable sin cloro (AP) pasada por filtro de As, formando así el inóculo.

Por otro lado, para el cultivo del *biofilm*, se tomaron placas de vidrio esmerilado (5x10 cm) y se las colocaron cubriendo el fondo de peceras de vidrio (30x40x15 cm) que fueron llenadas con 8L de agua potable, previamente pasada por filtro comercial de As (Figura 5b). A cada pecera, se le adicionó el inóculo (en una relación de 12,5 mL de inóculo/L de agua) y se las mantuvo en cámaras de incubación con temperatura y fotoperíodo controlados ($22 \pm 1^\circ\text{C}$; 16 h luz/8 h oscuridad) y una corriente constante, generada por bombas de agua (Figura 5c). A las 24 horas, se adicionó otra alícuota de inóculo en la misma relación. El cultivo de *biofilm* duró 25 días (hasta su madurez) y, para evitar una limitante de crecimiento debido a nutrientes, se le adicionó semanalmente a cada pecera, una solución de fósforo (219,5 mg $\text{H}_2\text{KPO}_4/\text{L}$), en una relación de 1 mL de solución de fósforo por litro de agua.

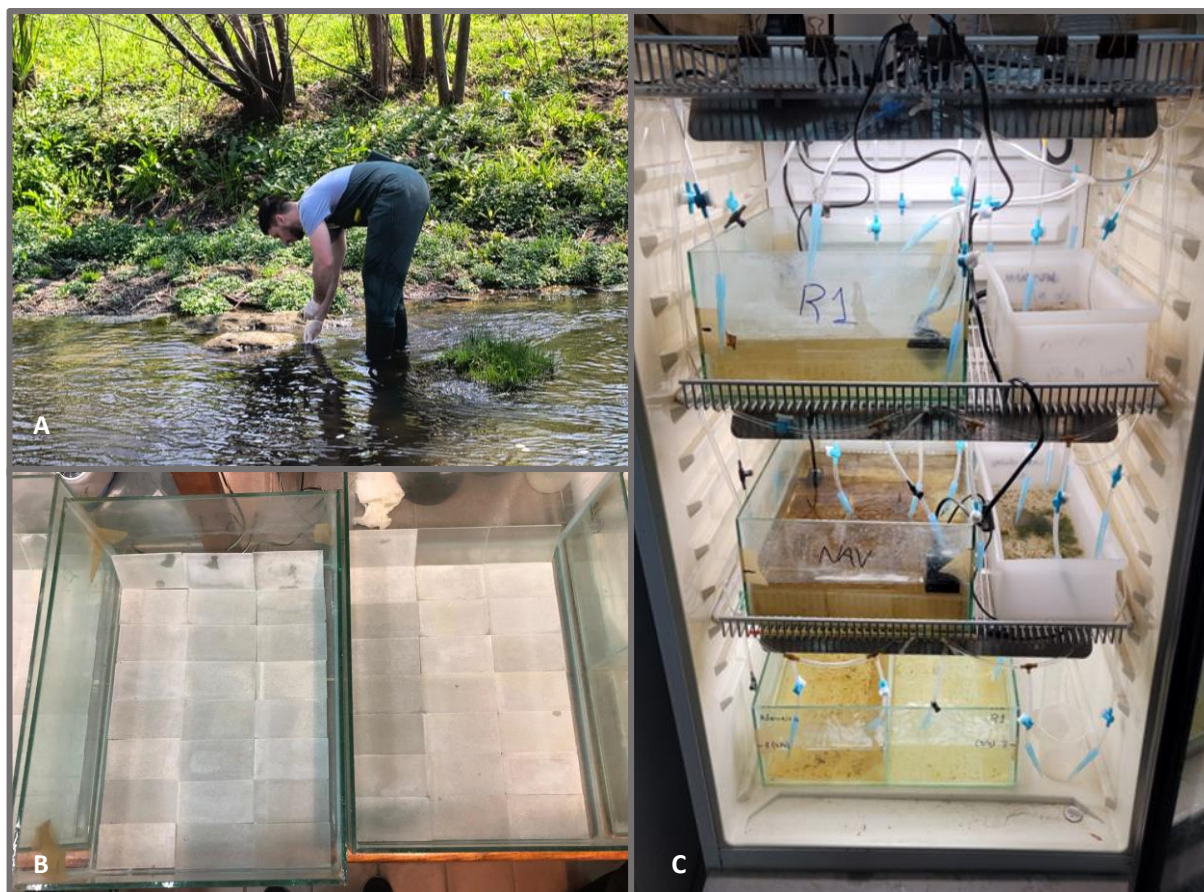


Figura 5. Las muestras de *biofilm* fueron recolectadas en campo raspando superficies de rocas, plantas u objetos sumergidos (A). El cultivo se realizó en peceras cubiertas de placas de vidrio esmerilado (B), en cámaras de incubación con fotoperíodo y temperatura controlados y corriente de agua generado por bombas (C).

Cnesterodon decemmaculatus

Como representante de la ictiofauna, se utilizó al pez nativo *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), también conocido vulgarmente como “madrecita de agua”. Se trata de un pez pequeño de agua dulce, perteneciente a la familia Poecillidae (orden Cyprinodontiformes), que no supera los 5 cm de longitud. Presenta un cuerpo subcilíndrico, boca súpera y hábitos omnívoros, ya sea por ramoneo de superficies o alimentándose de microinvertebrados en la interfase aire/agua. Los machos se distinguen fácilmente de las hembras, principalmente por su menor tamaño y porque presentan una aleta anal modificada en órgano intromitente o gonopodio (Figura 6). Su rápida reproducción, crecimiento acelerado y corta vida generacional le confieren un gran éxito ecológico (Molero y Pisano, 1987).

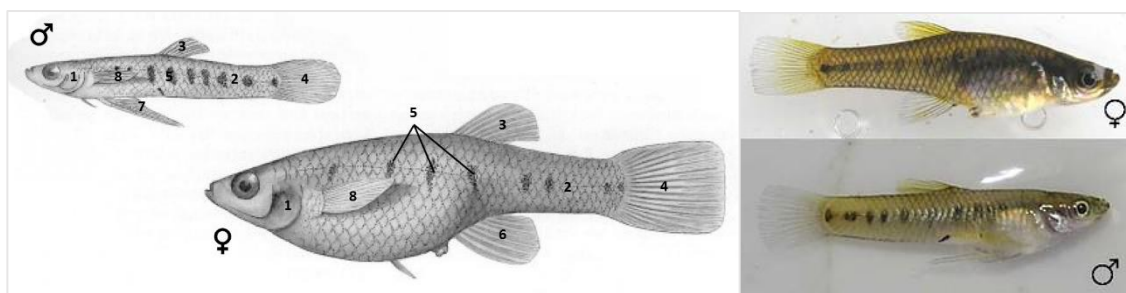


Figura 6. Esquema de un macho y una hembra de *C. decemmaculatus*, indicando sus partes: (1) Opérculo, (2) Línea lateral, (3) Aleta dorsal, (4) Aleta caudal, (5) Fotóforos, (6) Aleta pélvica o anal, (7) Gonopodio, (8) Aletas pectorales. A la derecha, fotografía de ejemplares del cultivo de laboratorio. (Imágenes tomadas de Ferrari *et al.*, 2017).

Su distribución se concentra, principalmente, en la región Pampeana, abarcando Argentina, Brasil y Uruguay, habitando ríos, arroyos y cuerpos de agua lénticos (Lucinda, 2005). Su persistencia a condiciones de alta contaminación, lo hacen un buen representante de las dinámicas y efecto de los contaminantes a nivel local, siendo los efectos observados, más representativos de la realidad. No se considera una especie amenazada ya que no se encuentra en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, www.iucn.org, 2016) y ha sido recomendada para su uso en bioensayos (IRAM, 2008). Además, es una especie que ha sido utilizada para bioensayos ecotoxicológicos tanto para evaluaciones a campo (González Núñez *et al.*, 2024; Zambrano *et al.*, 2018) como en laboratorio para la evaluación de distintos contaminantes (Menendez Helman *et al.*, 2012; Bonifacio *et al.*, 2020; Young *et al.*, 2020).

Debido a estas características, se ha realizado con éxito una estandarización en la cría de esta especie en condiciones de laboratorio (Ferrari *et al.*, 2017), logrando así, la producción *indoor* de una población desarrollada bajo parámetros controlados y libre de contaminación, en el bioterio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA-INEDES) de la Universidad Nacional de Luján.

Particularmente, para los ensayos de exposición de esta tesis, se emplearon hembras adultas de *C. decemmaculatus* del bioterio. Esto permitió reducir la variabilidad debida al sexo en los resultados y, al ser las hembras de mayor tamaño que los machos, nos permitió asegurar la cantidad de material biológico necesario para la determinación de todos los biomarcadores. Los ejemplares fueron recolectados de los estanques de cría del cultivo *indoor*, que permanecen en agua potable sin cloro, con aireación constante, fotoperíodo (16 horas luz /8 horas oscuridad) y temperatura (22°C) controlados, y alimentados *ad libitum* con alimento comercial (Tetrafin), de composición conocida (proteína 41%, grasa 14,8%, carbohidratos 27,1%, ceniza 8,1%, y humedad 9 mg/g, con un contenido energético de 1,823 J/mg).

Parámetros fisicoquímicos

En cada uno de los muestreos, en los que se recolectó *biofilm*, se midieron una serie de parámetros fisicoquímicos. Algunos de ellos fueron *in situ*, utilizando una sonda Hach® y, para el resto de los parámetros, se tomaron muestras de agua que fueron luego procesadas en el laboratorio. En la Tabla 1 se describen los parámetros determinados, la expresión de los resultados y las técnicas empleadas.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos medidos y metodología empleada; ^a APHA, AWWA, 2012.

Parámetro	Unidades	Metodología
<i>In situ</i>		
Temperatura del agua	°C	Sensor Hach®
Oxígeno disuelto (OD)	mg O ₂ /L	Sensor Hach®
Conductividad	μS/cm	Sensor Hach®
pH	U pH	Sensor Hach®
En laboratorio		
Dureza total	mg CaCO ₃ /L	Titulación con EDTA
Alcalinidad	mg CaCO ₃ /L	Titulación con H ₂ SO ₄ ^a
Cloruros	mg Cl ⁻ /L	Titulación con AgNO ₃ ^a
Demanda biológica de oxígeno (DBO)	mg O ₂ /L	Winkler ^a
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg O ₂ /L	Colorimetría ^a
Fósforo reactivo soluble (PRS)	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	Colorimetría ^a
Amonio	mg N-NH ₄ ⁺ /L	Colorimetría ^a
Nitritos	mg N-NO ₂ ⁻ /L	Colorimetría ^a
Metales pesados	μg/L	Absorción atómica ^a

Adicionalmente, utilizando parámetros medidos, se determinaron dos índices:

- *Índice de Calidad del Agua (ICA; Berón, 1984)*: es un método de evaluación de la calidad del agua basado en múltiples parámetros físico-químicos y biológicos como: temperatura, oxígeno disuelto, amonio, cloruros y demanda biológica de oxígeno. Cada parámetro se pondera según su importancia en la calidad del agua, y se combinan en una fórmula que da un valor final en una escala de 0 a 10. Según este valor, el agua se clasifica en categorías que van desde excelente hasta muy contaminada (descarga cloacal).

- **Índice de Biodegradabilidad:** es una relación que se utiliza para evaluar el tipo de contaminación de un efluente. Este índice se obtiene a partir de la comparación entre la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO) y nos permite evaluar la proporción de materia orgánica que puede ser degradada biológicamente por microorganismos en comparación con la carga total de compuestos oxidables. Valores mayores a 0,4 indican una alta biodegradabilidad, favoreciendo el tratamiento mediante procesos biológicos. Cuando la relación se encuentra entre 0,3 y 0,4, la biodegradabilidad es moderada o baja, lo que puede requerir tratamientos físico-químicos complementarios. Finalmente, valores menores a 0,3 sugieren la presencia de compuestos difíciles de degradar por procesos biológicos, haciendo necesario el uso de estrategias de tratamiento alternativas.

Para mayor detalle sobre las técnicas físico-químicas empleadas y los índices calculados, ver “Anexo – Técnicas fisicoquímicas”.

Finalmente, en cada sitio se tomaron muestras de agua que se fijaron con HNO_3 cc., para la posterior cuantificación de metales como arsénico, cadmio, cobre, cromo y plomo. Estos metales fueron seleccionados debido a que han sido previamente reportados, a lo largo de los años, en las zonas de estudio (Ossana *et al.*, 2013; González Núñez *et al.*, 2024) y poseen relevancia ambiental, ya que presentan toxicidad, persistencia y potencial de bioacumulación, que los convierte en contaminantes de interés prioritario. Las determinaciones fueron llevadas a cabo en el laboratorio de química analítica de la Universidad Nacional de Luján (UNLu).

Bioensayos

Todos los bioensayos de interacción *biofilm*-pez se llevaron a cabo en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperiodo (16:8, L:O) y aireación constante. Para los ensayos, se utilizaron peceras de vidrio de $14 \times 14 \times 20$ cm, cada una con un volumen de 2 L. Se asignaron aleatoriamente grupos de entre 6 y 10 hembras de *C. decemmaculatus* a cada pecera, dependiendo del ensayo y las determinaciones posteriores, con un total de cinco réplicas por tratamiento. Los medios de exposición se prepararon con agua potable declorada (AP), con las concentraciones de arsénico definidas para cada experimento, preparadas a partir de diluciones de la solución stock de arsenito de sodio (NaAsO_2 Merck, Alemania; CAS 7784-46-5; concentración nominal: 3746.08 mg As(III) / L). Antes del inicio de cada bioensayo, los peces fueron sometidos a un período de aclimatación de siete días en AP,

manteniéndose en las mismas condiciones experimentales. Durante este período, fueron alimentados diariamente *ad libitum* con alimento Tretafin® en escamas molido.

Durante los bioensayos, ciertos parámetros fisicoquímicos como oxígeno disuelto, pH, conductividad y dureza, fueron controlados semanalmente. Además, los medios de las peceras se recambiaron una vez por semana, y se tomaron muestras al azar para las mediciones de los niveles de arsénico de los distintos tratamientos.

Procesamiento de muestras biológicas (peces y *biofilm*)

Al finalizar cada ensayo de exposición, los peces fueron retirados de a uno con una red pequeña y colocados en vasos de precipitado de 25 mL. Se anestesiaron en frío y cuando no se observaron movimientos operculares ni natatorios, se los retiró con pinza de punta plana, se colocaron sobre Parafilm® y se pesaron en balanza analítica de precisión Mettler-Toledo®. Luego, sobre una placa de parafina en frío, se midieron las longitudes totales con calibre electrónico (precisión: 0,01 mm) y se sacrificaron siguiendo los criterios propuestos por AVMA (2013) y el Comité de Bioética de la Universidad Nacional de Luján (DISP SE ACAD LUJ- 0001438-18). Para ello, se realizó un corte transversal a nivel del opérculo y, bajo una lupa estereoscópica

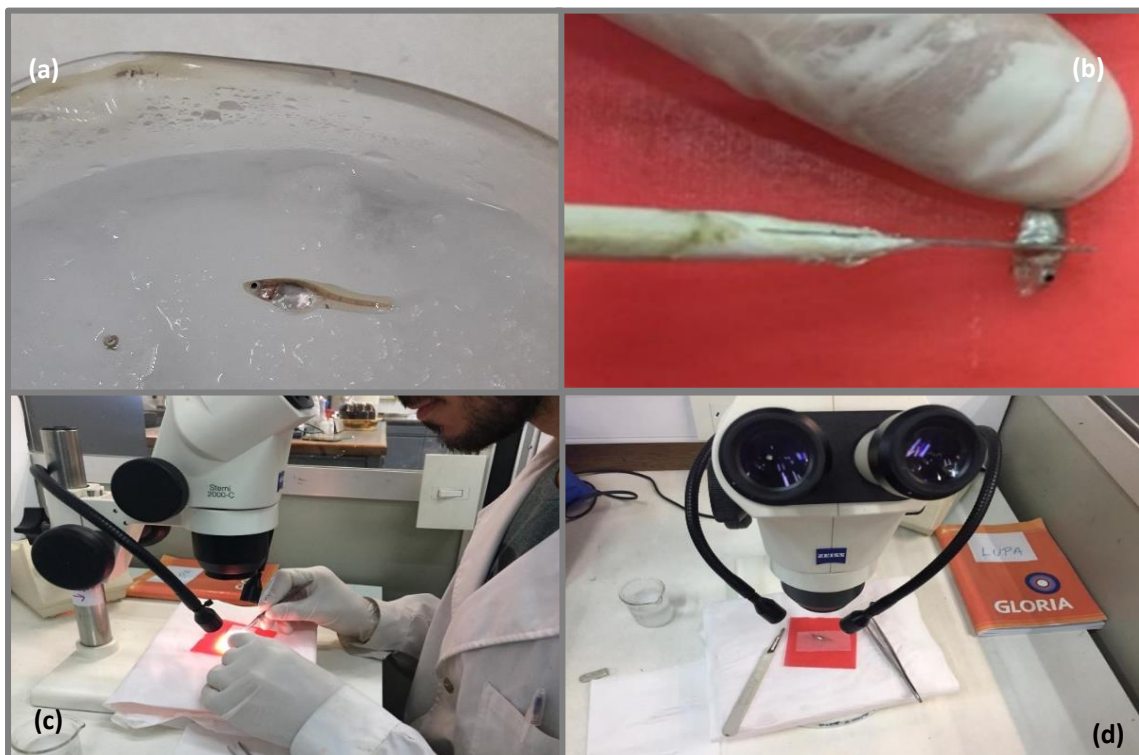


Figura 7. Los individuos procesados fueron anestesiados en agua con hielo (a) y, posteriormente, se realizó la eutanasia mediante un corte transversal a nivel del opérculo (b). Dicho procedimiento, junto con la extracción de los diferentes órganos/tejidos, fueron realizados manteniendo el frío y bajo una lupa estereoscópica (c y d).

(Zeiss) se extrajeron: hígado, branquias, encéfalo y músculo. Todos los órganos/tejidos fueron pesados individualmente y colocados en Eppendorf de 1,5 ml; que se conservaron en freezer a -80°C para las posteriores determinaciones de los parámetros biomarcadores (Figura 7).

En cuanto al *biofilm*, una vez finalizada cada exposición, se retiraron las placas de cada pecera y fueron raspadas con un bisturí estéril dentro de tubos Eppendorf de 1,5 mL (pre-pesados). Las muestras fueron pesadas y conservadas en freezer a -80°C para las posteriores determinaciones de los parámetros biomarcadores.

Composición del *biofilm*

Se determinó la composición de la comunidad microbiana del *biofilm* con el objetivo de caracterizar su estructura y compararla según el análisis necesario en cada caso. La identificación y cuantificación de los organismos presentes en el *biofilm* se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (marca Carl Zeiss, mod. Primo Star) a 400x. Para la determinación taxonómica, se empleó como referencia el “*Atlas de microorganismos de agua dulce*” de Streble y Krauter (1987). Para ello, se tomó una muestra con pipeta Pasteur y se colocó sobre un portaobjetos. El procedimiento consistió en la observación aleatoria de campos del portaobjetos, hasta contabilizar más de 200 individuos por muestra para garantizar una representación adecuada de la comunidad presente.

Los individuos identificados fueron clasificados en los siguientes grupos:

Cianobacterias	Amebozoos
Euglenoides	Hongos
Diatomeas	Rotíferos
Clorofitas (Algas verdes)	Cladóceros
Crisofitas (Algas doradas)	Copépodos
Xantofitas	Anfípodos
Ciliados	Oligoquetos
Heliozoos	Gastrotricos

Biomarcadores

A partir de las muestras biológicas procesadas (peces y *biofilm*), se determinaron varios tipos de biomarcadores detallados a continuación:

Morfométricos

Las longitudes totales y los pesos húmedos medidos de los peces fueron relacionados mediante el cálculo del factor de condición (FC): $(\text{peso total}/\text{longitud total}^3) \times 100$. Así mismo, se utilizó el peso del individuo y se lo relacionó con el peso húmedo del hígado mediante el índice hepatosomático (IHS): $(\text{peso hígado}/\text{peso total}) \times 100$. Con estos índices se realizó una evaluación del estado general de los peces (Di Giulio y Hinton, 2008).

Estrés oxidativo

Los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo se midieron en hígado y branquias de los peces, así como en las muestras de *biofilm*. Se evaluaron: contenido de glutatión reducido (GSH), actividad de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), y peroxidación lipídica a través de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para estas determinaciones, a partir de cada muestra, se preparó un homogenato en una solución compuesta por NaH_2PO_4 0,1 M, KCl 0,15 M, EDTA 1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM y glicerol al 10% v/v (pH 7,4). Se utilizaron 600 μL de la solución para cada órgano, en el caso de los peces, y una relación de 2 μL de solución por cada mg de muestra, en el caso del *biofilm*. El procedimiento se llevó a cabo utilizando un homogeneizador de vidrio/Teflón, manteniendo las muestras en hielo y aplicando 20 golpes a 3000 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4°C (centrífuga Eppendorf 5810 R). La fase sobrenadante obtenida fue fraccionada para las diferentes técnicas y almacenada a -80°C hasta su posterior análisis. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetro Shimadzu UV-1900.

❖ Contenido de Glutatión (GSH):

El contenido de GSH se determinó según el método descrito por Ellman (1959). Para ello, el homogenato fue tratado con ácido tricloroacético (TCA) al 10% en una proporción 1:1 y centrifugado a 10.000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la cuantificación de GSH. La mezcla de reacción contenía 40 μL del sobrenadante, 60 μL de TCA 5% y 1 mL de DTNB 1,5 mM. La reacción de formación de aniones tiolatos se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió a 412 nm, utilizando una curva estándar de GSH. Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles GSH} \times \text{g tej}^{-1}$ y por peso húmedo en *biofilm* ($\mu\text{moles GSH} \times \text{g ph}^{-1}$).

❖ Actividad de la enzima catalasa (CAT):

Se determinó utilizando el método propuesto por Baudhuin *et al.* (1964). La mezcla de reacción consistió en solución de NaH_2PO_4 0,05 M (pH 7,2), H_2O_2 17,8 mM y 40 μL (para peces) o 80 μL (para *biofilm*) de la fracción sobrenadante, en un volumen final de 1,5 mL. La

disminución del H_2O_2 (coeficiente de extinción molar = $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se registró a 240 nm durante 60 s a 25°C. La actividad enzimática se expresó como $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ consumidos} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

❖ Actividad de la enzima glutatión-s-transferasa (GST):

Se determinó siguiendo el método propuesto por Habig *et al.* (1974). La mezcla de reacción consistió en solución NaH_2PO_4 0,1 M (pH 6,5), GSH 10 mM, 1-cloro-2,4-dinitrobenzén (CDNB) 20 mM y 40 μL (para peces) o 80 μL (para *biofilm*) de la fracción sobrenadante, en un volumen final de 1,3 mL. La formación del conjugado GS-DNB (coeficiente de extinción molar = $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a partir de CDBN y GSH se registró a 340 nm durante 2 min a 25°C. La actividad de la enzima se expresó como $\mu\text{moles de CDBN conjugados} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

❖ Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):

La peroxidación lipídica se determinó mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA), en condiciones ácidas y de alta temperatura (95-100°C), siguiendo los métodos propuestos por Ohkawa *et al.* (1979) y Oakes y van der Kraak (2003), con modificaciones de Sager *et al.* (2022). La mezcla de reacción contenía 60 μL de la fracción sobrenadante, 20 μL de solución de butilhidroxitolueno (BHT) 1,407 mM, 20 μL de dodecilsulfato de sodio (SDS) 8,1% m/v, 150 μL de ácido acético 20% v/v y 150 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% m/v; y se incubó a 95 °C durante 1 h. Tras la incubación, se añadieron 100 μL de agua ultrapura y 500 μL de n-butanol, y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min a 15 °C. Los niveles de MDA se cuantificaron fluorométricamente en la fase orgánica (excitación: 515 nm; emisión: 553 nm; espectrofluorómetro Perkin Elmer, LS 55) utilizando una curva estándar de tetrametoxipropeno (TMP). Los resultados se expresaron como nmoles de TBARS por gramo de tejido, en peces (nmoles TBARS $\times \text{g tej}^{-1}$) y por gramo de peso húmedo, en *biofilm* (nmoles TBARS $\times \text{g ph}^{-1}$).

Metabolismo intermediario

Con una parte de los tejidos musculares de los peces se calculó la Asignación de Energía Celular (CEA) según Verslycke *et al.* (2004), como la relación entre la “energía disponible” (E_a), representada por la suma de lípidos, proteínas y carbohidratos, y el consumo energético (E_c), estimado a través de la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS), según la ecuación:

$$CEA = \frac{E_a}{E_c}$$

Una disminución en el CEA indica una reducción en la energía disponible o un mayor gasto de energía, lo que resulta en una menor cantidad de energía disponible para el crecimiento o la reproducción.

El homogenato se preparó a partir de tejido muscular utilizando un *buffer* Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) con MgSO_4 75 μM , polivinilpirrolidona (PVP) 1,5 mg/mL y Tritón X -100 0,18% v/v. La relación utilizada fue de 100 μL de *buffer* por mg tejido; y el *buffer* fue previamente activado con tritón en una relación de 1,8 μL /mL de *buffer*. Se utilizó un homogeneizador de teflón mantenido en hielo a 3000 rpm y 20 golpes. El homogenato final se alicuotó, midiendo inmediatamente la actividad del ETS, mientras que el resto fue almacenado a -80°C para la posterior cuantificación de lípidos, proteínas e hidratos de carbono.

❖ **Actividad del sistema de transporte de electrones (ETS):**

Esta técnica mide la energía consumida a nivel mitocondrial, y está basada en la determinación espectrofotométrica de la reducción de INT (p-Iodonitro Tetrazolium Violet; Sigma) según el método descrito por Fanslow *et al.* (2001), donde el INT actúa como aceptor artificial de electrones (reemplazando al O_2). El homogenato se centrifugó a 2655 g (5000 rpm) durante 10 min a 4°C . La fracción sobrenadante obtenida se utilizó en la mezcla de reacción, que contenía: 50 μL del sobrenadante, 300 μL de *buffer* (TRIS-HCl 0,13 M, pH 8,5 con 0,3% v/v de Tritón X-100), 50 μL de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) 1,7 mM, 50 μL de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) 0,25 mM y 100 μL de INT 8 mM. La mezcla se incubó durante 20 min a 30°C . y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 μL de una solución de formaldehído: H_3PO_4 1:1 v/v. La formación de INT-formazán (proporcional a la actividad respiratoria o flujo electrónico del sistema de transporte de electrones) se registró a 490 nm y, mediante una conversión, los resultados se expresaron como mg de O_2 consumido por gramo de tejido por hora ($\text{mg O}_2 \times \text{g tej}^{-1} \times \text{h}^{-1}$).

❖ **Contenido de hidratos de carbono:**

Se determinó según la técnica propuesta por Carroll *et al.* (1956). Se tomaron 400 μL del homogenato y se los mezcló con 300 μL de TCA 15% m/v. La mezcla se incubó a -20°C durante 10 min y, posteriormente, se centrifugó a 3000 g por 10 min a 4°C . El sobrenadante fue separado y el *pellet* se lavó con 300 μL de TCA 5% m/v, seguido de una nueva centrifugación en las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido se combinó con el previamente separado. A partir del extracto final, se tomaron 250 μL , que se incubaron en hielo por 10 min. Luego, se añadió lentamente 1 mL de solución de antrona (2:1 en H_2SO_4 cc) para formar dos fases en la solución. Tras una incubación adicional de 5 min en hielo, la solución se homogenizó y se incubó a 100°C durante 10 min. Finalmente, se enfrió en hielo

y oscuridad durante 5 min y la absorbancia se registró a 620 nm, utilizando una curva estándar de dextrosa. Los resultados se expresaron en mg de hidratos de carbono por gramo de tejido ($\text{mg HdC} \times \text{g tej}^{-1}$).

❖ **Contenido de lípidos:**

Los lípidos se extrajeron según el método utilizado por Bligh y Dyer (1959) y se midieron según Frings, y Dunn (1970). Para ello, se tomaron 300 μL del homogenato y se mezclaron con 300 μL de cloroformo y 300 μL de metanol de grado analítico. La mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se descartaron la fase superior y la interfase, mientras que la fase inferior (clorofórmica) se transfirió a tubos de vidrio y se evaporó a 100°C durante 5-10 minutos. Una vez evaporados, se adicionó 1 mL de H_2SO_4 cc y se incubó a 100°C durante 10 min. A partir de los extractos obtenidos, se prepararon los triplicados, a los cuales se les agregó 1,5 mL de fosfo-vainillina, preparada en una relación 1:4 de vainillina 0,6% m/v y ácido ortofosfórico de grado analítico. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 min y se dejó enfriar por 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm, utilizando una curva estándar de aceite de oliva. Los resultados se expresaron en mg de lípidos por gramo de tejido ($\text{mg lípidos} \times \text{g tej}^{-1}$).

❖ **Contenido de proteínas totales:**

El contenido de proteínas totales en todos los homogenatos (los utilizados para las determinaciones relacionadas con el estrés oxidativo, el metabolismo intermediario y la neurotoxicidad), se cuantificó mediante el método de Lowry *et al.* (1951) usando albúmina de suero bovino como estándar. Para el ensayo colorimétrico, el homogenato correspondiente se mezcló con 1 mL de una solución 50:1 de Na_2CO_3 al 2% m/v en NaOH 0,1 N y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% m/v en tartrato de sodio y potasio al 1% m/v; y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 100 μL de reactivo de Folin (Merck, el principal constituyente es el ácido fosfomolibdico-tungstico) diluido 1:1 en agua ultrapura. Este se reduce en el medio de reacción pasando de un color amarillo a azul, cuya intensidad se midió a 750 nm. Los resultados se expresaron en mg de proteínas totales por gramo de tejido ($\text{mg proteínas} \times \text{g tej}^{-1}$).

Las diferentes fracciones de la reserva energética (lípidos, proteínas y carbohidratos) fueron transformados en equivalentes energéticos usando sus respectivas energías de combustión (39500 mJ/mg lípidos; 24000 mJ/mg proteínas; y 17500 mJ/mg carbohidratos). La energía consumida, fue estimada a partir del oxígeno consumido por individuo (obtenido a partir de los datos de ETS) que fue transformado en equivalentes energéticos usando los equivalentes oxientálpicos para una mezcla promedio de lípidos, proteínas y azúcar (484 kJ/mol O_2).

Sistema nervioso

Como biomarcador de neurotoxicidad, se evaluó la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en el encéfalo y en tejido muscular de los peces.

El homogenato se preparó en *buffer* fosfato de potasio 0,1 M (pH 8), manteniendo una relación de 50 μ L de *buffer* por mg de tejido. En algunos casos, debido al tamaño reducido de los encéfalos, se realizaron *pools* de dos individuos del mismo tratamiento. El tejido se homogenizó con un homogeneizador de vidrio/teflón, mediante 20 golpes a 3000 rpm, y luego se centrifugó a 10.000 g durante 15 min a 4°C. La fracción sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

❖ Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE):

Se determinó utilizando el método propuesto por Ellman *et al.* (1961). La mezcla de reacción consistió en 1,5 mL de *buffer* fosfato de potasio 0,1 M (pH 8), 25 μ L del sobrenadante, 50 μ L de 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 mM en *buffer* fosfato 0,1 M (pH 7) y 10 μ L de Acetilcolina iodada 0,075 M como sustrato. La formación del anión TNB⁻ (coeficiente de extinción molar = 13,6 mM⁻¹cm⁻¹), producto de la reacción del DTNB con la tiocolina liberada, se registró a 412 nm durante 2 min a 25°C. La actividad de la enzima se expresó como nmoles de acetilcolina consumido por minuto por mg de proteína (nmol ACh cons. x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹).

Actividad extracelular

Los biomarcadores de actividad extracelular fueron determinados en las muestras de *biofilm* por la medición de la actividad de las enzimas fosfatasa alcalina y β -glucosidasa.

Para el homogenato, se tomó una fracción de *biofilm* (de peso húmedo conocido) y se resuspendió en 10 mL de agua ultrapura estéril. Posteriormente, la muestra fue sometida a sonicación (en un baño de ultrasonido/sonicación) en tres intervalos de 1 minuto, con descansos de 30 segundos entre cada uno, para facilitar la liberación de las enzimas extracelulares.

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y β -glucosidasa se determinó siguiendo el método descrito por Romaní y Sabater (1999). Como sustratos se emplearon 4-Metilumbeliferil fosfato (MUP) y 4-Metilumbeliferil β -D-glucopiranosido, respectivamente, a una concentración final de 0,3 mM. Se preparó una curva estándar de 4-Metilumbeliferona (MUF) con concentraciones entre 10 μ M y 50 μ M. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, bajo agitación constante y en oscuridad. Para detener la reacción, se añadió una solución *buffer* de glicina 0,05 M (pH 10,4). La fluorescencia se midió a una longitud de excitación de 365 nm y

una emisión de 455 nm (espectrofluorómetro Perkin Elmer, LS 55). La actividad enzimática se expresó como nmoles de MUF liberados por hora por gramo de peso húmedo ($\text{nmol MUF} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$).

Bioacumulación de arsénico

Para la determinación de As total, se secaron peces y/o *biofilm* en estufa a 60°C por 24 h y, posteriormente, las muestras se molieron con mortero hasta obtener un homogeneizado seco. Se pesó un mínimo de 60 mg de muestra (con peces, en algunos casos se necesitó más de un individuo para alcanzar dicho peso), los cuales se colocaron en un crisol de porcelana y se les añadió 1 mL de solución estabilizadora ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 5% y MgO al 5%), que retiene al As para evitar pérdidas durante la calcinación en seco. A continuación, se realizó una digestión ácida, agregando 2 mL de HNO_3 cc en cada crisol (en el caso de los peces) o 4 mL de HNO_3 cc + 1 mL de H_2O_2 30% - 100 vol (en el caso del *biofilm*) y se llevó a sequedad en plancha calefactora a 120°C. Posteriormente, las muestras fueron calcinadas en mufla durante por 4 h a 450 °C (con un calentamiento progresivo de 200 a 450 °C en 2,5 horas), hasta la obtención de cenizas de color blanco. Las cenizas se disolvieron con HCl cc y se trasvasaron a un matraz de 10 mL, llevándose a volumen con el mismo ácido. Sobre 1 mL de muestra tratada, se realizó la pre-reducción del As mediante la adición 1 mL de solución pre-reductora (5 % de KI + 5% de ácido ascórbico). Finalmente, la concentración de As se determinó por espectrofotometría de absorción atómica en el laboratorio de Química Analítica de la Universidad Nacional de Luján (UNLu). Los resultados se expresaron como $\mu\text{g As/mg peso seco}$.

A modo de resumen de la sección de biomarcadores y bioacumulación, se presenta un diagrama indicando las determinaciones que se realizaron a partir de los ensayos, tanto en peces (figura 8) como en *biofilm* (figura 9):

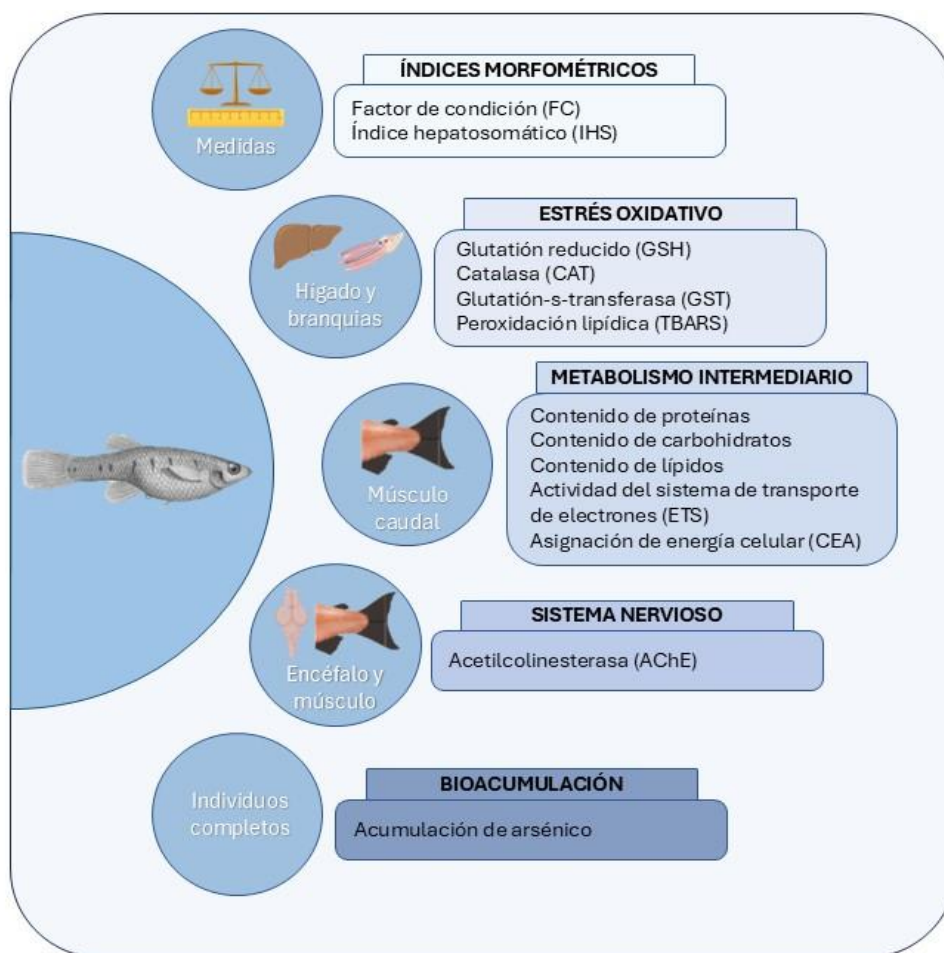


Figura 8. Diagrama de determinaciones realizadas en los peces de los distintos ensayos.

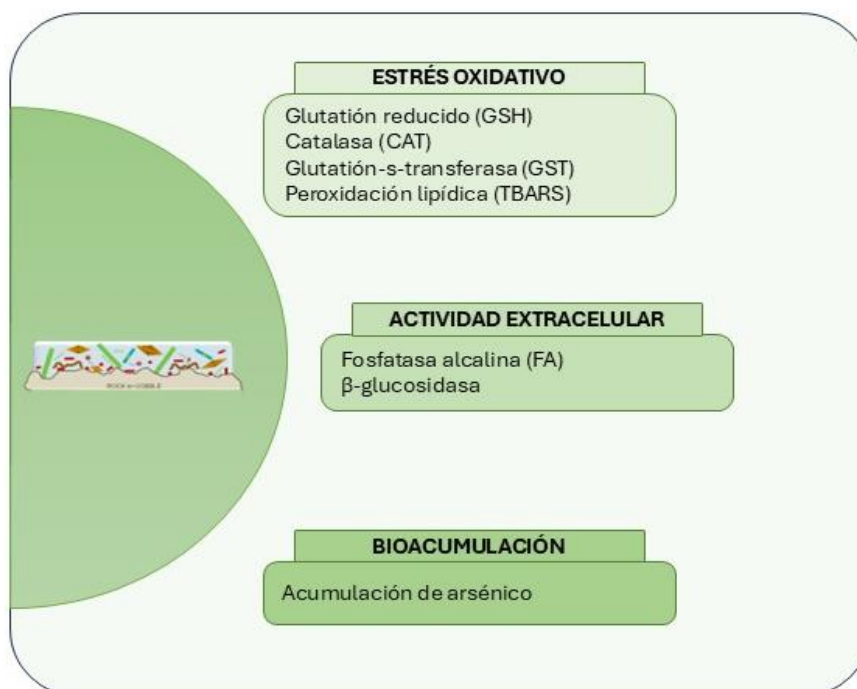


Figura 9. Diagrama de determinaciones realizadas en *biofilm* de los distintos ensayos.

En todos los datos obtenidos, se evaluó la normalidad y la homogeneidad de varianzas por medio del *test* de Kormogorov- Smirnov y el *test* de Bartlett, respectivamente.

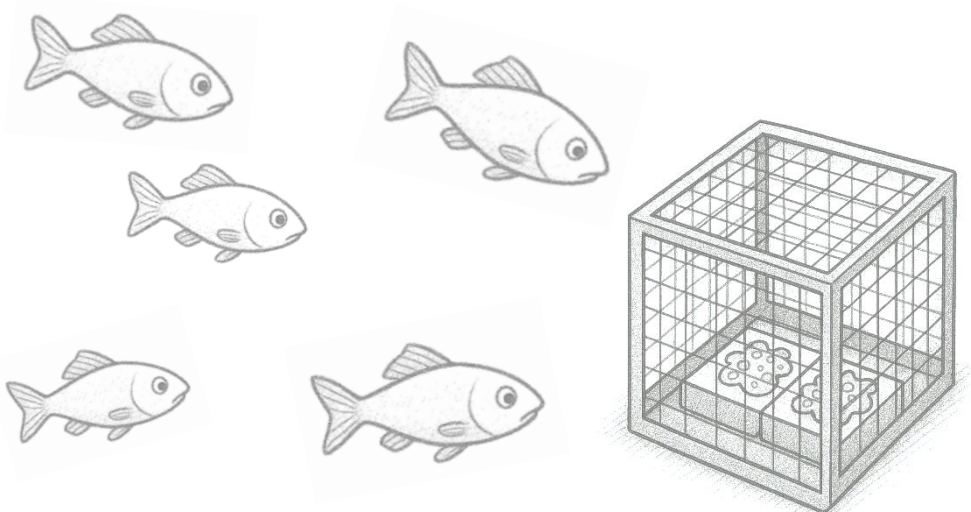
Para las comparaciones estadísticas entre tratamientos, se emplearon pruebas de comparaciones múltiples utilizando el programa Graphpad Instat. Se realizó un ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey-Kramer para múltiples comparaciones (en aquellos datos que cumplieron la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza) o un análisis de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos con un *post hoc* de Dunn's para múltiples comparaciones (en aquellos datos que no cumplieron alguno de los supuestos) (Zar, 2010).

Para las comparaciones entre dos tratamientos, se aplicaron *t-tests* no apareados en los casos donde los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. En caso contrario, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para datos no paramétricos.

Posteriormente, con el objetivo de realizar un análisis más integral, se llevaron a cabo análisis multivariados con los tratamientos o poblaciones y las variables bioquímicas, utilizando el programa Past 3, aplicando el método de análisis de ordenación de componentes principales (PCA).

Capítulo 1:

Ensayo de exposición a
arsénico de *Cnesterodon*
decemmaculatus en presencia
de *biofilm*



Introducción

Los bioensayos crónicos y subcrónicos son herramientas útiles en ecotoxicología para evaluar, en organismos acuáticos, los efectos subletales de la exposición a contaminantes a largo plazo. Estos ensayos permiten detectar respuestas que no siempre son evidentes en estudios agudos, siendo más realistas y relevantes para evaluar la contaminación ambiental en ecosistemas acuáticos afectados por contaminantes persistentes como el arsénico (Morales, 2004; Walker *et al.*, 2012; Carriquiriborde, 2021). En el caso de los peces, los bioensayos crónicos y subcrónicos han demostrado ser ventajosos para estudiar la bioacumulación, los efectos en el metabolismo energético, el estrés oxidativo y otras variables fisiológicas clave para comprender el impacto ecológico de estos tóxicos (de La Torre *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2012; Brandts *et al.*, 2022; Shahjahan *et al.*, 2022).

El arsénico es conocido por sus efectos tóxicos en organismos acuáticos, incluyendo alteraciones en biomarcadores que comprenden desde lo comportamental hasta alteraciones bioquímicas, enzimáticas y de genotoxicidad (Puntoriero *et al.*, 2018; González Núñez *et al.*, 2022; Lompré *et al.* 2023). Sin embargo, las interacciones entre este contaminante y los componentes del ecosistema, como el *biofilm*, añaden mayor complejidad y realismo para entender su dinámica en ambientes naturales.

El *biofilm*, desempeña un rol dual en la modulación de la toxicidad del As. Por un lado, puede actuar como un sumidero de contaminantes, reteniendo y transformando compuestos tóxicos mediante procesos de adsorción, bioacumulación y biotransformación. Esto puede reducir su biodisponibilidad en el agua, atenuando sus efectos en organismos expuestos (Mishra *et al.*, 2022; Roy *et al.*, 2024; Qiu *et al.*, 2024). Por otro lado, bajo ciertas condiciones ambientales, el *biofilm* puede liberar los contaminantes al medio, afectando la toxicidad global del sistema acuático (Magellan *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2019). Estudios recientes han demostrado que estas dinámicas pueden influir en la exposición de peces a As, modulando sus respuestas fisiológicas y bioquímicas (Tuulaikhuu *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2024).

Este capítulo se centra en la evaluación del efecto del *biofilm* como modulador de la toxicidad del As en el pez *Cnesterodon decemmaculatus*, utilizando bioensayos subcrónicos (8 días) y crónicos (21 días). Los resultados obtenidos contribuyen a comprender cómo las interacciones entre el *biofilm* y el As afectan la fisiología de los peces, proporcionando información valiosa para la gestión y restauración de cuerpos de agua contaminados.

Objetivos específicos

- Analizar el impacto del As y el *biofilm* en hembras adultas de *C. decemmaculatus* expuestas durante distintos tiempos (8 y 21 días) a concentraciones subletales de As (0,2, 0,5 y 1 mg As/L), en presencia de *biofilm* con distintos orígenes.
- Evaluar, en los peces expuestos a los distintos tratamientos, la respuesta de biomarcadores de estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) en hígado y branquias, neurotóxicos (AChE) en encéfalo y músculo y metabolismo intermediario (ETS, lípidos, carbohidratos y proteínas) en musculo caudal junto con la asignación energética celular (CEA).
- Determinar la acumulación de arsénico en peces expuestos a las diferentes concentraciones del tóxico y su relación con la presencia de *biofilm*.
- Evaluar la respuesta del *biofilm* a la exposición al arsénico e interacción con los peces mediante la medición de biomarcadores de estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) y actividad enzimática extracelular (fosfatasa alcalina y β -glucosidasa).
- Integrar la información de los biomarcadores medidos para identificar patrones de respuesta biológica y diferenciar entre condiciones experimentales mediante análisis multivariados.

Materiales y Métodos

Sitios de muestreo

Para la realización de los ensayos, el *biofilm* fue recolectado, en septiembre de 2023, en dos sitios pertenecientes a distintas cuencas hidrográficas, seleccionados por las características particulares de las condiciones ambientales que moldean sus comunidades microbianas, si bien ambos presentan niveles relativamente bajos de contaminación (Palacio, 2020; De Diego, 2021):

➤ *Arroyo Naveira (Nav, Cuenca del Río Luján):*

(-34.567302, -59.064189) Se trata de un arroyo de segundo orden de la cuenca del río Luján. El muestreo se llevó a cabo en su intersección con la Ruta Nacional 7, aproximadamente a 5 km del curso principal del río, en las afueras de la ciudad de Luján. Se trata de un arroyo perenne de unos 8 km de longitud, caracterizado por un caudal muy bajo debido a la suave pendiente de la región, baja profundidad, presencia de macrófitas y un fondo sin rocas o guijarros, por lo que se compone de sedimentos finos, principalmente limo y arcilla. Se ubica en una región con impacto humano moderado a bajo rodeado de actividad principalmente agrícola (Figura 10).



Figura 10. Sitio Naveira (Nav), ubicado en un arroyo de segundo orden de la cuenca del río Luján.

➤ *Represa Roggero (R1, Cuenca del Río Reconquista):*

(-34.684614, -58.854516) Está localizado justo aguas abajo de la represa Roggero, que es el límite de la cuenca superior del río Reconquista, en el área de confluencia de los arroyos La Chozza, Durazno y La Horqueta. Es un sitio con mayor caudal (debido a que se trata del cauce principal del río), una corriente mayor (impulsada por la represa) que se

ve atenuada por la presencia de numerosas macrófitas y vegetación circundante. Posee un fondo rocoso con deposición de abundante sedimento. Aunque la calidad del agua es relativamente similar a la del arroyo Naveira, las comunidades microbianas del *biofilm* están adaptadas a las particularidades ambientales de esta cuenca, lo que proporciona un punto de comparación (Figura 11).



Figura 11. Sitio Represa Roggero (R1), ubicado en la cabecera del río Reconquista.

En ambos sitios, las muestras de *biofilm* fueron recolectadas directamente de sustratos sólidos como piedras y vegetación sumergida, asegurando que los inóculos reflejen la estructura y funcionalidad de las comunidades naturales. Posteriormente, los inóculos fueron transportados al laboratorio en condiciones controladas para preservar su viabilidad y utilizados para cultivar *biofilm* bajo condiciones estandarizadas, asegurando la representatividad de cada sitio en los ensayos de exposición, según lo explicado previamente en la sección de “Recolección y cultivo de *biofilm*” en “Materiales y métodos generales” (pág. 33). Para evaluar la representatividad de la comunidad, se analizó la composición de la misma microscópicamente (dentro de las 24 horas posteriores al muestreo), contabilizando grandes grupos, tanto en el inóculo recolectado, como a tiempo final del cultivo en el laboratorio y se realizó un análisis de Sørensen, para evaluar la similitud.

El índice de Sørensen (Sørensen, 1948), es ampliamente utilizado en estudios ecológicos para comparar comunidades biológicas, ya que proporciona una medida de similitud basada en la presencia o ausencia de especies.

El índice de Sørensen se define como:

$$S = \frac{2a}{2a + b + c}$$

donde:

- a representa el número de especies compartidas por ambas comunidades,
- b el número de especies exclusivas de la primera comunidad,
- c el número de especies exclusivas de la segunda comunidad.

Este índice toma valores entre 0 y 1, donde 0 indica una completa disimilitud (sin especies en común) y 1 representa una identidad total en la composición de especies entre ambas comunidades. Debido a su sensibilidad hacia las especies comunes, este índice resulta particularmente apropiado en contextos donde se espera que la perturbación ambiental no genere un recambio completo de especies, sino modificaciones sutiles en la comunidad. Su aplicación permite, por tanto, detectar si las comunidades mantienen un núcleo estructural similar bajo diferentes condiciones experimentales.

Finalmente, se realizó un perfil físico-químico de los sitios, midiendo parámetros tanto *in situ* (temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad), como en laboratorio a partir de muestras de agua (dureza, alcalinidad, cloruros, amonio, fósforo reactivo soluble, nitritos, DBO, DQO y la presencia de metales pesados como arsénico, cadmio, cobre, plomo y cromo) y se calcularon índices como el de biodegradabilidad y el índice de calidad de agua ICA (Berón, 1984). Todas las determinaciones se llevaron a cabo según lo explicado en la sección *Parámetros físico-químicos de Materiales y métodos generales*.

Bioensayos

Para los ensayos de exposición, se utilizaron hembras adultas de *Cnesterodon decemmaculatus*, extraídas de los estanques de cría del bioterio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA-INEDES) de la Universidad Nacional de Luján.

Una semana antes del bioensayo, los peces fueron aclimatados a las condiciones experimentales. Para ello, se utilizaron peceras de vidrio de 2 litros (5 por tratamiento) con agua potable sin cloro, pasada por filtro de arsénico, en las cuales se colocaron 10 individuos en cada una. Se colocaron en cámaras de incubación con fotoperíodo y temperatura controlada, las cuales fueron iguales a las condiciones del acuario y, las mismas, se mantuvieron estables durante todo el bioensayo: temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$; fotoperíodo 16 h luz/8 h oscuridad; y aireación constante (Figura 12a). La alimentación durante la aclimatación fue *ad libitum* y durante el ensayo correspondió al 2% de la biomasa de cada pecera (calculado pesando al grupo de peces presentes en cada pecera y promediando entre ellas), y se les suministró alimento para peces en escamas Tetrafin® triturado con mortero.

Una vez finalizado el período de aclimatación de los peces (7 días) y alcanzada la maduración del *biofilm* en las placas (25 días), se realizaron las exposiciones a arsénico. Estas fueron llevadas a cabo en dos tiempos: 8 días y 21 días; dos orígenes del *biofilm*: Nav y R1; y se emplearon tres concentraciones: 0,2, 0,5 y 1,0 mg As/L; preparadas a partir de diluciones de la solución stock de NaAsO₂. Todos los tratamientos, a excepción de los de 0,2 mg As/L, fueron realizados de manera contemporánea (primavera 2023). Los tratamientos con 0,2 mg As/L, se realizaron en un ensayo previo, únicamente durante 21 días, en primavera del año 2022 (con su respectivo muestreo de *biofilm*). Este bioensayo fue preliminar y sirvió para poner a punto el protocolo de exposición, definir las concentraciones y la forma de cultivo del *biofilm*. Sin embargo, a pesar de ser preliminar, los resultados fueron considerados en este estudio.

En los tratamientos con *biofilm* se colocaron 3 placas colonizadas por pecera (de origen correspondiente al tratamiento, Nav o R1), dentro de estructuras malladas que impedían que los peces ramonearan dicho *biofilm* (Figura 12b). La cantidad de placas por pecera estuvo determinada por la capacidad máxima de cultivo de *biofilm* en el laboratorio y por la cantidad de muestras necesarias para las determinaciones de los diferentes biomarcadores.

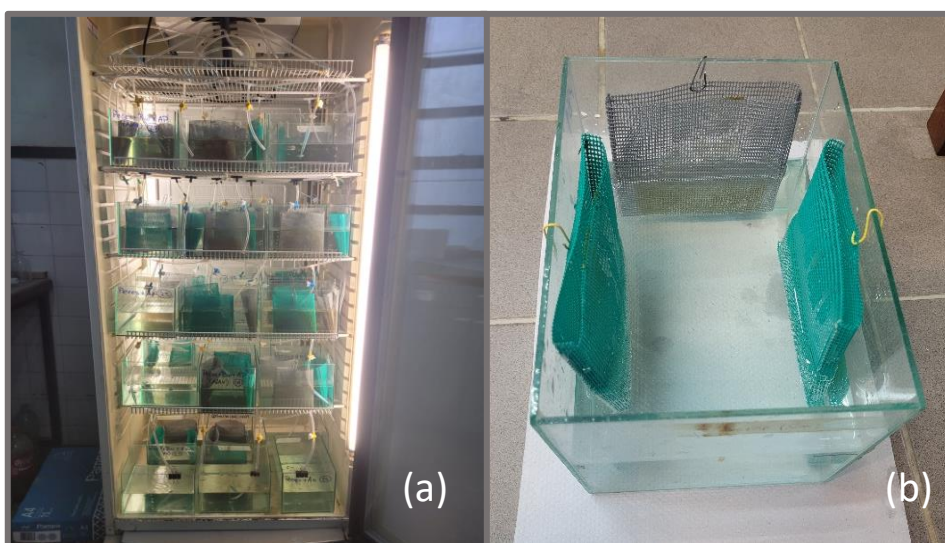


Figura 12. Cámara de incubación en la que se llevó a cabo el bioensayo, con temperatura y fotoperíodos controlados, y aireación constante (a). Placas de *biofilm* dentro de las estructuras malladas que impiden que los peces se alimenten de ellas (b).

Debido a la imposibilidad de procesar todos los organismos en un solo día, las réplicas de los tratamientos fueron iniciadas en fechas diferidas. Esta estrategia permitió asegurar un manejo adecuado de las muestras y garantizar la precisión en la recolección de datos, evitando errores por saturación en los procedimientos experimentales. En la figura 13 se observa la disposición general de todos los tratamientos.

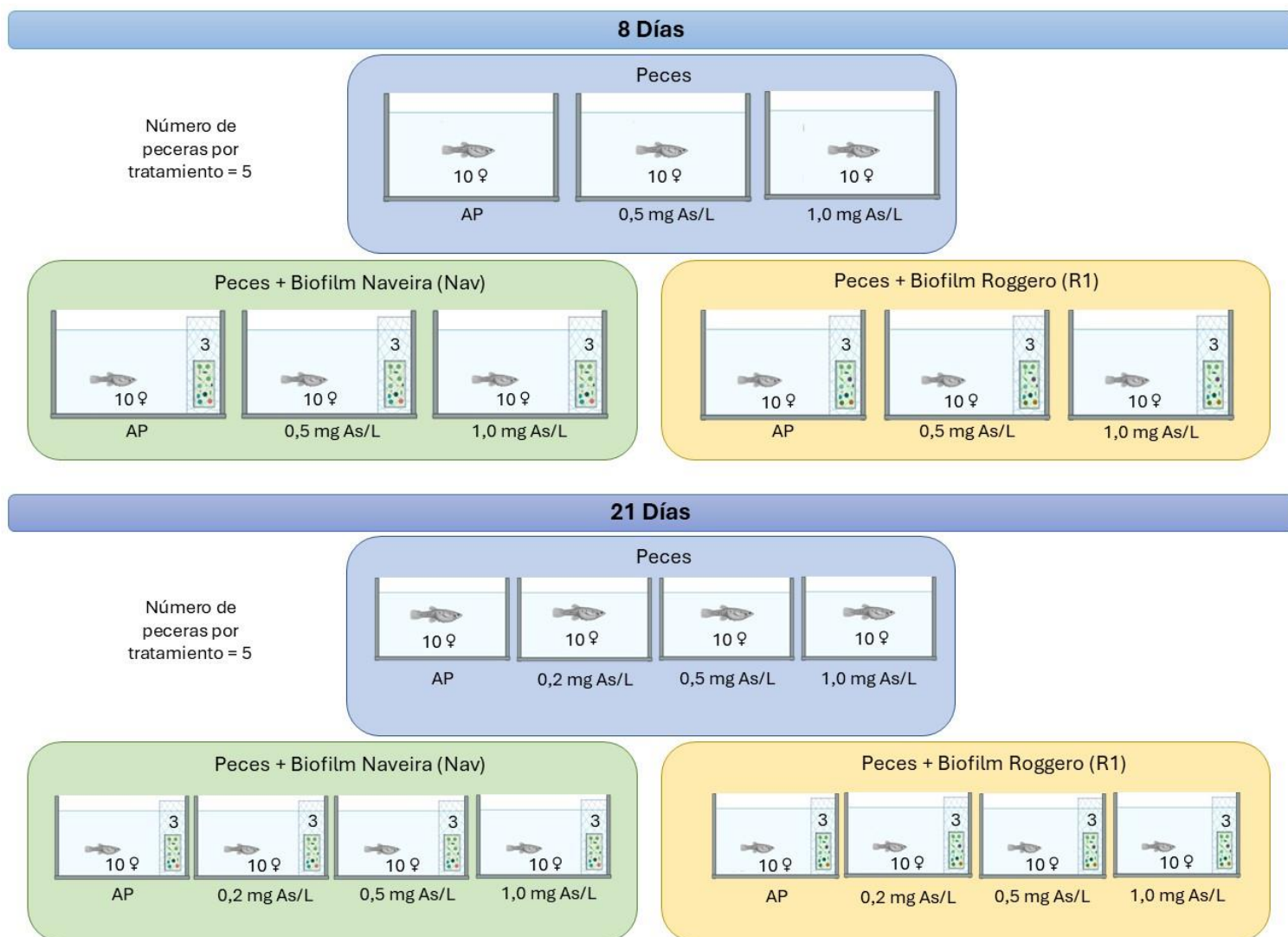


Figura 13. Esquema del diseño experimental indicando los tratamientos realizados en ambos tiempos de exposición (8 días y 21 días). Los tratamientos fueron: peces solos en agua potable (AP), peces con *biofilm* cultivado de Naveira (Nav) y peces con *biofilm* cultivado de la represa Roggero (R1). Las concentraciones de As(III) utilizadas fueron 0,2, 0,5 y 1 mg As/L. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado.

Biomarcadores

Al finalizar los tiempos de exposición de los bioensayos, se realizó el sacrificio, procesamiento y toma de muestras tanto de peces como de *biofilm*. Posteriormente, se realizaron las determinaciones de los diferentes biomarcadores sobre las muestras obtenidas. Tanto el procesamiento de los organismos como las mediciones de los biomarcadores, se realizaron siguiendo los procedimientos detallados en la sección de “*Materiales y métodos generales*”.

En los peces, se evaluaron biomarcadores de estrés oxidativo en hígado y branquias, incluyendo el contenido de glutatión reducido (GSH), la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) y el nivel de peroxidación lipídica, estimado mediante sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La actividad de la enzima catalasa (CAT) se determinó exclusivamente en hígado, ya que en branquias su actividad fue demasiado baja para ser cuantificada. A fin de identificar posibles efectos sobre el sistema nervioso, se midió la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en encéfalo y músculo. Asimismo, se analizaron parámetros del metabolismo intermediario en músculo, incluyendo los contenidos de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, así como la actividad de la cadena transportadora de electrones (ETS), a partir de los cuales se calculó el índice de asignación de energía celular (CEA). Adicionalmente, se determinó la bioacumulación de arsénico en ejemplares completos de peces.

En el caso del *biofilm*, se analizaron biomarcadores de estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) y biomarcadores relacionados con la actividad extracelular, tales como fosfatasa alcalina y β -glucosidasa. Estos fueron evaluados en el cultivo previo al bioensayo y a tiempo final del ensayo (21 días).

Análisis estadístico

Para facilitar el análisis e interpretación de los resultados, los datos se organizaron en tres tipos de comparaciones:

- 1) Se realizaron ANOVAS de una vía con comparaciones múltiples entre concentraciones de As y AP dentro de cada grupo experimental (1: sin *biofilm*, 2: con *biofilm* de Nav o 3: con *biofilm* de R1); y las diferencias significativas se indican con letras diferentes con subíndices que indican el grupo analizado (1, 2 o 3).
- 2) También se realizaron ANOVAS con comparaciones múltiples entre grupos para cada concentración; y las diferencias significativas fueron señaladas con líneas punteadas entre los tratamientos.
- 3) Por último, se realizaron *t-tests* o pruebas de Mann-Whitney entre tiempos de exposición (8 y 21 días) para cada tratamiento, representado en las tablas.

Todos los análisis fueron llevados a cabo según lo establecido en “Materiales y Métodos Generales”.

Resultados

Parámetros fisicoquímicos

Sitios de muestreo

En la tabla 2, se presentan los valores de los distintos parámetros fisicoquímicos y metales pesados medidos en los sitios de muestreo. Además, se presentan los límites permitidos para dichos valores.

Los sitios seleccionados para la recolección de *biofilm*, Naveira (Nav) y Represa Roggero (R1), presentaron condiciones fisicoquímicas generales similares, con valores que reflejan una contaminación relativamente baja. Esta situación se ve respaldada por los altos valores del Índice de Calidad de Agua (ICA), de 9,6 en Nav y 8 en R1. No obstante, se observaron algunas diferencias puntuales, como niveles más elevados de amonio (0,310 mg NH₃-N/L) y DBO (9,1 mg O₂/L) en R1, en comparación con Nav (amonio: 0,003 mg NH₃-N/L y DBO: 2,5 mg O₂/L), lo cual sugiere una mayor carga orgánica en el primero. Además, el fósforo reactivo soluble (PRS) en R1 se encontró cercano al límite permitido (0,95 mg P-PO₄³⁻/L), lo que podría indicar un aporte adicional de nutrientes asociado a fuentes antrópicas.

En cuanto a los metales pesados, ambos sitios presentaron concentraciones de cadmio y cobre superiores a los valores guía establecidos (Cd: 2 µg/L y 3,7 µg/L; Cu: 9,8 µg/L y 2 µg/L en Nav y R1, respectivamente). Asimismo, se registraron niveles elevados de arsénico, con una concentración de 54 µg/L en Nav y 40 µg/L en R1.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos y metales pesados medidos en los sitios muestreados (Nav: Naveira; R1: represa Roggero), para los dos años en los que se realizaron los ensayos (2022 y 2023). Se muestran los límites permitidos para los parámetros fisicoquímicos de descargas a cuerpos de agua superficiales (Ley 5.965, Decreto 2009/60; Resolución 389/98, anexo II y Resolución 336/03, Anexo II; Res. de la AdA N° 42/06 y Res. de ACUMAR N° 283/19) y para los metales pesados establecidos para la protección de la vida acuática (Ley 24.051, Decreto 831/93, anexo II). En rojo, valores que están por fuera de los límites permitidos. PRS: fósforo reactivo soluble; DBO: demanda biológica de oxígeno; DQO: demanda química de oxígeno. ND: no detectado; NM: no medido.

	Septiembre 2022		Septiembre 2023		
Parámetro	Naveira (Nav)	Represa Roggero (R1)	Naveira (Nav)	Represa Roggero (R1)	Límites permitidos
In situ					
Temperatura en el agua (°C)	21,4	18,9	18,3	16,7	>35
pH	9,31	8,94	7,46	7,73	6,5-9,0
Conductividad (µS/cm)	818	1186	779	793	
Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	17,04	12,84	12,39	11,40	≥ 5,0
En laboratorio					
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	68	122	73	79	-
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	237	224	117	100	-
Cloruros (mg Cl ⁻ /L)	4,8	16,5	1,0	5,0	≤ 250
PRS (mg P-PO ₄ ³⁻ /L)	0,05	1,32	N/D	0,95	≤ 1,0
Amonio (mg NH ₃ -N/L)	0,053	0,168	0,003	0,310	≤ 1,37
Nitritos (mg NO ₂ -N/L)	0,037	0,016	0,059	0,044	≤ 1,0
DBO (mg O ₂ /L)	7,2	3,1	2,5	9,1	≤ 10
DQO (mg O ₂ /L)	12,5	30,0	98,9	75,6	≤ 250
Índice de biodegradabilidad (DBO/DQO)	0,58	0,10	0,02	0,12	-
Índice de Calidad de Agua (ICA)	8,3	9,3	9,6	8,0	-
Metales					
Arsénico (µg As/L)	64	62	54	40	≤ 50
Cadmio (µg Cd/L)	<2	<2	2,0	3,7	≤ 0,8
Cobre (µg Cu/L)	4,5	2,2	9,8	2,0	≤ 2,0
Cromo (µg Cr/L)	NM	NM	ND	ND	≤ 2,0
Plomo (µg Pb/L)	4,6	3,3	<0,5	ND	≤ 2,0

Bioensayo

En la Tabla 3 se presentan los parámetros fisicoquímicos medidos durante el ensayo, incluyendo oxígeno disuelto, pH, conductividad y dureza, para todos los tratamientos. Los resultados muestran que todos los parámetros se mantuvieron constantes o sin grandes variaciones a lo largo de todo el periodo de ensayo, indicando que las condiciones ambientales fueron estables y controladas durante las exposiciones experimentales. Además, se muestran

las concentraciones analíticas de arsénico utilizadas en todos los tratamientos (0; 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos medidos durante los ensayos. Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media (ESM); entre paréntesis se indica el número de muestras. También se presentan los valores analíticos de As total en los medios de ensayo (agua potable declorada), para todos los tratamientos. Límite de cuantificación: 0,003 mg As/L. OD: oxígeno disuelto; P: peces; Bio: biofilm; Nav: arroyo Naveira; R1: represa Roggero.

Tiempo	Tratamiento	mg As/L	OD (mg/L)	pH	Conductividad (μ S/cm)	Dureza (mg CaCO ₂ /L)	Concentración analítica (mg As/L)
8 días	Peces	0	7,71 $\pm$ 0,14 (5)	8,53 $\pm$ 0,02 (5)	924 $\pm$ 19 (5)	86 $\pm$ 2 (5)	0,005
		0,5	8,10 $\pm$ 0,03 (5)	8,72 $\pm$ 0,01 (5)	898 $\pm$ 07 (5)	83 $\pm$ 1 (5)	0,497
		1	7,94 $\pm$ 0,10 (5)	8,66 $\pm$ 0,03 (5)	910 $\pm$ 05 (5)	78 $\pm$ 1 (5)	1,034
	P + Bio Nav	0	7,84 $\pm$ 0,11 (5)	7,12 $\pm$ 0,06 (5)	871 $\pm$ 10 (5)	78 $\pm$ 1 (5)	0,035
		0,5	6,54 $\pm$ 0,19 (5)	7,34 $\pm$ 0,03 (5)	959 $\pm$ 20 (5)	69 $\pm$ 2 (5)	0,501
		1	6,55 $\pm$ 0,31 (5)	7,48 $\pm$ 0,04 (5)	898 $\pm$ 04 (5)	74 $\pm$ 1 (5)	1,024
	P + Bio R1	0	8,26 $\pm$ 0,12 (5)	7,18 $\pm$ 0,06 (5)	924 $\pm$ 21 (5)	74 $\pm$ 1 (5)	0,038
		0,5	6,32 $\pm$ 0,20 (5)	7,25 $\pm$ 0,04 (5)	960 $\pm$ 16 (5)	78 $\pm$ 1 (5)	0,497
		1	6,80 $\pm$ 0,26 (5)	7,41 $\pm$ 0,02 (5)	890 $\pm$ 05 (5)	74 $\pm$ 1 (5)	0,970
21 días	Peces	0	8,19 $\pm$ 0,01 (5)	8,50 $\pm$ 0,06 (5)	943 $\pm$ 23 (5)	93 $\pm$ 2 (5)	0,037
		0,2	8,03 $\pm$ 0,07 (5)	8,63 $\pm$ 0,06 (5)	880 $\pm$ 03 (5)	78 $\pm$ 1 (5)	0,215
		0,5	7,87 $\pm$ 0,11 (5)	8,63 $\pm$ 0,01 (5)	921 $\pm$ 09 (5)	78 $\pm$ 1 (5)	0,553
		1	7,86 $\pm$ 0,05 (5)	8,68 $\pm$ 0,02 (5)	900 $\pm$ 03 (5)	78 $\pm$ 1 (5)	1,031
	P + Bio Nav	0	6,91 $\pm$ 0,12 (5)	7,56 $\pm$ 0,02 (5)	1044 $\pm$ 38 (5)	74 $\pm$ 1 (5)	0,039
		0,2	7,66 $\pm$ 0,07 (5)	8,63 $\pm$ 0,06 (5)	894 $\pm$ 05 (5)	80 $\pm$ 1 (5)	0,229
		0,5	7,29 $\pm$ 0,04 (5)	7,63 $\pm$ 0,04 (5)	936 $\pm$ 20 (5)	74 $\pm$ 1 (5)	0,476
		1	6,49 $\pm$ 0,12 (5)	7,84 $\pm$ 0,03 (5)	908 $\pm$ 09 (5)	73 $\pm$ 1 (5)	1,109
	P + Bio R1	0	6,77 $\pm$ 0,13 (5)	7,54 $\pm$ 0,01 (5)	906 $\pm$ 12 (5)	74 $\pm$ 1 (5)	0,046
		0,2	7,21 $\pm$ 0,10 (5)	8,69 $\pm$ 0,06 (5)	901 $\pm$ 07 (5)	73 $\pm$ 1 (5)	0,235
		0,5	6,05 $\pm$ 0,10 (5)	7,55 $\pm$ 0,02 (5)	886 $\pm$ 06 (5)	74 $\pm$ 1 (5)	0,596
		1	6,75 $\pm$ 0,10 (5)	7,59 $\pm$ 0,02 (5)	896 $\pm$ 03 (5)	72 $\pm$ 1 (5)	1,013

Composición del *biofilm*

La figura 14 muestra la composición porcentual de las comunidades de *biofilm* en los sitios de muestreo Nav y R1, tanto en condiciones de campo como en cultivos de laboratorio, para el ensayo realizado el 2023. En el *biofilm* de campo de Nav, las clorofitas (55%), con una gran abundancia de especies filamentosas, fueron el grupo predominante, seguidas por las diatomeas (27%) y las cianobacterias (11%). Por su parte, al analizar el cultivo de laboratorio, se observó que la abundancia de clorofitas disminuyó al 34%, mientras que las diatomeas se mantuvieron relativamente constantes (25%). Esta notable disminución de las algas verdes produjo un aumento en la abundancia relativa de otros grupos como las cianobacterias (20%), los ciliados (14%), los rotíferos (5%) y los amebozoos (3%). El índice de Sørensen entre el *biofilm*

de campo y el cultivo de Nav fue de 0,70, lo que indica que el cultivo en laboratorio tiene una buena representatividad de la comunidad natural, a pesar de las variaciones en las abundancias relativas.

Por otro lado, en el *biofilm* de R1, las clorofitas fueron nuevamente el grupo predominante (48%), seguidas por las diatomeas (31%) y los ciliados (15%). En el cultivo de laboratorio, los grupos predominantes se mantuvieron, aunque con algunas variaciones en sus abundancias. Las clorofitas permanecieron casi constantes (44%), pero las diatomeas se redujeron a un 17% y los ciliados aumentaron a un 20%. Además, se observó un aumento en la abundancia de otros grupos minoritarios como las cianobacterias (7%), los rotíferos (7%) y los amebozoos (4%). El índice de Sørensen entre el *biofilm* de campo y el cultivo de R1 fue de 0,74, indicando una alta representatividad de la comunidad natural.

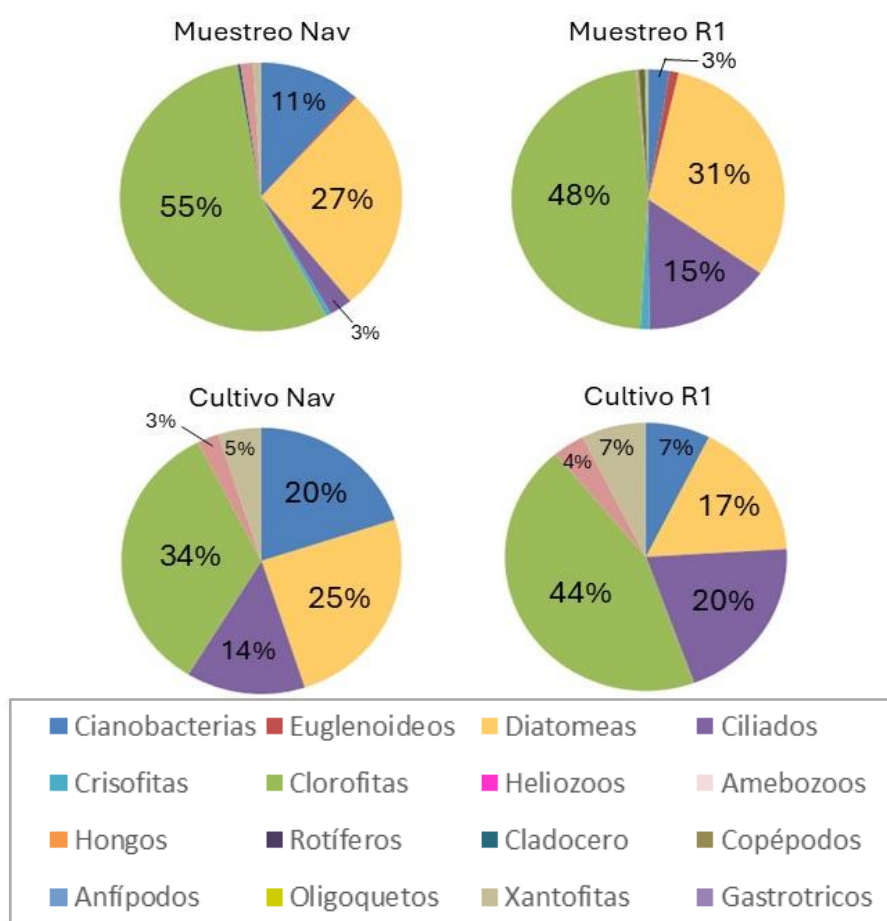


Figura 14. Gráficos de torta que indican la abundancia relativa de los grupos taxonómicos identificados en cada muestra de *biofilm* analizada tanto de campo (muestreo Nav y R1), como del cultivo en laboratorio (cultivo Nav y R1). En el gráfico se muestran los porcentajes de abundancia relativa de los principales grupos observados.

Índices morfométricos

El análisis de los biomarcadores morfológicos mostró variaciones en la condición corporal y la relación hepatosomática de los peces expuestos a diferentes concentraciones de arsénico y tipos de *biofilm* a lo largo del tiempo.

➤ Factor de Condición (FC)

El Factor de Condición (FC) presentó variaciones significativas en algunos tratamientos, como se observa en la Figura 15. A los 8 días de exposición, no hubo cambios dentro de cada grupo, solo los peces expuestos a 1 mg As/L en presencia de *biofilm* de R1, presentaron valores de FC significativamente más bajos en comparación con los peces expuestos a la misma concentración, pero en ausencia de *biofilm* (línea punteada). A los 21 días, si se observaron diferencias en algunos grupos, donde los peces expuestos a 0,2 (peces sin *biofilm* y peces + Bio R1) y 0,5 mg As/L (sin *biofilm*) mostraron una disminución significativa en el FC respecto a su control. En cuanto a las diferencias entre grupos, los expuestos a 0,5 mg As/L en ausencia de *biofilm* mostraron valores significativamente menores que los expuestos a la misma concentración en presencia de *biofilm*, tanto de Nav como de R1.

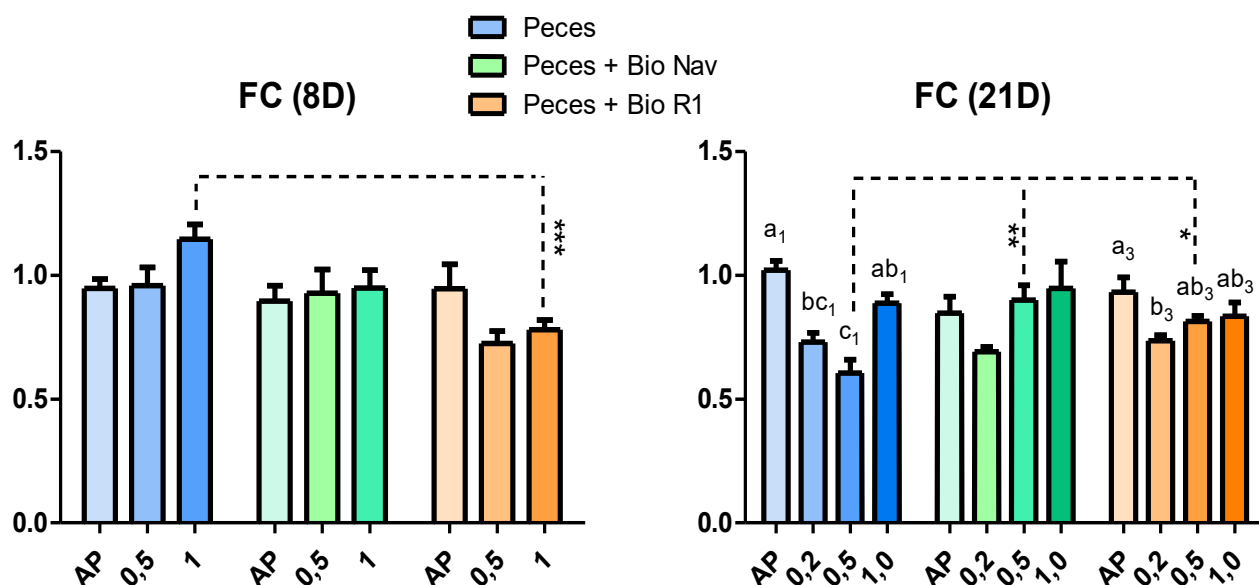


Figura 15. Valores medios del factor de condición (FC) calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Para evaluar la evolución en el tiempo de estos biomarcadores, se compararon los valores obtenidos a los 8 y 21 días en cada tratamiento (Tabla 4). Los resultados mostraron que el FC de los peces expuestos a 0,5 y 1,0 mg As/L en ausencia de *biofilm*, disminuyó significativamente con el tiempo, a diferencia de su control, que se mantuvo estable. En los tratamientos con *biofilm*, no se observaron variaciones significativas en el tiempo.

Tabla 4. Valores medios del factor de condición (FC) calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: *(p < 0.05), **(p< 0.01), *** (p< 0.001), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	0,95 ± 0,04	1,02 ± 0,04	NS
Peces + As 0,5	0,96 ± 0,07	0,61 ± 0,05	**
Peces + As 1	1,15 ± 0,06	0,89 ± 0,04	**
Peces + Bio + AP (Nav)	0,90 ± 0,06	0,85 ± 0,07	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	0,93 ± 0,10	0,90 ± 0,06	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	0,95 ± 0,07	0,95 ± 0,11	NS
Peces + Bio + AP (R1)	0,95 ± 0,10	0,93 ± 0,06	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	0,73 ± 0,05	0,81 ± 0,02	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	0,78 ± 0,04	0,83 ± 0,06	NS

➤ Índice hepatosomático (IHS)

El Índice Hepatosomático (IHS) mostró diferencias significativas entre tratamientos (Figura 16). A los 8 días, se observó un aumento del IHS en los peces expuestos a arsénico en presencia de *biofilm* de Nav, que resultó significativo para la mayor concentración (AP vs 1,0 mg As/L). En cuanto a las diferencias entre grupos (línea punteada), el control con *biofilm* R1, presentó valores significativamente mayores que los de Nav. A los 21 días, en los peces expuestos a As sin *biofilm* se observó un aumento significativo del IHS en la concentración de 1,0 mg As/L respecto al control y a la concentración más baja (0,2 mg As/L). Un patrón similar se observó en el tratamiento con *biofilm* de R1, donde los valores de IHS en las concentraciones de 0,5 y 1,0 mg As/L fueron significativamente superiores al control y 0,2 mg As/L. En contraste, en presencia de *biofilm* de Nav, no se observó ningún aumento significativo y los valores se mantuvieron constantes.

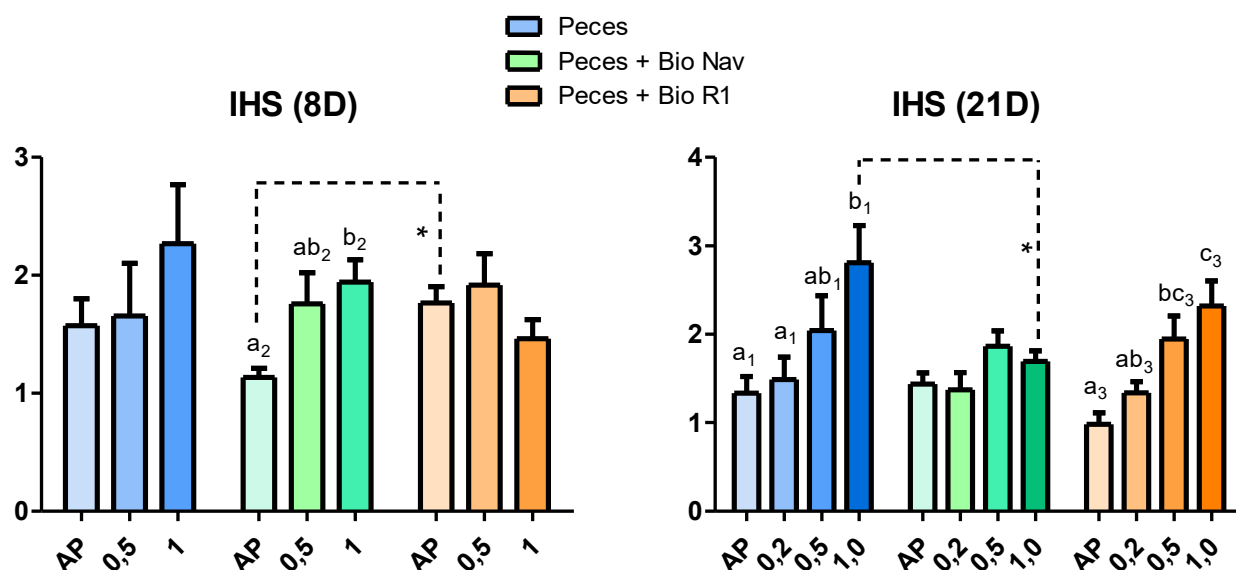


Figura 16. Valores medios del índice hepatosomático (IHS) calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable de clorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Respecto al efecto del tiempo de exposición (Tabla 5), se observaron variaciones significativas únicamente en los tratamientos con *biofilm* de R1. En este caso, el IHS disminuyó significativamente a los 21 días en el control, mientras que aumentó en la concentración de 1,0 mg As/L. En el resto de los tratamientos, no se registraron cambios significativos en el IHS a lo largo del tiempo.

Tabla 5. Valores medios del índice hepatosomático (IHS) calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	1,57 ± 0,23	1,34 ± 0,19	NS
Peces + As 0,5	1,65 ± 0,43	2,04 ± 0,39	NS
Peces + As 1	2,27 ± 0,50	2,81 ± 0,42	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	1,13 ± 0,08	1,44 ± 0,12	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	1,76 ± 0,26	1,87 ± 0,17	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	1,94 ± 0,19	1,7 ± 0,12	NS
Peces + Bio + AP (R1)	1,77 ± 0,14	0,98 ± 0,13	***
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	1,92 ± 0,27	1,95 ± 0,26	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	1,46 ± 0,16	2,32 ± 0,28	*

Estrés oxidativo

➤ Contenido de Glutación Reducido (GSH)

El contenido de glutación reducido (GSH) fue medido en hígado y branquias, y encontramos variaciones significativas según el tiempo de exposición, el tratamiento evaluado y el órgano analizado.

En hígado (Figura 17), a los 8 días de exposición, los niveles de GSH disminuyeron en los tratamientos con As de cada grupo. Esto fue significativo en la concentración más alta de As (1 mg As/L) respecto a su control, tanto en peces expuestos sin *biofilm* como en aquellos en presencia de *biofilm* de R1. En este último grupo también hubo diferencias en la concentración de 0,5 mg As/L. Al analizar entre grupos, los peces expuestos solos mostraron, en general, niveles de GSH significativamente mayores que aquellos expuestos en presencia de *biofilm* (tanto Nav como R1), para todas las concentraciones de arsénico. A los 21 días, los niveles de GSH en los peces expuestos a As sin *biofilm* se redujeron significativamente en todas las concentraciones de As respecto al control. En los demás grupos, a diferencia de lo ocurrido cuando estuvieron expuestos a As por 8 días, no hubo cambios. Entre grupos, el control de R1 presentó niveles de GSH significativamente menores que el control sin *biofilm*.

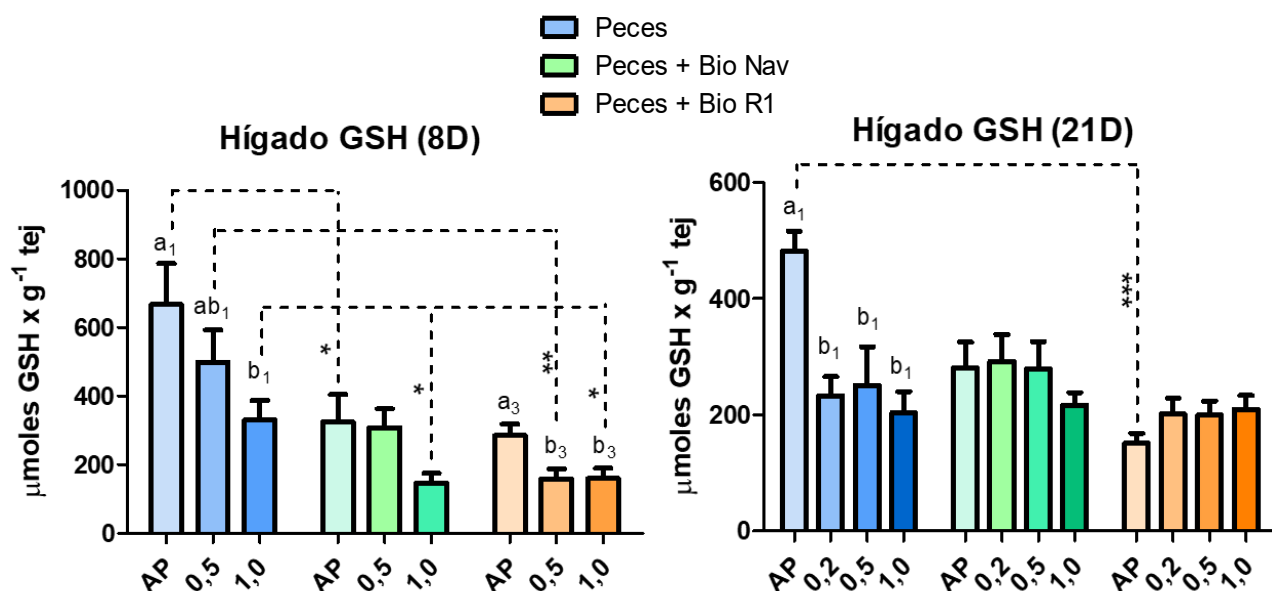


Figura 17. Valores medios del contenido de GSH en hígado, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable declarada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

En cuanto al tiempo de exposición (Tabla 6), se observó una disminución significativa en los niveles de GSH a los 21 días en dos tratamientos: en la concentración de 0,5 mg As/L de los peces expuestos sin *biofilm* y en el control del *biofilm* de R1.

Tabla 6. Valores medios del contenido de GSH ($\mu\text{moles GSH. g tej}^{-1}$) en hígado, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	668 $\pm$ 118	482 $\pm$ 34	NS
Peces + As 0,5	500 $\pm$ 93	251 $\pm$ 66	*
Peces + As 1	330 $\pm$ 58	204 $\pm$ 36	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	325 $\pm$ 80	281 $\pm$ 44	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	309 $\pm$ 54	279 $\pm$ 47	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	147 $\pm$ 28	216 $\pm$ 22	NS
Peces + Bio + AP (R1)	285 $\pm$ 32	151 $\pm$ 17	**
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	158 $\pm$ 30	200 $\pm$ 24	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	159 $\pm$ 31	209 $\pm$ 24	NS

En branquias (Figura 18), a los 8 días, a diferencia del hígado, los peces expuestos a 1 mg As/L en ausencia de *biofilm* presentaron niveles de GSH significativamente mayores al control y a 0,5 mg As/L. Además, en esta concentración, los niveles de GSH fueron significativamente superiores a los registrados en los grupos expuestos a 1 mg As/L en presencia de *biofilm* de Nav y R1. También se registró un aumento significativo en la concentración de 0,5 mg As/L del grupo con *biofilm* de Nav, respecto a su control. A los 21 días, no se observaron diferencias significativas asociadas a la exposición a As para cada grupo. Sin embargo, de manera general, los peces mantenidos sin *biofilm* presentaron niveles de GSH en branquias significativamente mayores que aquellos expuestos en presencia de *biofilm*, independientemente del sitio, Nav o R1.

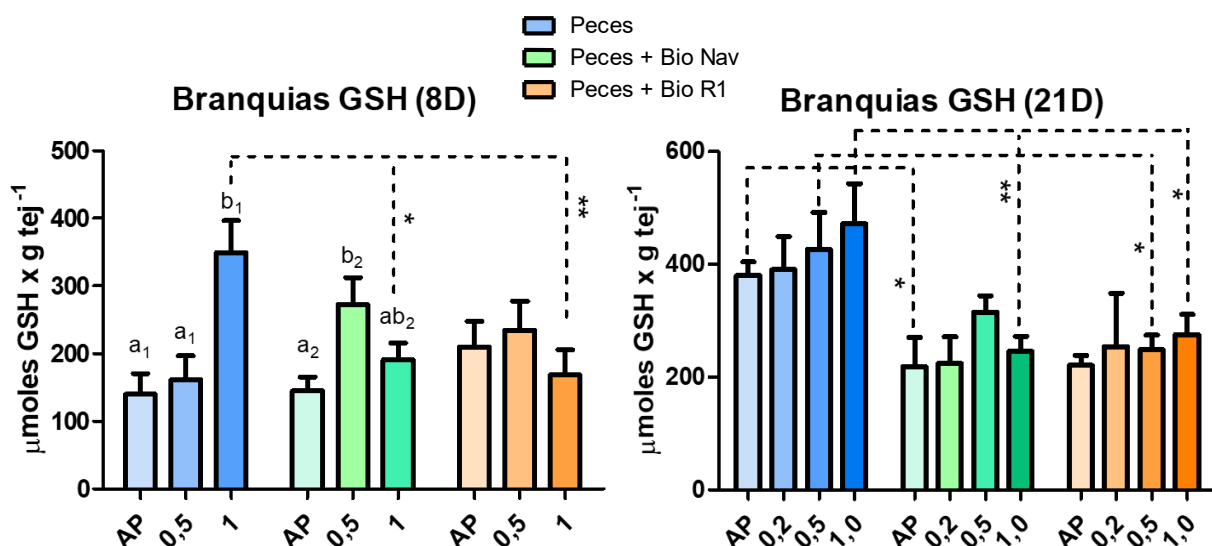


Figura 18. Valores medios del contenido de GSH en branquias, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

El análisis temporal (Tabla 7) mostró un aumento significativo en los niveles de GSH de las branquias a 21 días en los peces expuestos a As sin *biofilm*, tanto en el control como en la concentración de 0,5 mg As/L. En contraste, en los tratamientos con *biofilm*, no se registraron variaciones significativas a lo largo del tiempo.

Tabla 7. Valores medios del contenido de GSH ($\mu\text{moles GSH} \cdot \text{g tej}^{-1}$) en branquias, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	140 ± 31	380 ± 24	***
Peces + As 0,5	161 ± 35	426 ± 66	**
Peces + As 1	350 ± 47	472 ± 71	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	145 ± 21	218 ± 53	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	273 ± 40	316 ± 29	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	191 ± 25	246 ± 27	NS
Peces + Bio + AP (R1)	210 ± 38	221 ± 18	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	234 ± 43	249 ± 26	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	169 ± 36	276 ± 36	NS

➤ Actividad de la enzima Catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa (CAT) en hígado presentó variaciones entre los tratamientos evaluados (Figura 19). A los 8 días de exposición, los peces expuestos a 1 mg As/L en ausencia de *biofilm* presentaron una actividad significativamente menor que el control. En contraste, en presencia de *biofilm* de R1, la actividad en los peces expuestos a esta misma concentración fue significativamente mayor comparado a su control. A los 21 días, no se observaron diferencias significativas dentro de los grupos expuestos a diferentes concentraciones de As. Al comparar entre grupos, hubo diferencias en el control sin *biofilm* respecto al control de R1 y en la concentración de 1,0 mg As/L con el grupo de Nav.

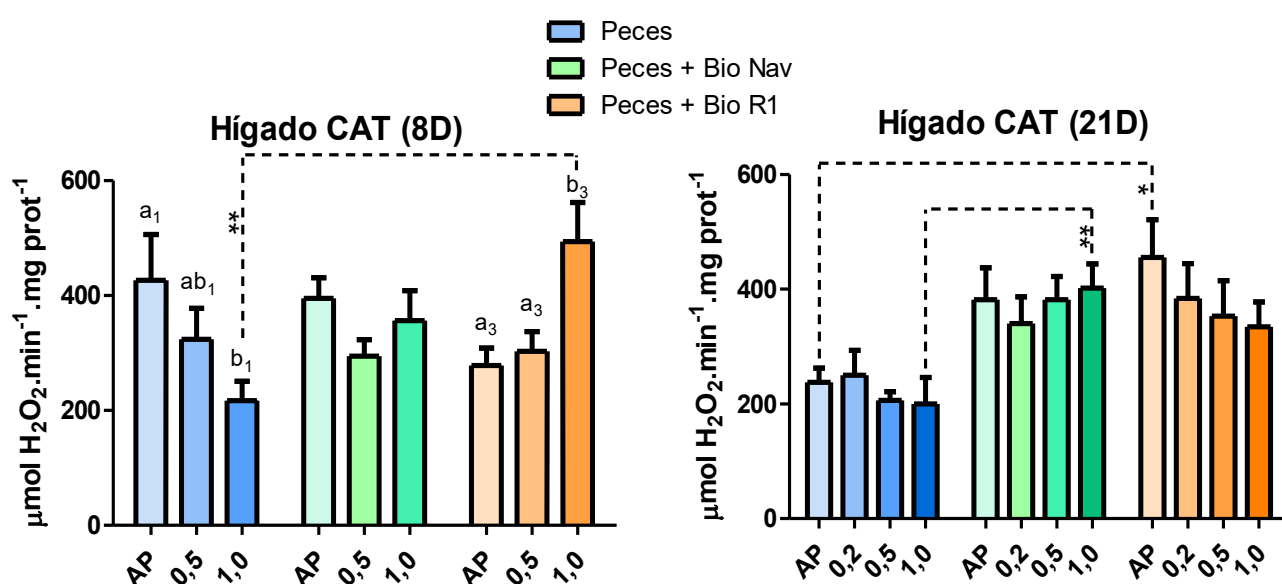


Figura 19. Valores medios de la actividad de la enzima catalasa (CAT) en hígado, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable declarada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Al analizar el efecto en el tiempo (Tabla 8), se observó que la actividad enzimática de CAT disminuyó significativamente en los peces del control sin *biofilm* y aumentó en el control de R1.

Tabla 8. Valores medios de la actividad de CAT ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 \text{ cons. min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$) en hígado, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	427 $\pm$ 79	238 $\pm$ 25	*
Peces + As 0,5	324 $\pm$ 54	207 $\pm$ 15	NS
Peces + As 1	217 $\pm$ 34	200 $\pm$ 46	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	396 $\pm$ 36	382 $\pm$ 55	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	295 $\pm$ 28	382 $\pm$ 41	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	356 $\pm$ 53	402 $\pm$ 43	NS
Peces + Bio + AP (R1)	278 $\pm$ 31	455 $\pm$ 66	*
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	303 $\pm$ 34	353 $\pm$ 61	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	494 $\pm$ 67	335 $\pm$ 43	NS

➤ Actividad de la enzima Glutación-s-transferasa (GST)

La actividad de la enzima glutación-S-transferasa (GST) fue evaluada en hígado y branquias.

En el hígado (Figura 20), a los 8 días de exposición, la actividad enzimática de GST se mantuvo relativamente estable, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, a los 21 días, hubo diferencias entre los grupos. Los peces expuestos a As en presencia de *biofilm*, tanto de Nav como R1, presentaron valores significativamente mayores que aquellos expuestos a As sin *biofilm*, para los controles y la concentración más alta (1 mg As/L).

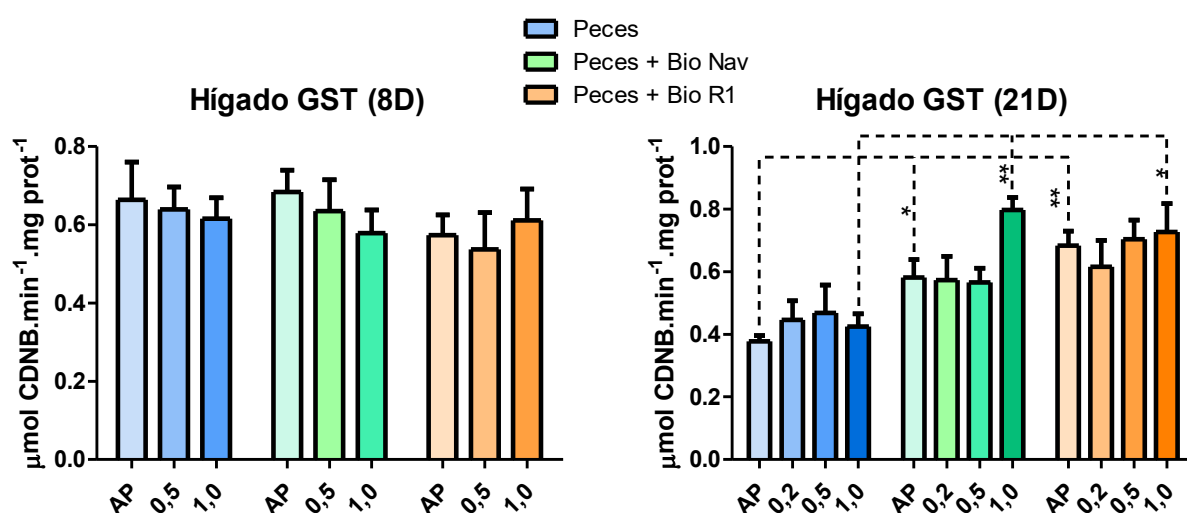


Figura 20. Valores medios de la actividad de la glutación-s-transferasa (GST) en hígado, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

El análisis temporal (Tabla 9) mostró una disminución significativa en la actividad de la enzima GST en los tratamientos AP y 1 mg As/L de peces expuestos sin *biofilm* a los 21 días en comparación con los valores registrados a los 8 días; y un aumento en los expuestos a 1 mg As/L en presencia de *biofilm* de Nav.

Tabla 9. Valores medios de la actividad de la GST ($\mu\text{moles CDNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$) en hígado, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	$0,664 \pm 0,097$	$0,378 \pm 0,019$	**
Peces + As 0,5	$0,640 \pm 0,056$	$0,468 \pm 0,089$	NS
Peces + As 1	$0,616 \pm 0,053$	$0,426 \pm 0,041$	*
Peces + Bio + AP (Nav)	$0,683 \pm 0,056$	$0,582 \pm 0,057$	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	$0,635 \pm 0,080$	$0,567 \pm 0,045$	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	$0,579 \pm 0,059$	$0,798 \pm 0,039$	**
Peces + Bio + AP (R1)	$0,574 \pm 0,052$	$0,683 \pm 0,046$	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	$0,537 \pm 0,094$	$0,703 \pm 0,062$	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	$0,612 \pm 0,080$	$0,727 \pm 0,090$	NS

Por otro lado, en branquias (Figura 21), la actividad de la enzima GST se mantuvo relativamente estable, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos, tanto a los 8 como a los 21 días. Asimismo, no se observaron variaciones asociadas al tiempo de exposición.

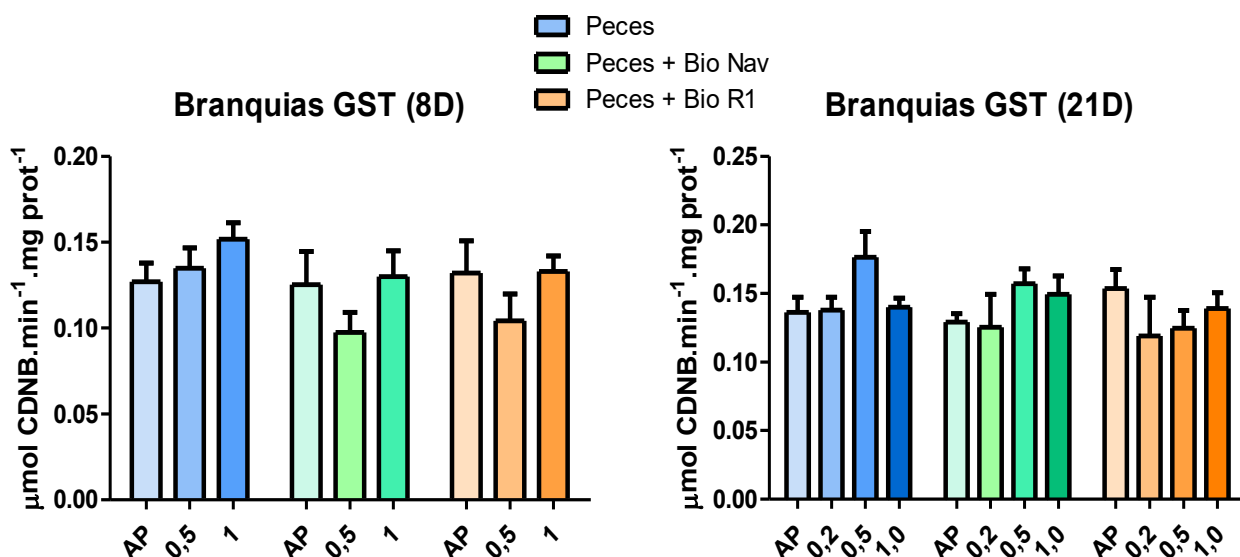


Figura 21. Valores medios de la actividad de la glutatión-s-transferasa (GST) en branquias, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. No se observaron diferencias significativas.

➤ *Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

En la figura 22, se observan los niveles de TBARS medidos en hígado. A los 8 días, no se observaron diferencias significativas dentro de cada grupo. Sin embargo, los peces mantenidos en presencia de *biofilm* presentaron niveles de TBARS significativamente menores que aquellos expuestos sin *biofilm*, tanto en AP como en todas las concentraciones de As.

A los 21 días, los peces expuestos a 1 mg As/L sin *biofilm* y con *biofilm* de R1 mostraron niveles de TBARS significativamente inferiores a sus respectivos controles. En el caso de los peces expuestos a esta concentración en presencia de *biofilm* de Nav, también se registró una disminución en los niveles de TBARS, aunque ésta no resultó significativa. Además, los valores en este tratamiento fueron significativamente mayores que los observados en los demás grupos para la misma concentración.

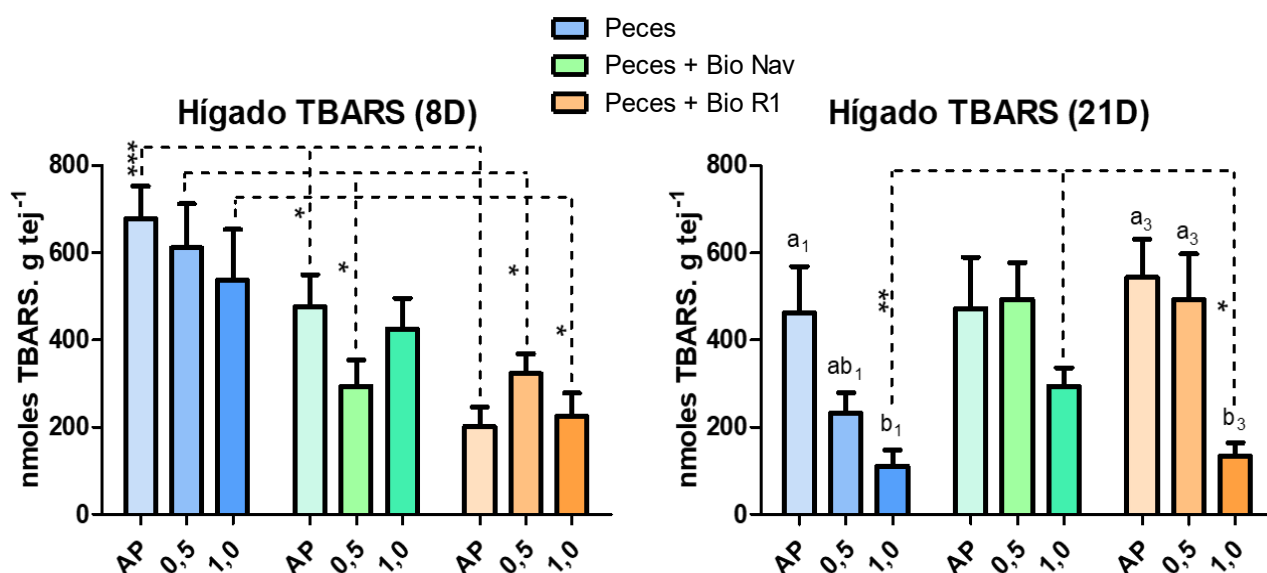


Figura 22. Valores medios del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Al analizar el efecto del tiempo de exposición (Tabla 10), se observó una reducción significativa en los niveles de TBARS en peces expuestos a 0,5 y 1 mg As/L en ausencia de *biofilm* a los 21 días y un aumento significativo en el grupo control (AP) expuesto en presencia de *biofilm* de R1.

Tabla 10. Valores medios del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado (nmoles TBARS. g tej⁻¹), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: *(p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	679 ± 75	462 ± 107	NS
Peces + As 0,5	611 ± 101	231 ± 48	**
Peces + As 1	537 ± 117	111 ± 36	***
Peces + Bio + AP (Nav)	476 ± 73	471 ± 119	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	294 ± 61	493 ± 85	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	425 ± 70	295 ± 42	NS
Peces + Bio + AP (R1)	202 ± 46	544 ± 87	**
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	323 ± 45	493 ± 104	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	225 ± 53	133 ± 32	NS

En la figura 23 se presentan los niveles de TBARS medidos en branquias. A los 8 días de exposición, los peces expuestos a 0,5 mg As/L y 1 mg As/L sin *biofilm* mostraron niveles de TBARS significativamente mayores en comparación con el control, en contraste con el patrón observado en hígado. Además, los niveles fueron significativamente superiores respecto a los peces mantenidos en presencia de *biofilm* de Nav o R1. Dentro del grupo de R1, los peces expuestos a 0,5 mg As/L también tuvieron niveles significativamente mayores que su control.

A los 21 días, los valores de TBARS en los peces expuestos a 1 mg As/L sin *biofilm* mostraron un incremento significativo respecto al control y a la concentración de 0,5 mg As/L. Todo este grupo tuvo valores mayores de peroxidación que los grupos con *biofilm*, siendo significativo entre los controles AP y 1 mg As/L.

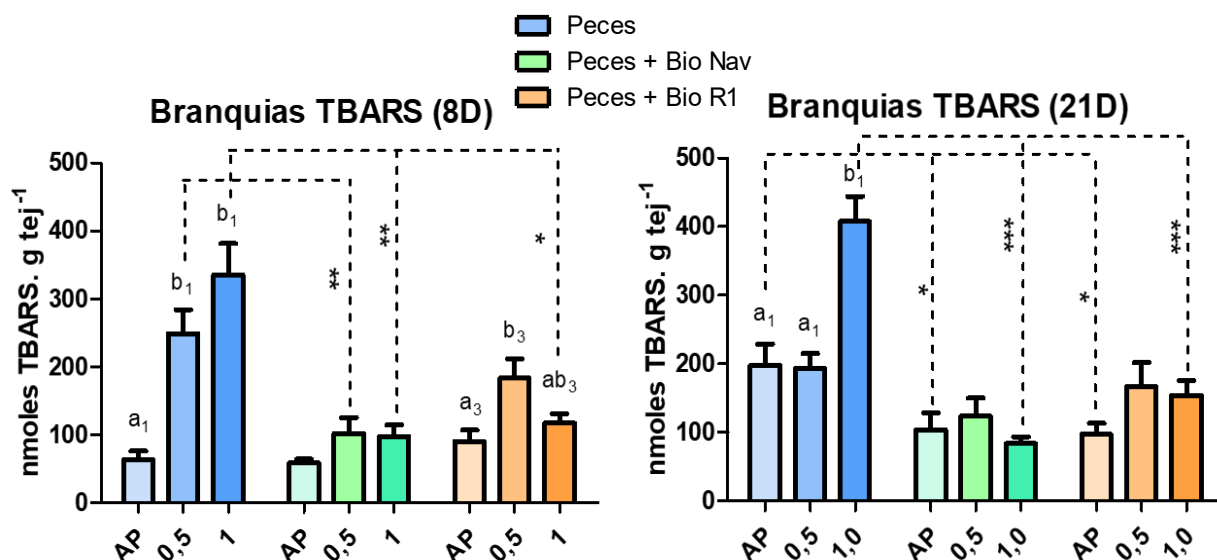


Figura 23. Valores medios del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en branquias, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

En el análisis del efecto debido al tiempo de exposición (Tabla 11), solo se observaron diferencias significativas entre el control de los peces expuestos sin *biofilm*.

Tabla 11. Valores medios del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado (nmol TBARS. g tej⁻¹), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	63 ± 13	198 ± 31	**
Peces + As 0,5	249 ± 36	193 ± 22	NS
Peces + As 1	335 ± 46	408 ± 36	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	58 ± 17	104 ± 25	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	103 ± 23	123 ± 26	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	98 ± 17	83 ± 10	NS
Peces + Bio + AP (R1)	90 ± 17	97 ± 16	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	184 ± 28	167 ± 35	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	117 ± 14	154 ± 22	NS

Metabolismo intermediario

➤ Actividad del sistema de transporte de electrones (ETS)

En la figura 24 se muestra la actividad medida del ETS, relacionada con el gasto energético. A los 8 días, no se observaron diferencias dentro de los grupos de exposición. Sin embargo, los peces expuestos a arsénico en agua sin *biofilm* mostraron valores de ETS significativamente mayores en comparación con aquellos mantenidos en presencia de *biofilm*, para todos los tratamientos. A los 21 días, esta diferencia entre grupos ya no se observó, aunque la actividad del ETS aumentó en los individuos del tratamiento de 1,0 mg As/L con *biofilm* de R1, resultando significativo con la misma concentración de *biofilm* de Nav. Este aumento de la actividad del ETS en el tratamiento de R1 a los 21 días, en comparación con los 8 días, fue el único aumento significativo debido al tiempo de exposición (Tabla 12).

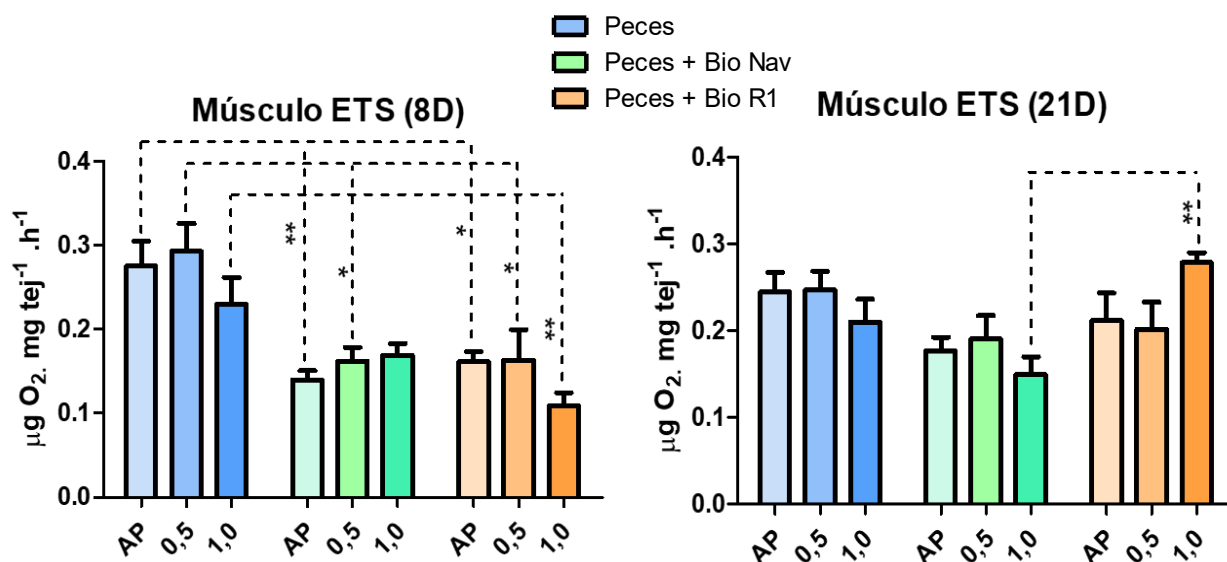


Figura 24. Valores medios de la actividad de la cadena transportadora de electrones (ETS) en músculo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Tabla 12. Valores medios de la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) en músculo ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg tej}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	$0,28 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,02$	NS
Peces + As 0,5	$0,29 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,02$	NS
Peces + As 1	$0,23 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03$	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	$0,14 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	$0,16 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,03$	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	$0,17 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$	NS
Peces + Bio + AP (R1)	$0,16 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,03$	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	$0,16 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,03$	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	$0,11 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	***

➤ Contenido de hidratos de carbono

En la figura 25 se presenta el contenido de hidratos de carbono en músculo para los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. A los 8 días, se observó un aumento significativo en los niveles de carbohidratos en los peces expuestos a 0,5 mg As/L en presencia de *biofilm* de Nav, respecto a su control. Este tratamiento también resultó significativo en comparación con la misma concentración de *biofilm* de R1. A los 21 días, se registró una disminución significativa en los niveles de hidratos de carbono en las concentraciones de 0,2 y 0,5 mg As/L de los peces expuestos sin *biofilm*, respecto de su control. De manera similar, en los peces expuestos en presencia de *biofilm* de R1 también se registró una disminución significativa para 0,5 mg As/L, respecto a su control. Además, los valores obtenidos en este tratamiento fueron significativamente menores que los obtenidos a la misma concentración de los demás grupos.

En el análisis temporal (tabla 13) se observó un aumento significativo en el contenido de carbohidratos en los peces expuestos sin *biofilm*, tanto en el control como para la concentración

más alta de As (1 mg As/L), como resultado del tiempo de exposición. De manera similar, este aumento también se registró en los peces expuestos a 1 mg As/L en presencia de *biofilm* de R1.

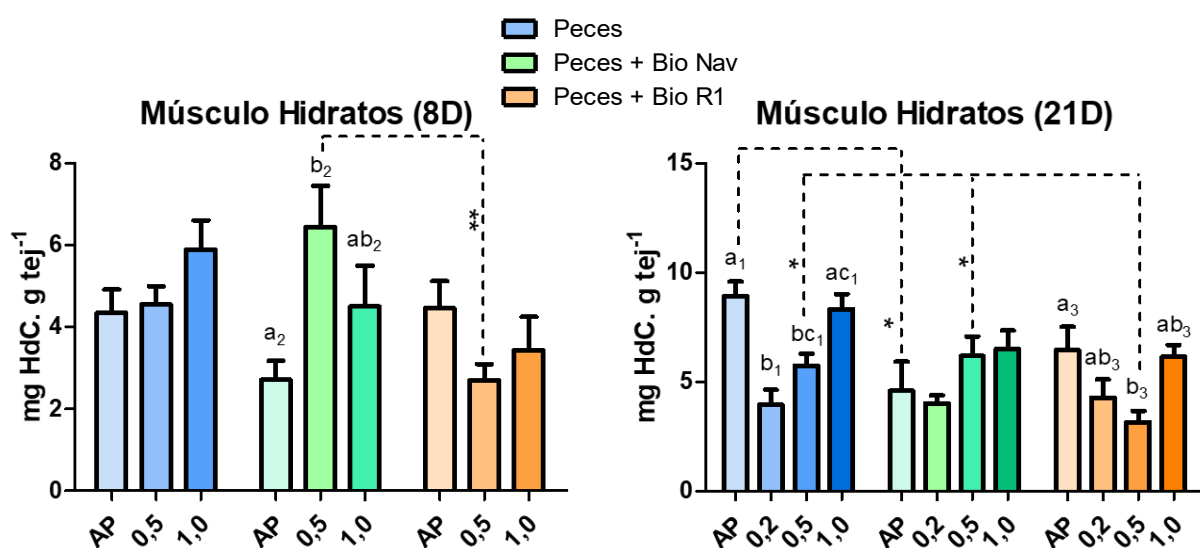


Figura 25. Valores medios del contenido de hidratos de carbono en músculo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Tabla 13. Valores medios del contenido de hidratos de carbono en músculo ($\text{mg HdC. g tej}^{-1}$), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	4,35 $\pm$ 0,57	8,92 $\pm$ 0,65	***
Peces + As 0,5	4,55 $\pm$ 0,45	5,73 $\pm$ 0,55	NS
Peces + As 1	5,89 $\pm$ 0,72	8,33 $\pm$ 0,69	*
Peces + Bio + AP (Nav)	2,71 $\pm$ 0,47	4,59 $\pm$ 1,33	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	6,45 $\pm$ 1,00	6,18 $\pm$ 0,89	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	4,50 $\pm$ 1,00	6,51 $\pm$ 0,85	NS
Peces + Bio + AP (R1)	4,46 $\pm$ 0,66	6,44 $\pm$ 1,08	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	2,70 $\pm$ 0,40	3,16 $\pm$ 0,51	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	3,43 $\pm$ 0,82	6,16 $\pm$ 0,54	*

➤ Contenido de lípidos

En la figura 26 se presentan los resultados del contenido de lípidos en músculo en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. A los 8 días, los niveles de lípidos se mantuvieron constantes en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre los

grupos. A los 21 días, los peces expuestos sin *biofilm* a 1,0 mg As/L mostraron un aumento significativo en el contenido de lípidos, respecto al control y a la concentración más baja (0,2 mg As/L). Además, los niveles de lípidos en este tratamiento fueron significativamente superiores a los registrados para la misma concentración en los grupos expuestos en presencia de *biofilm*.

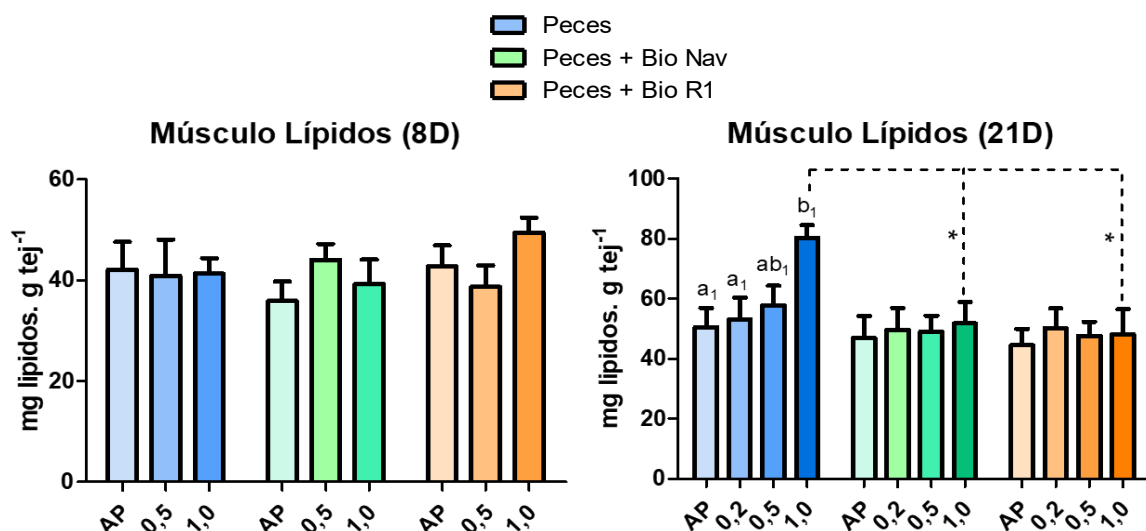


Figura 26. Valores medios del contenido de lípidos en músculo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Al analizar la variación debida al tiempo (Tabla 14), se observó un aumento significativo en los niveles de lípidos en los peces expuestos sin *biofilm* a 1 mg As/L entre los 8 y 21 días, mientras que en el resto de los tratamientos no se registraron diferencias significativas entre tiempos.

Tabla 14. Valores medios del contenido de lípidos en músculo ($\text{mg lípidos. g tej}^{-1}$), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	42,06 $\pm$ 5,58	50,59 $\pm$ 6,25	NS
Peces + As 0,5	40,85 $\pm$ 7,27	57,79 $\pm$ 6,57	NS
Peces + As 1	41,34 $\pm$ 3,02	80,38 $\pm$ 4,28	***
Peces + Bio + AP (Nav)	35,89 $\pm$ 3,87	46,87 $\pm$ 7,33	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	44,01 $\pm$ 3,21	49,00 $\pm$ 5,37	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	39,30 $\pm$ 4,76	51,77 $\pm$ 7,15	NS
Peces + Bio + AP (R1)	42,75 $\pm$ 4,19	44,55 $\pm$ 5,40	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	38,72 $\pm$ 4,27	47,64 $\pm$ 4,63	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	49,42 $\pm$ 3,01	48,10 $\pm$ 8,48	NS

➤ Contenido de proteínas

El contenido de proteínas en músculo, también fue analizado en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición (Figura 27). A los 8 días, los peces expuestos a 1 mg As/L en ausencia de *biofilm* presentaron niveles de proteínas significativamente menores en comparación con el control, mientras que en los grupos expuestos con *biofilm* no se registraron diferencias. A los 21 días, los niveles de proteínas se mantuvieron constantes entre los distintos tratamientos, sin observarse diferencias significativas.

En el análisis temporal (Tabla 15) se mostró una tendencia a la estabilización de los niveles de proteínas entre los tratamientos, registrándose únicamente un aumento significativo en los peces expuestos a 0,5 mg As/L en presencia del *biofilm* de Nav.

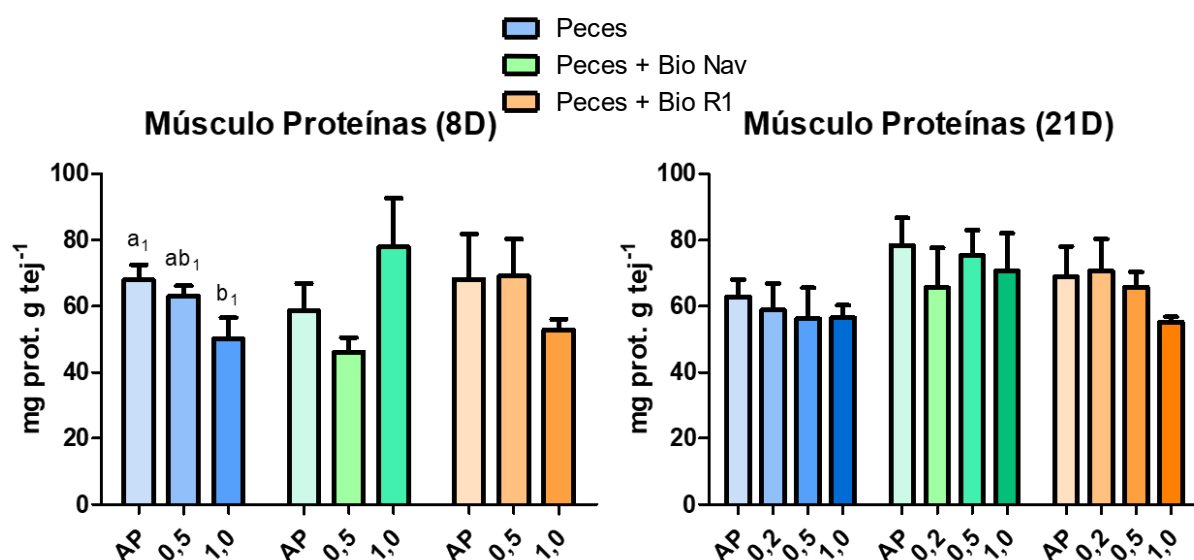


Figura 27. Valores medios del contenido de proteínas en músculo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Tabla 15. Valores medios del contenido de proteínas en músculo (mg prot. g tej⁻¹), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: *(p < 0.05), **(p < 0.01), *** (p < 0.001), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	67,94 ± 4,64	62,84 ± 5,15	NS
Peces + As 0,5	62,95 ± 3,15	56,24 ± 9,32	NS
Peces + As 1	50,15 ± 6,32	56,45 ± 3,80	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	58,64 ± 8,27	78,38 ± 8,36	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	46,13 ± 4,45	75,32 ± 7,64	**
Peces + Bio + As 1 (Nav)	77,90 ± 14,76	70,59 ± 11,47	NS
Peces + Bio + AP (R1)	68,23 ± 13,62	68,95 ± 9,12	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	69,10 ± 11,22	65,79 ± 4,52	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	52,75 ± 3,32	55,19 ± 1,60	NS

➤ Índice de asignación de energía celular (CEA)

A partir de los datos de las reservas y gasto energético, se calculó el índice de asignación de energía celular (CEA) en músculo, permitiendo evaluar variaciones en el balance energético de los peces en función de la presencia de arsénico y *biofilm* en el medio (Figura 28). A los 8 días, no se registraron diferencias en los valores del CEA dentro de los grupos de exposición. Sin embargo, en términos generales, los peces expuestos sin *biofilm* presentaron valores de CEA inferiores respecto a aquellos mantenidos en presencia de *biofilm*, siendo el control significativamente menor en comparación con los controles de los demás grupos. A los 21 días, los valores tendieron a estabilizarse y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Al analizar las diferencias asociadas al tiempo de exposición (Tabla 16), se observó una disminución del CEA en los peces expuestos a As en presencia de *biofilm* de R1, que resultó significativa para la mayor concentración (1 mg As/L). Los demás grupos no presentaron diferencias debido al tiempo.

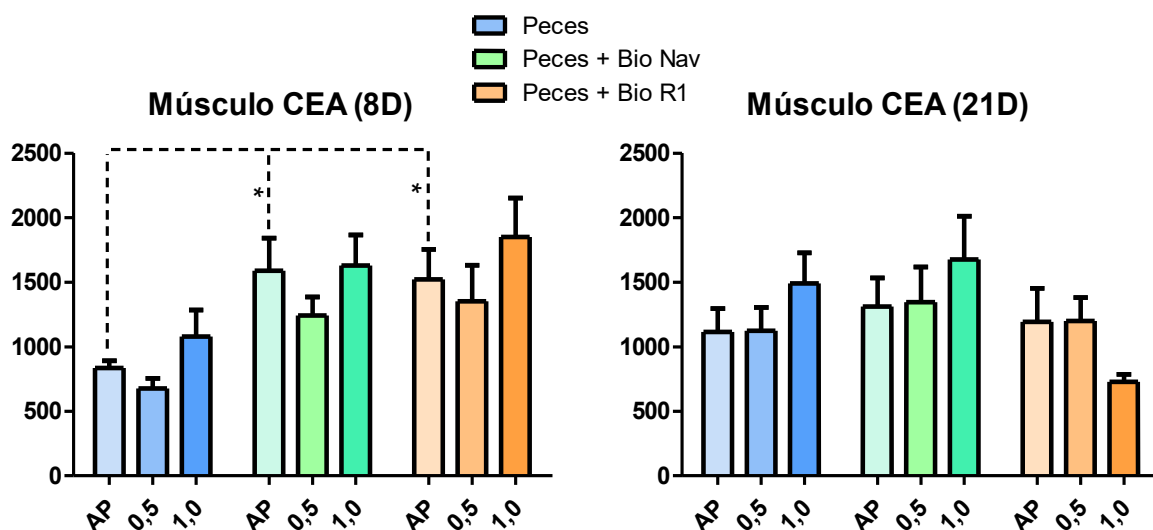


Figura 28. Valores medios del índice de asignación de energía celular (CEA) en músculo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Tabla 16. Valores medios del índice de asignación de energía celular (CEA) en músculo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	834 ± 56	1115 ± 180	NS
Peces + As 0,5	676 ± 80	1125 ± 180	NS
Peces + As 1	1078 ± 206	1492 ± 236	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	1588 ± 252	1312 ± 221	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	1242 ± 142	1345 ± 274	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	1629 ± 237	1676 ± 335	NS
Peces + Bio + AP (R1)	1522 ± 232	1193 ± 259	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	1352 ± 279	1200 ± 181	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	1852 ± 299	728 ± 59	**

Sistema nervioso

Sistema nervioso

➤ Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)

Para analizar posibles variaciones en la función neuromuscular en respuesta a la exposición al arsénico y la presencia de *biofilm* en el medio, se midió la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en músculo y encéfalo.

En la figura 29, se presentan los resultados obtenidos en músculo. A los 8 días, no se registraron diferencias dentro de los grupos, aunque el control de los peces expuestos sin *biofilm* mostró valores de actividad significativamente mayores en el control del grupo de Nav. A los 21 días, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y los valores se mantuvieron relativamente homogéneos en todos los grupos evaluados.

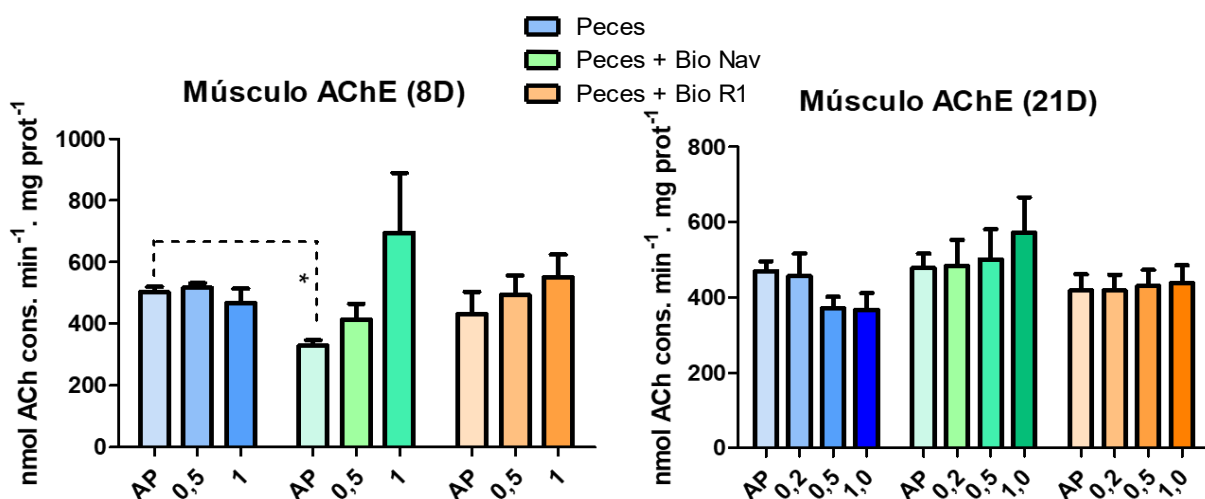


Figura 29. Valores medios de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en músculo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

El análisis temporal (Tabla 17) mostró una disminución de la actividad de la enzima AChE muscular en los peces expuestos a As sin *biofilm* a los 21 días, que resultó significativa para la concentración de 0,5 mg As/L. En contraste, se registró un aumento significativo en el control asociado al *biofilm* de Nav, debido al tiempo de exposición.

Tabla 17. Valores medios de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en músculo (nmoles ACh cons. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	503 $\pm$ 17	471 $\pm$ 26	NS
Peces + As 0,5	517 $\pm$ 14	372 $\pm$ 30	***
Peces + As 1	467 $\pm$ 47	368 $\pm$ 44	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	329 $\pm$ 18	479 $\pm$ 38	**
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	415 $\pm$ 51	502 $\pm$ 79	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	696 $\pm$ 194	572 $\pm$ 94	NS
Peces + Bio + AP (R1)	432 $\pm$ 72	419 $\pm$ 44	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	493 $\pm$ 63	431 $\pm$ 43	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	552 $\pm$ 74	438 $\pm$ 48	NS

En la figura 30 se presentan los resultados obtenidos en encéfalo. A los 8 días, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, con valores relativamente similares en todos los grupos. A los 21 días, los peces expuestos a 1 mg As/L en ausencia de *biofilm* tuvieron una reducción significativa de la actividad de AChE respecto al control y a la concentración de 0,5 mg As/L. Además, el control de este grupo mostró una actividad significativamente mayor que el control del grupo de Nav. Por otro lado, la actividad de los peces expuestos a 1 mg As/L en presencia de *biofilm* de R1, fue significativamente mayor en comparación a la misma concentración de los otros grupos.

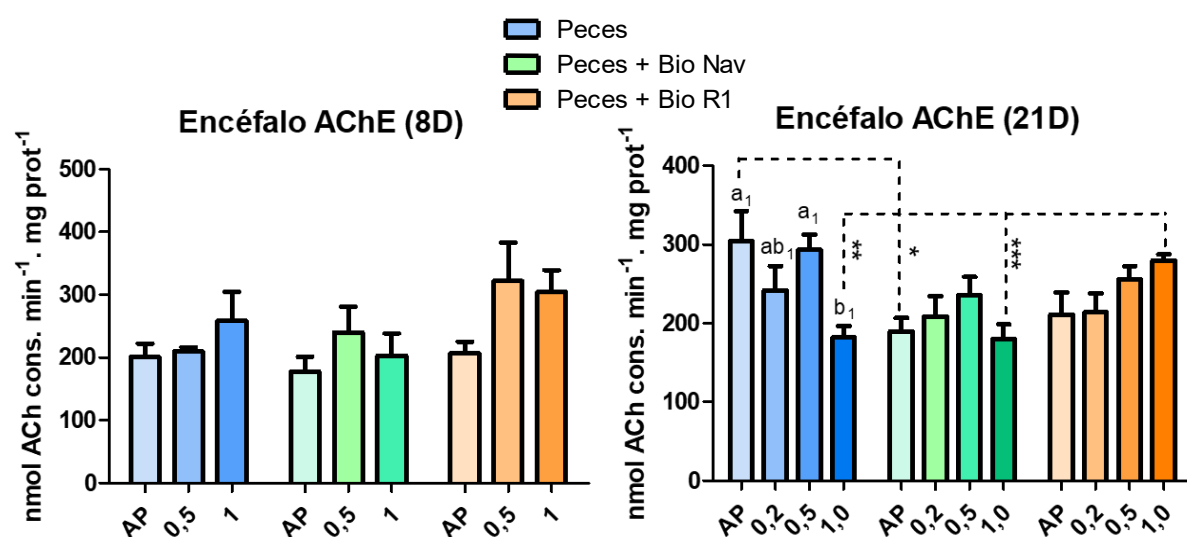


Figura 30. Valores medios de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en encéfalo, calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Debajo del gráfico se indican las concentraciones de As utilizadas: AP (agua potable decolorada); 0,2; 0,5 y 1,0 mg As/L. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

El análisis temporal (Tabla 18) mostró un aumento significativo en la actividad de AChE de los peces expuestos sin *biofilm*, tanto en el control como en la concentración de 0,5 mg As/L. En los demás grupos, no se registraron diferencias significativas a lo largo del tiempo.

Tabla 18. Valores medios de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en encéfalo (nmoles ACh cons. min⁻¹. mg prot⁻¹), calculados para los peces de cada tratamiento, tanto para 8 como para 21 días de exposición; con el correspondiente error estándar de la media (ESM). Se indica la significancia para cada tratamiento entre ambos tiempos de exposición: *(p < 0.05), **(p < 0.01), *** (p < 0.001), NS (no significativo). AP: agua potable; 0,5 y 1: mg As/L ensayados.

Tratamiento	8 días	21 días	Significancia
Peces + AP	201 ± 22	304 ± 38	*
Peces + As 0,5	210 ± 7	293 ± 20	**
Peces + As 1	259 ± 46	182 ± 15	NS
Peces + Bio + AP (Nav)	177 ± 24	190 ± 16	NS
Peces + Bio + As 0,5 (Nav)	240 ± 41	235 ± 24	NS
Peces + Bio + As 1 (Nav)	202 ± 36	180 ± 19	NS
Peces + Bio + AP (R1)	206 ± 19	211 ± 28	NS
Peces + Bio + As 0,5 (R1)	322 ± 61	256 ± 17	NS
Peces + Bio + As 1 (R1)	304 ± 35	280 ± 8	NS

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Con el objetivo de integrar todos los biomarcadores medidos en peces, explorar patrones conjuntos en las respuestas fisiológicas y estudiar cómo la presencia de *biofilm* en el medio modula los efectos del As, se realizaron análisis de componentes principales (PCA), utilizando los biomarcadores correspondientes a los diferentes tiempos y grupos de exposición. Dado que los biomarcadores se expresan en diferentes unidades, todos los PCA se construyeron a partir de matrices de correlación. Debido a la cantidad de gráficos presentados, las tablas con los *loadings* de cada PCA se encuentran presentadas en el *Anexo: Complementos estadísticos* (pág. 182).

En primera instancia se analizó cada grupo por separado (peces sin *biofilm* y peces con *biofilm* de Nav y R1), expuestos a las diferentes concentraciones de As, en los dos tiempos de ensayo.

En el caso de los peces expuestos sin *biofilm* se obtuvo que, a los 8 días (Figura 31a), los dos primeros componentes explicaron en conjunto el 37,85 % de la varianza total (CP1: 23,12 %; CP2: 14,73 %). El CP1 mostró mayor peso en variables relacionadas con estrés oxidativo hepático, como el contenido de GSH (0,40), la actividad de catalasa (0,31) y de GST (0,27), así como con la actividad metabólica: ETS (0,35) y CEA (-0,31). Por su parte, el CP2 se relacionó principalmente con los biomarcadores de estrés oxidativo en branquias, particularmente TBARS (0,52) y GSH (0,42).

En el gráfico se observa una clara separación entre los grupos según la concentración de As. Los peces del grupo control (Peces + AP) y los expuestos a 0,5 mg As/L se agrupan hacia

valores positivos de CP1, mientras que los individuos expuestos a 1 mg As/L se distribuyen hacia valores negativos, mostrando una clara diferenciación en su perfil fisiológico. El grupo expuesto a 0,5 mg As/L, por su parte, se presenta como intermedio, aunque más próximo al control que al grupo más afectado.

Por otro lado, a los 21 días de exposición (Figura 31b), los dos primeros componentes explicaron en conjunto el 39,98 % de la varianza total (CP1: 22,67 %; CP2: 17,31 %). El CP1 se asoció principalmente con variables relacionadas al metabolismo energético y estrés oxidativo de los peces, como el contenido muscular de lípidos (-0,45), el CEA (-0,34), TBARS de branquias (-0,35) y GSH hepático (0,34). Por su parte, el CP2 reflejó principalmente variaciones en biomarcadores relacionados con el sistema nervioso, el estrés oxidativo y la condición general: AChE muscular (0,49), GST branquial (-0,34) y el FC (0,38).

En el gráfico se sigue observando una diferenciación entre las distintas concentraciones de arsénico. Sin embargo, a diferencia de lo registrado a los 8 días, el grupo control (Peces + AP) aparece ahora más solapado con el grupo expuesto a 1 mg As/L. Por su parte, el grupo expuesto a 0,5 mg As/L se ubica en una posición intermedia: se separa de los peces expuestos a 1 mg As/L sobre el CP1, y del grupo control sobre el CP2, lo que sugiere un estado transicional, reflejo de un efecto intermedio en términos de respuesta multibiomarcadora.

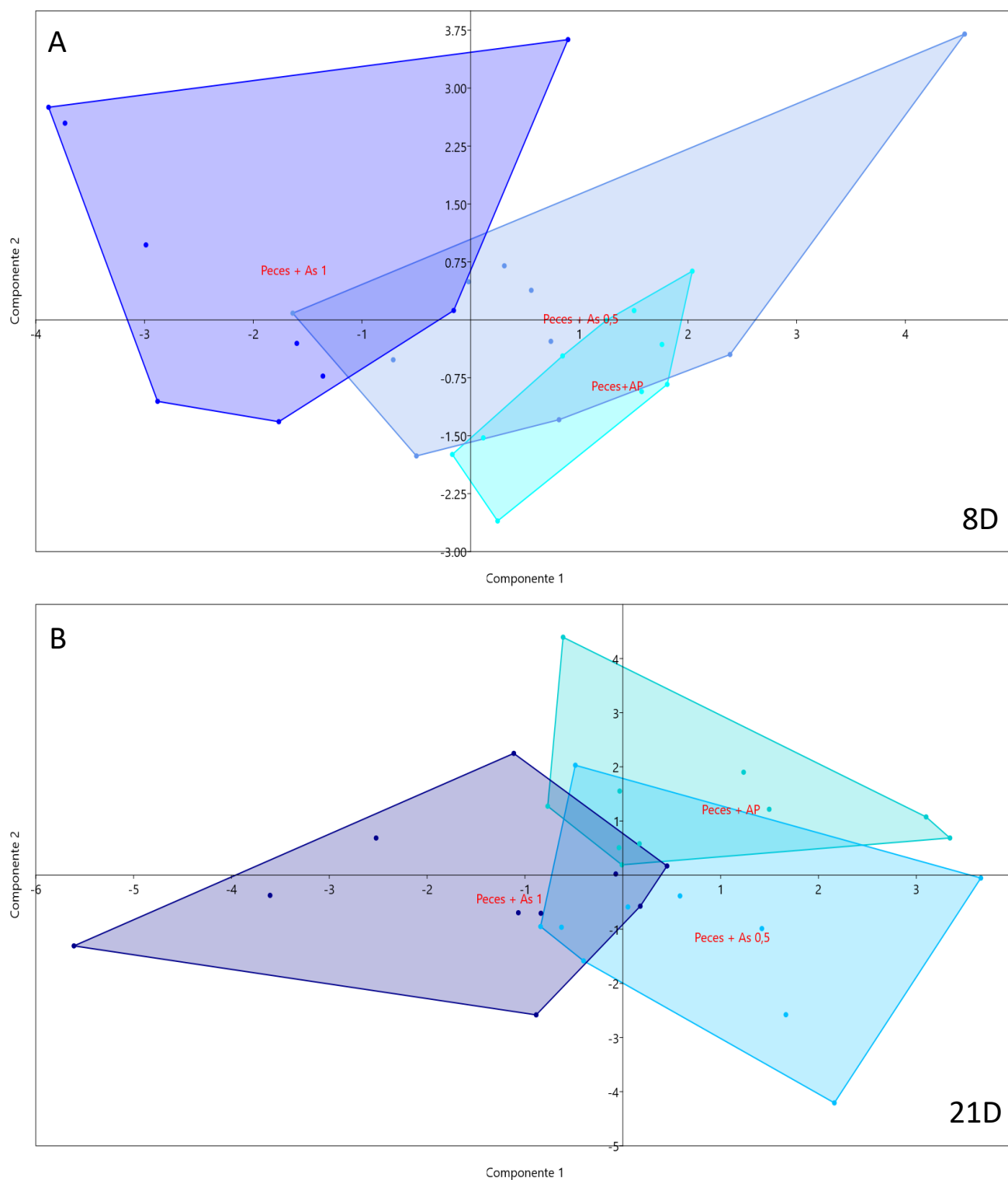


Figura 31. Gráficos generados por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada tratamiento para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a los ejemplares sobre los cuales se hicieron las determinaciones de los biomarcadores y diferentes colores corresponden a diferentes tratamientos: cuanto más oscuro el color, mayor concentración de As (AP, 0,5 y 1,0 mg As/L). A: 8 días de exposición (varianza total = 37,85%); B: 21 días de exposición (varianza total = 39,98%).

Por otro lado, se analizaron las exposiciones de los peces en presencia de *biofilm* de Nav. A los 8 días (Figura 32a), los dos primeros componentes explicaron conjuntamente el 34,85 % de la varianza total (CP1: 17,81 %; CP2: 17,04 %). El CP1 estuvo influenciado principalmente por variables asociadas al metabolismo energético, con un fuerte peso del índice CEA (0,52) y las proteínas musculares (0,41), y con la actividad de GST hepática (0,34). El CP2, en cambio, reflejó principalmente variaciones en biomarcadores de estrés oxidativo en branquias, como GSH (0,44) y TBARS (0,41), junto con la actividad de AChE en cerebro (0,32) y el contenido de lípidos musculares (0,34).

En el gráfico, los tratamientos no llegan a diferenciarse de forma clara, mostrando una superposición considerable entre los grupos, a diferencia de lo observado en los peces en ausencia de *biofilm*. Sin embargo, se observa una cierta separación entre el grupo control (Peces + Bio Nav AP) y el grupo expuesto a 0,5 mg As/L, principalmente a lo largo del eje CP2.

A los 21 días de exposición (Figura 32b), los dos primeros componentes explicaron conjuntamente el 36,53 % de la varianza total (CP1: 19,98 %; CP2: 16,55 %). El CP1 estuvo influenciado principalmente por variables asociadas al metabolismo energético, como el CEA (0,40), el contenido de lípidos (0,39), proteínas (0,39) y la ETS (-0,33). Por su parte, el CP2 reflejó principalmente el estrés oxidativo hepático, con la actividad de GST (0,45), catalasa (0,40) y TBARS (-0,36).

En el gráfico, se observa una marcada superposición entre los tres grupos evaluados (AP, 0,5 y 1 mg As/L), lo que indica que los perfiles fisiológicos resultantes de la exposición al As no se diferencian claramente en presencia del *biofilm* de Nav, a diferencia de lo observado en la exposición al As sin *biofilm*.

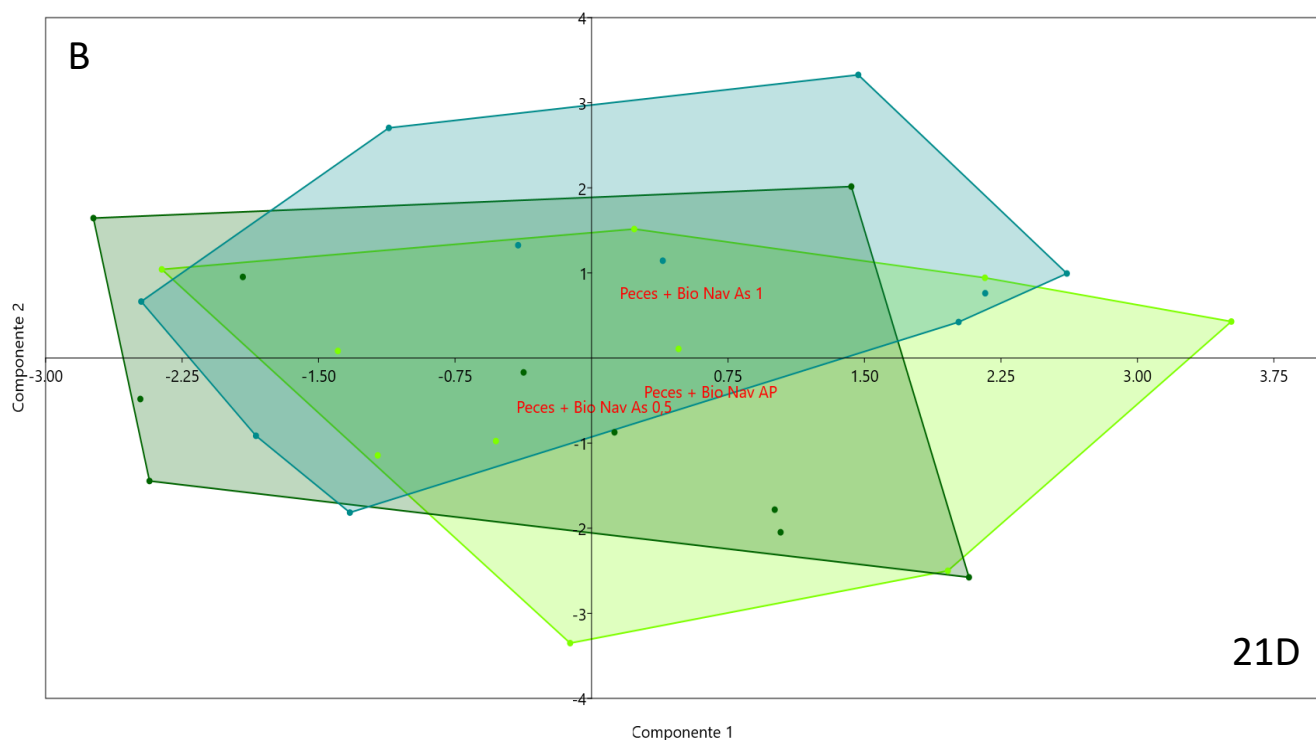
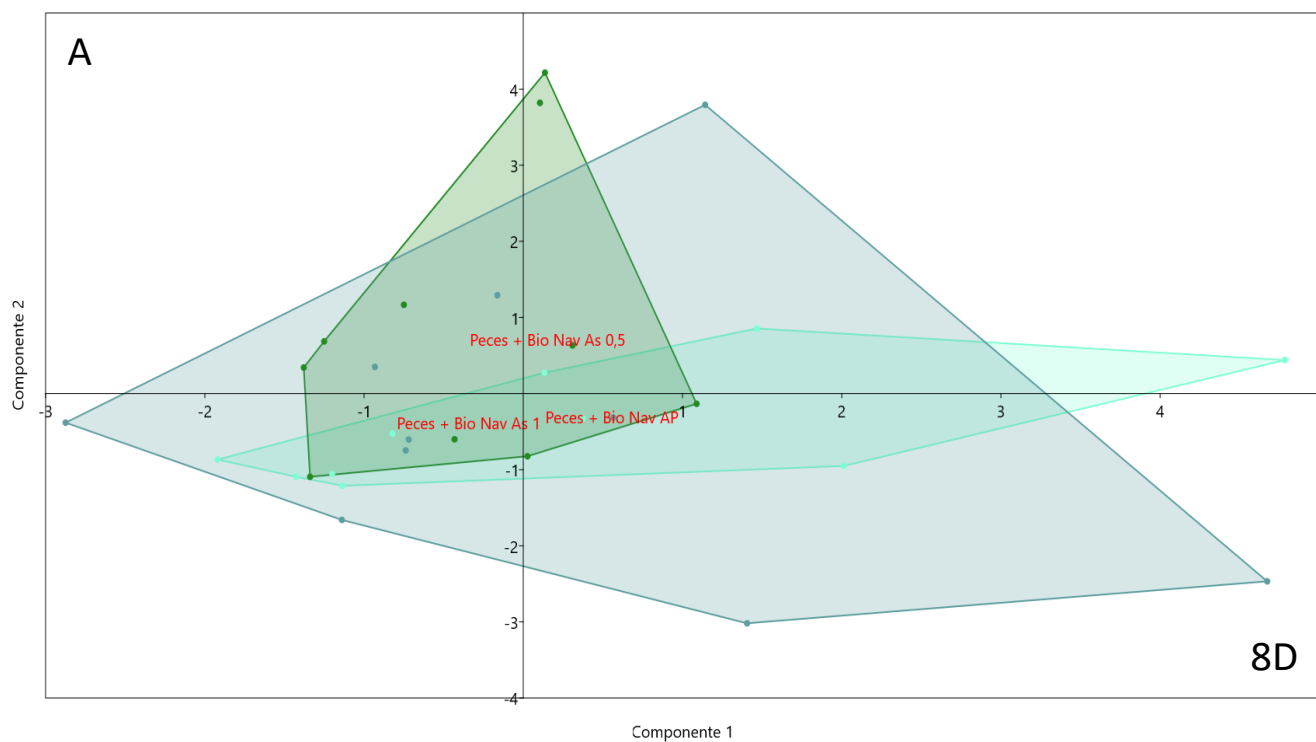


Figura 32. Gráficos generados por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada tratamiento para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a los ejemplares sobre los cuales se hicieron las determinaciones de los biomarcadores y diferentes colores corresponden a diferentes tratamientos: cuanto más oscuro el color, mayor concentración de As (AP, 0,5 y 1,0 mg As/L). A: 8 días de exposición (varianza total = 34,85%); B: 21 días de exposición (varianza total = 36,53%).

Finalmente, se analizaron las exposiciones a As de los peces en presencia de *biofilm* de R1. A los 8 días (Figura 33a), los dos primeros componentes explicaron en conjunto el 31,66 % de la varianza total (CP1: 17,30 %; CP2: 14,36 %). El CP1 estuvo fuertemente influenciado por variables vinculadas al metabolismo energético, tales como el contenido de lípidos en músculo (0,41) y el CEA (0,37), y al índice hepatosomático (-0,40). El CP2, en tanto, se relacionó principalmente con indicadores de estrés oxidativo, como TBARS en branquias (0,43) e hígado (0,37), así como con el factor de condición (-0,45) y el contenido de carbohidratos (-0,45).

En el gráfico se observan ciertas diferencias entre los tratamientos, con una separación moderada entre los grupos. El tratamiento con 0,5 mg As/L se ubica hacia valores positivos del CP2, mientras que el grupo control se posiciona en el sector negativo de ese componente, con una leve superposición entre ambos. El grupo expuesto a 1 mg As/L se superpone parcialmente con ambos tratamientos, sin formar una agrupación completamente definida. Al igual que lo observado en presencia de *biofilm* de Nav, las diferencias entre tratamientos no son marcadas.

A los 21 días de exposición (Figura 33b), los dos primeros componentes explicaron en conjunto el 33,92 % de la varianza total (CP1: 18,79 %; CP2: 15,13 %). El CP1 estuvo dominado por variables relacionadas al metabolismo energético, como las proteínas musculares (0,38) y el CEA (0,35), y con la actividad de la enzima AChE cerebral (-0,41). Por su parte, el CP2, mostró mayor peso en biomarcadores de estrés oxidativo en branquias (TBARS: 0,35; GST: -0,41), así como metabólicos (CEA: 0,35; ETS: -0,37).

En el gráfico se evidencia una mayor separación entre los tratamientos respecto a lo observado a los 8 días. El grupo control (Peces + Bio R1 AP) se ubica hacia la región positiva de CP1, mientras que los peces expuestos a 1 mg As/L se separan hacia el extremo opuesto de ese eje. El grupo expuesto a 0,5 mg As/L se posiciona de forma intermedia, parcialmente superpuesto con ambos. A diferencia de lo observado en presencia de *biofilm* de Nav, en este caso la separación entre grupos se acentúa a los 21 días.

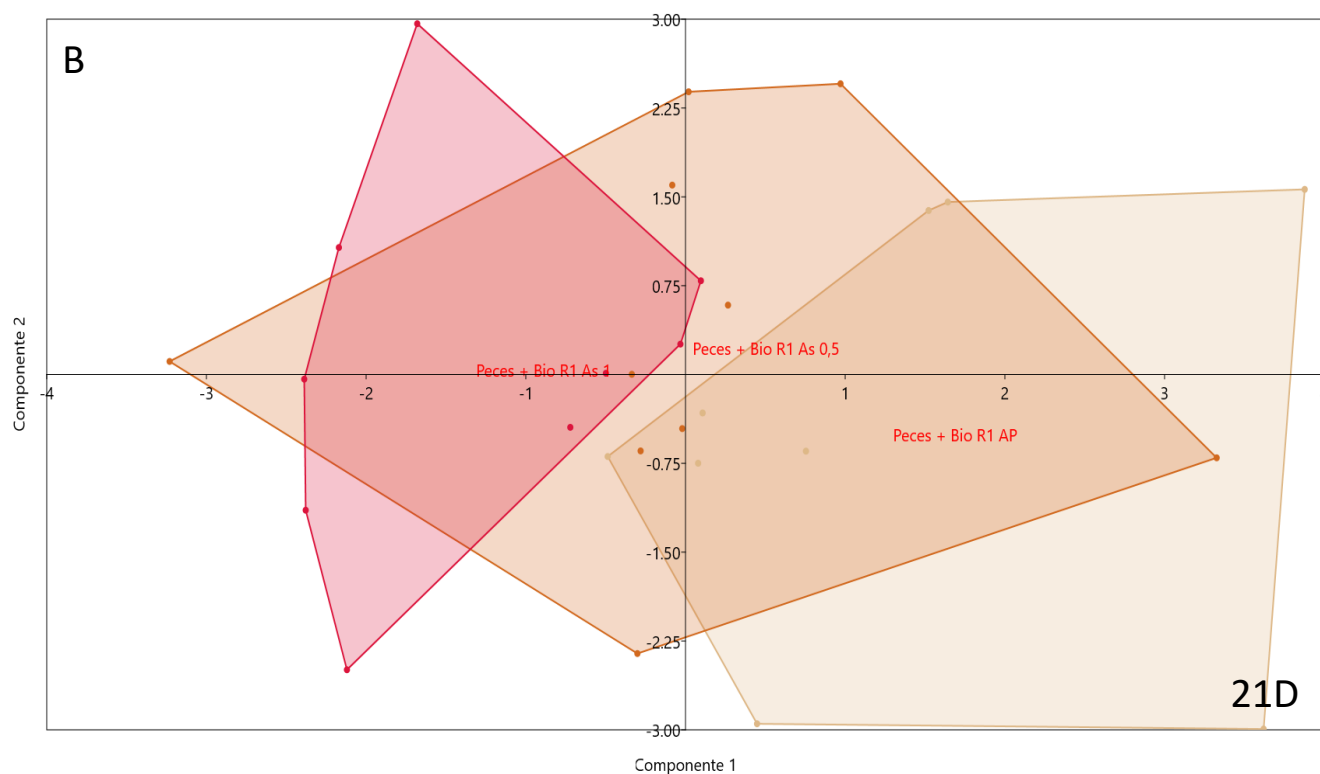
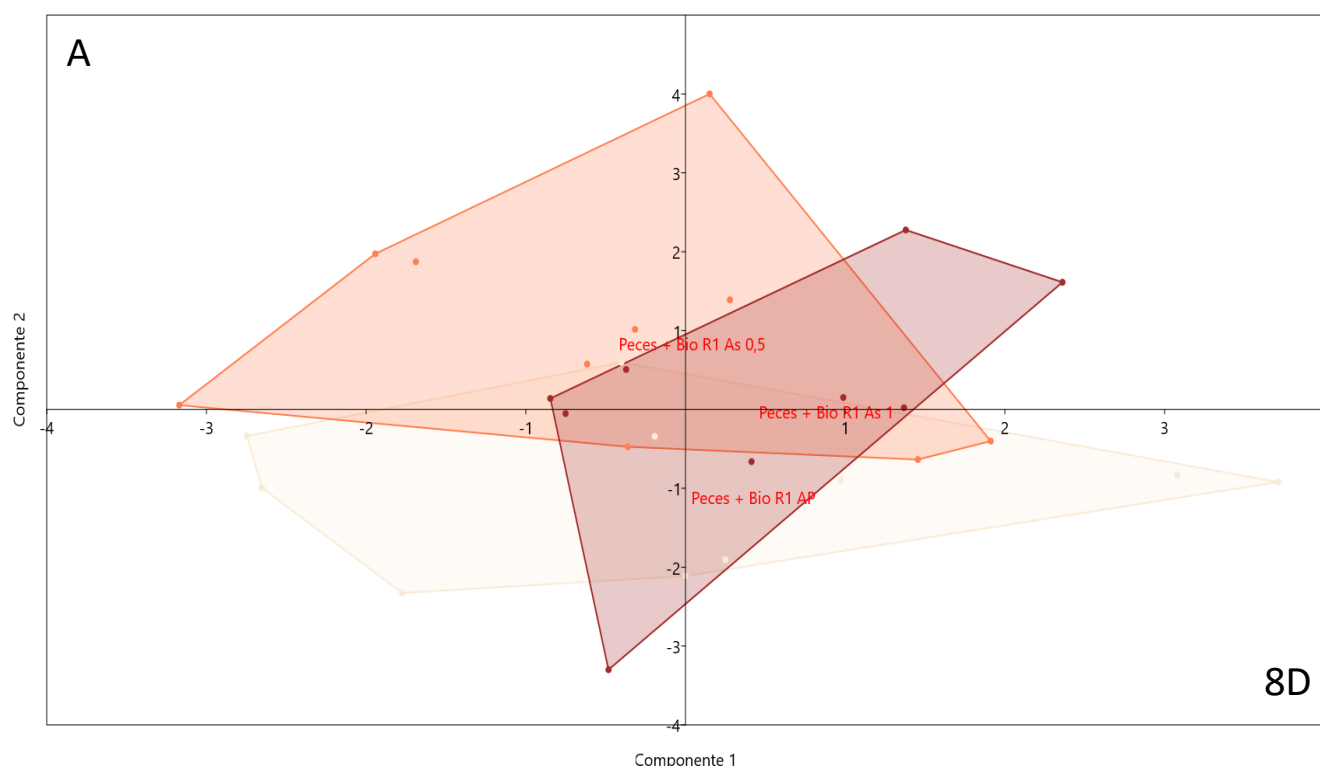


Figura 33. Gráficos generados por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada tratamiento para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a los ejemplares sobre los cuales se hicieron las determinaciones de los biomarcadores y diferentes colores corresponden a diferentes tratamientos: cuanto más oscuro el color, mayor concentración de As (AP, 0,5 y 1,0 mg As/L). A: 8 días de exposición (varianza total = 31,66%); B: 21 días de exposición (varianza total = 33,92%).

Además del análisis por grupos, se compararon las respuestas de los tres grupos de exposición (peces sin *biofilm*, con *biofilm* de Nav y de R1) dentro de cada concentración de As (AP, 0,5 y 1 mg As/L), tanto para 8 días como para 21 días.

En primer lugar, se compararon los grupos control a 8 días de exposición (Peces + AP, Peces + Bio Nav AP y Peces + Bio R1 AP; Figura 34a) y se observó una diferenciación entre tratamientos aún en ausencia de arsénico. Los dos primeros componentes explicaron el 33,79 % de la varianza total (CP1: 18,03 %; CP2: 15,76 %). El CP1 se asoció principalmente con el CEA (0,51), las proteínas musculares (0,41) y la actividad GST branquial (-0,50), mientras que el CP2 estuvo influenciado por otras variables metabólicas como ETS (0,46) y lípidos (0,42), y la actividad de AChE en músculo (0,43). Los peces sin *biofilm* se agruparon hacia valores negativos de CP1 y positivos de CP2, los peces con *biofilm* de R1 ocuparon una posición intermedia, y los del grupo con *biofilm* de Nav se ubicaron hacia el extremo opuesto al grupo sin *biofilm*, reflejando diferencias fisiológicas en los peces, asociadas exclusivamente a la presencia y origen del *biofilm*.

A una concentración de 0,5 mg As/L (Figura 34b), la separación entre tratamientos se acentuó aún más. Los dos primeros componentes explicaron el 41,33 % de la varianza total (CP1: 28,85 %; CP2: 12,48 %). El CP1 estuvo fuertemente influenciado por biomarcadores hepáticos (GSH: 0,34; GST: 0,34), branquiales (GST: 0,38) y metabólicos (ETS: 0,36), mientras que el CP2 se asoció al contenido de hidratos de carbono (0,60), al factor de condición (0,52) y al AChE muscular (-0,34). En este caso, los tres grupos se distribuyeron claramente en distintas regiones del gráfico con leves superposiciones entre ellos, indicando que tanto la exposición al As como la presencia y el tipo de *biofilm* generaron perfiles de respuesta fisiológica bien diferenciados.

Por último, a 1 mg As/L (Figura 34c), se acentuó más la separación de los peces sin *biofilm* con los tratamientos con *biofilm* de Nav y R1. Los dos primeros componentes explicaron el 39,47 % de la varianza total (CP1: 24,81 %; CP2: 14,66 %). El CP1 estuvo dominado por variables relacionadas con el estrés oxidativo en branquias, especialmente TBARS (0,41) y GSH (0,34), y metabólicas como ETS (0,36) y CEA (-0,36), mientras que el CP2 reflejó principalmente la contribución de TBARS hepático (0,38), GSH y GST en branquias (0,36 y -0,35), y contenido de carbohidratos (-0,43). A diferencia de lo observado a la menor concentración de As, la influencia del origen del *biofilm* se redujo, quedando superpuestos Nav y R1, dando lugar a una respuesta fisiológica homogénea entre ambos grupos con *biofilm* a esta concentración.

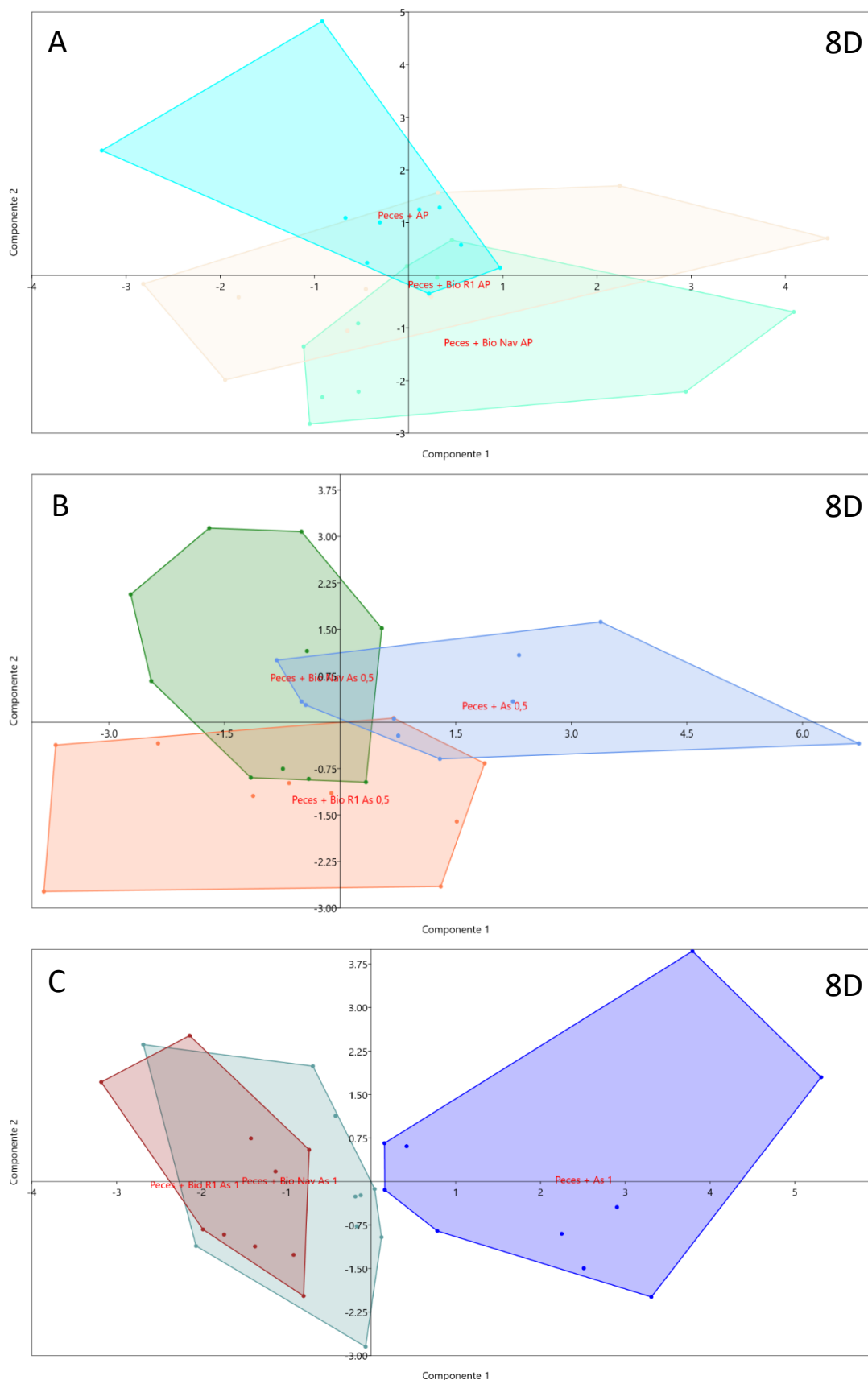


Figura 34. Gráficos generados por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada tratamiento para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a los ejemplares sobre los cuales se hicieron las determinaciones de los biomarcadores y diferentes colores corresponden a diferentes grupos: Peces sin *biofilm* (tonos de azul), peces con *biofilm* de Nav (tonos de verde) y peces con *biofilm* de R1 (tonos de marrón). A: grupos AP (varianza total = 33,79%); B: grupos 0,5 mg As/L (varianza total = 41,33 %); C: grupos 1 mg As/L (varianza total = 39,47%). Tiempo de exposición: 8 días.

Por otro lado, se evaluaron las mismas respuestas a 21 días. Al comparar los controles (Figura 35a), los dos primeros componentes explicaron el 36,83 % de la varianza total (CP1: 21,31 %; CP2: 15,52 %). El CP1 estuvo influenciado principalmente por la actividad de AChE en encéfalo (0,44), el contenido de TBARS branquial (0,39) y el contenido de hidratos de carbono en músculo (0,36), mientras que el CP2 estuvo dominado por biomarcadores metabólicos como el contenido de lípidos (0,51), el ETS (-0,44) y el CEA (0,51). A diferencia de lo observado a los 8 días, los grupos con *biofilm* de Nav y R1 mostraron una mayor superposición entre sí, aunque ambos se mantuvieron diferenciados del grupo sin *biofilm*, que se ubicó hacia valores positivos de CP1.

Al analizar los tratamientos con 0,5 mg As/L (Figura 35b), los dos primeros componentes explicaron el 37,07 % de la varianza total (CP1: 22,76 %; CP2: 14,31 %). El CP1 estuvo influenciado por el GSH branquial (-0,41), la actividad de AChE en músculo (0,38) y el CEA (0,33), mientras que el CP2 estuvo dominado por la actividad de las enzimas hepáticas GST y CAT (0,50 y 0,42) y por el factor de condición (0,40). En este caso, se observó una mayor superposición entre los grupos con *biofilm* hacia los valores positivos de CP1 y CP2, mientras que los peces sin *biofilm* conservaron una separación hacia los valores negativos de los dos ejes.

Por último, en los tratamientos con 1 mg As/L (Figura 35c), los dos primeros componentes explicaron el 44,08 % de la varianza total (CP1: 25,30 %; CP2: 18,78 %). El CP1 estuvo dominado por biomarcadores hepáticos, como catalasa (0,35), GST (0,33) y el IHS (-0,33), así como el contenido de TBARS de branquias (-0,37). El CP2 reflejó la influencia metabólica del CEA (0,51), los lípidos (0,38) y ETS (-0,45), y la actividad de AChE encefálica (-0,42). En este caso, la alta concentración de arsénico en una exposición prolongada produjo una clara separación entre los tres grupos evaluados. A diferencia de las concentraciones más bajas y a los 8 días, los grupos con *biofilm* se separaron entre sí, evidenciando un efecto diferencial del origen del *biofilm* sobre la fisiología de los peces frente a una exposición crónica a As.

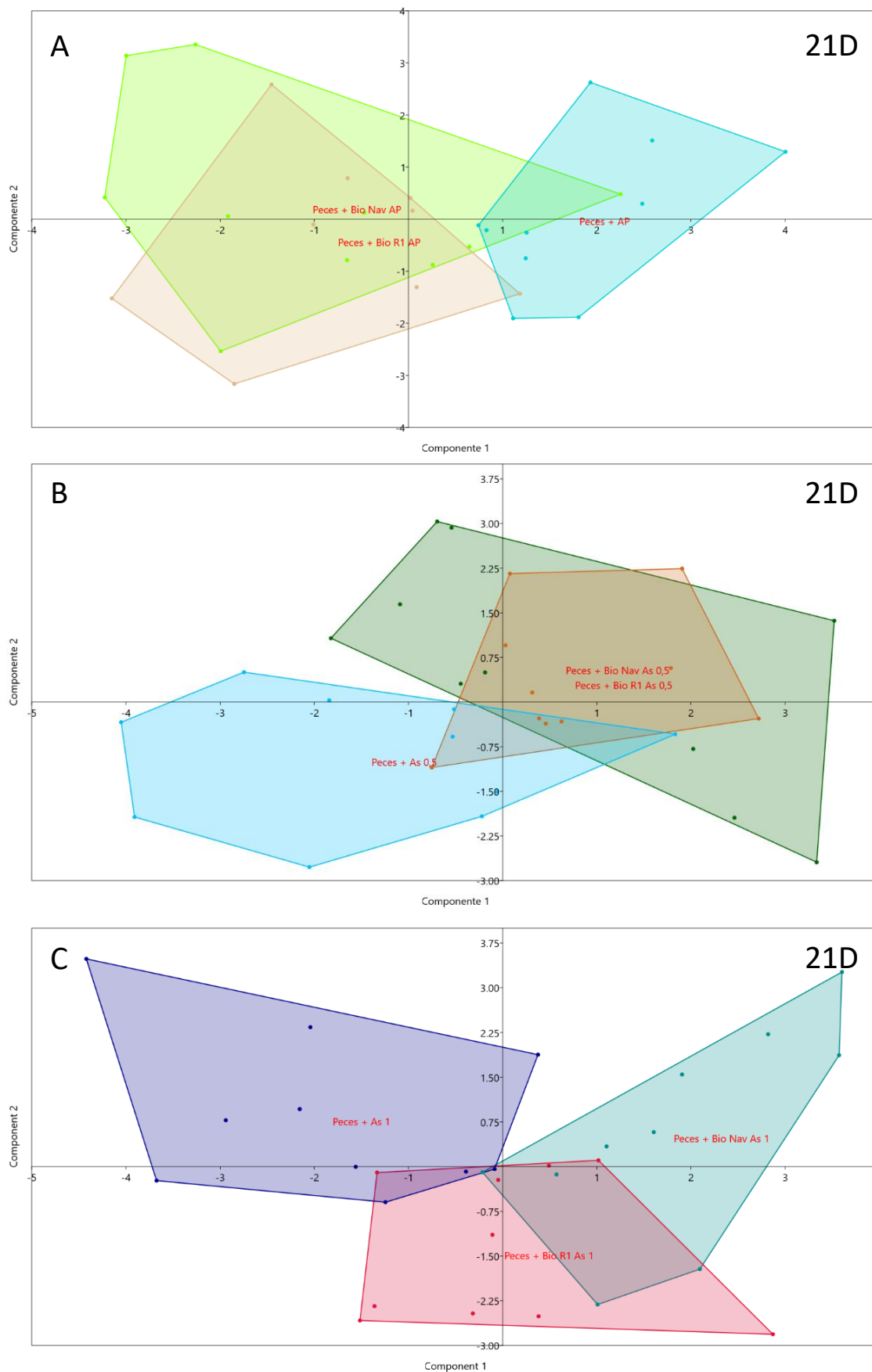


Figura 35. Gráficos generados por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada tratamiento para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a los ejemplares sobre los cuales se hicieron las determinaciones de los biomarcadores y diferentes colores corresponden a diferentes grupos: Peces sin *biofilm* (tonos de azul), peces con *biofilm* de Nav (tonos de verde) y peces con *biofilm* de R1 (tonos de marrón). A: grupos AP (varianza total = 36,83%); B: grupos 0,5 mg As/L (varianza total = 37,07 %); C: grupos 1 mg As/L (varianza total = 44,08%). Tiempo de exposición: 21 días.

Bioacumulación de As en peces

En la Figura 36 se muestran los niveles de arsénico acumulado en peces tras 8 y 21 días de exposición en los distintos tratamientos. Este es un estudio preliminar, ya que no se contó con la cantidad de replicas para realizar un análisis estadístico, debido a los costos de las determinaciones y el número de individuos necesarios para la determinación, por lo que las mediciones fueron únicas o duplicadas. En general, se observa un aumento en los niveles de arsénico con el incremento de la concentración del mismo en el medio, tanto en ausencia como en presencia de *biofilm*. Además, la acumulación tendió a ser mayor a los 21 días en la mayoría de los tratamientos.

En ausencia de *biofilm*, los peces presentaron los mayores niveles de arsénico, alcanzando un máximo de aproximadamente 10 $\mu\text{g As/g}$ peso seco a los 21 días en la concentración más alta (1 mg As/L). Este grupo también mostró una mayor diferencia entre los peces expuestos y su control, en comparación con los grupos con *biofilm*.

En los peces expuestos en presencia de *biofilm* de Nav, los valores de arsénico fueron relativamente similares entre concentraciones, especialmente a los 8 días. En contraste, en presencia del *biofilm* de R1, los niveles de arsénico en peces aumentaron de forma más marcada con la concentración en el medio, mostrando un patrón acumulativo más dependiente del nivel de exposición, tanto a los 8 como a los 21 días.

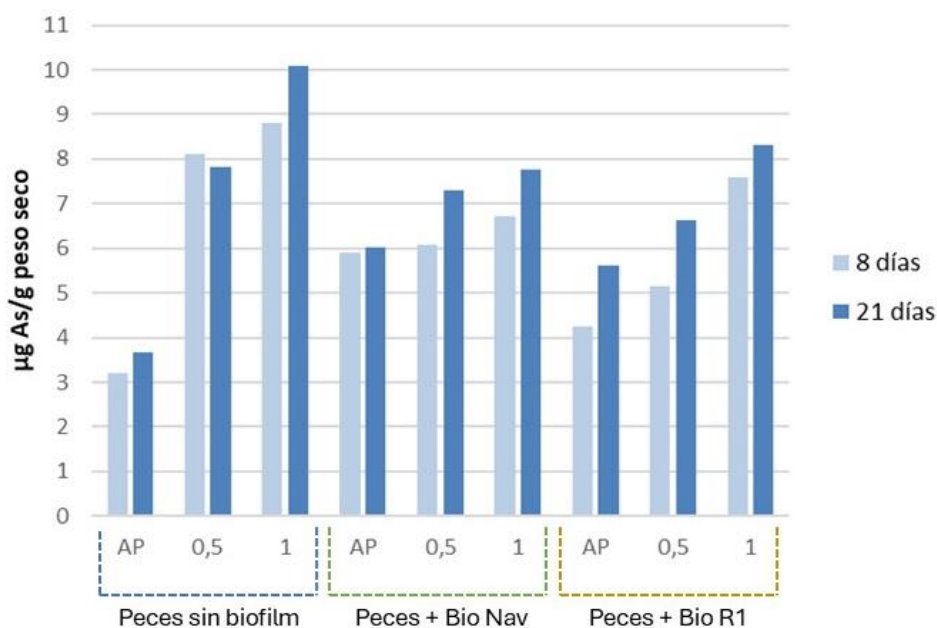


Figura 36. Acumulación de arsénico ($\mu\text{g As/g}$ peso seco) en peces expuestos a las diferentes concentraciones de As (0, 0,5 y 1 mg/L), tanto a los 8 como a los 21 días, en ausencia y presencia de *biofilm* de diferente origen (Nav y R1).

Además de la evaluación de biomarcadores en los peces, se analizaron distintos parámetros bioquímicos en el *biofilm* de los tratamientos experimentales a tiempo final (21 días) y se los comparó con los valores obtenidos en los cultivos previos al bioensayo. Estos análisis permitieron determinar la respuesta del *biofilm* ante la exposición al arsénico y ante la interacción con los peces.

Estrés oxidativo

Se cuantificaron distintos biomarcadores de estrés oxidativo en el *biofilm* expuesto a arsénico, incluyendo el contenido de glutatión reducido (GSH), la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), y los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) (Figura 37).

En relación al contenido de GSH, se observó una tendencia general a valores más elevados en los tratamientos con *biofilm* de R1 en comparación con los de Nav. Para todas las concentraciones de As, los valores de GSH en el *biofilm* de R1 fueron significativamente superiores a los correspondientes al *biofilm* de Nav. Al comparar con el cultivo previo al ensayo (T0) (líneas transversales), no se observaron diferencias significativas en el *biofilm* de Nav, luego de 21 días de exposición y en presencia de los peces. En cambio, en el *biofilm* de R1 los valores de GSH fueron significativamente mayores en todos los tratamientos experimentales en comparación al T0.

Respecto a la actividad CAT, los valores de ambos cultivos fueron similares y se registraron aumentos significativos en todos los tratamientos de ambos sitios luego de 21 días de exposición. Además, en la concentración de 1 mg As/L, el *biofilm* de R1 mostró valores significativamente más altos que el *biofilm* de Nav.

La actividad GST también mostró valores similares entre ambos cultivos y, luego del bioensayo, todos los tratamientos presentaron valores significativamente mayores que los del *biofilm* a T0. Por otro lado, la actividad de esta enzima tuvo un aumento significativo en las concentraciones más altas de As (0,5 y 1,0 mg As/L) en R1, en comparación con el control y la concentración más baja (0,2 mg As/L) de ese mismo grupo. Además, estos valores también fueron significativamente superiores a los correspondientes tratamientos de *biofilm* de Nav.

Finalmente, los niveles de TBARS solo mostraron un aumento significativo en el *biofilm* de Nav expuesto a 1 mg As/L, en comparación con el expuesto a 0,5 mg As/L. A su vez, este valor

fue significativamente mayor que el observado para la misma concentración en el *biofilm* de R1.

No fue posible medir este parámetro en los T0.

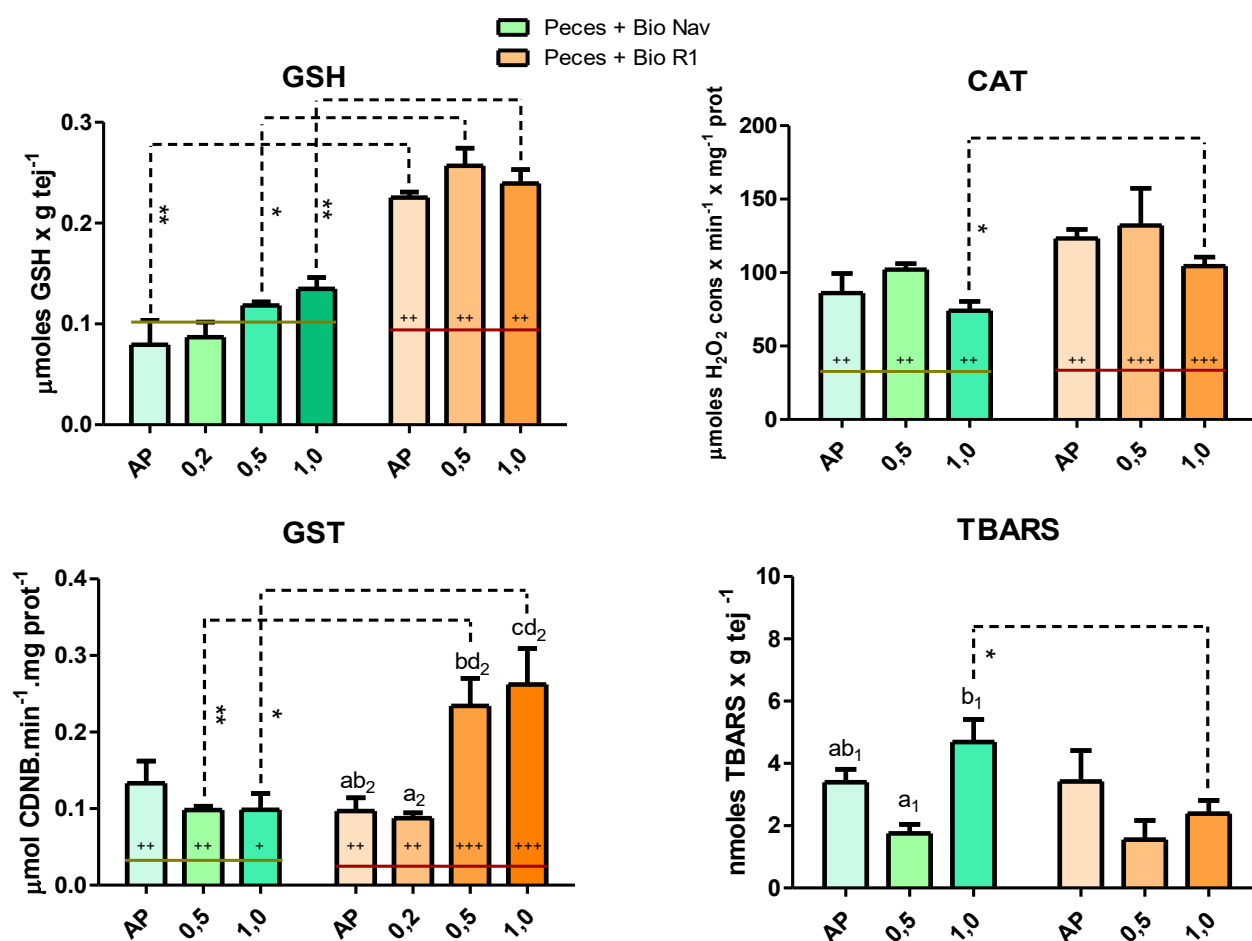


Figura 37. Valores medios de los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) medidos en el *biofilm* de cada tratamiento a los 21 días de exposición a As (AP: agua potable; 0,5 y 1,0 mg As/L); con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice (p < 0.05). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001). La línea transversal de cada grupo indica el valor medio del biomarcador medido en el cultivo previo al ensayo (T0) y las cruces en las barras indican diferencias significativas con el T0: + (p < 0.05), ++ (p < 0.01), +++ (p < 0.001).

Enzimas extracelulares

Por otro lado, se evaluó la actividad de las enzimas extracelulares fosfatasa alcalina y β -glucosidasa en el *biofilm* de los diferentes tratamientos experimentales (Figura 38).

En el caso de la fosfatasa alcalina, en comparación con el T0, el *biofilm* de todos los tratamientos mostraron una disminución significativa en su actividad enzimática luego del bioensayo, tanto en Nav como en R1. Por otro lado, se observó un aumento significativo de la actividad en el *biofilm* de Nav, tanto para la concentración de 0,5 como para 1,0 mg As/L,

respecto al control. Además, estos valores fueron significativamente superiores a los registrados para las mismas concentraciones en el *biofilm* de R1, donde no se evidenciaron cambios significativos en la actividad en respuesta al As.

En cuanto a la actividad de la β -glucosidasa, se observó una disminución significativa de los valores, únicamente en el *biofilm* de los tratamientos de Nav, respecto al T0. Luego de los 21 días de exposición al As, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales. No se contó con suficiente muestra del *biofilm* de R1 en AP, por lo que no se pudo determinar el biomarcador en este tratamiento.

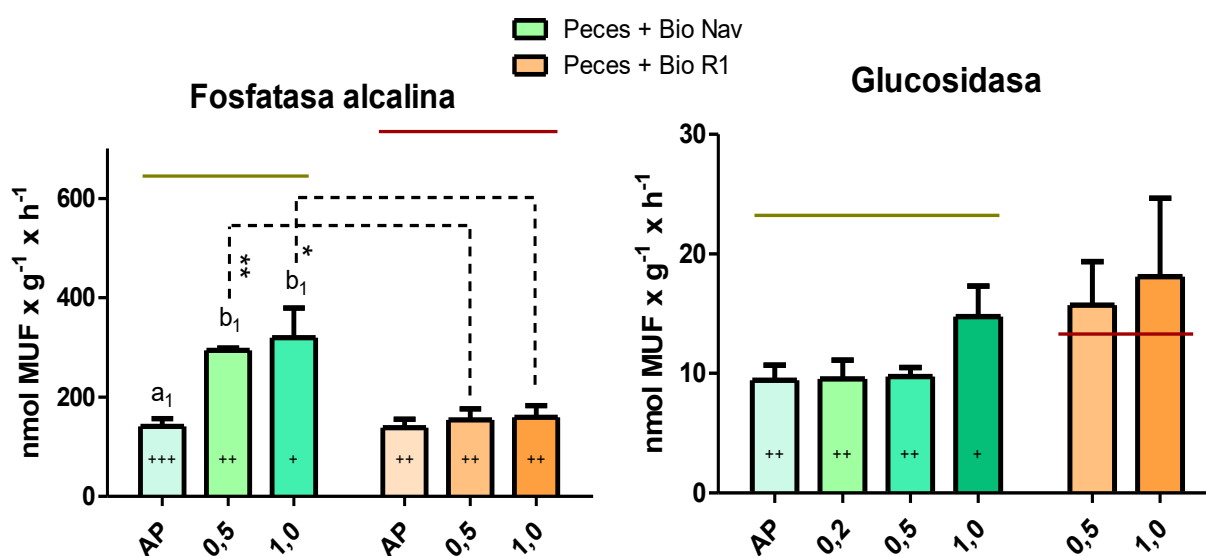


Figura 38. Valores medios de los biomarcadores relacionados con las enzimas extracelulares (fosfatasa alcalina y β -glucosidasa) medidos en el *biofilm* de cada tratamiento a los 21 días de exposición a As (AP: agua potable; 0,5 y 1,0 mg As/L); con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada grupo, indicado con el subíndice ($p < 0.05$). Las líneas punteadas indican diferencias significativas entre grupos, para las mismas concentraciones de As: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). La línea transversal de cada grupo indica el valor medio del biomarcador medido en el cultivo previo al ensayo (T0) y las cruces en las barras indican diferencias significativas con el T0: + ($p < 0.05$), ++ ($p < 0.01$), +++ ($p < 0.001$).

Discusión y conclusiones

Los resultados de este estudio demostraron que la presencia de *biofilm*, y su origen, varían los efectos del arsénico sobre *Cnesterodon decemmaculatus*, evidenciando una interacción compleja entre el contaminante y la matriz biológica del medio.

A nivel general, los peces expuestos al arsénico mostraron alteraciones en su estado morfológico, donde el factor de condición (FC) y el índice hepatosomático (IHS) mostraron variaciones a lo largo del tiempo y entre tratamientos. Se observó una reducción progresiva del FC en peces expuestos por 21 días, a arsénico sin *biofilm* y con *biofilm* de R1, lo que sugiere un impacto negativo en la condición corporal. Además, los peces expuestos al arsénico mostraron alteraciones significativas en el IHS, reflejando una posible hipertrofia o hiperplasia hepática como respuesta a la toxicidad del metaloide. Este tipo de respuesta ha sido reportado previamente en peces expuestos a metales pesados, en donde el incremento del IHS se asocia con un aumento en la actividad metabólica del hígado frente al estrés inducido por los contaminantes (Georgieva *et al.*, 2016; Macirella *et al.*, 2023). En nuestro estudio, el aumento del IHS fue particularmente evidente a los 21 días de exposición en los peces mantenidos sin *biofilm* y en aquellos expuestos en presencia de *biofilm* del sitio R1, ambos mostrando una relación positiva entre la concentración de arsénico en el medio y la masa hepática. En contraste, los peces expuestos en presencia de *biofilm* del sitio Nav presentaron aumento a los 8 días y no a los 21 días, sugiriendo una posible capacidad moduladora de este *biofilm* sobre los efectos hepáticos del arsénico a largo plazo. El incremento del IHS observado podría estar vinculado con procesos de inflamación, acumulación de lípidos o proliferación celular hepática, mecanismos ya descritos como respuestas comunes frente a la exposición a metales como el arsénico, cadmio y cobre (Jasim, 2017). Estas alteraciones pueden implicar una sobrecarga funcional del hígado en sus funciones de detoxificación, almacenamiento y metabolismo de lípidos y proteínas, comprometiendo potencialmente la homeostasis del organismo. Además, algunos estudios han demostrado que los cambios en el IHS pueden ser más marcados bajo exposiciones prolongadas o crónicas, y pueden correlacionarse con daño histológico en tejidos hepáticos (Georgieva *et al.*, 2016). Si bien en esta tesis no se analizó la histología de los tejidos, hay trabajos en los que se han observado histopatologías hepáticas como picnosis, hipertrofia nuclear, necrosis, dilatación sinusoidal, etc. de peces expuestos a As (Ahmed *et al.*, 2013).

En términos de estrés oxidativo, los peces expuestos al arsénico mostraron alteraciones significativas en los sistemas de defensa antioxidante y en los niveles de daño oxidativo, con respuestas que variaron en función del órgano, el tiempo de exposición y la presencia del *biofilm*

en el medio. En hígado, órgano central en la detoxificación de contaminantes, se observaron disminuciones en los niveles de GSH, TBARS, y en la actividad de CAT en los peces expuestos a arsénico sin *biofilm*, tanto a los 8 como a los 21 días. Estos resultados, que en principio podrían parecer inconsistentes con un estado de estrés oxidativo, han sido observados también en estudios previos bajo condiciones de exposición crónica al arsénico. En Cui *et al.* (2020), se ha reportado que tras una activación inicial de enzimas antioxidantes como la CAT y un aumento en los niveles de malondialdehído (MDA), estos parámetros pueden disminuir en etapas posteriores de la exposición, evidenciando un proceso de adaptación fisiológica frente al tóxico. Esta dinámica fue asociada al aumento progresivo en la biometilación del arsénico en hígado, lo que promovió la transformación hacia especies menos reactivas, como la arsenobetaína, y se tradujo en una reducción del daño oxidativo. Resultados similares fueron obtenidos por González Núñez (2025), quien reportó que en peces de la especie *C. decemmaculatus* expuestos a arsénico en agua, la actividad de CAT aumentó significativamente a las 96 h, pero disminuyó de forma significativa a los 12 y 21 días respecto al control. Además, Horton *et al.* (1987) propusieron que la reducción en los niveles de TBARS no necesariamente refleja una ausencia de estrés oxidativo, sino que puede estar vinculada a modificaciones en la composición de ácidos grasos de membrana o a la inducción de enzimas detoxificantes como el citocromo P450 (capaces de canalizar los hidroperóxidos hacia rutas no peroxidativas); mecanismos que podrían estar modulando la respuesta observada.

En cambio, en las branquias, los peces expuestos sin *biofilm* presentaron un aumento significativo en los niveles de GSH junto con un incremento de TBARS, reflejando una respuesta antioxidante activa frente al daño generado por el contacto directo del epitelio branquial con el arsénico disuelto en el agua. Este aumento de GSH podría interpretarse como una estrategia de defensa frente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), en un intento de preservar la integridad de las membranas celulares, aunque no suficiente para evitar el daño evidenciado por el aumento en los niveles de peroxidación lipídica. Resultados similares fueron reportados por Moussa *et al.* (2022), en peces expuestos a metales pesados en ambientes contaminados, donde observaron una activación de los mecanismos antioxidantes, acompañada de una marcada peroxidación lipídica y daño estructural en branquias; y destacaron que ciertos tejidos pueden activar rutas compensatorias frente al estrés oxidativo sostenido, particularmente en órganos de contacto directo como las branquias.

En presencia de *biofilm*, varias de estas respuestas antioxidantes se vieron atenuadas o modificadas en comparación con los peces sin *biofilm*, lo que sugiere un efecto protector mediado por la biopelícula. Este rol amortiguador ya fue señalado por Tuulaikhuu *et al.* (2016),

quienes demostraron que los microhábitats generados por *biofilm* pueden reducir la biodisponibilidad de metales y limitar el impacto oxidativo sobre peces expuestos. De manera similar, Kumar *et al.* (2025) reportaron que la incorporación de perifiton en sistemas contaminados con arsénico redujo significativamente, en peces *Labeo rohita*, la bioacumulación y los efectos oxidativos, incluyendo parámetros en branquias y encéfalo, al tiempo que promovía la retención del As como especies menos tóxicas.

En nuestro estudio, esta atenuación fue particularmente evidente en los peces expuestos en presencia del *biofilm* de Nav, cuyas respuestas fisiológicas se diferenciaron marcadamente de las de los peces sin *biofilm*. En cambio, los peces expuestos con *biofilm* de R1, si bien presentaron respuestas diferentes, tuvieron un perfil general más cercano al del grupo sin *biofilm*, tanto en los niveles de TBARS como en las respuestas antioxidantes, lo cual sugiere que este *biofilm* tuvo un efecto “protector” más limitado. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las características ecológicas y funcionales de cada *biofilm* según su origen, incluyendo su estructura microbiana, capacidad de retención del tóxico o producción de compuestos antioxidantes.

El metabolismo energético también presentó variaciones según la condición experimental. La actividad del sistema de transporte de electrones (ETS), como estimador del metabolismo aeróbico celular, fue significativamente mayor en los peces sin *biofilm* que en aquellos mantenidos en presencia de *biofilm*, independientemente de la concentración de arsénico y del tiempo de exposición. Este patrón sugiere que la presencia del *biofilm*, más allá de atenuar los efectos del tóxico, podría estar asociada a un entorno más estable que reduce la demanda metabólica general. En este sentido, se ha propuesto que el *biofilm* no solo actúa como modulador de la calidad del agua y barrera frente a contaminantes, sino que también aporta nutrientes esenciales y compuestos bioactivos que pueden mejorar el estado fisiológico de los organismos acuáticos, disminuyendo así la necesidad de una activación metabólica elevada frente a condiciones ambientales adversas (Pandey *et al.*, 2022). Respecto a las reservas energéticas, el contenido de hidratos de carbono en músculo disminuyó significativamente a los 21 días en las concentraciones intermedias de As (0,2 y 0,5 mg/L) en peces sin *biofilm*, lo cual puede reflejar la movilización de glucógeno como fuente energética frente a una exposición sostenida. Un patrón similar se observó en los peces con *biofilm* de R1, en particular en la concentración de 0,5 mg/L, indicando una posible convergencia en la respuesta ante condiciones crónicas de estrés. La reducción de hidratos de carbono ha sido reportada como una consecuencia de la glucogenólisis inducida por contaminantes como el arsénico y por una alta demanda energética sostenida (Ananth *et al.*, 2014; Kumar y Banerjee, 2014). En cambio,

con el *biofilm* de Nav, no se registraron cambios a los 21 días, pero sí un aumento en los tratamientos expuestos a As a los 8 días. Este incremento podría estar relacionado con el aporte nutricional del *biofilm*, ya que se ha demostrado que los *biofilms* desarrollados en ambientes menos impactados pueden ofrecer una fuente adicional de compuestos energéticos fácilmente asimilables, como carbohidratos y lípidos, que contribuirían al almacenamiento transitorio de glucógeno en tejidos musculares (Roeselers *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2022). Por otro lado, a los 21 días se observó un aumento significativo en el contenido de lípidos en los peces expuestos a 1 mg As/L en ausencia de *biofilm*. Este resultado podría interpretarse como una estrategia de acumulación compensatoria de reservas energéticas frente a un escenario crónico de estrés ambiental. Estudios como el de González Núñez (2025) también reportaron un aumento significativo en los niveles de lípidos y consumo de carbohidratos musculares en *C. decemmaculatus* expuestos a 1 mg As/L durante 21 días, respaldando la hipótesis de una respuesta fisiológica adaptativa. Además, en Li *et al.* (2016) han demostrado que el arsénico puede inducir alteraciones en el metabolismo hepático, incluyendo una desviación del metabolismo de la glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato, la inhibición de la utilización mitocondrial del piruvato y una disminución de la oxidación de ácidos grasos. Estas modificaciones metabólicas favorecen la acumulación de lípidos, almacenados en forma de gotas lipídicas, como mecanismo de protección celular frente al daño oxidativo o la disfunción energética sostenida.

En cuanto al análisis estadístico temporal, se evaluaron diferencias entre los mismos tratamientos a los 8 y 21 días de exposición. Uno de los aspectos más interesantes a destacar fue la detección de cambios significativos en los controles AP, especialmente en biomarcadores de estrés oxidativo, como GSH y TBARS en branquias, CAT y GST en hígado, además de otros indicadores como el contenido de hidratos de carbono musculares y la actividad de la AChE en encéfalo. Este hallazgo indica que, aun en ausencia de un tóxico exógeno, los animales pueden experimentar estrés fisiológico asociado al mantenimiento prolongado en condiciones de laboratorio. Esto sugiere una respuesta fisiológica a factores inherentes al encierro experimental, como el confinamiento, el manejo, la falta de estímulos ambientales o la exposición continua a condiciones artificiales. Este tipo de respuestas han sido reportadas previamente por Pottinger y Calder (1995), quienes demostraron que los protocolos experimentales pueden inducir estrés crónico en peces incluso sin presencia de contaminantes, y por Spagnoli *et al.* (2016), que señalaron la influencia del tiempo de mantenimiento y otras variables del entorno de laboratorio sobre parámetros bioquímicos sensibles. Desde un enfoque más general, Schulte (2013) plantea que incluso variaciones sutiles en el ambiente pueden

desencadenar respuestas que afectan la homeostasis fisiológica en peces. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la importancia de considerar el efecto del tiempo y de las condiciones de ensayo en estudios de exposición prolongada, para poder interpretar los cambios fisiológicos en contexto, reconociendo que el estrés ambiental no se limita únicamente a la acción de un tóxico.

Los análisis de componentes principales (PCA) permitieron integrar la información obtenida a partir de todos los biomarcadores medidos en los peces, proporcionando una visión multivariada y destacando algunos de ellos entre todos los biomarcadores analizados. Para de esta manera, evaluar el efecto del *biofilm*, su origen y el arsénico en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. En los tratamientos sin *biofilm*, tanto a los 8 como a los 21 días, se observó una clara separación entre las concentraciones de arsénico, indicando un efecto progresivo del tóxico sobre la fisiología de los peces, especialmente en biomarcadores de estrés oxidativo y metabolismo intermediario. En contraste, en los tratamientos con *biofilm* de Nav, los individuos se agruparon en una misma zona del gráfico, sin distinción clara entre las distintas concentraciones, tanto a los 8 como a los 21 días. Esta fuerte superposición sugeriría que la presencia del *biofilm* de Nav atenuó la expresión de las respuestas fisiológicas frente al contaminante, impidiendo observar diferencias atribuibles a la concentración del tóxico. Por su parte, en los tratamientos con *biofilm* de R1, se observó una superposición parcial entre concentraciones a los 8 días, mientras que, a los 21 días, mostraron un patrón de gradiente, donde las distintas concentraciones de As se separaron en el espacio multivariado, reflejando un efecto más claro del tóxico. Esta dinámica podría indicar que el *biofilm* de R1, si bien inicialmente modula la respuesta, a largo plazo no. Esto se hace más evidente al analizar los biomarcadores medidos directamente en el *biofilm*, donde a los 21 días se observó un aumento significativo de la actividad de GST en R1, para las dos concentraciones más altas de As, así como una actividad significativamente mayor de CAT en la concentración más elevada, en comparación con el *biofilm* de Nav. Estos efectos sugieren que el *biofilm* de R1 comienza a verse afectado por la exposición prolongada al As, lo cual podría estar comprometiendo su integridad fisiológica y, en consecuencia, reduciendo su capacidad para mitigar el efecto del contaminante. Estas diferencias podrían explicarse por características intrínsecas de los *biofilms*, como su estructura, composición microbiana o capacidad de retención y transformación del arsénico. Como se ha discutido previamente, los *biofilms* pueden reducir la biodisponibilidad de contaminantes o transformarlos en especies menos tóxicas, amortiguando así su impacto fisiológico (Tuulaikhuu *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2025). En este sentido, los resultados sugieren que el *biofilm* de Nav tiene una mayor capacidad para mitigar el efecto del As tanto en los peces como en sí mismo, mientras que el de R1 resulta menos efectivo en exposiciones prolongadas.

Al analizar las cargas (*loadings*) de los componentes principales podemos identificar qué biomarcadores contribuyeron más a las separaciones observadas entre los grupos experimentales. En los peces sin *biofilm*, a los 8 días, el componente principal 1 (que explica la mayor proporción de variabilidad) estuvo dominado por biomarcadores de estrés oxidativo, como GSH, CAT y TBARS, lo que indica que las respuestas tempranas al arsénico se concentraron en la activación de las defensas antioxidantes. Sin embargo, a los 21 días, los biomarcadores con mayor peso fueron aquellos asociados al metabolismo intermediario, como los niveles de hidratos de carbono, lípidos y CEA. Este cambio en el perfil dominante sugiere que, a medida que se prolonga la exposición, se produce una transición desde una respuesta de defensa inmediata hacia una alteración del estado energético, posiblemente reflejando el agotamiento progresivo de reservas o la necesidad de redistribuir energía para sostener mecanismos de compensación fisiológica (Schulte, 2013; Spagnoli *et al.*, 2016). En contraste, en los tratamientos con *biofilm*, tanto de Nav como de R1, el eje CP1 estuvo dominado por biomarcadores del metabolismo intermediario tanto a los 8 como a los 21 días. Esta consistencia en el patrón sugiere que la presencia del *biofilm* impacta directamente sobre el balance energético de los peces desde etapas tempranas. Como se discutió previamente, el *biofilm* puede actuar como fuente nutritiva, aportando compuestos energéticos y bioactivos que influyen sobre las reservas metabólicas (Roeselers *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2022).

Por otro lado, al comparar los tres grupos experimentales dentro de cada concentración de As, se observó que los peces sin *biofilm* se separaron consistentemente de los grupos con *biofilm*, tanto en el control como en las concentraciones de 0,5 y 1 mg As/L y para ambos tiempos de exposición, evidenciando que la sola presencia del *biofilm* en el medio ya genera una respuesta fisiológica diferente en los peces. A bajas concentraciones, los tratamientos con *biofilm* de distintos orígenes se diferenciaron entre sí, indicando que su origen modula la respuesta al contaminante. Sin embargo, a la concentración más alta de As, ambos grupos con *biofilm* se superpusieron entre sí. Esto sugiere que, frente a exposiciones más severas, el efecto de la presencia del *biofilm* se mantiene, pero las diferencias entre orígenes se diluyen, posiblemente porque la capacidad moduladora de ambas comunidades se ve superada por la toxicidad del contaminante. A los 21 días, esta tendencia se acentuó aún más, ya que los tratamientos con *biofilm* mostraron una mayor superposición incluso desde el control, resultando en una convergencia en sus efectos fisiológicos a lo largo del tiempo.

En cuanto a los biomarcadores, en los controles a los 8 días, predominaron aquellos relacionados con el metabolismo intermediario indicando que, en ausencia de un contaminante, las diferencias fisiológicas entre grupos parecen estar asociadas al efecto del *biofilm* sobre el

estado energético de los peces. Por otro lado, a 0,5 y 1 mg As/L, los biomarcadores más influyentes fueron los de estrés oxidativo, por lo que el As se convierte en el principal modulador de la fisiología a esas concentraciones. A los 21 días, tanto en los controles como en la concentración intermedia (0,5 mg As/L), se mantuvo una contribución combinada de biomarcadores de estrés oxidativo y metabolismo energético, mientras que en la concentración más alta (1 mg/L), volvió a predominar el peso de los biomarcadores de estrés oxidativo. Esto refuerza la idea de que, con el avance del tiempo y el incremento de la concentración de As, la fisiología de los peces se ve cada vez más determinada por el estrés del tóxico, y no tanto por el origen del *biofilm*.

En conjunto, los análisis multivariados respaldan los resultados observados en los biomarcadores individuales y confirman que la presencia de *biofilm* modula significativamente la respuesta fisiológica al arsénico, no solo en magnitud sino también en tipo de respuesta; y subrayan que el origen de la comunidad microbiana es un factor determinante.

Al evaluar la acumulación de As en los organismos, si bien son resultados preliminares, se observó que los peces expuestos a arsénico en ausencia de *biofilm* presentaron los niveles más altos de As, particularmente a 1 mg/L y a 21 días, alcanzando hasta 10 µg As/g peso seco. En presencia de *biofilm*, la acumulación fue menor, indicando que éste modula la biodisponibilidad del metal. Este efecto fue más marcado en los tratamientos con *biofilm* de Nav, donde los niveles de arsénico se mantuvieron relativamente constantes entre concentraciones, lo que sugiere una mayor capacidad del *biofilm* para retener o inmovilizar el contaminante. En cambio, en los peces expuestos con *biofilm* de R1, los niveles de As aumentaron con la concentración del medio, reflejando una respuesta tóxica dependiente.

Este comportamiento coincide con lo reportado por Kumar *et al.* (2025), quienes observaron que la presencia de *biofilm* microalgal en peces *Labeo rohita* expuestos a As(III) redujo en un 50–60 % la bioacumulación total de As en músculo, y promovió la transformación del metaloide hacia formas menos tóxicas como el ácido dimetilarsínico (DMA). Este efecto fue atribuido a la capacidad del *biofilm* para estimular mecanismos endógenos de biotransformación en el pez, como la actividad hepática de GSH y GGT (gamma-glutamyl transferasa), sin inducir daño hepático, y a su vez modular la expresión de genes antioxidantes. Aunque en nuestro estudio no se evaluó la especiación del As, los patrones observados son consistentes con una menor disponibilidad o absorción del contaminante en presencia del *biofilm*, y especialmente con el *biofilm* de Nav, que también se asoció con mejores perfiles fisiológicos en los peces.

Finalmente, se determinaron biomarcadores de estrés oxidativo y actividad enzimática extracelular en el *biofilm* a tiempo final con el objetivo de evaluar si estas comunidades microbianas respondían fisiológicamente a la exposición al arsénico y a su interacción con los peces. Los biomarcadores de estrés oxidativo revelaron que estas comunidades microbianas no solo interactúan con el metal modulando su biodisponibilidad, sino que también son afectadas directamente por su toxicidad. En particular, se observaron respuestas diferenciales entre los *biofilms* de los sitios Nav y R1, siendo este último el que mostró, en general, mayores niveles de GSH, CAT y GST en los tratamientos con As. Además, al comparar con el T0, ambos *biofilms* revelaron aumentos significativos en las defensas antioxidantes. Esto podría deberse a que el envejecimiento del *biofilm* durante los 21 días de ensayo y/o la interacción con los peces, genera una activación de mecanismos de defensa en la comunidad. Esta dinámica ya fue observada por Bonet *et al.* (2013), quienes señalaron que los *biofilms* cultivados en sistemas experimentales con peces pueden experimentar alteraciones funcionales incluso en ausencia de contaminantes, debido a la excreción de metabolitos y compuestos nitrogenados como el amonio. Estos compuestos pueden modificar las condiciones locales del microhábitat del *biofilm*, afectando su fisiología y generando cambios en la actividad enzimática y en la dinámica de nutrientes.

Respecto a las enzimas extracelulares, se registró un aumento significativo en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en el *biofilm* de Nav a las concentraciones más altas de As, fenómeno no observado en el *biofilm* de R1. Este aumento puede estar relacionado con la interferencia del arseniato (As^{5+}) en la captación de fósforo, ya que ambos compiten por los mismos transportadores y sitios enzimáticos, lo que reduce la disponibilidad efectiva del fosfato en el sistema (Wang *et al.*, 2017). Esta relación fue analizada en perifiton de arroyos pampeanos por Rodríguez Castro *et al.* (2015), quienes en un sistema de microcosmos observaron que la exposición combinada a As y P modificó la estructura y funcionalidad de la comunidad, aumentando la acumulación intracelular de As y reduciendo la captación de fósforo en condiciones de limitación. Esta interferencia podría estar estimulando la producción de fosfatasa por parte de la comunidad microbiana, como mecanismo compensatorio frente a esta "percepción" de déficit de fósforo. En este sentido, Huang *et al.* (1998) demostraron que la expresión de esta enzima puede incrementarse en *biofilms* como respuesta adaptativa ante condiciones de limitación de fósforo, incluso cuando hay suficiente fósforo total disponible, debido a esta interferencia competitiva con análogos estructurales como el arseniato. En contraste, la enzima β -glucosidasa no mostró variaciones en su actividad frente al As, aunque se observaron valores levemente mayores en el *biofilm* de R1 en comparación con el de Nav. Las diferencias significativas con respecto a los T0, particularmente en Nav, indican que esta enzima

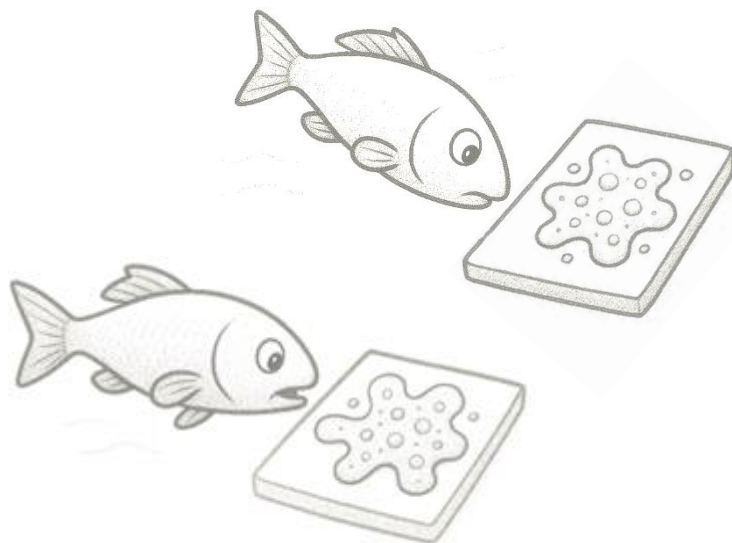
también se ve influenciada por la dinámica del sistema experimental, el envejecimiento del *biofilm* y la presencia de peces, posiblemente como resultado de cambios en la disponibilidad de materia orgánica.

Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la interacción entre contaminantes y componentes bióticos del ecosistema en la evaluación del impacto ambiental del arsénico en ambientes acuáticos. La presencia de *biofilm* puede modificar la dinámica del arsénico en el sistema, afectando tanto su biodisponibilidad como la respuesta de los organismos expuestos, lo que refuerza la necesidad de incluir este componente en estudios ecotoxicológicos para comprender mejor los efectos de los contaminantes en ecosistemas naturales.

En síntesis, los resultados obtenidos en este capítulo evidencian que la presencia de *biofilm*, y particularmente su origen, modulan de manera significativa los efectos del arsénico sobre *Cnesterodon decemmaculatus*, afectando no solo su fisiología individual sino también la dinámica de acumulación del contaminante. La exposición al arsénico provocó alteraciones en múltiples niveles funcionales, incluyendo estrés oxidativo, metabolismo energético y condición corporal, con respuestas que variaron notablemente según la presencia o ausencia de *biofilm*. El *biofilm* de Nav mostró un mayor efecto amortiguador frente al tóxico, mientras que el de R1 resultó menos eficaz en atenuar los impactos fisiológicos y acumulativos. Por otra parte, se demostró que el *biofilm* mismo respondió funcionalmente al arsénico, mostrando alteraciones en biomarcadores de estrés oxidativo y actividad enzimática extracelular, lo que refuerza su rol como una unidad biológica dinámica dentro del sistema. En conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de incluir al *biofilm* en estudios ecotoxicológicos, no solo como componente del hábitat, sino como un agente que puede modificar de forma decisiva el destino y efecto de los contaminantes en los ecosistemas acuáticos.

Capítulo 2:

Ensayo de interacción directa
entre *Cnesterodon*
decemmaculatus y *biofilm*



Introducción

La bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes en las redes tróficas acuáticas son procesos clave que determinan la transferencia y el impacto de sustancias tóxicas en los ecosistemas. Entre los contaminantes, el As puede incorporarse a la biota a través de diferentes vías, incluyendo la absorción directa desde el agua y la ingestión de alimentos contaminados (Mandal y Suzuki, 2002; Shi *et al.*, 2023).

En los peces, una de las principales vías de incorporación del As es la alimentación, especialmente cuando éste se encuentra asociado a partículas del sedimento o a los organismos que componen su dieta, como invertebrados y *biofilm* (Kumari *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2023). Una vez ingerido, el arsénico puede atravesar la mucosa intestinal mediante difusión pasiva o a través de transportadores específicos de membrana, como los transportadores de aniones orgánicos (OATP) y las acuagliceroporinas (AQGP), que facilitan su paso a través del epitelio intestinal y su posterior distribución sistémica (Bieczynski *et al.*, 2021). Una vez dentro del organismo, el arsénico puede acumularse en los tejidos y transferirse a lo largo de la cadena trófica, aumentando su concentración en los niveles superiores y generando efectos tóxicos en peces y otros vertebrados (Painefilú *et al.*, 2019). No obstante, el intestino de los peces también actúa como una barrera de defensa frente a la exposición a xenobióticos. La presencia de transportadores de la familia *ATP-binding cassette* (ABC), como los de la subfamilia ABCC, contribuye a la detoxificación del arsénico mediante su excreción activa hacia la luz intestinal (Painefilú *et al.*, 2019). Sin embargo, la exposición prolongada a este metaloide puede comprometer la integridad estructural del epitelio intestinal y alterar la composición de la microbiota asociada, con potenciales efectos adversos en la salud y el metabolismo del organismo (Zhang *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2023).

El *biofilm* tiene la capacidad para acumular metales pesados y otros contaminantes lo que lo convierte en una fuente potencialmente significativa de exposición para los peces, ya que su consumo puede contribuir sustancialmente a la carga total de As en sus tejidos (Farag *et al.*, 1998).

En este contexto, el estudio de la interacción directa entre *Cnesterodon decemmaculatus* y *biofilm* adquiere relevancia no solo para comprender los mecanismos de bioacumulación de este tóxico, sino también para evaluar el papel de los peces en la dinámica de los contaminantes en los ecosistemas acuáticos. En este capítulo se analizará dicha interacción, evaluando al *biofilm* como fuente de As en la dieta de los peces y los efectos fisiológicos asociados a dicha exposición.

Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de la exposición alimentaria a *biofilm* contaminado con As en *Cnesterodon decemmaculatus*, mediante el uso de biomarcadores de estrés oxidativo, metabolismo intermediario y sistema nervioso.
- Analizar la transferencia de As desde el medio acuático al *biofilm* y desde el *biofilm* a los peces, y calcular el factor de bioacumulación (BAF) para estimar la eficiencia en la transferencia del metaloide.
- Comparar la bioacumulación de As, en *Cnesterodon decemmaculatus*, por vía alimentaria y por exposición en el agua, a fin de entender la relevancia de cada vía en la acumulación y efecto de este metaloide.
- Integrar la información de los biomarcadores medidos para identificar patrones de respuesta biológica y diferenciar entre condiciones experimentales mediante análisis multivariados.

Materiales y Métodos

Muestreo y cultivo de *biofilm*

Para la realización del ensayo, el inóculo de *biofilm* fue recolectado en septiembre de 2024, en el arroyo Naveira de la cuenca del río Luján (-34.567302, -59.064189), sitio que fue descrito en el capítulo 1 (pág. 50).

Tanto para la recolección y cultivo de *biofilm*, como su posterior análisis de composición, se siguió el mismo protocolo ya descrito en “*Materiales y Métodos Generales*”. Las muestras de *biofilm* fueron recolectadas directamente de sustratos sólidos como piedras y vegetación sumergida, asegurando que el inóculo refleje la estructura y funcionalidad de las comunidades naturales. Posteriormente, el inóculo fue transportado al laboratorio en condiciones controladas para preservar su viabilidad y utilizado para cultivar *biofilm* bajo condiciones estandarizadas. Al alcanzar una comunidad madura en el *biofilm* (25 días), se analizó la composición de la comunidad microscópicamente, contabilizando grandes grupos, y se realizó un análisis de Sørensen, para evaluar la similitud entre tratamientos.

Bioensayo

Para los ensayos de exposición, se utilizaron hembras adultas de *Cnesterodon decemmaculatus*, provenientes del bioterio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA-INEDES) de la Universidad Nacional de Luján. Los ejemplares fueron recolectados de los estanques de cría del cultivo, donde son mantenidos en agua potable sin cloro, con aireación constante, fotoperíodo controlado (16 h luz / 8 h oscuridad) y temperatura estable ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

El cultivo de *biofilm* se dividió en dos grupos experimentales. Ambos se desarrollaron bajo los mismos criterios establecidos previamente. Sin embargo, al día 18 del cultivo (una semana antes de comenzar el bioensayo), un grupo fue mantenido en agua potable sin cloro (control), mientras que el otro fue expuesto a una concentración final de 1,0 mg As/L, mediante la adición de una dilución de la solución stock de arsenito de sodio (NaAsO_2 , Merck, Alemania; concentración nominal: 3746.08 mg As(III)/L).

Paralelamente, una semana antes de comenzar el bioensayo, los peces fueron sometidos a un período de aclimatación en condiciones de ensayo. Para ello, se utilizaron peceras de vidrio de 2 L con agua potable sin cloro, previamente filtrada para eliminar arsénico, en las que se colocaron 6 individuos en cada una. Las peceras fueron colocadas en cámaras de incubación con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo (16 h luz / 8 h oscuridad) y aireación constante, condiciones que se mantuvieron estables a lo largo del ensayo (Figura 39a). Durante la

aclimatación, los peces fueron alimentados *ad libitum* con alimento comercial Tetrafin®, previamente triturado con mortero.

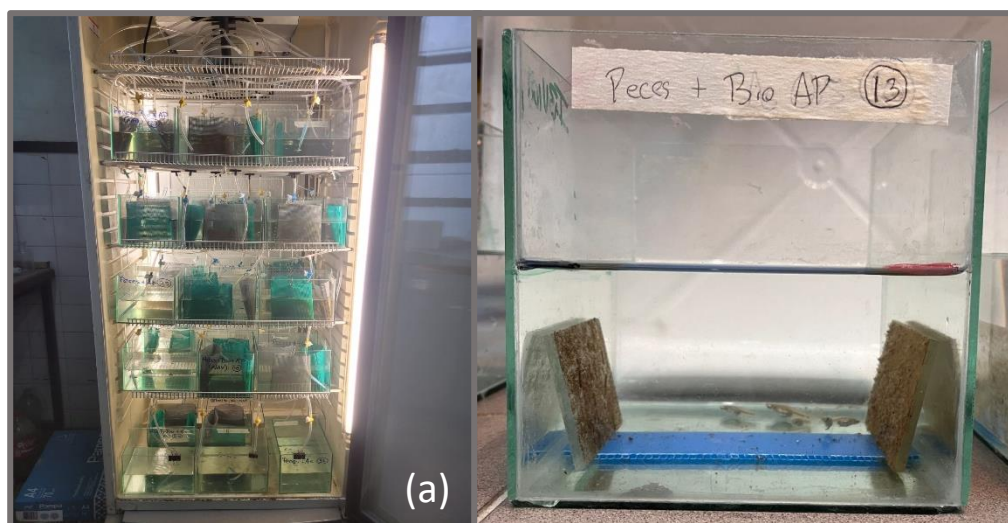


Figura 39. Cámara de incubación en la que se llevó a cabo el bioensayo, con temperatura y fotoperíodos controlados, y aireación constante (a). Placas de *biofilm* dentro de las peceras, colocadas en forma vertical para que los peces se alimenten de ellas (b).

Finalizado el período de aclimatación de los peces (7 días) y alcanzada la madurez de la comunidad del *biofilm* en las placas (25 días), se inició el ensayo de exposición con una duración de 8 días. Para evaluar la interacción directa entre *biofilm* y peces a través de la exposición alimentaria, se establecieron cuatro tratamientos experimentales:

1. P + Bio AP: Peces en AP alimentados con placas con *biofilm* cultivado en agua potable (AP).
2. P + Bio As: Peces en AP alimentados con placas con *biofilm* expuesto por 7 días a arsénico (As).
3. P + AP: Peces mantenidos en agua potable sin arsénico y sin *biofilm*.
4. P + As: Peces mantenidos en agua con 1 mg As/L y sin *biofilm*.

En los tratamientos con *biofilm* (P + Bio AP y P + Bio As), los peces fueron alimentados con placas colonizadas, dispuestas verticalmente dentro de las peceras para facilitar su ramoneo (ya que los peces poseen boca súpera) y evitar la deposición de desechos que pudieran afectar su estructura o funcionamiento (Figura 39b). Las placas fueron renovadas cada 48 h, y la dieta fue complementada diariamente con alimento comercial en escamas en una proporción equivalente al 1% de la biomasa total de cada pecera (promedio de todas las unidades experimentales).

En los tratamientos sin *biofilm* (P + AP y P + As), los peces fueron alimentados exclusivamente con alimento comercial en escamas, suministrado en una cantidad equivalente al 2% de la biomasa total de cada pecera.

En la figura 40 se presenta un resumen del bioensayo, desde el muestreo de *biofilm* hasta la exposición de los peces.

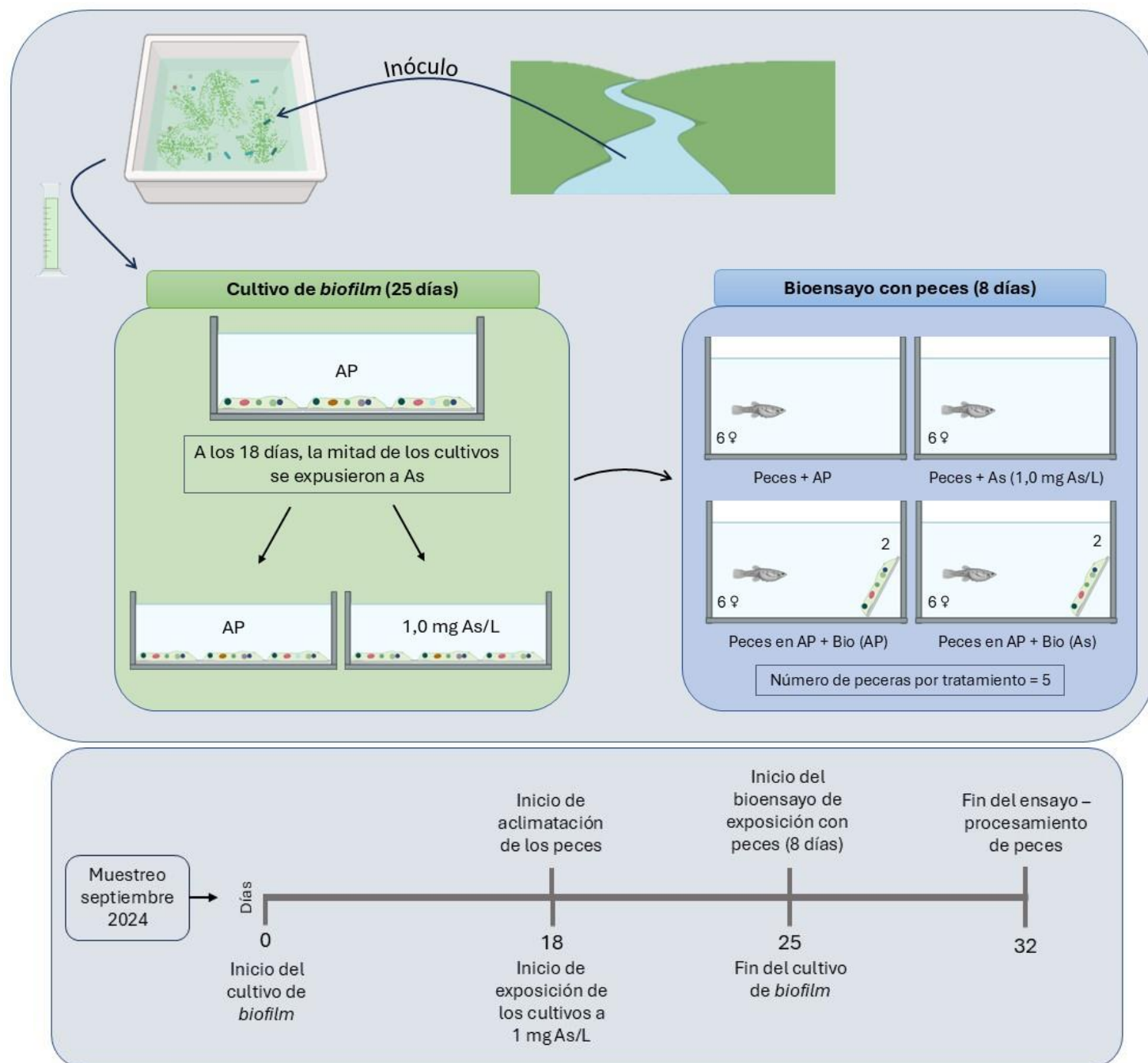


Figura 40. Esquema del diseño experimental realizado. Los tratamientos son: peces en agua potable (Peces + AP), peces expuestos a 1.0 mg As/L (Peces + As), peces en AP que fueron alimentados con *biofilm* cultivado en AP (Peces + Bio AP) y peces en AP que fueron alimentados con *biofilm* previamente expuesto a 1,0 mg As/L durante el cultivo (Peces + Bio As). Cada tratamiento se realizó por quintuplicado. Los números representan cantidad de placas de *biofilm* o peces por acuario. También se presenta una línea de tiempo con los eventos principales.

Al finalizar los 8 días de exposición, los peces fueron sacrificados, disecados y, sus órganos y tejidos, conservados para las diferentes determinaciones. Tanto el procesamiento de los individuos como las posteriores mediciones de los biomarcadores, se llevaron a cabo según lo descrito en “*Materiales y Métodos Generales*”.

En este ensayo, además de los tejidos y órganos previamente establecidos en peces, se incorporaron los intestinos para la evaluación de biomarcadores. Para ello, luego de ser extraídos, estos fueron abiertos longitudinalmente y enjuagados en una solución tipo Cortland (Kwong y Niyogi, 2012) para eliminar el contenido intestinal. Dicha solución estaba compuesta por NaCl 159,9 mM, KCl 2,55 mM, CaCl₂ 1,56 mM, MgSO₄ 0,93 mM, NaH₂PO₄ 2,97 mM, NaHCO₃ 5 mM y glucosa (C₆H₁₂O₆) 5,55 mM; estos dos últimos componentes fueron añadidos al momento de su uso, y la solución se llevó a pH 7,4. Posteriormente, los intestinos fueron pesados y guardados en freezer a -80°C hasta su análisis.

Por lo tanto, se evaluaron biomarcadores de estrés oxidativo en hígado, branquias e intestino, los cuales fueron: contenido de glutatión reducido (GSH), la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) y la peroxidación lipídica a través de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La actividad de la enzima catalasa (CAT) se determinó en hígado e intestino, ya que en branquias su actividad era demasiado baja para ser cuantificada.

Para evaluar posibles efectos sobre el sistema nervioso, se midió la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en encéfalo y músculo. Además, se analizaron parámetros del metabolismo intermediario en músculo, incluyendo el contenido de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, así como la actividad de la cadena transportadora de electrones (ETS), a partir de los cuales se calculó el índice de asignación de energía celular (CEA).

Finalmente, se determinó la bioacumulación de As tanto en ejemplares completos de peces como en *biofilm*. A partir de estos datos, junto con la concentración de As en el medio de cultivo y la biomasa como peso seco (medida en el *biofilm* presente en las placas), se pudo estudiar, en términos cuantitativos, la transferencia de éste desde el medio acuático hacia el *biofilm* y, luego, al pez.

Además, se analizó la capacidad de bioacumular mediante el factor de bioacumulación (BAF, por sus siglas en inglés), calculado para cada tratamiento como el cociente entre la concentración de arsénico en el pez y la concentración de arsénico disuelto en el agua o presente en la fuente de alimentación (en este caso *biofilm*), según la siguiente fórmula:

$$BAF = \frac{C_{\text{pez}}}{C_{\text{medio de exposición}}}$$

donde:

- C_{pez} es la concentración de arsénico en tejido (expresada en $\mu\text{g As/g}$),
- $C_{\text{medio de exposición}}$ es la concentración de arsénico en el agua o *biofilm* con el que se alimentaron ($\mu\text{g As/g}$).

Un $BAF > 1$ sugiere que el organismo acumula más contaminante del que hay disuelto, lo cual puede ser indicio de una alta afinidad o baja capacidad de eliminación. Mientras que, un $BAF < 1$ sugiere una acumulación limitada, posiblemente por una rápida excreción, baja absorción o detoxificación eficiente.

Resultados

Parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 19 se presentan los parámetros fisicoquímicos medidos durante el ensayo, incluyendo oxígeno disuelto, pH, conductividad y dureza, para todos los tratamientos. Los resultados muestran que todos los parámetros se mantuvieron constantes o sin grandes variaciones a lo largo de todo el periodo de ensayo, indicando que las condiciones ambientales fueron estables y controladas durante las exposiciones experimentales.

Tabla 19. Parámetros fisicoquímicos medidos durante el ensayo. Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media (ESM); entre paréntesis se indica el número de muestras. OD: oxígeno disuelto.

Tratamiento	OD (mg/L)	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Dureza (mg CaCO_3/L)
Peces + AP	$7,97 \pm 0,10$ (5)	$8,04 \pm 0,04$ (5)	942 ± 10 (5)	88 ± 4 (3)
Peces + As (1 mg As/L)	$7,82 \pm 0,15$ (5)	$8,09 \pm 0,05$ (5)	984 ± 10 (5)	83 ± 3 (3)
Peces + Bio (AP)	$7,88 \pm 0,09$ (5)	$7,99 \pm 0,02$ (5)	946 ± 9 (5)	85 ± 2 (3)
Peces + Bio (As)	$7,59 \pm 0,26$ (5)	$7,99 \pm 0,03$ (5)	985 ± 10 (5)	77 ± 2 (3)

Composición del *biofilm*

El análisis de la composición del *biofilm* en los cultivos experimentales (Cultivo AP y Cultivo As) mostró una alta similitud en la estructura de la comunidad bajo ambas condiciones (Figura 41). En ambos casos, las diatomeas fueron el grupo dominante, representando el 66,1 % y 66,5 % del total de organismos observados, seguidas por las clorofitas (8,9 % y 8,4 %) y las cianobacterias (6,9 % y 8,0 %).

Los ciliados y euglenoideos también estuvieron presentes en proporciones similares, con valores de 5,8 % y 5,2 % para los ciliados, y 4,2 % y 5,4 % para los euglenoideos. La principal diferencia entre los cultivos radicó en un mayor desarrollo de los amebozoos en el cultivo con arsénico (3,4 % frente a 0,8 % en AP), mientras que los rotíferos presentaron una menor proporción en esa condición (1,7 % frente a 4,0 % en AP).

Más allá de estas variaciones puntuales, la composición comunitaria general no presentó modificaciones notables como consecuencia de la exposición al metaloide. Esta estabilidad se ve reflejada en el valor del índice de similitud de Sørensen, que fue de 0,857 (85,7 %), indicando que la comunidad microbiana se mantuvo estructuralmente estable a pesar del tratamiento con arsénico.

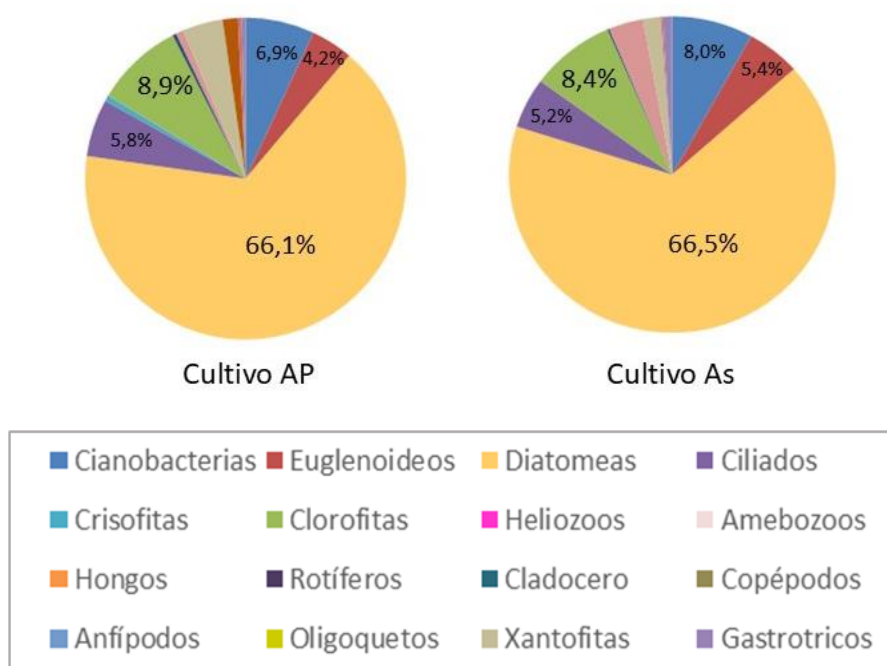


Figura 41. Gráficos de torta que indican la abundancia relativa de los grupos taxonómicos identificados en cada muestra de *biofilm*: cultivo en agua potable sin cloro (Cultivo AP) y cultivo expuesto a arsénico (Cultivo As). En el gráfico se muestran los porcentajes de abundancia relativa de los principales grupos observados.

Biomarcadores

Índices morfométricos

Al finalizar el ensayo de exposición, se determinaron el factor de condición (FC) y el índice hepatosomático (IHS) en los peces, a partir de las medidas morfométricas obtenidas durante el procesamiento de los individuos de cada tratamiento (Figura 42). Ambos parámetros fueron evaluados para identificar posibles alteraciones generales en el estado fisiológico de los peces. Tal como se muestra en la figura, no se observaron diferencias significativas en los valores de FC ni de IHS entre los tratamientos.

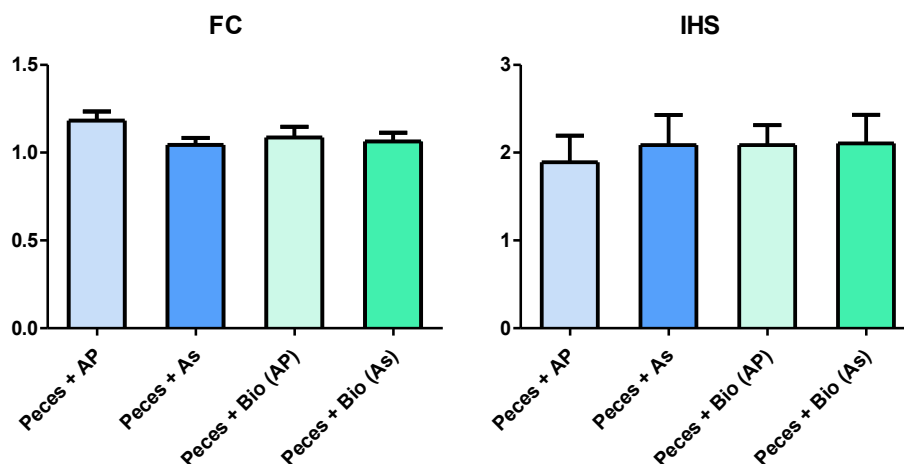


Figura 42. Valores medios del factor de condición (FC) e índice hepatosomático (IHS) calculados para los peces de cada tratamiento, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). No se observan diferencias significativas ($p < 0.05$). Peces + AP: Peces en agua potable; Peces + As: Peces en 1 mg As/L; Peces + Bio (AP): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP; Peces + Bio (As): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

Estrés oxidativo

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a los biomarcadores de estrés oxidativo medidos en hígado, intestino y branquias.

➤ Hígado

Al análisis de los biomarcadores en hígado mostró variados patrones de respuesta entre los tratamientos evaluados (Figura 43). En el contenido de GSH, si bien no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, el grupo Peces + AP mostró valores promedio más elevados que el resto de los tratamientos, que se mantuvieron relativamente similares entre sí. En la actividad de la enzima CAT, los Peces + AP presentaron valores significativamente mayores respecto a los demás tratamientos. En cuanto a la actividad GST, se registraron incrementos significativos en ambos tratamientos con arsénico en comparación con sus respectivos controles, indicando un efecto tanto en la exposición directa como en la alimentaria. Por último, los niveles de TBARS fueron significativamente menores en Peces + As respecto a Peces + AP, mientras que los tratamientos con *biofilm* no mostraron diferencias significativas entre sí ni con los otros grupos, y presentaron valores intermedios.

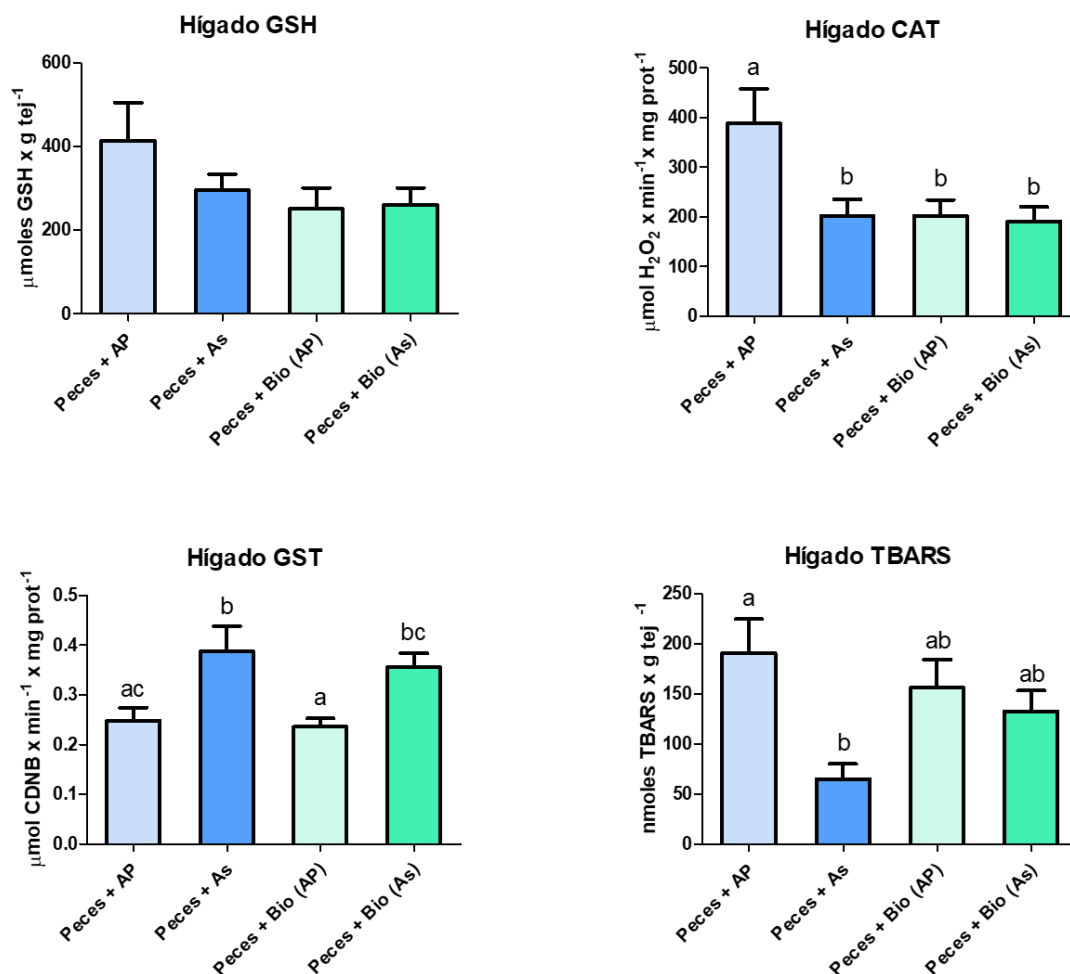


Figura 43. Valores medios de los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) medidos en hígado, para todos los tratamientos, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Peces + AP: Peces en agua potable; Peces + As: Peces en 1 mg As/L; Peces + Bio (AP): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP; Peces + Bio (As): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

➤ Intestino

Los valores de los biomarcadores de estrés oxidativo medidos en intestino se presentan en la Figura 44. Los niveles de GSH no presentaron variaciones significativas entre los tratamientos, manteniéndose en valores similares en todos los grupos. En cuanto a la enzima CAT, se observó una reducción en su actividad en presencia del As, en ambos tipos de exposición, pero ésta resultó significativa solo para los peces alimentados con *biofilm* contaminado con As en comparación con los alimentados con el *biofilm* cultivado en AP. Para GST, se registró un aumento significativo en Peces + As respecto al control, mientras que en los demás tratamientos no hubo diferencias entre sí, ni con otros grupos. Por último, los niveles de TBARS de los peces

expuestos a As a través del *biofilm* mostraron un valor significativamente mayor que todos los demás tratamientos, que se mantuvieron en niveles similares.

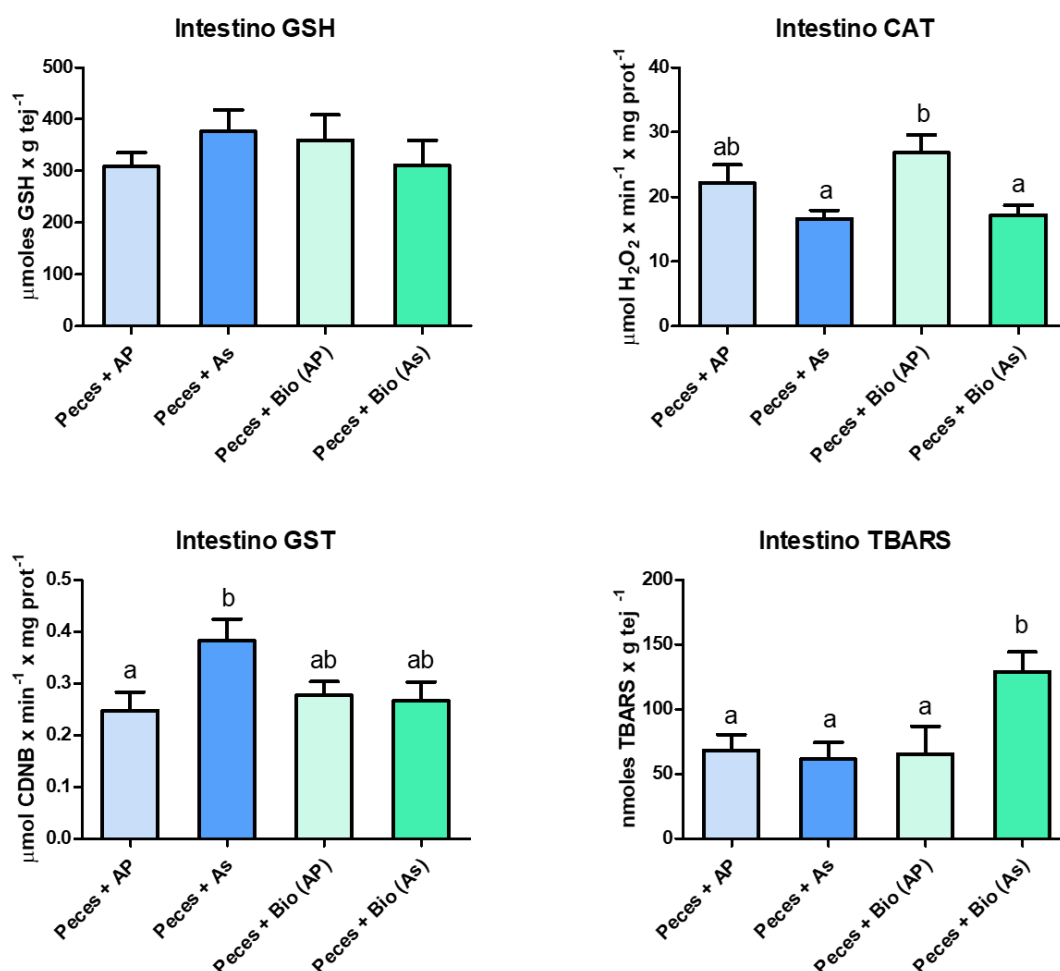


Figura 44. Valores medios de los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) medidos en intestino, para todos los tratamientos, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Peces + AP: Peces en agua potable; Peces + As: Peces en 1 mg As/L; Peces + Bio (AP): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP; Peces + Bio (As): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

➤ *Branquias*

Los resultados obtenidos para los biomarcadores de estrés oxidativo en branquias se muestran en la Figura 45. Tanto para el contenido de GSH, como para la actividad de la GST, no se observaron diferencias entre los tratamientos. Por otro lado, el contenido de TBARS de Peces + As presentó un aumento significativo respecto al control, mientras que los tratamientos con *biofilm* mantuvieron valores intermedios, sin diferencias significativas con el resto de los grupos.

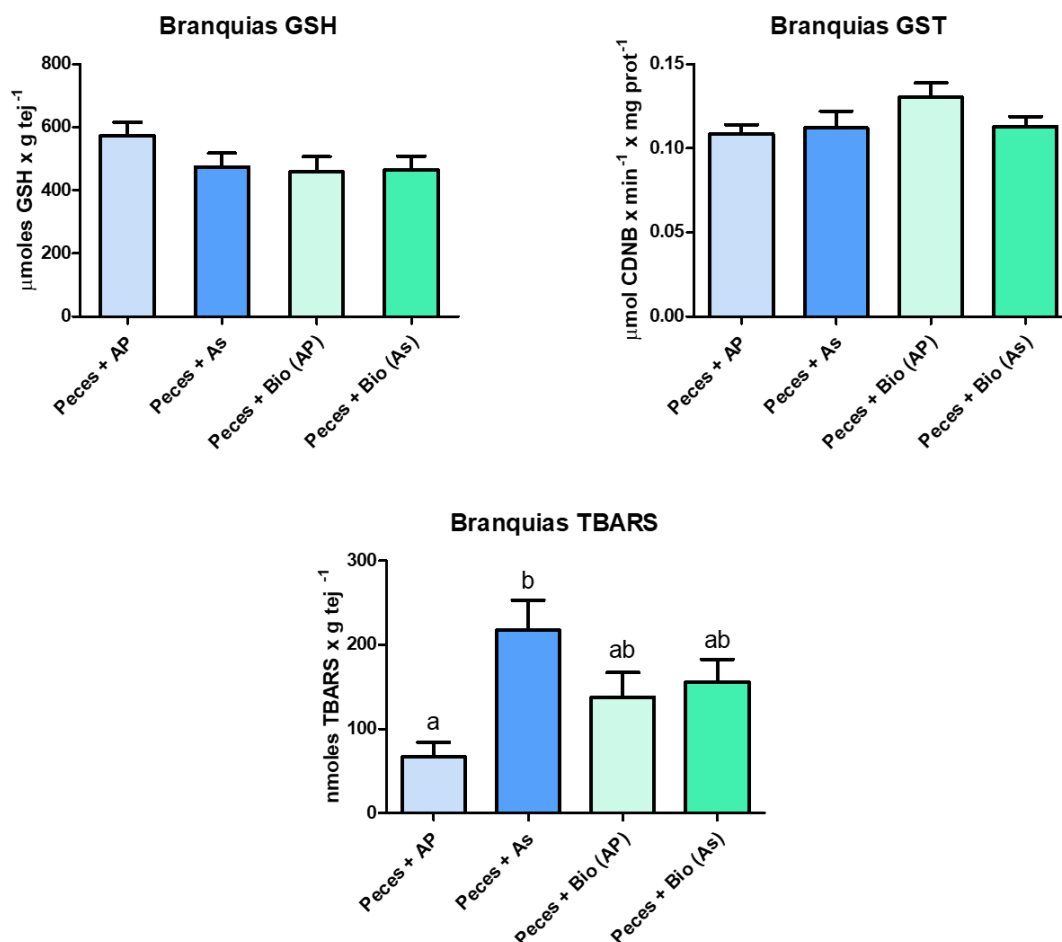


Figura 45. Valores medios de los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo (GSH, GST y TBARS) medidos en branquias, para todos los tratamientos, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Peces + AP: Peces en agua potable; Peces + As: Peces en 1 mg As/L; Peces + Bio (AP): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP; Peces + Bio (As): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

Metabolismo intermediario

En músculo se analizaron biomarcadores relacionados con el metabolismo intermediario (Figura 46), incluyendo el contenido de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, así como la actividad de la cadena transportadora de electrones (ETS). A partir de estos datos se calculó el índice de asignación de energía celular (CEA), como indicador del estado energético global.

En el contenido de hidratos de carbono, se observó una disminución en los tratamientos con As, siendo significativa únicamente en Peces + As respecto al control. En cuanto a lípidos, los peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP presentaron valores significativamente mayores que el resto de los tratamientos. El contenido de proteínas fue significativamente menor en los peces de los tratamientos con arsénico en comparación con sus respectivos

controles. A su vez, los peces alimentados con *biofilm* presentaron valores significativamente mayores que aquellos expuestos a través del agua.

Al evaluar el gasto energético, medido por la actividad del ETS, se registró un aumento significativo en Peces + As respecto al control, siendo además significativamente mayor que en los peces expuestos a través del *biofilm*.

Finalmente, al integrar todos estos datos en el CEA, se observó una disminución en los peces de los tratamientos con As respecto a los de AP, pero esta resultó significativa solo para Peces + As. Además, el CEA de los tratamientos con *biofilm* fue significativamente mayor que en los tratamientos sin él.

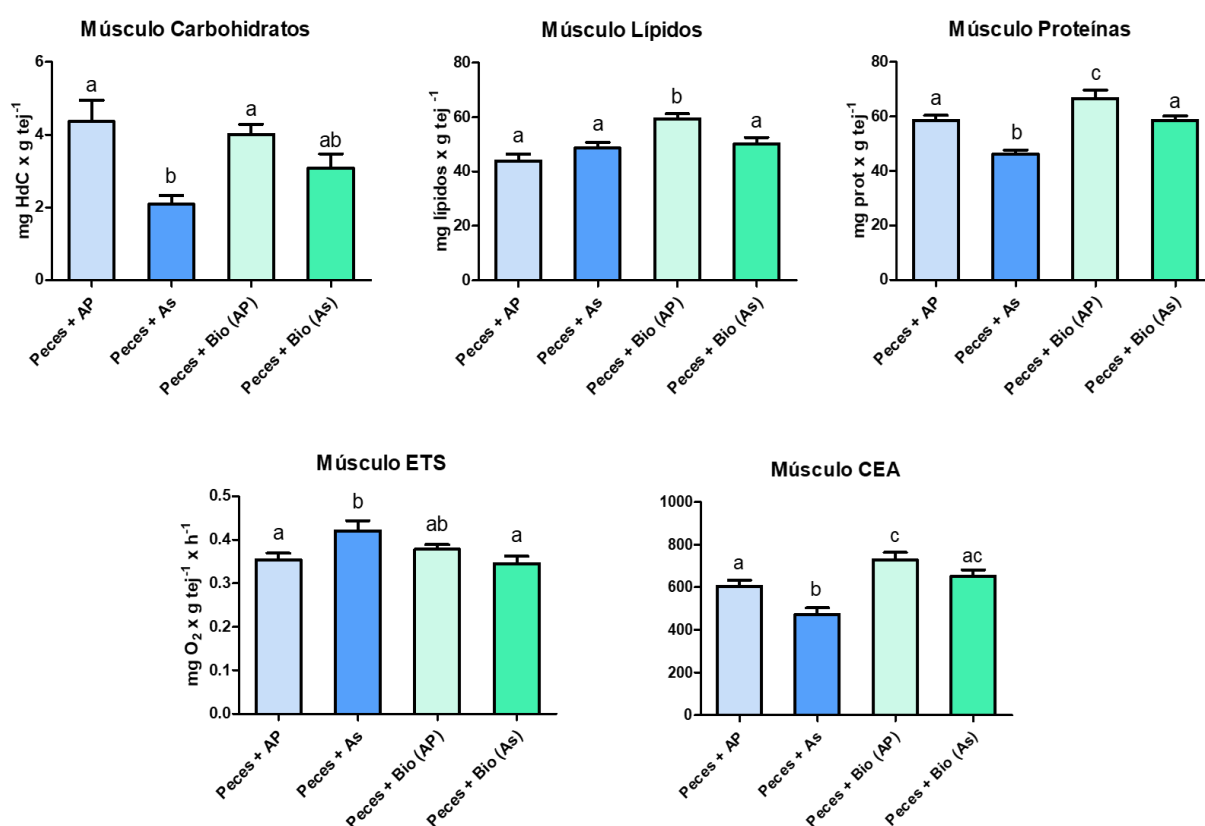


Figura 46. Biomarcadores relacionados con el metabolismo intermediario, medidos en músculo. Se midieron las reservas energéticas (contenido de hidratos de carbono, lípidos y proteínas), el gasto energético (actividad de la ETS) y se calculó el índice de asignación de energía celular (CEA). Se presentan los valores medios para todos los tratamientos, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Peces + AP: Peces en agua potable; Peces + As: Peces en 1 mg As/L; Peces + Bio (AP): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP; Peces + Bio (As): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

Sistema nervioso

En músculo y encéfalo, se evaluó la actividad de acetilcolinesterasa (AChE), como un biomarcador relacionado con la actividad del sistema nervioso (Figura 47). En músculo, la

actividad de AChE fue significativamente menor en peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP, en comparación con los demás tratamientos; mientras que, en encéfalo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

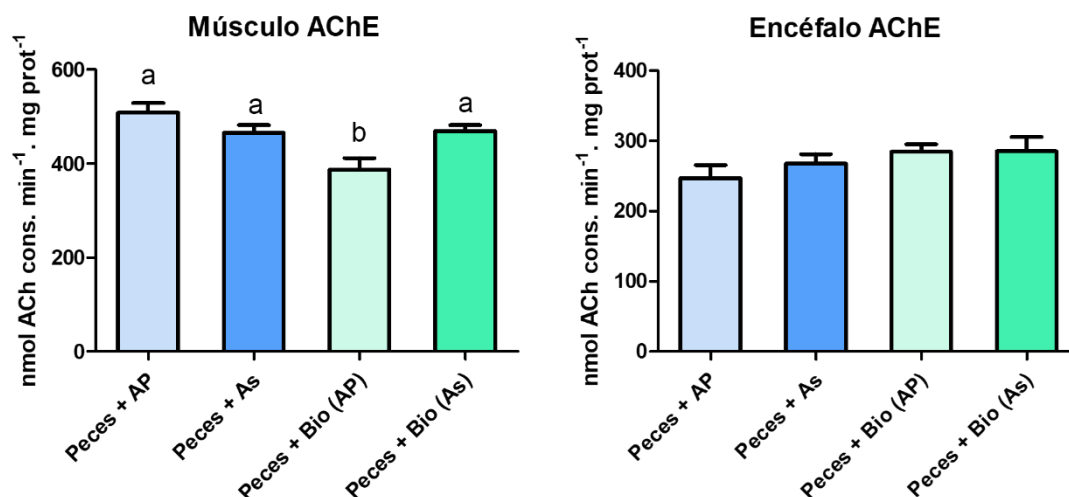


Figura 47. Valores medios de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), medida en músculo y cerebro, para todos los tratamientos, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Peces + AP: Peces en agua potable; Peces + As: Peces en 1 mg As/L; Peces + Bio (AP): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP; Peces + Bio (As): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

🌈 Análisis de componentes principales (PCA)

Para integrar la información de los biomarcadores medidos, se elaboró un análisis de componentes principales (PCA), facilitando la visualización de patrones de respuesta fisiológica entre los distintos tratamientos. Se utilizó una matriz de correlación y se obtuvo que los dos primeros componentes principales explicaron en conjunto el 36,4 % de la varianza total (CP1 = 19,0 %, CP2 = 17,4 %), lo que indica una dispersión moderada de la variabilidad entre tratamientos dentro del espacio bidimensional.

Según los *loadings* o cargas de los coeficientes de correlación (Tabla 20), el CP1 estuvo asociado principalmente a biomarcadores hepáticos de estrés oxidativo, con altas cargas positivas para la actividad de catalasa (0,41), TBARS (0,40) y el contenido de GSH (0,35) en hígado. Esto indica que este eje resume un gradiente de activación antioxidante y daño oxidativo hepático. Por su parte, el CP2 reflejó principalmente variaciones en el metabolismo energético, con altos valores positivos para el CEA (0,45), el contenido de proteínas (0,34) y lípidos (0,34) en músculo, sugiriendo que este eje representa, principalmente, alteraciones en el estado energético muscular.

Tabla 20. “Loadings” de las diferentes variables utilizadas para los componentes principales 1 y 2. GSH = Glutación reducido; GST = Glutación-s-transferasa; TBARS = Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; AChE = acetilcolinesterasa; ETS = Sistema de transporte de electrones; CEA = asignación de energía celular. En rojo se indican las variables con mayor peso.

Variables	Loadings	
	CP 1	CP 2
Hígado GSH	0,350	-0,302
Hígado Catalasa	0,409	-0,207
Hígado GST	-0,146	-0,298
Hígado TBARS	0,399	-0,019
Intestino GSH	0,059	-0,054
Intestino Catalasa	0,064	0,279
Intestino GST	-0,285	-0,169
Intestino TBARS	-0,106	0,017
Branquias GSH	0,274	-0,141
Branquias GST	-0,069	-0,036
Branquias TBARS	-0,119	-0,097
Cerebro AChE	-0,107	0,054
Músculo AChE	0,042	-0,274
Músculo ETS	-0,196	-0,229
Músculo Lípidos	-0,094	0,337
Músculo HdC	0,188	0,153
Músculo Proteínas	0,256	0,344
CEA	0,138	0,450
Factor de condición	0,315	-0,016
Índice hepatosomático	-0,235	0,218

En el espacio definido por los componentes principales, los tratamientos se distribuyeron de forma diferenciada (Figura 48). El grupo de peces mantenidos en agua potable sin *biofilm* (P + AP) se ubicó hacia la región positiva del CP1, mientras que P + As se desplazó hacia la región negativa de ambos componentes separándose del resto de los tratamientos, principalmente de su control, reflejando un perfil caracterizado por menor estado energético y mayor estrés oxidativo producto de la exposición a As en el medio.

Los tratamientos de peces alimentados con *biofilm* se posicionaron de manera intermedia a lo largo del CP1, entre los dos grupos previamente mencionados. Su diferenciación principal se observó en CP2 donde, P + Bio (AP) alcanzó los valores más altos sobre este eje, asociado a un mejor estado energético, mientras que P + Bio (As) se mantuvo en valores intermedios, solapándose más con el resto de los tratamientos.

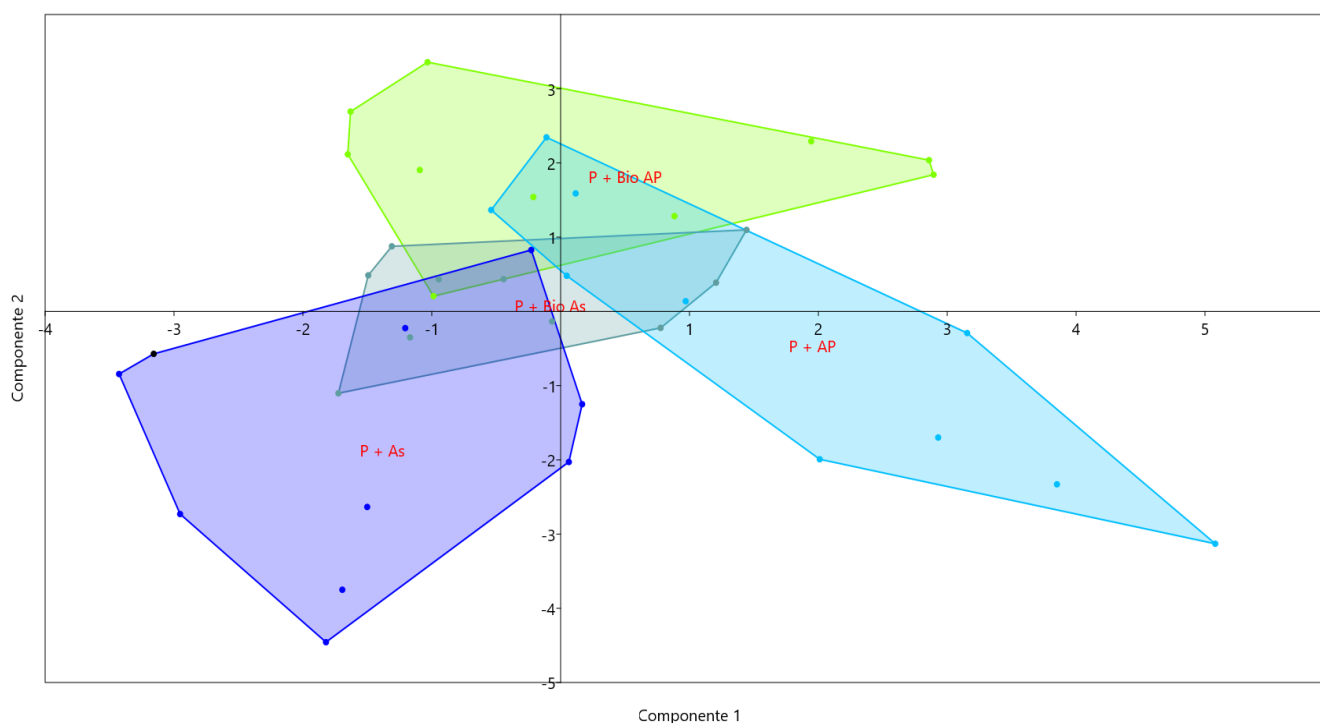


Figura 48. Gráfico generado por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada tratamiento para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a los ejemplares sobre los cuales se hicieron las determinaciones de los biomarcadores y diferentes colores corresponden a diferentes tratamientos: P + AP = peces en agua potable (celeste); P + As = peces en agua con 1.0 mg As/L (azul); P + Bio AP = peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP (verde claro); P + Bio As = peces alimentados con *biofilm* cultivado en As (verde oscuro). Varianza total representada = 36,4%.

Bioacumulación y transferencia de As

Se evaluó la capacidad de captación de As por parte del *biofilm* durante los 7 días en los cuales se expuso el cultivo (Figura 49). Para ello, se tomaron muestras de agua diariamente de los estanques de cultivo expuestos para determinar la concentración de As en el medio. Los resultados mostraron que, al finalizar el período de exposición (7 días), la concentración analítica de As en el agua (que inicialmente era de 1 mg As/L) se redujo aproximadamente a la mitad (0,536 mg As/L). Como se observa en la Figura, la mayor disminución ocurrió en los primeros días. En el *biofilm* cultivado en AP, la concentración analítica de As promedio fue de 0,028 mg As/L.

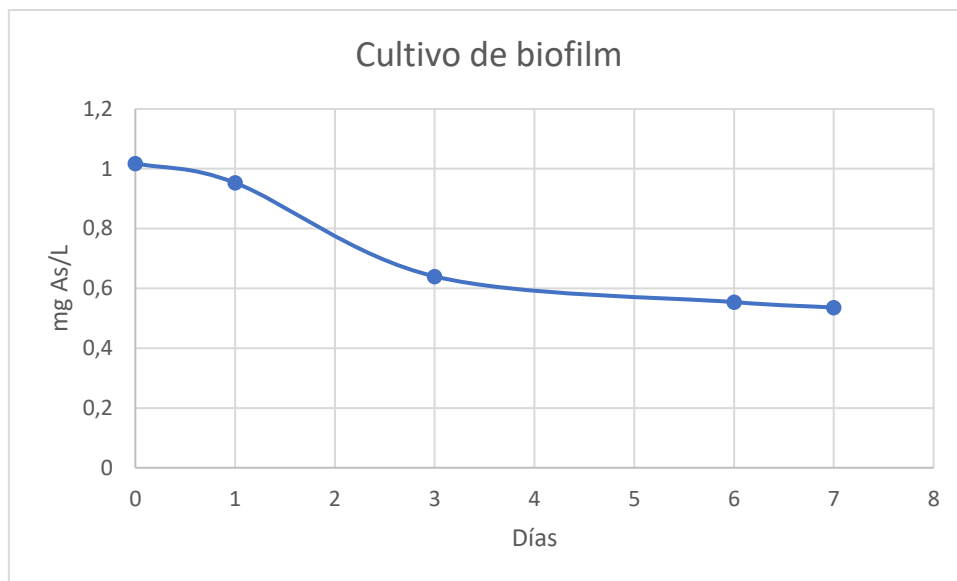


Figura 49. Valores de concentración de As en los estanques de cultivo de *biofilm*, medidos durante el tiempo de exposición.

También se determinó la bioacumulación de As en ambos cultivos de *biofilm*, junto con la biomasa en cada placa (Tabla 21). A partir de estos datos, se estimó la cantidad total de As presente en cada placa que fue suministrada a los peces. Además, para evaluar la transferencia del As desde el medio al *biofilm*, se calculó el Factor de Bioacumulación (BAF) como la relación entre la concentración de As en el *biofilm* y la concentración de As en el agua. Los resultados mostraron que el *biofilm* tiene una alta capacidad de retención de As, con un BAF mayor a 1. En el cultivo AP, el filtro no retuvo completamente el As, y se observó que el *biofilm* acumuló As en una proporción 501,8 veces mayor que la concentración en el agua, mientras que en Cultivo As el BAF fue de 51,2.

Tabla 21. Concentración de arsénico en el medio y en el *biofilm* cultivado en agua potable (Cultivo AP) y en 1 mg As/L (Cultivo As). Se presenta la biomasa promedio del *biofilm* por placa, la cantidad total de As acumulado por placa y el Factor de Bioacumulación (BAF) del *biofilm*, calculado como la relación entre la concentración de As en el *biofilm* y la concentración en el agua. Bio + AP: *biofilm* cultivado en AP; Peces + As: *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

Tratamiento	Bio + AP	Bio + As
As en el medio ($\mu\text{g As/L}$)	28	1018
As en el medio ($\mu\text{g As/g}$)	0,028	1,020
As en <i>biofilm</i> ($\mu\text{g As/g peso seco}$)	14,05 $\pm$ 5,06	52,18 $\pm$ 1,80
Peso seco <i>biofilm</i> /placa (g)	0,068 $\pm$ 0,027	0,052 $\pm$ 0,016
As por placa ($\mu\text{g As/placa}$)	0,95	2,73
BAF	501,8	51,2

Finalmente, se analizó la bioacumulación de As en los peces bajo las diferentes condiciones experimentales (Tabla 22). Los peces expuestos a As en el agua (Peces + As) presentaron una mayor concentración de As en comparación a aquellos mantenidos únicamente en agua potable (Peces + AP). Al analizar los BAF, ambos tratamientos presentaron valores superiores a 1, lo que indica una alta capacidad de incorporación del metaloide desde el medio acuoso hacia el organismo. Por otro lado, los peces alimentados con *biofilm* expuesto a As (Peces + Bio As) también presentaron concentraciones de As mayores que aquellos alimentados con *biofilm* cultivado en AP (Peces + Bio AP). Sin embargo, el cálculo del BAF mostró valores menores a 1 en ambos tratamientos, lo que indica que los peces bioacumulan una menor proporción del As si es ingerido, en comparación con la cantidad presente en el *biofilm* consumido. Esto quiere decir que, a pesar de que por ambas vías de ingreso el As se bioacumula, la vía oral posee una eficiencia de asimilación del As mucho menor que la exposición directa en el medio.

Tabla 22. Concentración de arsénico en los peces expuestos. Se presenta la concentración de As en el medio o en el *biofilm* ingerido, la bioacumulación en los tejidos de los peces y el Factor de Bioacumulación (BAF), calculado como la relación entre la concentración de As en los peces y la concentración de As en el *biofilm* consumido. Peces + AP: Peces en agua potable; Peces + As: Peces en 1 mg As/L; Peces + Bio (AP): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en AP; Peces + Bio (As): Peces alimentados con *biofilm* cultivado en 1 mg As/L.

Tratamiento	Peces + AP	Peces + As	Peces + Bio AP	Peces + Bio As
As en el medio ($\mu\text{g As/L}$)	3	792	16	17
As en el medio/ <i>biofilm</i> ($\mu\text{g As/g}$)	0,003	0,794	14,050	52,180
As en peces ($\mu\text{g As/g peso seco}$)	$2,76 \pm 0,09$	$4,62 \pm 0,20$	$3,17 \pm 0,08$	$4,72 \pm 0,23$
BAF	917,95	5,78	0,23	0,09

Discusión y conclusiones

El presente estudio permitió evaluar la interacción entre *Cnesterodon decemmaculatus* y el *biofilm* como fuente potencial de exposición dietaria a As, analizando su impacto en diferentes biomarcadores fisiológicos y metabólicos en los peces, así como la transferencia y bioacumulación del metaloide.

En primer lugar, al evaluar la composición del *biofilm*, se observó que la exposición al arsénico en el medio del cultivo no generó modificaciones relevantes en su estructura comunitaria, lo que indica que ésta se mantuvo estable a pesar de la presencia del contaminante. Esto aseguró que los efectos observados en los peces expuestos fueran atribuibles a la presencia de As y no a diferencias en la composición del *biofilm* consumido.

El análisis de los biomarcadores de estrés oxidativo evidenció respuestas diferenciales según la vía de exposición al arsénico y en algunos casos también dependiendo del tejido analizado. La actividad de la enzima GST en intestino aumentó significativamente en los peces expuestos a As en el medio, mientras que, en el hígado, también en aquellos que consumieron *biofilm* contaminado, lo que sugiere una activación generalizada de los mecanismos de detoxificación frente a la presencia del metaloide. Este patrón puede explicarse por el rol directo de la GST sobre los xenobióticos, ya que esta enzima actúa facilitando su conjugación con glutatión para permitir su eliminación, independientemente del mecanismo de defensa antioxidante (Di Giulio y Hinton, 2008). Otros biomarcadores hepáticos evidenciaron diferencias notorias entre las dos rutas de exposición. En los peces expuestos al As en el agua, se observó una disminución significativa en los niveles de TBARS y en la actividad de la CAT, un patrón que coincide con lo reportado en el capítulo anterior y que ha sido asociado a procesos de adaptación fisiológica bajo exposición subcrónica. Sin embargo, los peces alimentados con *biofilm* contaminado no presentaron cambios en estos dos parámetros, indicando que el estrés oxidativo inducido por esta vía fue menor o de características distintas. Esta divergencia entre las respuestas podría deberse a diferencias en la forma de incorporación, biodisponibilidad o velocidad de absorción del As. En intestino de los peces expuestos a As a través de la dieta, la actividad catalasa también disminuyó, pero los niveles de TBARS aumentaron, sugiriendo una inhibición enzimática causada por un exceso de ROS o por un agotamiento de las defensas antioxidantes frente a un estrés oxidativo prolongado (Lushchak *et al.*, 2009a, b).

Estudios previos han documentado que la exposición prolongada al arsénico por vía dietaria puede activar respuestas antioxidantes sin necesariamente desencadenar un daño oxidativo significativo. Por ejemplo, Cui *et al.* (2020) observaron que durante la exposición

crónica dietaria al arsénico, los niveles de GSH, CAT y SOD aumentaban inicialmente (días 5 y 15) y luego tendían a estabilizarse o disminuir, en paralelo con un aumento en la biotransformación hepática hacia especies menos tóxicas como la arsenobetaína. Asimismo, Fontagné-Dicharry *et al.* (2018) y Iheanacho y Odo (2020) destacaron que la naturaleza del contaminante ingerido y el tiempo de exposición pueden influir en el perfil de respuesta antioxidante, provocando desde activación defensiva sostenida hasta desregulación enzimática y daño hepático, dependiendo de la intensidad y persistencia del estrés. En este contexto, la vía dietaria parecería inducir un estrés más atenuado, posiblemente por una liberación más lenta del tóxico o por mecanismos digestivos y metabólicos que modulan su efecto.

El incremento en los niveles de TBARS en intestino sugiere que el daño oxidativo generado por el arsénico en este órgano no fue completamente neutralizado. Una respuesta similar se obtuvo en las branquias donde el aumento significativo de TBARS se dio frente a la exposición a As en el medio acuoso y no vía alimentaria. Esto refuerza la idea de que órganos como el intestino y las branquias actúan como una barrera inicial de absorción, pero el metabolismo y detoxificación del As ocurren principalmente a nivel hepático (Moussa *et al.* 2022). En cuanto al contenido de GSH no fue un biomarcador sensible que se haya modificado en ningún tratamiento.

Los biomarcadores del metabolismo energético también evidenciaron efectos diferenciales según la vía de exposición al arsénico y la presencia de *biofilm* como recurso trófico. En los peces expuestos directamente al arsénico en el agua, se registró una disminución significativa en el contenido de hidratos de carbono y proteínas, junto con un aumento del gasto metabólico (ETS) y una reducción en el índice CEA, lo que sugiere una alta demanda energética posiblemente asociada a procesos de detoxificación y reparación celular. En cambio, los peces alimentados con *biofilm* presentaron un perfil energético más favorable. En particular, los tratamientos con *biofilm* mostraron niveles significativamente mayores de proteínas, lípidos y CEA que los grupos sin él, independientemente de la presencia del As, lo que indica un efecto positivo de este recurso alimentario sobre el estado energético. Sin embargo, el contenido de lípidos y proteínas tuvo una disminución significativa en peces que se alimentaron con *biofilm* contaminado con As respecto a los que consumieron el cultivado en AP. Esto sugiere que la exposición dietaria también compromete las reservas energéticas, aunque de forma menos severa que la vía acuática. Estos patrones son consistentes con lo reportado por Zheng *et al.* (2015), quienes observaron que la exposición a metales en el agua generó una reducción del contenido lipídico muscular en peces, mientras que la exposición por vía alimentaria resultó menos perjudicial. Erickson *et al.* (2019) también destacaron que la toxicidad del As difiere según

la vía de ingreso, siendo más marcada por vía acuática, posiblemente por la absorción directa a través de branquias, en contraposición a la absorción intestinal más gradual en la vía dietaria. A su vez, Kumari *et al.* (2016) señalaron que el As interfiere con el metabolismo de lípidos y carbohidratos en peces, y que su biotransformación hepática puede modular su toxicidad. En conjunto, estos antecedentes respaldan que tanto la intensidad como el tipo de alteración en el metabolismo energético dependen de la vía de ingreso del As, y que la incorporación del *biofilm* como fuente trófica puede atenuar los efectos fisiológicos adversos, al menos parcialmente.

Mediante el análisis multivariado (PCA) se pudieron visualizar de forma integrada las diferencias entre tratamientos y visualizar posibles patrones. Los peces expuestos al As en el agua se agruparon claramente en una región del espacio multivariado asociada con mayor estrés oxidativo y deterioro energético, mientras que los tratamientos con *biofilm* se posicionaron de forma intermedia, siendo el grupo alimentado con *biofilm* no contaminado (P + Bio AP) el que mostró un perfil energético más favorable. Este patrón da cuenta no solo del impacto diferencial de las vías de exposición, sino también de un posible efecto nutritivo del *biofilm* en ausencia de contaminantes.

Finalmente, la evaluación de la bioacumulación de As evidenció que el *biofilm* tiene una alta capacidad de captación del metaloide desde el agua, lo que resalta su función como reservorio concentrador de contaminantes. Cabe considerar, que previamente a este estudio se realizó una prueba de decaimiento de As solo, para determinar el tiempo de renovación de los medios en los bioensayos, y no se observó decaimiento de los niveles del tóxico en los 7 días evaluados. Este patrón concuerda con lo propuesto por Griboff *et al.* (2018), quienes observaron que los organismos ubicados en los niveles tróficos más bajos, como el fitoplancton, tienden a acumular mayores concentraciones de metales y metaloides, actuando como puntos de entrada clave en la transferencia trófica de estos contaminantes. En cuanto a los peces, aquellos que consumieron *biofilm* contaminado bioacumularon As, aunque en proporciones menores a la concentración presente en el *biofilm* ingerido, lo que se reflejó en valores de BAF inferiores a 1. Por el contrario, los peces expuestos al As en el agua presentaron valores de BAF superiores a 1, indicando una mayor eficiencia relativa de incorporación por esta vía.

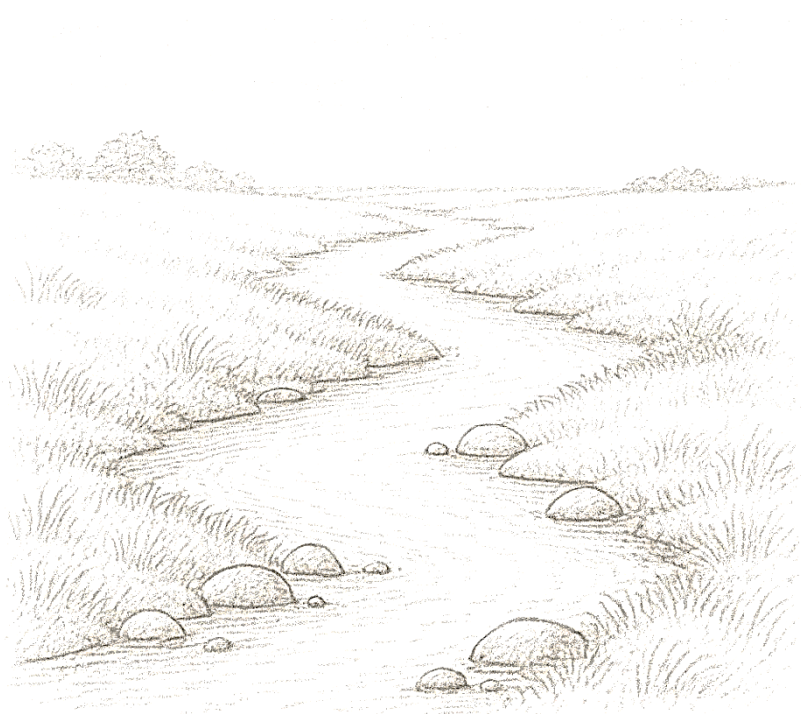
Esta diferencia podría estar vinculada a la existencia de mecanismos fisiológicos que regulan la absorción y retención del As ingerido, como su biotransformación hepática hacia especies menos tóxicas. Estudios como los de Ciardullo *et al.* (2008), Pei *et al.* (2019) y Juncos *et al.* (2019) han reportado que el As incorporado por vía alimentaria puede ser rápidamente transformado en el hígado en especies menos reactivas, como la arsenobetaína, facilitando su excreción y reduciendo su acumulación sistémica. En esta línea, Zhang *et al.* (2022) destacan

que, además de la biotransformación a especies como DMA y AsB, la vía dietaria suele tener una menor eficiencia de asimilación comparada con la absorción directa desde el agua, la cual tiende a ser más rápida y menos controlada, especialmente a través de las branquias. Asimismo, estos autores remarcan que el arsénico no se biomagnifica en redes tróficas acuáticas, sino que tiende a diluirse en los niveles tróficos superiores, lo que refuerza la importancia de considerar tanto la vía de exposición como la especiación química al interpretar los patrones de bioacumulación observados.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia del *biofilm* como vector de transferencia de As en los ecosistemas acuáticos y la relevancia de la vía alimentaria en la exposición al metaloide en peces. Si bien la bioacumulación a través de la dieta es menor que la exposición directa en el agua, su impacto sobre los organismos debe considerarse en estudios ecotoxicológicos y de riesgo ambiental, especialmente en sistemas donde el *biofilm* puede representar una fuente de arsénico disponible para la biota. Además, este capítulo aporta evidencia experimental sobre las respuestas fisiológicas de *Cnesterodon decemmaculatus* frente a distintas vías de exposición del contaminante, contribuyendo a la comprensión de los procesos de transferencia, acumulación y efecto del arsénico en sistemas acuáticos, evidenciando las relaciones complejas entre sistemas biológicos, que involucran la especiación del As, la toxicocinética y la toxicodinámica, por lo cual son necesarios estudios adicionales.

Capítulo 3:

Evaluación de *biofilm* natural
en cuencas fluviales
pampeanas con diferentes
grados de contaminación



Introducción

El crecimiento poblacional, la expansión agrícola y la intensificación de actividades industriales han generado un impacto significativo en la calidad de los cuerpos de agua dulce de América Latina (Salibián, 2006). Los contaminantes poseen una amplia gama de propiedades químicas y físicas que influyen fuertemente tanto en su destino en el medio ambiente como en sus efectos sobre los sistemas biológicos, lo cual afecta tanto la salud humana como la de los ecosistemas (Walker *et al.*, 2014; Salibián, 2014; Amé *et al.*, 2019). En países como Argentina, esta problemática se refleja en el deterioro de los principales ríos y cuencas hidrográficas, muchos de los cuales están sometidos a presiones antropogénicas que incluyen la descarga de efluentes industriales, el uso de agroquímicos y la expansión urbana sin infraestructura adecuada para el tratamiento de aguas residuales (Cirelli y Ojeda, 2008).

Los ríos urbanos figuran entre los ecosistemas más degradados porque son impactados por varias fuentes de contaminación tanto puntuales como difusas originadas por aportes naturales o xenobióticos. Aunque la descarga de aguas residuales crudas o parcialmente tratadas en un río constituye, con mucho, la forma más común de contaminación, procesos como la escorrentía o la filtración en los suelos resultan en un aporte continuo de sustancias al cuerpo de agua (Salibián, 2006; Walker *et al.*, 2014). En especial, los que atraviesan la región pampeana, como los de las cuencas del Luján y del Reconquista, son ejemplos emblemáticos de esta situación. Estos sistemas fluviales no solo son esenciales para el suministro de agua y la biodiversidad, sino que también cumplen roles clave en actividades económicas como la agricultura, la ganadería y la industria. Sin embargo, el manejo inadecuado de estos recursos ha resultado en una disminución de su calidad y en el deterioro de las comunidades biológicas asociadas (López *et al.*, 2013; Kuczynski, 2016; Basílico *et al.*, 2022).

Cuenca del río Luján

La cuenca del río Luján (Figura 50) se localiza al noreste de la provincia de Buenos Aires, cubriendo una superficie de aproximadamente 3.760 km², sobre la que se halla una población total de 2.938.458 habitantes (INDEC, 2022). Posee una longitud aproximada de 128 km hasta su desembocadura en el Río Paraná a través del Canal Santa María; y tiene su origen en la confluencia entre los arroyos El Durazno y Los Leones, en Suipacha. Su cuenca abarca varios partidos, incluyendo Campana, Chacabuco, Escobar, Exaltación de La Cruz, General Rodríguez, José C. Paz, Luján, Malvinas Argentinas, Mercedes, Moreno, Pilar, San Andrés de Giles, San Fernando, Suipacha y Tigre (Silva Busso, 2010; Graziano *et al.*, 2020).

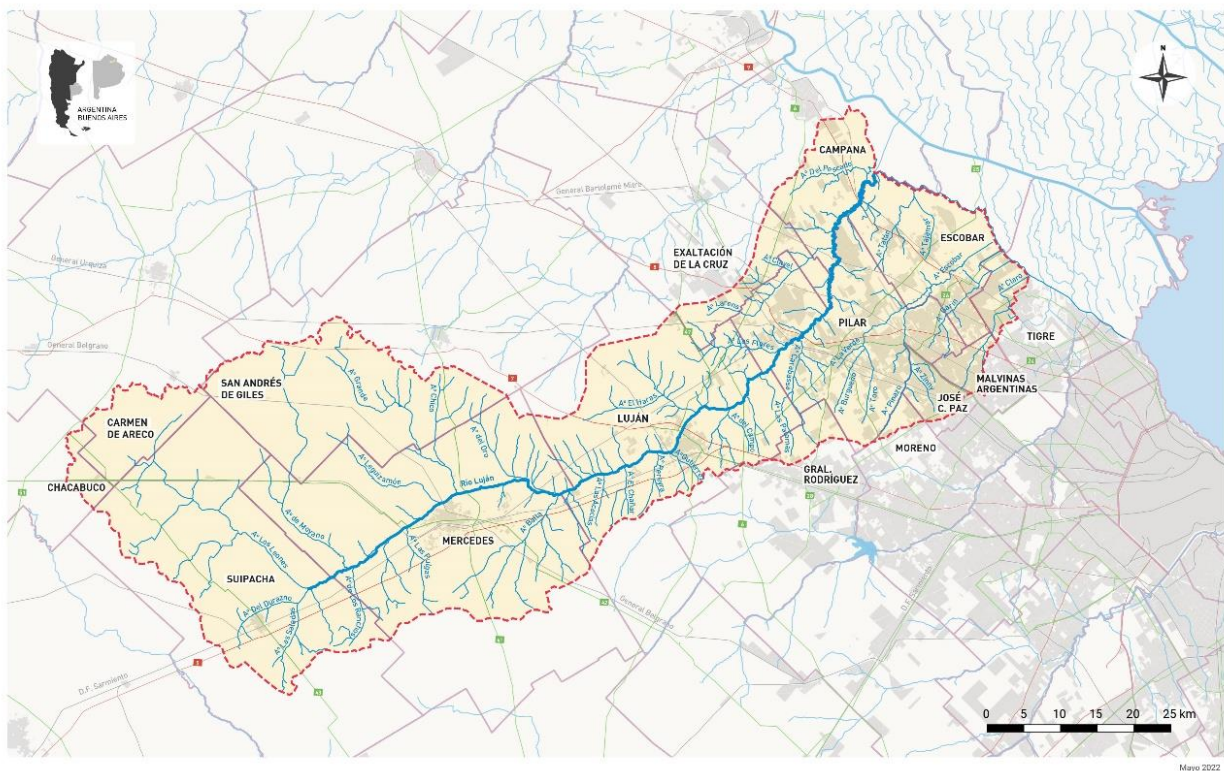


Figura 50. Cuenca del Río Luján, los municipios que la conforman y los cursos de agua permanentes y temporarios. (Fuente: gba.gob.ar/comilu)

El río Luján es un típico río de llanura ondulada, con varios meandros y una suave pendiente. Es un importante afluente del Río de la Plata y está ubicado en la pampa ondulada, formando valles de distintos tipos en su recorrido.

Esta cuenca ha experimentado una expansión urbana y agrícola, lo que ha incrementado la carga de efluentes domésticos y agroquímicos en sus aguas. La cuenca alta se encuentra en una zona predominantemente rural (con una amplia explotación agrícola-ganadera) con urbanizaciones de escala intermedia, mientras que la cuenca media-baja presenta mayor grado de urbanización, con una combinación de actividades residenciales, comerciales e industriales, especialmente en las inmediaciones del Gran Buenos Aires. En última instancia, todas estas actividades conducen a la escorrentía hacia el curso principal de agua, lo que resalta la importancia del monitoreo de este entorno (Castañé *et al.*, 2015; González Núñez *et al.*, 2024).

Cuenca del río Reconquista

El río Reconquista se cita a menudo en Argentina como un ejemplo típico de la influencia contaminante de la actividad humana en el ambiente (Salibián, 2006; Ossana *et al.*, 2013; Rigacci

et al., 2013). Ubicado en la provincia de Buenos Aires, drena una cuenca de 1670 km² y recibe las contribuciones de 82 pequeños arroyos. Es el resultado de la confluencia de los arroyos La Choya, Durazno y La Horqueta (34 "41 'S -59" 24' 0) y se extiende desde SO hasta NE en aproximadamente 85 km (Salibián, 2006) (Figura 51). Esta cuenca atraviesa 18 partidos del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), sobre la que se hallan más de 5.200.000 habitantes (INDEC, 2022).

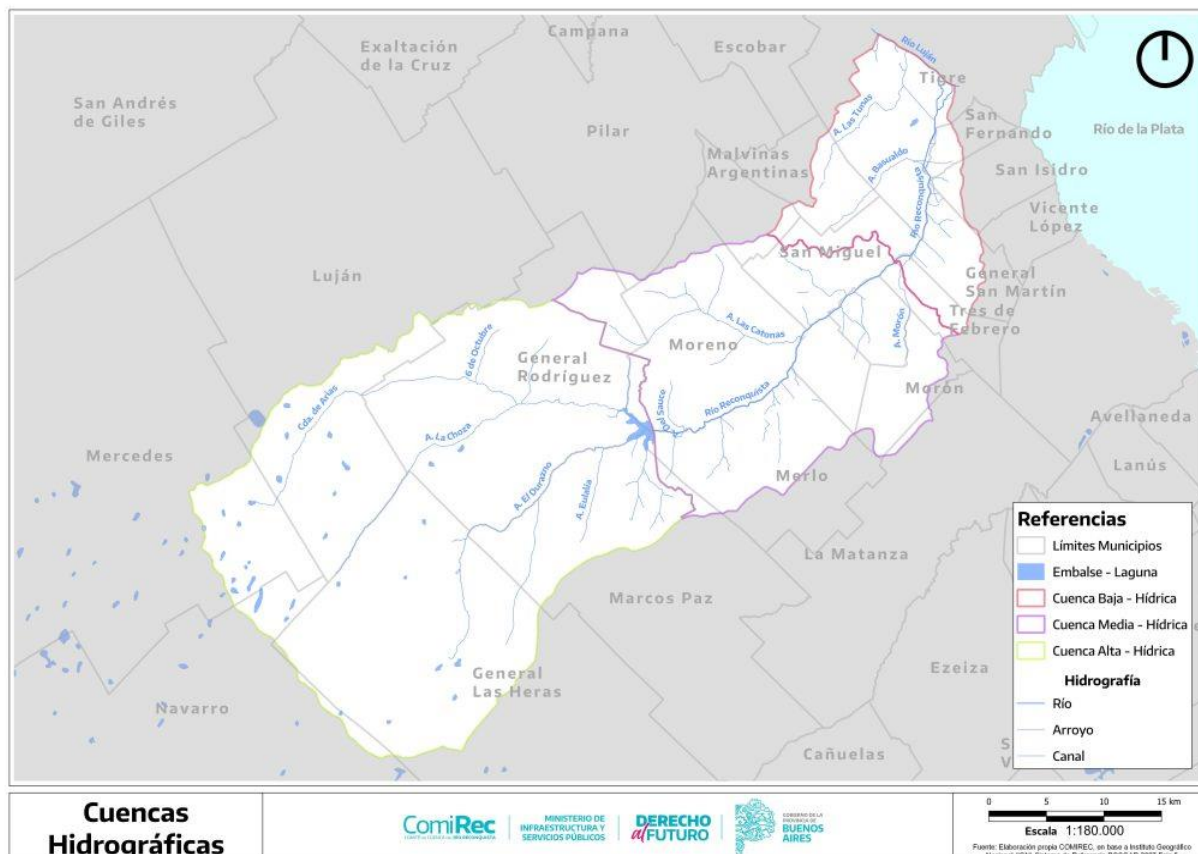


Figura 51. Cuenca del Río Reconquista, los municipios que conforman los Comité de Cuenca Alta, Media y Baja y los cursos de agua permanentes y temporarios. (Fuente: gba.gob.ar)

En su nacimiento, el Reconquista presenta un buen estado ecológico que permite el desarrollo de la vida acuática, aunque esta condición no se debe a la ausencia del ingreso de contaminantes en la cuenca alta, sino al proceso de autodepuración que ocurre en el lago San Francisco formado por la represa Roggero (Rigacci, 2019). Sin embargo, pocos kilómetros aguas abajo del inicio del río, se observa un deterioro de la calidad del agua, el cual es sólo el inicio de un deterioro progresivo de la calidad ecológica del río hasta llegar a su desembocadura en el río Luján (De la Torre, 2000; Salibián 2006; Baudou, 2019). El curso principal y sus afluentes reciben agua de múltiples orígenes, como vertederos agrícolas, domésticos e industriales, que transportan una gran y diversa carga de microorganismos y sustancias contaminantes. Estos incluyen fármacos (Mastrangelo *et al.*, 2022), coliformes fecales (López *et al.*, 2013), metales pesados (Ossana *et al.*, 2013) y plaguicidas (Bianco *et al.*, 2023), entre otros. La magnitud y

diversidad de estos compuestos excede, en la mayoría de los casos, la capacidad de autodepuración del río (Ossana, 2011), generando una situación crítica. Como resultado, el agua del río se convierte en una mezcla extremadamente compleja de productos químicos que, después de alteraciones e interacciones físicas, químicas y biológicas, tanto sinérgicas como antagónicas, pueden convertirse en un factor de alto riesgo toxicológico y ecotoxicológico (Salibián, 2006; Ossana *et al.*, 2016; Baudou *et al.*, 2019). Con el paso del tiempo, la situación se ha agravado debido a la persistencia de descargas domiciliarias e industriales con escaso o nulo tratamiento, lo que ha contribuido al progresivo deterioro de la calidad del agua y de la biota presente (Palacio, 2020; Trípoli, 2024). En la actualidad, este río es considerado uno de los cuerpos de agua dulce en condiciones más críticas del país, tanto por la diversidad y cantidad de residuos vertidos como por el potencial impacto que sus descargas pueden tener sobre el Río de la Plata, un estuario binacional que abastece de agua potable a la ciudad de Buenos Aires y a amplios sectores del conurbano bonaerense.

En este contexto, las comunidades naturales de *biofilm* emergen como componentes esenciales de los ecosistemas acuáticos debido a su capacidad de adaptarse y responder a las condiciones ambientales en las que se desarrollan (Fleming *et al.*, 2023). Estas comunidades no solo reflejan los gradientes de contaminación y las presiones específicas de cada cuenca, sino que también desempeñan un papel activo en la modulación de la calidad del agua mediante procesos de adsorción, bioacumulación y transformación de contaminantes.

Estudiar cómo se estructuran y funcionan, a nivel fisiológico, las comunidades de *biofilm* de las cuencas de los ríos Luján y Reconquista, contribuye al entendimiento de sus adaptaciones ecológicas y ofrece información clave para la gestión de recursos hídricos y el diseño de estrategias de conservación. Este capítulo se propone aportar conocimientos sobre la importancia y utilidad del *biofilm* como indicador de contaminación en ambientes sometidos a distintos grados de presión antropogénica.

Objetivos específicos

- Evaluar el estado físico-químico de sitios pertenecientes a las cuencas del río Luján y Reconquista, con disímil grado de contaminación.
- Determinar la composición de las comunidades de *biofilm*, presentes en los sitios.
- Evaluar biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo y la actividad enzimática extracelular en esos *biofilms*.
- Integrar las respuestas de los biomarcadores y del estado fisicoquímico de cada sitio mediante análisis multivariados.
- Evaluar la capacidad de las comunidades de *biofilm* como bioindicadores de calidad del agua en ríos urbanos.

Materiales y Métodos

Sitios de muestreo

Para la realización de este estudio, durante la primavera del año 2024, se recolectaron muestras de *biofilm* en distintos sitios pertenecientes a dos cuencas hidrográficas de la provincia de Buenos Aires: los ríos Luján y Reconquista. Se realizó una toma de muestras en cada sitio. Los sitios de muestreo fueron seleccionados considerando su localización dentro de cada cuenca y el grado de contaminación al que se encuentran expuestos, incluyendo tanto áreas con bajo impacto antrópico como otras fuertemente influenciadas por actividades urbanas, industriales y agrícolas. Además, al análisis se agregó *biofilm* de los estakes de cultivo *outdoor* de peces, de la Universidad Nacional de Luján. En la Figura 52 (en color rojo) se presentan los sitios de muestreo georreferenciados para ambos sistemas fluviales.



Figura 52. Mapa de las cuencas de los ríos Luján (área verde) y Reconquista (área amarilla). Se indican los municipios que conforman las cuencas y los cursos de agua permanentes y temporarios. Los puntos negros con leyenda roja indican los sitios de muestreo de *biofilm*: UNLu = Universidad Nacional de Luján; Nav = arroyo Naveira; L1 = M.J.García; L2 = Las Tropas; L3 = Ruta 6; R1 = represa Roggero; R2 = puente

Cuenca del río Luján

➤ *M. J. García (L1):*

(-34.702089; -59.548930). Este sitio pertenece a la cuenca alta, donde la ribera suele estar cubierta por vegetación típica de los ríos pampeanos como pastizales altos y juncos. El uso de suelo de la zona es para fines agrícolas o ganaderos, principalmente. Aguas arriba se encuentra la localidad de Suipacha y la industria láctea “La Suipachense”.



Figura 53. Sitio L1, ubicado en el puente M.J.García.

➤ *Las Tropas (L2):*

(-34.565555, -59.123590). Este sitio pertenece a la cuenca media y se encuentra en la ciudad de Luján, una zona urbanizada, lo que influye significativamente en las características del río. Las riberas, parcialmente modificadas por la infraestructura y el impacto humano, presentan vegetación discontinua, con sectores erosionados y acumulación de residuos sólidos. El agua del río en este punto muestra signos de contaminación por la descarga de efluentes domiciliarios clandestinos y desechos urbanos, que afectan su calidad y generan olores desagradables en épocas de bajo caudal.



Figura 54. Sitio L2, ubicado en la ciudad de Luján.

➤ *Ruta 6 (L3):*

(-34.520826, -59.037780). El sitio está ubicado en la confluencia del río Luján con la Ruta Nacional 6, cerca de varias plantas industriales, aguas abajo de la ciudad de Luján. Es una zona donde convergen actividades industriales y urbanas, lo que afecta las condiciones ambientales del río. Las riberas muestran alteraciones asociadas al impacto humano, debido a obras de adecuación del cauce que se están llevando a cabo en el sitio, por ComiLu, por lo que la vegetación es limitada y presenta áreas erosionadas.

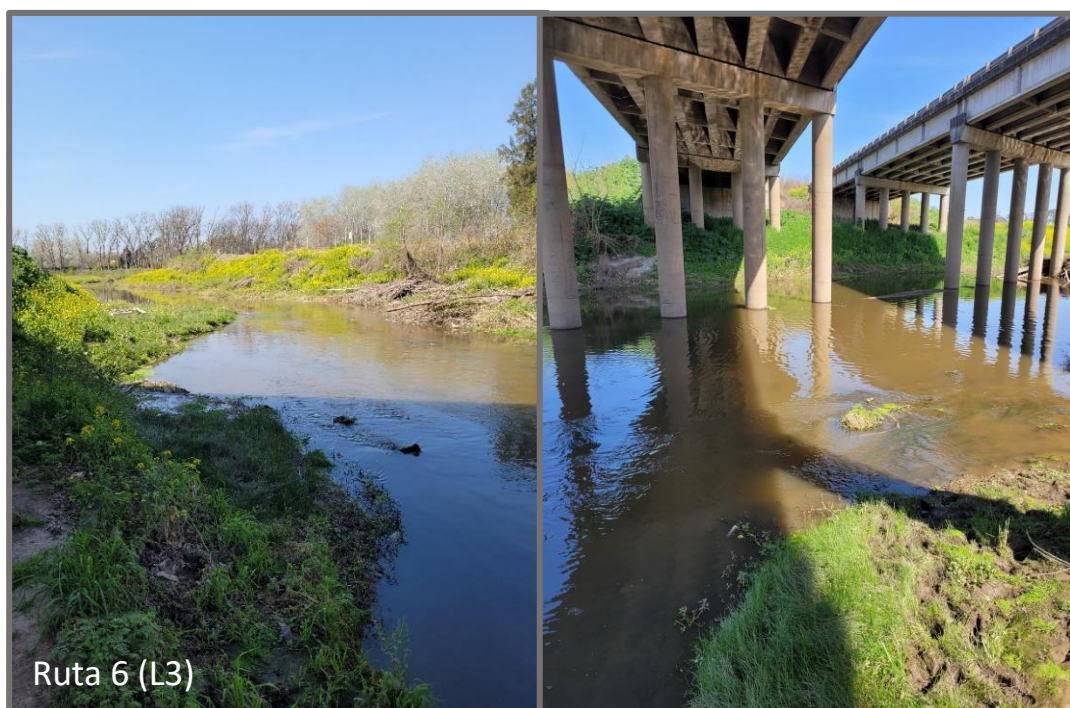


Figura 55. Sitio L3, ubicado en la intersección de la ruta 6 con el río Luján.

➤ *Arroyo Naveira (Nav):*

(-34.567302, -59.064189). Se trata de un arroyo perenne de segundo orden y el muestreo se llevó a cabo en su intersección con la Ruta Nacional 7, aproximadamente a 5 km del cauce principal del Río Luján. Se caracteriza por un flujo y un caudal muy bajo debido a la suave pendiente de la región, baja profundidad y presencia de macrófitas. Además, el fondo presenta una ausencia total de rocas o guijarros y se depositan sedimentos finos, principalmente limo y arcilla. Sobre sus márgenes el uso de suelo es principalmente agrícola.



Figura 56. Sitio Nav, arroyo de segundo orden del río Luján.

Cuenca del río Reconquista

➤ *Represa Roggero (R1):*

(-34.684614, -58.854516). Localizado justo aguas abajo de la represa Roggero, en la cuenca superior del río Reconquista. Es un sitio con una corriente alta (impulsada por la represa) que se ve atenuada por la presencia de numerosas macrófitas y vegetación circundante. Posee un fondo rocoso con deposición de abundante sedimento.



Figura 57. Sitio R1, ubicado luego de la represa Roggero .

➤ *Puente Martín Fierro (R2):*

(-34.608561, -58.717332). Este sitio se encuentra en la cuenca media del río Reconquista, aproximadamente 18 Km aguas abajo del sitio R1. Se encuentra en una zona urbanizada, en las inmediaciones del puente Martín Fierro, caracterizada por la presencia de viviendas precarias en sus márgenes y grandes acumulaciones de residuos tanto en las riberas como en el cauce del río. El área circundante presenta características típicas de zonas urbanas, con riberas que han sido modificadas por la actividad humana y vegetación limitada. En este tramo, el río recibe no solo efluentes urbanos, sino también descargas provenientes de varios parques industriales.



Figura 58. Sitio R2, ubicado en el puente Martín Fierro.

Control interno

- Cultivo de laboratorio (Lab):

Se trata de *biofilm* recolectado en los estanques de cultivos *outdoor* del bioterio del laboratorio PRODEA-INEDES, en la Universidad Nacional de Luján. Estos estanques contienen agua potable declorada y reciben aportes del agua de lluvia. Los parámetros del agua están caracterizados, por lo que fue utilizado como referencia o control.



Figura 59. Control de laboratorio, *biofilm* recolectado del cultivo *outdoor* de peces de la Universidad Nacional de Luján (UNLu).

+ Parámetros fisicoquímicos

En todos los sitios de muestreo se realizó un perfil físico-químico midiendo parámetros tanto *in situ* (temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad), como en laboratorio a partir de muestras de agua (dureza, alcalinidad, cloruros, amonio, fósforo reactivo soluble, nitritos, DBO, DQO y la presencia de metales pesados como arsénico, cadmio, cobre, plomo y cromo). Además, se calcularon los índices de biodegradabilidad y de calidad del agua (ICA) de Berón (1984). Todas las determinaciones se llevaron a cabo según lo explicado en el capítulo de “Materiales y métodos generales”. En cada sitio se tomaron tres muestras para las determinaciones.

Composición del *biofilm*

Para analizar la composición taxonómica del *biofilm*, las muestras fueron recolectadas raspando las superficies muestreadas en los sitios seleccionados. Estas muestras se colocaron en botellas plásticas de 100 mL, que contenían agua tomada directamente del río. Posteriormente, las botellas fueron transportadas al laboratorio, donde se mantuvieron bajo aireación constante hasta su análisis, realizado el mismo día o, a más tardar, al día siguiente de la recolección. La identificación y cuantificación de los organismos presentes se llevó a cabo según lo especificado en *Materiales y métodos generales*.

Índices de biodiversidad

Para evaluar la estructura de las comunidades del *biofilm* en los distintos sitios de muestreo, se calcularon cuatro índices de diversidad ecológica: Shannon (H'), Simpson ($1-D$), Margalef, y Pielou (J'). Estos índices permiten caracterizar tanto la riqueza (cantidad de taxones presentes) como la equitatividad (cómo se distribuyen las abundancias entre ellos), ofreciendo una visión más completa de la composición de las comunidades.

➤ *Índice de Shannon (H' , Shannon y Weaver, 1949):*

Este índice cuantifica la diversidad general de una comunidad considerando tanto la riqueza como la equitatividad. Se calcula con la fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$$

Donde p_i es la proporción relativa del grupo i respecto al total, y S es el número total de grupos. Valores más altos de H' indican mayor diversidad. Es sensible tanto al número de grupos como a la distribución de sus abundancias, y penaliza la dominancia de unos pocos grupos.

➤ *Índice de Simpson ($1-D$, Simpson, 1949):*

Evalúa la probabilidad de que dos individuos tomados al azar pertenezcan a grupos diferentes. Se expresa como:

$$1 - D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

donde p_i es nuevamente la proporción relativa del grupo i . Cuanto más cercano a 1 sea el resultado, mayor es la diversidad. Es un índice menos sensible a los grupos raros y más influenciado por los dominantes, lo que lo hace útil para detectar comunidades con fuerte desigualdad en la distribución.

➤ *Índice de Margalef (Margalef, 1951):*

Es un índice clásico de riqueza específica, que ajusta el número total de grupos observados según el tamaño de la muestra. Se calcula como:

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln(N)}$$

donde S es el número de grupos presentes y N es la abundancia total. Es particularmente útil para comparar la riqueza entre comunidades con distintos tamaños muestrales y es muy sensible a la presencia de grupos poco abundantes o raros.

➤ *Índice de equitatividad de Pielou (J' , Pielou, 1966):*

Mide cuán equitativamente están distribuidos los individuos entre los grupos presentes, y se basa en el índice de Shannon. Se calcula como:

$$J' = \frac{H'}{\ln(S)}$$

donde H' es el índice de Shannon y S es la riqueza. Toma valores entre 0 y 1, donde 1 indica una distribución completamente equitativa. Este índice es útil para evaluar si una comunidad está dominada por pocos grupos o si las abundancias están distribuidas de forma más homogénea.

Biomarcadores

Para realizar la determinación de los diferentes biomarcadores, las muestras fueron recolectadas raspando con bisturí estéril las superficies colonizadas en los sitios seleccionados y colocadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL (6 o 7 por sitio). Posteriormente, las muestras fueron transportadas al laboratorio donde se conservaron en freezer de -80°C hasta el momento de su procesamiento.

A partir de las muestras recolectadas, se determinaron los siguientes biomarcadores en el *biofilm*, según la metodología explicada en la sección de *Biomarcadores*, en *Materiales y métodos generales*:

Estrés oxidativo	Actividad extracelular
Glutación reducido (GSH)	Fosfatasa alcalina
Catalasa (CAT)	β -glucosidasa
Glutación-s-transferasa (GST)	
Peroxidación lipídica (TBARS)	

Análisis multivariados

Con el propósito de obtener una visión más integral de los datos y una mejor comprensión de la relación entre los diferentes sitios, se aplicaron análisis multivariados que incluyeron tanto los sitios de muestreo como las variables fisicoquímicas, bioquímicas o de composición. Para ello, se utilizó el método de análisis de componentes principales (PCA) y/o un análisis de agrupamiento jerárquico mediante el algoritmo UPGMA (por sus siglas en inglés, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Todos los análisis fueron llevados a cabo utilizando el programa Past 3.

Resultados

Perfiles fisicoquímicos de los sitios

En la tabla 23, se presentan los valores de los distintos parámetros fisicoquímicos y metales pesados medidos en los sitios de muestreo. Además, se presentan los niveles guía para dichos valores (Ley 5.965; Ley 24.051; Res. de la AdA Nº 42/06; Res. de ACUMAR Nº 283/19).

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos revelan patrones claros de deterioro en la calidad del agua a medida que avanzamos en el curso de ambos ríos. El control de laboratorio presentó parámetros óptimos y un índice de calidad de agua (ICA) alto de 9,4, lo que indica condiciones ideales como control. El arroyo Naveira, en la cuenca del Luján, fue el sitio de campo que más se asemejó al control, con parámetros de calidad similares, destacándose por su buen ICA (9,6) y valores fisicoquímicos dentro de los rangos permitidos.

En ambas cuencas, los sitios de las cabeceras (L1 y R1) ya mostraron ciertos signos de deterioro reflejados en valores de ICA más bajos (7,6 y 8,6, respectivamente), con una DBO alta en L1 (11,3) y un contenido de fósforo por encima de lo permitido en R1 (1,15 mg P-PO₄³⁻/L). Aguas abajo, la calidad del agua empeoró significativamente. En el río Luján, en ambos sitios urbanos (L2 y L3), los niveles de nutrientes como fósforo, amonio y nitritos aumentaron considerablemente, superando los niveles guía, reflejando un claro impacto de las actividades humanas sobre la calidad del agua.

En la cuenca del río Reconquista, el sitio R1, ubicado en la naciente del río, presenta una buena calidad de agua, con la mayoría de los parámetros dentro de los límites establecidos (a excepción del fósforo). A medida que avanzamos hacia el sitio R2, a unos 18 km de R1, la calidad del agua se deteriora de manera drástica, alcanzando un ICA de 2,3, lo que indica un estado crítico del sitio. En R2, los niveles de fósforo (2,23 mg P-PO₄³⁻/L) y, especialmente, de amonio (21,556 mg NH₃-N/L), están muy por encima de los niveles guía. Además, la demanda biológica de oxígeno (DBO) es alta (22,4 mg O₂/L) y el oxígeno disuelto (OD) se encuentra muy por debajo de los niveles guía de protección de la biota (2,17 mg O₂/L), lo que refleja un serio problema de eutrofización y contaminación en la zona.

Tabla 23 Valores medios de los parámetros fisicoquímicos y metales pesados medidos en los sitios estudiados (Lab: Laboratorio; Nav: Naveira; L1: M. J. García; L2: Las Tropas; L3: Ruta 6; R1: represa Roggero; R2: puente Martín Fierro). Se tomaron 3 muestras en cada sitio. Se muestran los límites permitidos para los parámetros fisicoquímicos de descargas a cuerpos de agua superficiales (Ley 5.965, Decreto 2009/60; Resolución 389/98, anexo II y Resolución 336/03, Anexo II; Res. de la AdA Nº 42/06 y Res. de ACUMAR Nº 283/19) y para los metales pesados establecidos para la protección de la vida acuática (Ley 24.051, Decreto 831/93, anexo II). En rojo, valores que están por fuera de los límites permitidos y niveles guía. PRS: fósforo reactivo soluble; DBO: demanda biológica de oxígeno; DQO: demanda química de oxígeno; ND: no detectable.

Parámetro	Lab	Nav	L1	L2	L3	R1	R2	Niveles guía
<i>In situ</i>								
Temperatura en el agua (°C)	14,9 ± 0,3	12,0 ± 0,2	19,4 ± 0,4	19,8 ± 0,7	20,8 ± 0,2	22,8 ± 0,3	23,9 ± 0,3	≤ 35
pH	7,19 ± 0,19	7,44 ± 0,35	8,33 ± 0,12	7,55 ± 0,20	7,24 ± 0,05	7,27 ± 0,08	6,92 ± 0,07	6,5-9,0
Conductividad (µS/cm)	670 ± 36	807 ± 5	1605 ± 39	1529 ± 29	1293 ± 52	1007 ± 38	1298 ± 61	-
Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	11,18 ± 0,09	12,43 ± 2,09	16,08 ± 1,42	8,93 ± 0,49	6,29 ± 0,19	8,65 ± 0,08	2,17 ± 0,26	≥ 5,0
Saturación de oxígeno (%)	109,7 ± 0,10	113,8 ± 19,1	174,9 ± 15,3	97,6 ± 4	70,3 ± 1,73	100,3 ± 1,35	25,7 ± 3,19	-
<i>En laboratorio</i>								
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	128 ± 7	69 ± 2	168 ± 0	163 ± 2	160 ± 0	109 ± 4	178 ± 2	-
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	204 ± 0	224 ± 0	315 ± 18	280 ± 13	263 ± 10	349 ± 3	533 ± 21	-
Cloruros (mg Cl ⁻ /L)	1,0 ± 0	1,0 ± 0	23,7 ± 1,2	23,0 ± 0	17,0 ± 0	11,5 ± 0	14,3 ± 0,3	≤ 250
PRS (mg P-PO ₄ ³⁻ /L)	0,05 ± 0	0,04 ± 0	0,55 ± 0,3	1,23 ± 0,06	1,12 ± 0,05	1,15 ± 0,05	2,23 ± 0,16	≤ 1,0
Amonio (mg NH ₃ -N/L)	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,024 ± 0,003	1,170 ± 0,084	1,443 ± 0,047	0,068 ± 0,028	21,556 ± 0,305	≤ 1,37
Nitritos (mg NO ₂ -N/L)	0,066 ± 0,009	0,153 ± 0,091	0,319 ± 0,007	2,109 ± 0,565	2,137 ± 0,178	0,050 ± 0,010	0,060 ± 0,007	≤ 1,0
DBO (mg O ₂ /L)	4,1 ± 1,1	2,3 ± 0,6	11,3 ± 3,8	12,1 ± 0,8	11,4 ± 0,4	4,3 ± 1,9	22,4 ± 0,5	≤ 10
DQO (mg O ₂ /L)	77,2 ± 1,4	75,9 ± 4,7	52,9 ± 0,7	72,5 ± 11,9	39,0 ± 0	58,5 ± 7,9	29,8 ± 11,1	≤ 250
Índice de biodegradabilidad (DBO/DQO)	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,20 ± 0,10	0,20 ± 0,02	0,29 ± 0	0,07 ± 0,03	0,81 ± 0,25	-
Índice de Calidad de Agua (ICA)	9,4 ± 0,2	9,6 ± 0,1	7,6 ± 0,7	6,0 ± 0,2	5,3 ± 0	8,6 ± 0,5	2,3 ± 0	-
<i>Metales</i>								
Arsénico (µg As/L)	8 ± 1	44 ± 9	91 ± 1	58 ± 3	48 ± 2	51 ± 4	18 ± 2	≤ 50
Cadmio (µg Cd/L)	<2	<2	5 ± 0	5 ± 1	3 ± 0	3 ± 1	3 ± 1	≤ 1
Cobre (µg Cu/L)	8 ± 2	7 ± 3	9 ± 7	4 ± 3	ND	<1	ND	≤ 2
Cromo (µg Cr/L)	<1	<1	3 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	ND	3 ± 1	≤ 2
Plomo (µg Pb/L)	6,6 ± 1,3	1,6 ± 0,4	5,6 ± 0	ND	3 ± 0	21,7 ± 27,2	6,1 ± 3	≤ 4

Con el fin de integrar todos los parámetros fisicoquímicos medidos, explorar patrones en la variación de los datos y evaluar similitudes entre los sitios de muestreo en función de la calidad del agua, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), utilizando una matriz de correlación (Figura 53). Los primeros dos componentes principales (CP) explican en conjunto un 70,68% de la varianza total del sistema, siendo el CP1 responsable del 43,00% y el CP2 del 27,68%.

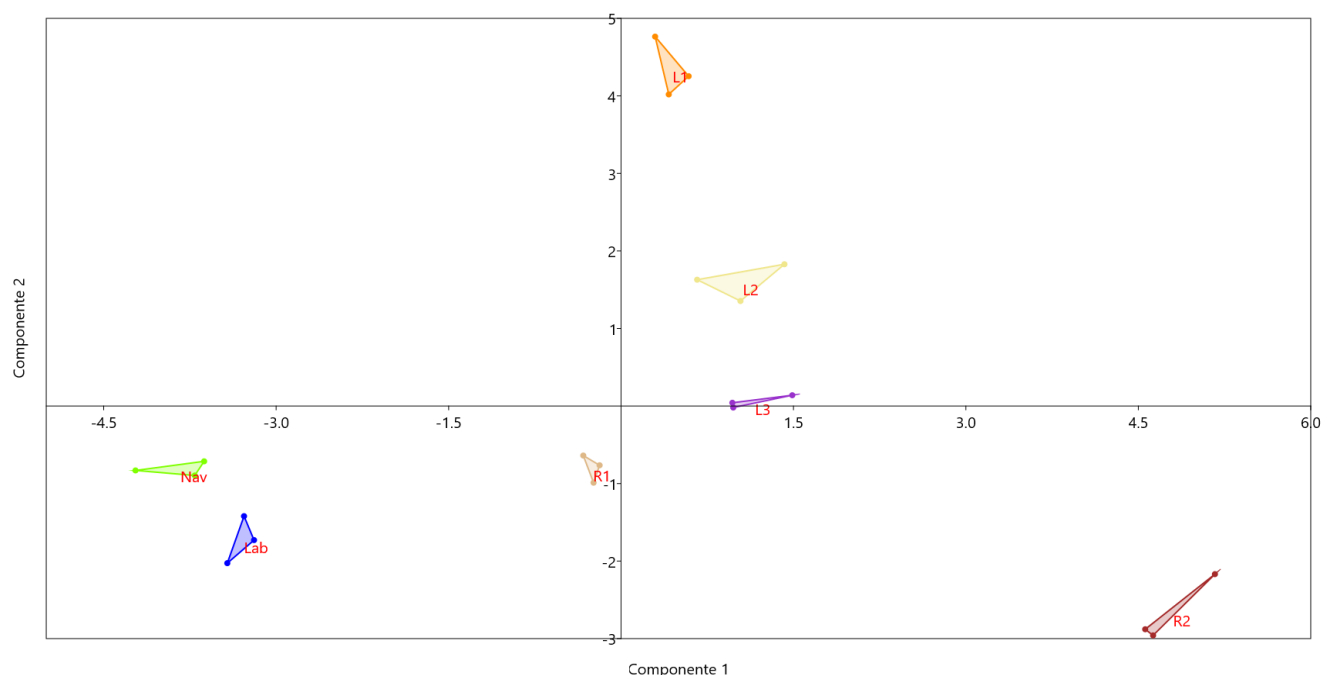


Figura 60. Gráfico generado por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada sitio para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a las muestras medidas y diferentes colores corresponden a diferentes sitios: Lab = control de laboratorio (azul); Nav = arroyo Naveira (verde); L1 = M.J.García (naranja); L2 = Las Tropas (amarillo); L3 = Ruta 6 (violeta); R1 = represa Roggero (marrón claro); R2 = puente Martín Fierro (marrón oscuro). Varianza total representada = 70,68%.

Al analizar los “loadings” o las cargas de las variables sobre los componentes (Tabla 24) vemos que el CP1 está influenciado positivamente por variables como PRS (0,325), alcalinidad (0,305), temperatura (0,317) y DBO (0,330), mientras que negativamente por variables como oxígeno disuelto (-0,241), saturación de oxígeno (-0,200) y DQO (-0,299). Esto sugiere que este eje representa un gradiente de eutrofización y carga orgánica, en donde valores altos de CP1 están asociados a mayor carga de nutrientes y menor oxigenación. El CP2, en cambio, está influenciado por arsénico (0,409), pH (0,409), cadmio (0,322), conductividad (0,304), cloruros (0,310) y saturación de oxígeno (0,339), lo que permite interpretarlo como un gradiente de mineralización y contaminación por metales. En este eje, valores altos podrían indicar sitios con mayor carga iónica y presencia de metales pesados.

Tabla 24. “Loadings” de las diferentes variables fisicoquímicas para los componentes principales 1 y 2. PRS = Fósforo reactivo soluble; DBO = Demanda biológica de oxígeno; DQO = Demanda química de oxígeno.

Variables	CP 1	CP 2
Temperatura	0,317	0,000
pH	-0,054	0,409
Conductividad	0,251	0,304
Oxígeno disuelto	-0,241	0,297
Saturación de oxígeno	-0,200	0,339
Dureza	0,292	0,129
Alcalinidad	0,305	-0,117
Cloruros	0,245	0,310
PRS	0,325	-0,132
Amonio	0,271	-0,220
Nitritos	0,075	0,132
DBO	0,330	-0,011
DQO	-0,299	0,035
Arsénico	0,027	0,409
Cadmio	0,229	0,322
Cobre	-0,205	0,001
Cromo	0,138	0,203
Plomo	-0,011	-0,117

En el espacio multivariado definido por ambos componentes, se observa que el control de Lab y el sitio Nav se ubican muy próximos entre sí en el cuadrante inferior izquierdo del gráfico, lo que indica una alta similitud en sus características fisicoquímicas. Ambos presentan valores negativos en los dos componentes, lo que sugiere una buena calidad de agua, con baja carga orgánica, alta oxigenación y escasa mineralización. A una distancia corta de este grupo se posiciona el sitio R1, que, si bien presenta una leve separación sobre el eje CP1, mantiene características relativamente similares, aunque con un mayor grado de nutrientes (como PRS) y presencia de metales pesados. En contraste, el sitio R2 se posiciona de forma aislada, con valores elevados sobre el CP1 y negativos en el CP2. Esta ubicación evidencia una condición de alta degradación, asociada a una mayor concentración de nutrientes y materia orgánica, y baja concentración de oxígeno disuelto.

Dentro de la cuenca del río Luján, se observa un patrón espacial progresivo entre los sitios, donde L1 se ubica en la zona central superior, indicando condiciones fisicoquímicas con un grado alto de mineralización y metales pesados. Un poco más alejado, se agrupan L2 y L3, que marcan una transición ambiental desde los sitios moderadamente afectados hacia uno más crítico (R2). Esta separación progresiva entre L1, L2 y L3 sugiere una transición desde condiciones menos

impactadas hacia un ambiente más deteriorado, donde L3 representa el sitio con mayor alteración dentro de la cuenca.

Posteriormente, para tener una mejor comprensión sobre la relación entre los sitios, se realizó un análisis de *clustering* jerárquico utilizando el algoritmo UPGMA y la distancia de Manhattan. El dendrograma resultante (figura 54) muestra cómo se agrupan los sitios según su similitud en los valores de los parámetros analizados, con un coeficiente de correlación cophenética de 0,82.

El análisis mostró que el control de laboratorio (Lab) y el arroyo Naveira (Nav) se agrupan juntos en el dendrograma, lo que refleja que ambos presentan características fisicoquímicas similares, como ya se había observado. A continuación, se agrupa el sitio R1 de la cuenca del río Reconquista, el cual presenta una calidad de agua bastante buena, aunque con algunos indicios de deterioro en comparación con los sitios anteriores.

En la cuenca del río Luján, se observa que los sitios L1 y L2 se agrupan de manera cercana, indicando que sus características fisicoquímicas no difieren en gran medida. Si bien L2 posee un estado peor a L1, ambos sitios muestran condiciones moderadamente deterioradas, pero aún no tanto como otros sitios de la cuenca. A medida que avanzamos en la cuenca, se observa que el sitio L3, ubicado en un área más afectada, se agrupa con L1 y L2, con una distancia mayor a ambos sitios. Finalmente, el sitio R2, que presenta una calidad de agua muy deteriorada con valores extremos en varios parámetros, se agrupa de forma más aislada, indicando un estado más crítico a diferencia de los demás sitios muestreados.

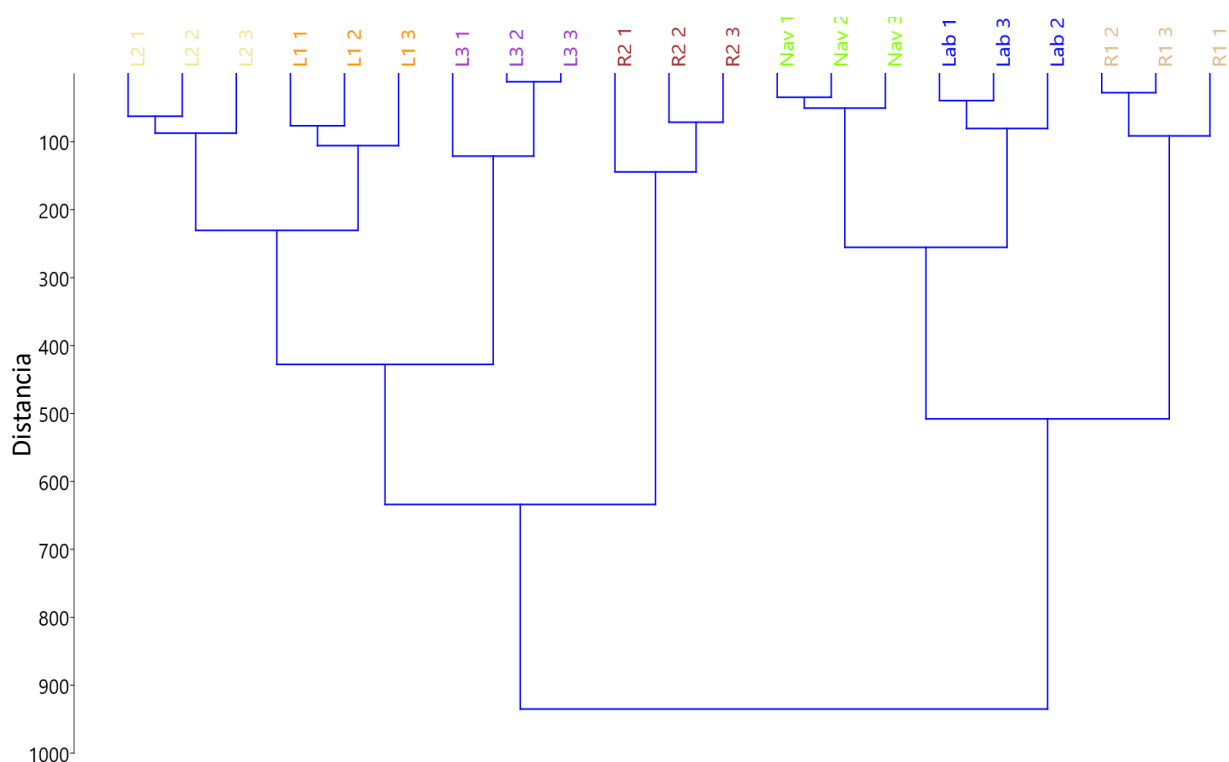


Figura 61. Dendrograma obtenido a partir del análisis de *clustering* mediante el algoritmo UPGMA y el índice de distancia de Manhattan. Las mediciones fueron hechas por triplicado. Lab = control de laboratorio (azul); Nav = arroyo Naveira (verde); L1 = M.J.García (naranja); L2 = Las Tropas (amarillo); L3 = Ruta 6 (violeta); R1 = represa Roggero (marrón claro); R2 = puente Martín Fierro (marrón oscuro).

Composición del *biofilm*

En la figura 55 se muestra la composición porcentual de las comunidades de *biofilm* en los distintos sitios de muestreo, detallando la abundancia relativa de cada grupo taxonómico identificado. A continuación, en la tabla 25 se presenta la cantidad de taxones registrados en cada uno de los grupos establecidos, indicando para cada sitio tanto el total de taxones identificados como la cantidad de grupos en los que se encontró al menos un representante. Por último, en la tabla 26 se exponen los valores de los índices de diversidad calculados: Shannon (H'), Simpson (1-D), Margalef y Pielou (J').

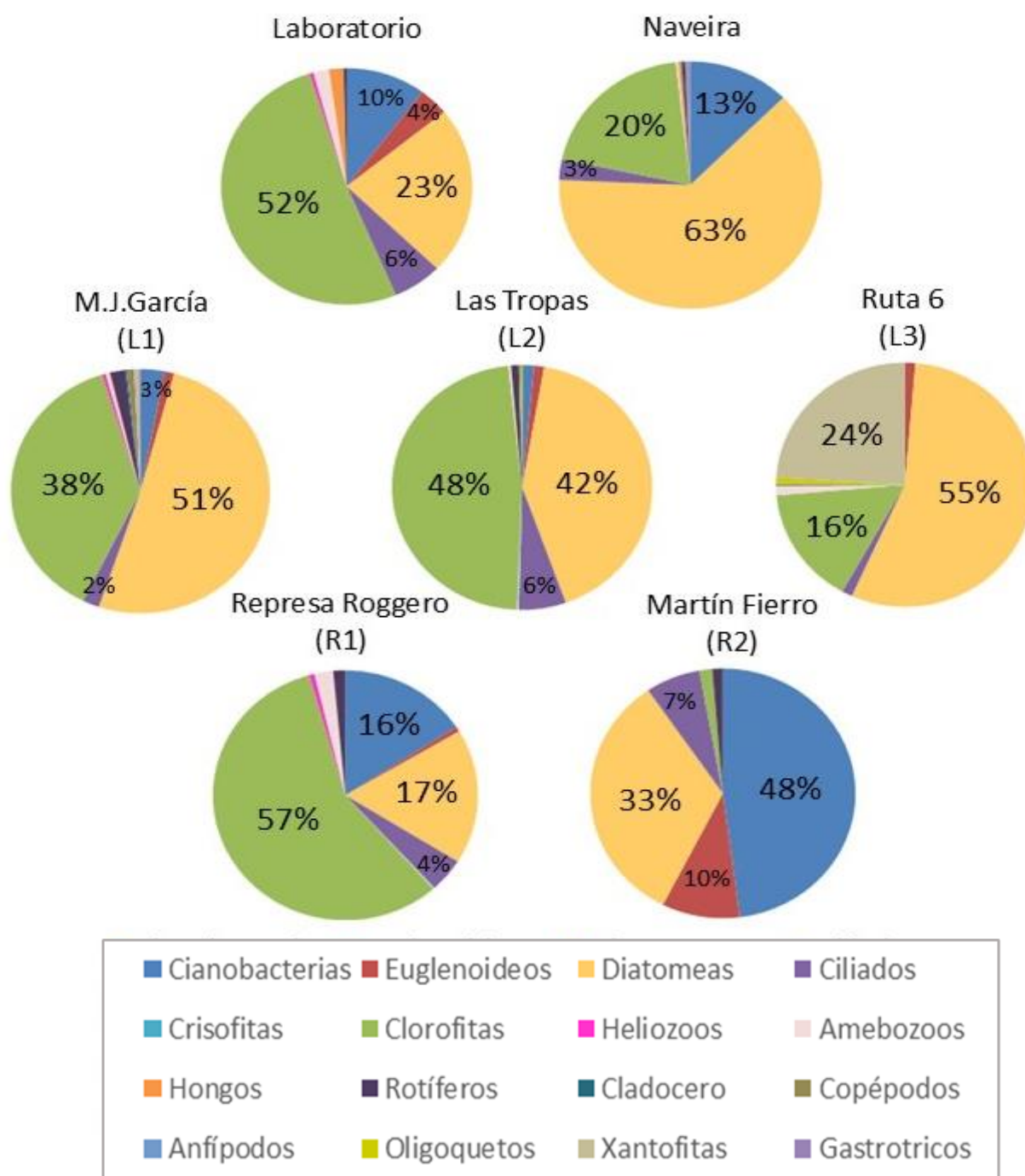


Figura 62. Gráficos de torta que indican la abundancia relativa de los grupos taxonómicos identificados en cada muestra de *biofilm* de los diferentes sitios muestreados.

Tabla 25. Cantidad de taxones identificados en cada uno de los grupos definidos. Se presentan el total de taxones identificados en cada sitio y el total de grupos que poseen al menos un representante. Lab: Laboratorio; Nav: Naveira; L1: M. J. García; L2: Las Tropas; L3: Ruta 6; R1: represa Roggero; R2: puente Martín Fierro.

<i>Grupos</i>	Lab	Nav	L1	L2	L3	R1	R2
Taxones identificados							
Cianobacterias	4	3	1	1	0	2	2
Euglenoideos	3	1	3	3	4	3	5
Diatomeas	3	5	5	5	5	1	2
Clorofitas (Algas verdes)	6	6	4	6	7	4	2
Crisofitas (Algas doradas)	0	0	0	1	0	1	0
Xantofitas	0	0	1	0	1	0	0
Ciliados	4	4	4	5	2	4	7
Heliozoos	1	0	1	0	0	1	0
Amebozoos	2	1	1	1	1	2	0
Hongos	1	0	1	0	0	0	0
Rotíferos	2	1	3	3	1	2	3
Cladóceros	0	1	1	0	1	0	0
Copépodos	0	0	1	1	0	0	0
Anfípodos	0	1	0	0	0	0	0
Oligoquetos	0	0	0	1	1	0	0
Gastrotricos	0	1	1	0	0	0	0
Total de taxones identificados	26	24	27	27	23	20	21
Total grupos con representantes	9	10	13	10	9	9	6

Tabla 26. Valores de los índices de diversidad calculados para cada sitio medidos a partir de la abundancia de cada taxon identificado.

Sitios	Índices			
	Shannon (H')	Simpson (1-D)	Margalef	Pielou (J')
Lab	2,26	0,84	4,16	0,69
Nav	1,98	0,78	3,89	0,62
L1	2,00	0,78	4,26	0,61
L2	1,77	0,72	4,22	0,54
L3	1,78	0,75	3,60	0,57
R1	1,50	0,64	3,33	0,50
R2	2,02	0,81	3,75	0,66

Los resultados muestran una marcada variación en la composición de las comunidades de *biofilm* y en los índices de diversidad entre los diferentes sitios estudiados. Tanto los grupos predominantes como los valores específicos de los índices reflejan diferencias claras en la estructura ecológica de las comunidades de estos sitios.

El *biofilm* del control de Laboratorio, presentó los mayores valores en los índices de diversidad evaluados: índice de Shannon ($H' = 2,26$), Simpson ($1-D = 0,84$) y una alta

equitatividad reflejada por el índice de Pielou ($J' = 0,69$). Este último valor indica una distribución más equilibrada de las abundancias relativas entre los grupos presentes. Asimismo, el alto valor de Margalef (4,16), que es especialmente sensible a la presencia de grupos raros o menos abundantes, confirma que la alta diversidad en este sitio se debe no solo al equilibrio entre grupos sino también a una elevada riqueza taxonómica. La composición mostró predominancia de clorofitas (52%) y diatomeas (23%), junto con contribuciones menores pero significativas de cianobacterias (10%), ciliados (6%) y euglenoideos (4%), reflejando condiciones ambientales equilibradas y favorables para múltiples grupos.

En comparación, Naveira presentó una composición dominada marcadamente por diatomeas (63%), aunque conservando una considerable presencia de clorofitas (20%) y cianobacterias (13%). La diversidad en Naveira fue levemente inferior al control, con Shannon ($H' = 1,98$) y Simpson ($1-D = 0,78$). Aunque la comunidad fue diversa, la mayor dominancia relativa de diatomeas disminuyó levemente la equitatividad (Pielou, $J' = 0,69$).

Por su parte, los sitios M.J.García (L1) y Las Tropas (L2) presentaron comunidades con composiciones notablemente similares. En ambos casos, los grupos predominantes fueron las diatomeas (51% en L1 y 42% en L2) y clorofitas (38% en L1 y 48% en L2), con escasa presencia de otros grupos. En consecuencia, los índices también resultaron muy similares entre estos dos sitios. L1 presentó valores ligeramente más altos (Shannon = 2,00; Simpson = 0,78, Pielou = 0,61) que L2 (Shannon = 1,77, Simpson = 0,72, Pielou = 0,54), reflejando que, si bien ambos tienen una diversidad considerable, L2 presenta una mayor dominancia relativa de algunos grupos. El índice de Margalef en ambos sitios (4,26 en L1 y 4,22 en L2) fue particularmente alto, reforzando la idea de la presencia de varios grupos raros, que nos dan una gran riqueza taxonómica (la mayor entre todos los sitios), pero una dominancia que recae en unos pocos grupos, favorecida probablemente por condiciones ambientales enriquecidas en nutrientes que permiten la proliferación de algunos grupos, especialmente algas verdes filamentosas (clorofitas) y diatomeas.

En contraste, el sitio de Ruta 6 (L3) mostró una composición particular y claramente diferenciada. Aunque las diatomeas (55%) fueron predominantes, este sitio se distinguió por una elevada presencia de xantofitas (24%), grupo que solo apareció en L1, y una reducción de la abundancia de clorofitas (16%). La diversidad en este sitio fue algo menor que en L1 y similar a L2 (Shannon = 1,78, Simpson = 0,75), así como la equitatividad (Pielou, $J' = 0,57$). Esto indica una comunidad un poco más equilibrada en términos de abundancia relativa de grupos. El índice de

Margalef fue menor (3,60), ya que hubo una riqueza más baja que los demás sitios, pero las distribuciones entre grupos fue algo más equitativa.

El sitio de la represa Roggero (R1) presentó la diversidad general más baja en comparación con los otros sitios. La comunidad estuvo dominada principalmente por clorofitas (57%), acompañadas por una proporción menor pero significativa de diatomeas (17%) y cianobacterias (16%). Esta estructura se ve reflejada en los valores de los índices de diversidad, con Shannon = 1,50 y Simpson = 0,64, que indican una menor diversidad efectiva. El índice de Pielou (0,50) señala una equitatividad reducida, es decir, una distribución desigual entre los grupos presentes. A su vez, el valor del índice de Margalef (3,33) sugiere una riqueza taxonómica intermedia, influida por la fuerte dominancia de clorofitas en este sitio, lo que limita la representación de otros grupos.

Finalmente, el sitio Martín Fierro (R2), a pesar de tener una riqueza baja (solo 6 grupos representados), los índices de diversidad resultaron altos (Shannon = 2,02, Simpson = 0,81), destacándose particularmente la elevada equitatividad (Pielou, J' = 0,66). Este valor de Pielou, más alto que en los demás sitios de campo, indica una distribución muy equilibrada de las abundancias relativas dentro de la comunidad, aunque restringida a unos pocos grupos principales: cianobacterias (48%), diatomeas (33%), euglenoideos (10%) y ciliados (7%). Estos grupos suelen estar relacionados con condiciones ambientales particulares, como la presencia de elevados niveles de nutrientes y materia orgánica. El índice de Margalef fue más bajo en este sitio (3,75), debido justamente a esta menor riqueza de grupos.

En síntesis, el análisis conjunto de los índices de diversidad y la composición relativa mostró claramente diferencias estructurales entre los sitios estudiados. El control de Laboratorio y el sitio Naveira presentaron comunidades más diversas y equilibradas, con alta riqueza taxonómica y distribución homogénea de las abundancias. Los sitios L1 y L2 revelaron comunidades intermedias con mayor riqueza, pero una marcada dominancia de algas verdes y diatomeas, reflejando condiciones posiblemente enriquecidas en nutrientes. En L3, por su parte, se favoreció el crecimiento de xantofitas que disminuyeron la dominancia de las clorofitas, modificando levemente su diversidad y equitatividad. En la represa Roggero se observó la riqueza y la diversidad más baja de todos los sitios, con una dominancia fuertemente marcada por las clorofitas. Finalmente, Martín Fierro mostró una composición singular con pocos grupos dominantes, pero notablemente equilibrados en sus abundancias, resultando en índices de diversidad efectivos notablemente altos, aunque limitados en cuanto a riqueza.

Para visualizar de forma clara las relaciones de similitud entre las comunidades de *biofilm* de los distintos sitios, se realizó un análisis de *clustering* o agrupamiento jerárquico, construido mediante el algoritmo UPGMA utilizando como medida de similitud el índice de Bray-Curtis (Figura 56). Este índice es apropiado para comparar comunidades ecológicas, ya que tiene en cuenta tanto la presencia como la abundancia relativa de los distintos grupos taxonómicos. El coeficiente de correlación cophenética obtenido (0,82) indica que el dendrograma representa de forma adecuada las relaciones de similitud originales entre los sitios.

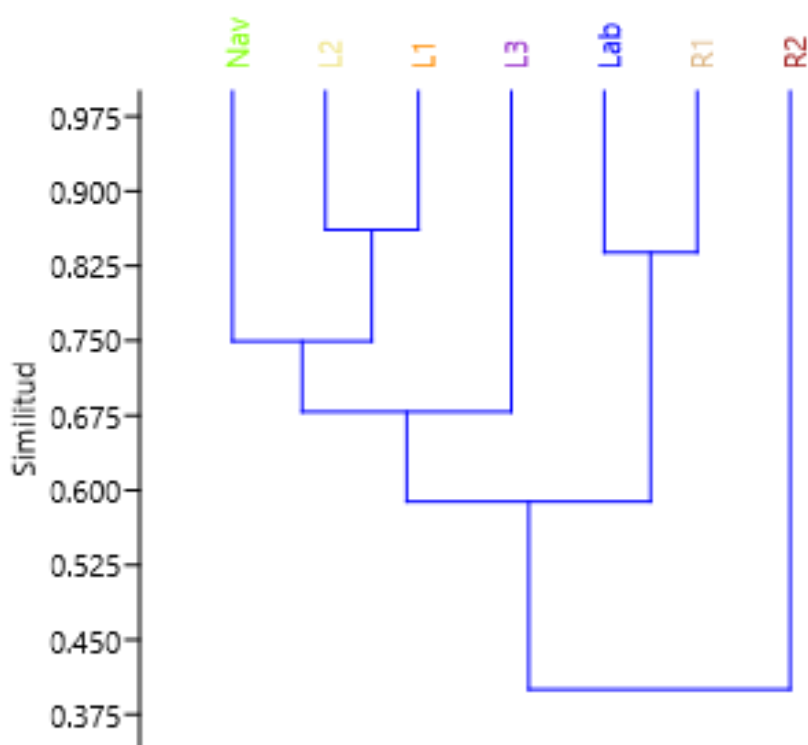


Figura 63. Dendrograma obtenido a partir del análisis de *clustering* mediante el algoritmo UPGMA y el índice de similitud de Bray-Curtis. Lab = control de laboratorio (azul); Nav = arroyo Naveira (verde); L1 = M.J.García (naranja); L2 = Las Tropas (amarillo); L3 = Ruta 6 (violeta); R1 = represa Roggero (marrón claro); R2 = puente Martín Fierro (marrón oscuro).

La estructura del dendrograma revela un agrupamiento inicial entre los sitios L1 y L2, que comparten una composición de *biofilm* muy similar, caracterizada por la predominancia de diatomeas y clorofitas, así como valores próximos en los índices de diversidad. A esta agrupación se une luego el sitio Naveira, que, si bien presenta diferencias en la dominancia relativa (con mayor peso de diatomeas), conserva cierta similitud estructural con L1 y L2. Este conjunto de tres sitios refleja una comunidad relativamente homogénea, compuesta por grupos comunes a la mayoría de los sitios y con una distribución comparable de abundancias.

Posteriormente, al grupo conformado por L1, L2 y Naveira, se suma L3. Si bien L3 presenta algunas diferencias notables, como una mayor representación de xantofitas, su estructura general aún conserva ciertos patrones compartidos con los sitios anteriores, especialmente en cuanto a la predominancia de diatomeas.

En paralelo, se observa la formación de otro agrupamiento independiente entre el sitio de Laboratorio y R1. La similitud entre estos dos sitios, uno de ellos considerado control, podría explicarse por una distribución de abundancias relativas similares en los grupos de clasificación generales, determinado por una clara dominancia de clorofitas y una presencia notable de diatomeas y cianobacterias.

Finalmente, el sitio R2 se incorpora al dendrograma como el más distante con respecto al resto de los sitios. Esta posición refleja su composición particular de baja riqueza de grupos, pero con una distribución más equilibrada de las abundancias relativas entre los pocos grupos dominantes, que difiere marcadamente de la de los otros sitios.

Biomarcadores

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de los biomarcadores asociados con el estrés oxidativo y la actividad extracelular. Estos biomarcadores fueron seleccionados para evaluar las respuestas del *biofilm* ante las diferentes condiciones ambientales y niveles de contaminación.

Estrés oxidativo

En la figura 57 se muestra los resultados de los biomarcadores de estrés oxidativo, incluyendo el contenido de glutatión reducido (GSH), la actividad de la enzima catalasa (CAT), la actividad de glutatión S-transferasa (GST) y los productos finales de peroxidación lipídica (TBARS).

En cuanto a GSH, el control de laboratorio (Lab) presentó la concentración más alta en comparación con el *biofilm* de los sitios de campo, con una diferencia significativa con respecto a los sitios L2 y R2, siendo el de este último sitio el *biofilm* con la concentración más baja de GSH. El *biofilm* del arroyo Naveira, tuvo el nivel de GSH más cercano al control, siendo significativamente mayor que R2.

Para CAT, la respuesta fue inversa, el *biofilm* de R2 presentó una actividad significativamente mayor que todos los demás sitios. Por su parte, el *biofilm* de los sitios L2 y L3 de la cuenca del Luján también mostraron valores significativamente mayores que el resto,

reflejando una mayor actividad enzimática en estos puntos. En contraste, la comunidad microbiana del control Lab y el arroyo Naveira tuvieron los valores más bajos, similares a los de los sitios L1 y R1, en las cabeceras.

En cuanto a GST, el control de laboratorio mostró la actividad más alta, significativamente mayor que en todos los sitios. Para los sitios de campo, el *biofilm* del arroyo Naveira presentó la menor actividad de GST. En la cuenca del Luján, los valores de GST en el sitio L3 fueron significativamente mayores que en L1, Nav y en los dos sitios del Reconquista (R1 y R2). Entre estos últimos, no se registraron diferencias significativas en la actividad de GST del *biofilm*.

Por último, la comunidad de *biofilm* de Lab mostró el menor contenido de TBARS, con diferencias significativas con todos los sitios de la cuenca del Luján (L1, L2 y L3). En contraste, el *biofilm* de L3 presentó el mayor contenido de TBARS, siendo significativamente mayor que todos los demás sitios.

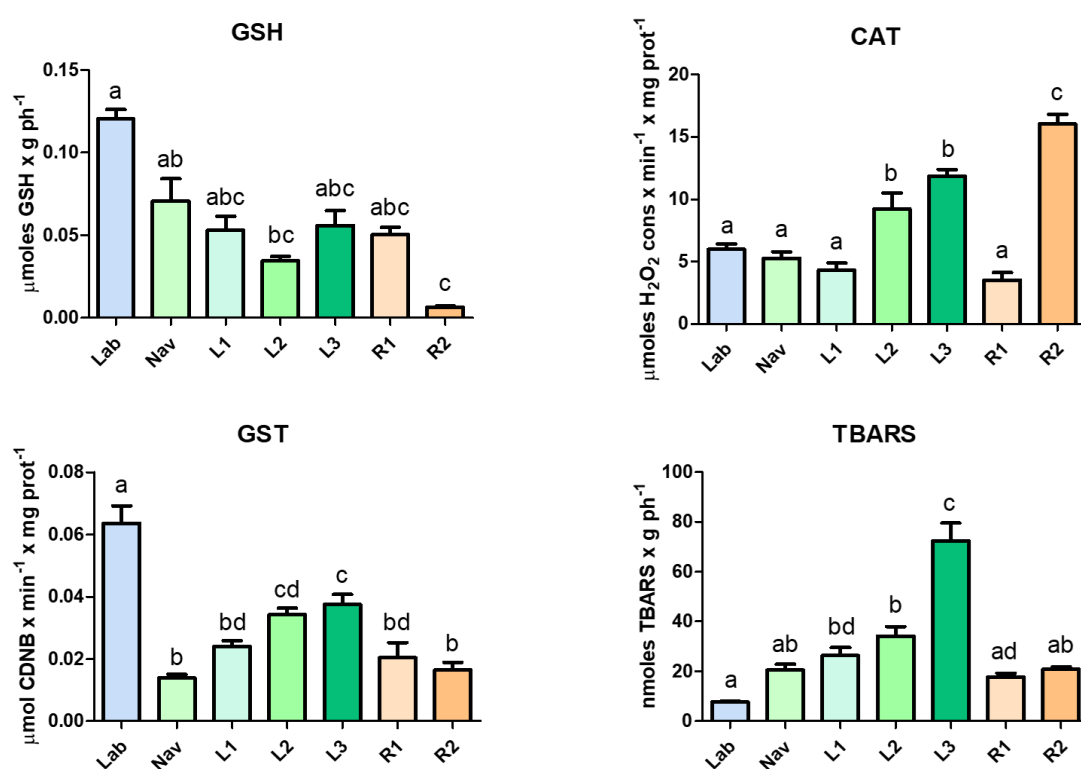


Figura 64. Valores medios de los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo (GSH, CAT, GST y TBARS) medidos en el *biofilm* de cada sitio, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras de cada sitio ($p < 0.05$). Nav = arroyo Naveira; L1 = M.J.García; L2 = Las Tropas; L3 = Ruta 6; R1 = represa Roggero; R2 = puente Martín Fierro.

Enzimas extracelulares

La figura 58 muestra los resultados de la actividad de fosfatasa alcalina y β -glucosidasa medidos en *biofilm* recolectado de los diferentes sitios de muestreo.

En el caso de fosfatasa alcalina, el *biofilm* del sitio R2 presentó la actividad más baja de todos, siendo significativamente menor en comparación con la de la mayoría de los sitios de la cuenca del Luján. En el sitio L3 y Nav se observó la mayor actividad de fosfatasa alcalina, siendo significativamente más alta que el control de laboratorio (Lab) y el *biofilm* de ambos sitios del río Reconquista. Por su parte, para la β -glucosidasa, el *biofilm* del sitio R2 mostró, nuevamente, la actividad más baja, mientras que en R1 se registró la actividad más alta, siendo significativamente mayor que la actividad enzimática observada en la comunidad de R2 y L2. En los demás sitios se registraron actividades intermedias, sin diferencias significativas entre ellos.

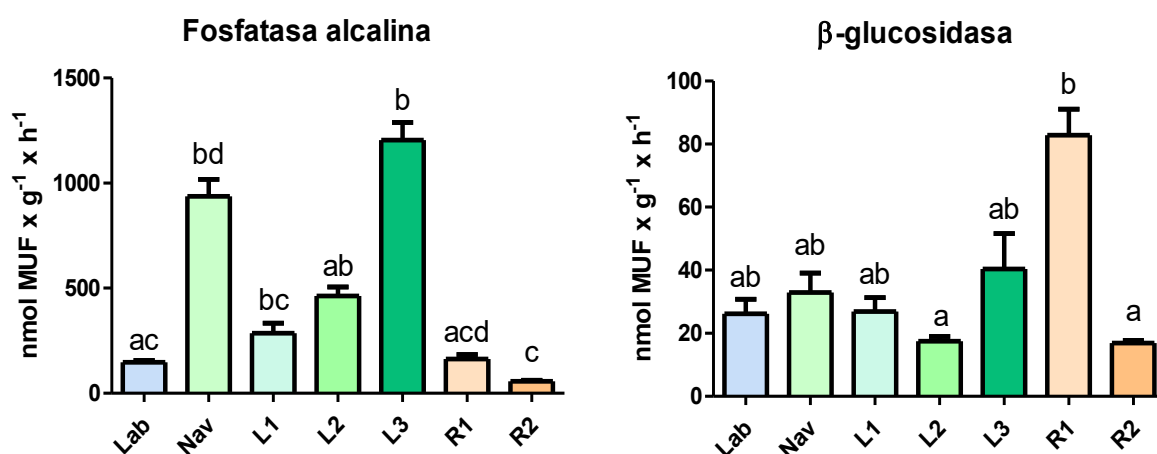


Figura 65. Valores medios de los biomarcadores extracelulares (fosfatasa alcalina y β -glucosidasa) medidos en el *biofilm* de cada sitio, con la correspondiente representación de los errores estándar de la media (ESM). Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras de cada sitio ($p < 0.05$). Nav = arroyo Naveira; L1 = M.J.García; L2 = Las Tropas; L3 = Ruta 6; R1 = represa Roggero; R2 = puente Martín Fierro.

Para tener un enfoque más integral y explorar la distribución y la relación entre los sitios de muestreo en función de sus perfiles de biomarcadores, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) sobre los biomarcadores de estrés oxidativo y actividad extracelular en *biofilm*, utilizando una matriz de correlación (Figura 59). Los dos primeros componentes principales explican en conjunto un 60,27% de la varianza total, con el CP1 explicando el 32,82% y el CP2 un 27,45%.

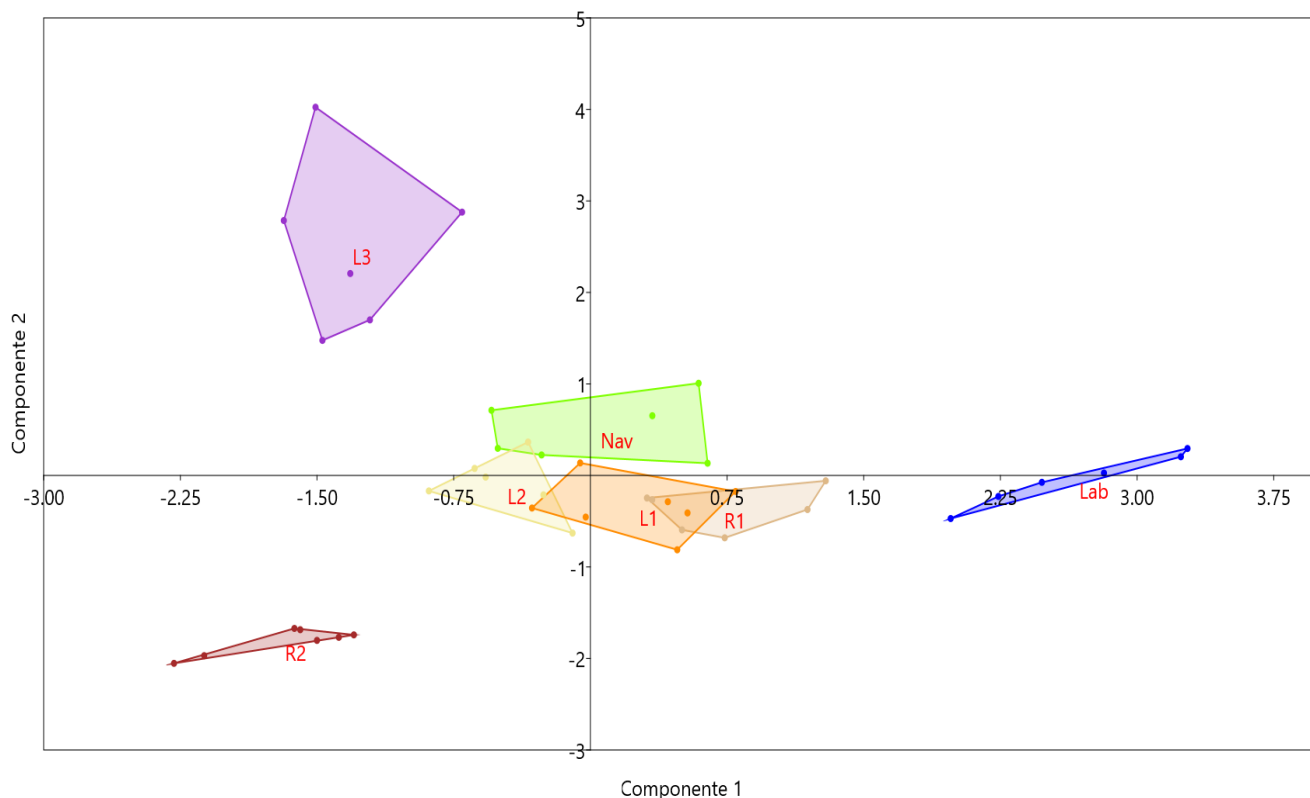


Figura 66. Gráfico generado por los componentes principales 1 y 2. Se realizó una traza convexa entre los puntos más externos de cada sitio para delimitarlos y se coloreó el área comprendida. Los puntos corresponden a las muestras medidas y diferentes colores corresponden a diferentes sitios: Lab = control de laboratorio (azul); Nav = arroyo Naveira (verde); L1 = M.J.García (naranja); L2 = Las Tropas (amarillo); L3 = Ruta 6 (violeta); R1 = represa Roggero (marrón claro); R2 = puente Martín Fierro (marrón oscuro). Varianza total

En cuanto a los “loadings” o las cargas de las variables sobre los componentes (Tabla 26) vemos que el CP1 está fuertemente influido por variables relacionadas al estrés oxidativo y la capacidad antioxidante como GSH (0,593), catalasa (-0,478) y GST (0,447). El CP2, en cambio, se ve fuertemente influenciado por biomarcadores como la fosfatasa alcalina (0,684) y TBARS (0,574).

Tabla 26. “Loadings” de las diferentes variables utilizadas para los componentes principales 1 y 2. GSH = Glutación reducido; GST = Glutación-s-transferasa; TBARS = Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Variables	CP 1	CP 2
Fosfatasa alcalina	-0,221	0,684
β-glucosidasa	0,098	0,173
GSH	0,593	0,298
Catalasa	-0,478	-0,181
GST	0,447	0,227
TBARS	-0,401	0,574

En el gráfico obtenido, vemos que Lab (control de laboratorio) se encuentra ubicado en la parte central derecha del gráfico, separado del resto, principalmente en el eje del CP1. Esto indica que su perfil de biomarcadores, sobre todo los relacionados con el estrés oxidativo, es muy distinto al de los demás sitios de campo. Por otro lado, el arroyo Naveira, se sitúa justo por encima de los sitios L1, L2 y R1, lo que sugiere que tiene características similares a estos sitios de la cuenca del río Luján y Reconquista, pero sin llegar a solaparse completamente con ellos.

Por su parte, los sitios de la cuenca del Luján muestran una distribución progresiva a medida que avanzamos hacia los sitios más alejados. L1 y L2 se agrupan más cercanamente, lo que indica condiciones ambientales similares que moldean la respuesta de los biomarcadores de sus comunidades. L3, al estar más alejado en el gráfico, refleja un mayor grado de alteración en comparación con los otros sitios de la misma cuenca, y con los otros sitios en general, sugiriendo un deterioro progresivo a medida que se avanza hacia aguas abajo.

En cuanto a los sitios del río Reconquista, R1 es el sitio de campo más cercano a Lab, reflejando una mayor similitud en el perfil de biomarcadores de su *biofilm*, correspondiente con un ambiente menos contaminado. R2, en cambio, se encuentra claramente separado de todos los demás sitios, en una zona más alejada del gráfico, lo que indica una diferencia significativa en los biomarcadores de su *biofilm*, con un perfil mucho más afectado.

Discusión y conclusiones

Este estudio proporcionó una visión integral de cómo las comunidades naturales de *biofilm* responden a diferentes gradientes de contaminación en dos cuencas fluviales de la región pampeana (ríos Luján y Reconquista). La combinación de los análisis fisicoquímicos, estructurales y fisiológicos reveló patrones claros de deterioro ambiental y sus efectos sobre las comunidades biológicas.

Los resultados fisicoquímicos mostraron una clara graduación en la calidad del agua, con diferencias entre los sitios de muestreo. El control de laboratorio (Lab), como control interno, presentó buenos valores fisicoquímicos, reflejando mejores condiciones de calidad del agua. Estos valores incluyen una menor concentración de nutrientes, un buen nivel de oxígeno disuelto y un bajo contenido de materia orgánica, lo que indica un ambiente con escasa alteración, ideal para la biodiversidad acuática. Por su parte, el arroyo Naveira (Nav), mostró características similares al control, lo que sugiere que también presenta un estado ambiental saludable, con menor impacto antrópico. Vale aclarar que en este sitio el uso de suelo agrícola que se realiza sobre las márgenes de este arroyo comenzó a implementarse luego de la pandemia.

Los sitios de la cuenca del río Luján muestran un progresivo deterioro de la calidad del agua a medida que se avanza aguas abajo. M.J.García (L1), ubicado en la cuenca alta, aunque presenta una calidad de agua aún aceptable, se observaron grandes floraciones algales y todos los metales evaluados en el sitio se hallaron por encima de los valores permitidos, indicando una degradación o perturbación desde su nacimiento. Conforme se avanza hacia Las Tropas (L2) y ruta 6 (L3), los parámetros fisicoquímicos empiezan a deteriorarse considerablemente. L2, a la altura de la ciudad de Luján, ya muestra indicios de una mayor contaminación, con aumento de nutrientes por encima de los límites permitidos, mientras que L3, al cruzar la zona urbanizada e industrial de la ciudad de Luján, presenta valores más extremos de nutrientes, mayor carga orgánica, y menores niveles de oxígeno disuelto. Estos resultados coinciden con lo reportado por Peluso *et al.* (2013), quienes documentaron la presencia de metales como Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn en concentraciones superiores a los valores permitidos en sedimentos de la cuenca media y baja del Luján, las cuales resultaron tóxicas para *Hyalella curvispina*, causando mortalidad. Además, Castañé *et al.* (2006, 2015) ya habían identificado condiciones de deterioro en la calidad del agua de esta cuenca, observando elevada carga orgánica, presión antrópica y signos de eutrofización, incluso en zonas alejadas de descargas puntuales. Trabajos más recientes

confirman que esta situación no solo persiste, sino que se ha agravado. Basílico *et al.* (2022) describieron un deterioro sedimentario generalizado asociado a la descarga de efluentes urbanos e industriales; mientras que González Núñez *et al.* (2024) observaron un gradiente fisicoquímico claro en la cuenca, con valores más extremos de conductividad, nutrientes y carga orgánica en los sitios más bajos (L2 y L3), lo que confirma un deterioro progresivo vinculado al uso del suelo urbano e industrial. Al comparar los resultados actuales con los antecedentes disponibles, se puede observar que la calidad del agua en los sitios de la cuenca del Luján no ha mejorado, sino que ha empeorado con el tiempo.

Por su parte, la cuenca del río Reconquista comienza con condiciones fisicoquímicas relativamente buenas en la represa Roggero (R1), con valores que sugieren un sistema con baja presión antrópica, favorecido por el proceso de autodepuración que ocurre en el embalse (Rigacci, 2019). Sin embargo, al avanzar aguas abajo, en tan solo 18 km, hacia el sitio del puente Martín Fierro (R2), que se encuentra en una zona altamente urbanizada e industrializada, los parámetros de calidad del agua alcanzan niveles críticos. En este sitio, los elevados niveles de nutrientes, la alta carga orgánica y los bajos niveles de oxígeno disuelto son indicadores claros de un proceso avanzado de eutrofización. El deterioro de esta cuenca ha sido ampliamente documentado en la literatura: Basílico *et al.* (2017) reportaron efectos genotóxicos en bioensayos con *Hydrocotyle ranunculoides*, asociados a efluentes cloacales en la cuenca alta; mientras que, Bianco *et al.* (2023) registraron efectos tóxicos en caracoles nativos expuestos al agua del río, con alta letalidad y fuerte inhibición de la acetilcolinesterasa, asociadas a la presencia de plaguicidas como clorpirifos. Nader *et al.* (2013) y Tufo *et al.* (2021) encontraron altas concentraciones de metales pesados (Zn, Cu, Cr, Pb) en sedimentos y agua, en estrecha relación con el uso del suelo y el vertido de efluentes sin tratamiento. Por su parte, Mastrángelo *et al.* (2022) identificaron la presencia de fármacos como ibuprofeno, diclofenac y cafeína, confirmando la descarga continua de contaminantes emergentes en la cuenca.

A pesar de los diagnósticos existentes y los métodos de gestión propuestos (Rigacci *et al.*, 2013; Baudou *et al.*, 2019), no se han observado mejoras significativas en la calidad ambiental. En su análisis de sedimentos de ambas cuencas, Basílico *et al.* (2022) compilaron evidencia de múltiples trabajos previos y concluyeron que tanto el río Luján como el Reconquista presentan niveles de contaminación consistentes con cuencas urbanas altamente impactadas, incluyendo presencia de metales, materia orgánica de origen antrópico, tóxicos persistentes y condiciones anóxicas propensas a la removilización de contaminantes. Esta síntesis integrada, junto con los resultados actuales, permite confirmar que el deterioro ambiental de ambos ríos es sostenido y

progresivo, sin indicios de mejora en el tiempo y con escenarios cada vez más complejos para su recuperación.

El análisis de la estructura de las comunidades de *biofilm* también proporcionó información clave sobre el estado ecológico de los sitios muestreados. En los sitios menos contaminados, como el control de laboratorio (Lab) y el arroyo Naveira (Nav), se observó una comunidad diversa y equilibrada, dominada por grupos como diatomeas y clorofitas. Estos sitios presentaron los valores más altos en los índices de diversidad (Shannon, Simpson, Margalef) y equitatividad (Pielou), lo que indica un ambiente acuático saludable y bien oxigenado, consistentes con los bajos valores de DBO y los altos niveles de oxígeno disuelto obtenidos en estos sitios. Resultados similares fueron observados por Vilches *et al.* (2016), donde hallaron que la estructura del perifiton fue compleja y diversa en sitios de baja presión antrópica.

En la cuenca del Luján, los tres sitios presentaron comunidades dominadas por diatomeas y clorofitas, con diferencias en equitatividad y riqueza taxonómica. En L1 y L2, estos grupos de algas representaron entre el 80 y 90% de la composición, con escasa participación de otros grupos. El índice de Margalef fue particularmente alto, indicando una elevada riqueza taxonómica, pero los valores de equitatividad fueron menores, lo que refleja una comunidad con dominancia marcada, posiblemente favorecida por un enriquecimiento en nutrientes o la contaminación por metales, entre otras cosas. L3, si bien mantuvo la predominancia de diatomeas, presentó una reducción de clorofitas y un aumento de xantofitas (24%), grupo que solo fue registrado en este sitio, lo que sugiere condiciones ambientales particulares que podrían estar relacionadas con un ambiente más deteriorado o más afectado por diferentes tipos de contaminación. Cambios similares fueron observados por Kravetz *et al.* (2023) en la cuenca del río Luján, donde se reportó una modificación en la composición del *biofilm* en presencia de efluentes industriales textiles. Estas condiciones, caracterizadas por la elevada carga de nutrientes, contaminantes orgánicos y colorantes que afectan la penetración de luz, favorecieron el desarrollo de especies oportunistas adaptadas al estrés ambiental. Un patrón comparable fue identificado por Fañani *et al.* (2021) en comunidades de macroinvertebrados de la misma cuenca, donde el avance de la urbanización generó una pérdida de diversidad y el favorecimiento de especies tolerantes, lo que refuerza la interpretación de una presión antrópica creciente como fuerza estructurante de las comunidades acuáticas.

En la cuenca del Reconquista se observaron patrones contrastantes. En R1, pese a tener condiciones fisicoquímicas aparentemente favorables, hubo niveles altos de As y Pb, y la comunidad mostró la menor diversidad y equitatividad del estudio, con una fuerte dominancia

de clorofitas. Este patrón podría explicarse por el efecto del embalsado, que genera condiciones más estables, pero también más propensas a la acumulación de ciertos contaminantes y el favorecimiento de la dominancia competitiva de ciertos grupos. Por su parte, en R2, a pesar de tener una riqueza baja, la equitatividad fue elevada, con un perfil comunitario dominado por cianobacterias, euglenoideos y ciliados. Un patrón similar fue observado por Cocheri *et al.* (2018) quienes reportaron *biofilms* con baja diversidad y dominancia de organismos oportunistas, como cianobacterias y euglenoideos, en ambientes sometidos a alta carga orgánica y presión antrópica. Por otro lado, González *et al.* (2019), quienes ensayaron con formulaciones comerciales de glifosato, demostraron que, ante la presión del tóxico, se favorece el crecimiento de cianobacterias y modifica la estructura del *biofilm*, desplazando a otros grupos como clorofitas y diatomeas. Esta coincidencia con nuestros resultados refuerza la interpretación de que dicha composición refleja una estructura comunitaria simplificada, adaptada a condiciones de hipoxia, elevada carga orgánica y contaminantes múltiples. Esta composición, tal como lo explican Adani *et al.* (2021) y De Diego *et al.* (2022), puede interpretarse como una reorganización adaptativa del *biofilm* frente a condiciones de estrés ambiental extremo, en la que prevalecen grupos resistentes y tolerantes.

Los biomarcadores de estrés oxidativo mostraron una clara correspondencia con los patrones observados en los perfiles fisicoquímicos y estructurales de los sitios de muestreo, sobre todo en el contenido de GSH y la actividad de la catalasa (CAT). En los sitios más contaminados, como R2 y L3, la actividad de las enzimas en los *biofilms* fue significativamente mayor, lo que sugiere que en estas áreas experimentaron un mayor nivel de estrés oxidativo debido a las condiciones ambientales adversas. Este patrón fue especialmente marcado en la cuenca del Luján, donde se observó un gradiente progresivo de respuestas, entre los sitios L1 y L3, consistente con el deterioro ambiental creciente aguas abajo, lo que resulta consistente con lo observado en muestreos de años anteriores en el *biofilm* de estos sitios (González Núñez *et al.*, 2024). En diversos estudios, la activación de enzimas como CAT y GST ha sido señalada como un mecanismo clave de defensa frente a metales pesados (Bonet *et al.*, 2013; Guerrieri *et al.*, 2022), contaminantes orgánicos y nanopartículas (Hou *et al.*, 2016), así como a biocidas y herbicidas (Bonnineau *et al.*, 2013; Roux *et al.*, 2024). Pero, al igual que en los resultados observados, coinciden en que la eficacia de la respuesta antioxidante puede verse limitada cuando las condiciones ambientales superan los umbrales de tolerancia del *biofilm*, lo que puede derivar en daño celular o funcional a pesar de la activación de mecanismos defensivos.

En R2, a pesar de los altos valores en los biomarcadores antioxidantes del *biofilm*, como la actividad de CAT y contenido de GSH, los valores de TBARS se mantuvieron relativamente bajos, lo que sugiere una adaptación funcional de la comunidad microbiana a un ambiente altamente contaminado. Este tipo de respuesta de las defensas ha sido descrito por diversos autores (Jakubowski y Walkowiak, 2015; Gambino y Cappitelli, 2016; da Cruz Nizer *et al.*, 2024), quienes destacan la capacidad del *biofilm* de reforzar su maquinaria antioxidante, protegerse mediante la matriz EPS y activar respuestas cooperativas ante condiciones de estrés ambiental crónico. En este contexto, la reorganización no se limita a una respuesta puntual, sino que implica una restructuración funcional sostenida en el tiempo, donde el sistema antioxidante se mantiene activo de manera constitutiva y la comunidad microbiana adapta su fisiología para preservar la integridad celular. Por el contrario, en L3, los niveles de TBARS del *biofilm* fueron los más altos de todos los sitios muestreados, a pesar de que se observa una respuesta antioxidante considerable. Aunque los mecanismos de defensa antioxidante fueron activados, estos resultaron insuficientes para contrarrestar el efecto acumulado de contaminantes, generando daño celular evidente. Este contraste entre la comunidad de R2 y L3 pone de manifiesto la complejidad de las respuestas del *biofilm*, que pueden incluir mecanismos de tolerancia diferenciales según el tipo y combinación de factores de estrés presentes (Guasch *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2013; Satapute *et al.*, 2019).

En *biofilm* expuesto a una mejor calidad de agua, como el control de Lab y el sitio Nav, los valores de biomarcadores se mantuvieron bajos, reflejando comunidades menos expuestas al estrés oxidativo y con un funcionamiento equilibrado. Este patrón coincide con lo que se espera en sistemas acuáticos con baja presión antrópica, donde el *biofilm* puede desarrollar sus funciones metabólicas manteniendo sus mecanismos defensivos en niveles basales y rutinarios.

Finalmente, mediante análisis multivariados, como el de componentes principales (PCA) o el análisis de *clustering* jerárquico, se logró integrar la información físico-química, bioquímica y estructural, permitiendo identificar patrones claros entre los sitios de muestreo. Estos enfoques facilitaron la comparación de los diferentes tipos de datos, revelando consistencia en los gradientes de deterioro observados. En los PCA, los sitios menos contaminados se agruparon más cerca del control de laboratorio (Lab), mientras que los sitios con mayor impacto ambiental se distribuyeron alejados, reflejando un deterioro progresivo aguas abajo en ambas cuencas. Este patrón fue replicado en los análisis de agrupamiento jerárquico, donde el control de Lab y el sitio con mejor calidad ambiental, Nav, formaron un clúster separado de los más contaminados (R2 y L3). Este tipo de abordaje integrador no solo permitió establecer relaciones

entre variables ambientales y biológicas, sino que se alinea con enfoques ampliamente validados en la literatura. Bonet *et al.* (2013), por ejemplo, utilizaron análisis de redundancia (RDA) para vincular biomarcadores antioxidantes con niveles de metales y características fisicoquímicas del agua, mientras que Hou *et al.* (2016) y Guasch *et al.* (2017) propusieron herramientas como el IBR (*Integrated Biomarker Response*) y el IBER (*Integrated Biomarker and Ecological Response*) para integrar respuestas bioquímicas y ecológicas. Pu *et al.* (2019), por su parte, demostraron que la combinación de datos fisicoquímicos, estructurales y moleculares permite construir indicadores más robustos y sensibles al deterioro ambiental que el análisis de variables aisladas. Estos estudios, junto con los resultados presentados, destacan el valor del uso de enfoques multivariados y de integración de respuestas como herramientas eficaces para caracterizar el impacto ambiental sobre comunidades de *biofilm*, reforzando su utilidad para evaluar con mayor precisión la calidad ecológica de los ecosistemas acuáticos.

En resumen, este estudio demuestra que las comunidades de *biofilm* constituyen indicadores ecológicos altamente sensibles y funcionales para la evaluación de la calidad del agua, que además resultan más sencillos de muestrear y analizar que otros organismos, como los peces. Su capacidad para integrar respuestas fisiológicas, bioquímicas y estructurales frente a las condiciones ambientales particulares de cada sitio permite detectar con precisión gradientes de deterioro, tanto frente a pulsos o descargas eventuales como incluso bajo exposiciones crónicas o complejas, antes de que se observen daños en escalas biológicas superiores (Juárez, 2017). Como plantean Dar y Bhat (2019), esta sensibilidad, combinada con su rápida capacidad de respuesta y su rol central en los procesos ecosistémicos, posiciona al *biofilm* como una herramienta valiosa tanto para el monitoreo ambiental como para la interpretación ecológica de los efectos causados por múltiples presiones antropogénicas.

Consideraciones finales

Efecto del As sobre *Cnesterodon decemmaculatus*

La exposición a As a través del agua provocó alteraciones fisiológicas profundas en *Cnesterodon decemmaculatus*, con respuestas que variaron según la concentración del metaloide y el tiempo de exposición. Estas alteraciones afectaron de forma consistente múltiples niveles funcionales, incluyendo la morfología, el sistema antioxidante y el metabolismo energético.

A nivel morfológico, se observó una disminución progresiva del factor de condición (FC) y un aumento del índice hepatosomático (IHS) en los peces expuestos a As, particularmente en los tratamientos de 21 días. Estos cambios fueron más evidentes a concentraciones intermedias y altas (0,5 y 1 mg As/L), reflejando una pérdida de masa corporal asociada posiblemente al catabolismo de reservas energéticas, junto con una hipertrofia hepática indicativa de un aumento en la actividad metabólica del hígado ante el estrés (Georgieva *et al.*, 2016; Jasim, 2017; Macirella *et al.*, 2023).

En lo que respecta al estrés oxidativo, las respuestas fueron órgano-específicas y dependientes del tiempo. El hígado, órgano clave en la detoxificación, registró una disminución sostenida de los niveles de glutatión reducido (GSH), actividad de catalasa (CAT) y peroxidación lipídica (TBARS) en ambos tiempos de exposición. Aunque estos resultados podrían parecer contradictorios con un escenario de estrés oxidativo, estudios previos han propuesto que esta disminución refleja una adaptación fisiológica en etapas subcrónicas y crónicas, posiblemente asociada a la biotransformación del metaloide hacia especies menos reactivas o la canalización de la respuesta hacia otras rutas alternativas (Cui *et al.*, 2020; Horton *et al.*, 1987; González Núñez, 2025). La consistencia de esta respuesta a lo largo del tiempo sugiere que, frente a una exposición prolongada, se produce una reorganización funcional del sistema antioxidante hepático. En branquias, en cambio, se observaron aumentos en TBARS y GSH en los tratamientos con concentraciones altas de As, lo que indica una activación de mecanismos antioxidantes frente al daño oxidativo en este órgano de contacto directo con el contaminante disuelto. Esta respuesta fue más pronunciada a los 8 días, sugiriendo un estrés inicial en el epitelio branquial que podría derivar luego en mecanismos adaptativos o en un agotamiento progresivo (Moussa *et al.*, 2022).

El metabolismo energético también mostró un deterioro progresivo con el aumento de la concentración y la duración de la exposición. En los peces expuestos a As a través del agua, se observó una reducción significativa del contenido de proteínas a los 8 días y de hidratos de

carbono a los 21 días, lo que podría interpretarse como una estrategia compensatoria frente a un estrés sostenido (Ananth *et al.*, 2014; Kumar y Banerjee, 2014).

El análisis multivariado respaldó estas observaciones. En los tratamientos sin *biofilm*, los análisis de componentes principales (PCA) mostraron una separación clara entre concentraciones de As, tanto a 8 como a 21 días, indicando un efecto tóxico concentración-dependiente. A los 8 días, en ambos ensayos (capítulos 1 y 2), los principales biomarcadores asociados a esta separación fueron los de estrés oxidativo (GSH, CAT, TBARS), mientras que a los 21 días predominaron los indicadores metabólicos (hidratos de carbono, lípidos, CEA), lo que sugiere una transición desde respuestas defensivas tempranas hacia un deterioro del estado energético en etapas más avanzadas. En conjunto, estos resultados evidencian que el As afecta de manera integral la fisiología de *C. decemmaculatus*. El hígado, las branquias y los músculos evidenciaron alteraciones bioquímicas marcadas, siendo los principales órganos y tejido blanco en la exposición. La progresión desde un estrés oxidativo inicial hacia una alteración metabólica generalizada en exposiciones prolongadas destaca la variación en el nivel de daño frente a la toxicidad del As y refuerza la necesidad de estudios biológicos que incluyan múltiples variables para una comprensión más integrada y realista.

El *biofilm* como modulador de la toxicidad del As

La presencia de *biofilm* en el medio acuático modificó significativamente la respuesta fisiológica de *C. decemmaculatus* frente a la exposición al As, actuando como un modulador de la toxicidad. Este efecto fue evidente tanto en la magnitud de las alteraciones bioquímicas como en el tipo de respuesta fisiológica observada, y dependió en gran medida del origen del *biofilm*, lo que pone de manifiesto su papel activo en la dinámica del contaminante en el sistema.

En términos generales, los peces expuestos al As en presencia de *biofilm* presentaron respuestas bioquímicas y metabólicas diferenciadas en comparación con aquellos sin él. En particular, se observaron respuestas atenuadas en biomarcadores de estrés oxidativo y un mejor estado energético general, lo que sugiere un efecto protector del *biofilm* frente al tóxico. Este patrón fue especialmente claro en los tratamientos con *biofilm* proveniente del arroyo Naveira (Nav), donde los peces mostraron menores alteraciones en el índice hepatosomático (IHS), mayor estabilidad en las reservas energéticas y una menor activación de las defensas antioxidantes frente a igual concentración de arsénico, en comparación con los peces sin *biofilm* o con *biofilm* del sitio Reconquista (R1). En presencia de *biofilm* de Nav, los peces mantuvieron niveles más estables de GSH, CAT y TBARS hepáticos, y no mostraron cambios significativos en

las reservas energéticas, incluso a las concentraciones más altas de As. En cambio, los peces mantenidos con *biofilm* de R1 presentaron respuestas fisiológicas más similares a las observadas en ausencia de *biofilm*, incluyendo disminución de GSH y TBARS y un aumento de la actividad CAT en hígado, junto con una reducción en el contenido de carbohidratos musculares.

Esta modulación ejercida por el *biofilm* fue evidenciada en los patrones observados en los análisis multivariados. En presencia del *biofilm* de Nav, los peces tendieron a agruparse sin distinción clara entre concentraciones de arsénico, tanto a los 8 como a los 21 días, lo que indica que la presencia de este *biofilm* amortiguó la respuesta fisiológica frente al contaminante. En cambio, en los tratamientos con *biofilm* de R1, si bien inicialmente se observó cierta superposición entre concentraciones, a los 21 días las respuestas comenzaron a separarse nuevamente en función de la dosis de As, sugiriendo que la capacidad protectora de este *biofilm* fue menos sostenida en el tiempo. El análisis de las variables con mayor peso (*loadings*) de los PCA permitió identificar que, en los tratamientos con *biofilm*, los biomarcadores del metabolismo energético (hidratos de carbono, lípidos, CEA) fueron los principales responsables de las diferencias observadas, tanto en etapas tempranas como tardías de la exposición. Esto contrasta con lo observado en los peces sin *biofilm*, donde los biomarcadores de estrés oxidativo dominaron las respuestas tempranas. Esto resalta que la presencia del *biofilm*, al amortiguar la disponibilidad del tóxico, evita que se produzca la respuesta inducida por éste en los peces y lo que prevalece es la respuesta a otras variables o factores, en este caso asociadas al estado energético. Como se ha sugerido en trabajos previos, esta modulación podría estar relacionada con el aporte de nutrientes, compuestos bioactivos o con una mejora general del microambiente promovida por la comunidad microbiana (Roeselers *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2022; Tuulaikhuu *et al.*, 2016).

Estas diferencias pueden atribuirse a las características funcionales y estructurales de cada *biofilm*, moldeadas por las condiciones ambientales de sus sitios de origen. El de Nav, proveniente de un sitio con menor presión antrópica, presentó un perfil funcional menos estresado, y podría presentar una mayor capacidad para retener arsénico en formas menos biodisponibles o aportar compuestos antioxidantes al medio (Bonet *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2025). En contraste, el *biofilm* de R1, mostró a los 21 días signos de estrés oxidativo propios, como aumento de la actividad de GST y CAT, y una menor respuesta frente al contaminante, disminuyendo así su rol protector sobre los peces. En ese sentido, Affione Di Cristóforo *et al.* (2021) demostraron que la sensibilidad de las algas frente a metales pesados y glifosato varía según la especie y su historia de exposición, lo que resalta la importancia de considerar las

adaptaciones locales y las respuestas fisiológicas de cada comunidad para interpretar adecuadamente su capacidad de interactuar con los contaminantes.

En síntesis, la presencia de *biofilm* en el medio acuático modula de forma significativa la toxicidad del arsénico sobre *Cnesterodon decemmaculatus*. Esta modulación se manifiesta tanto en una atenuación de las respuestas oxidativas como en una mejora del estado energético general, y depende de las características ecológicas del *biofilm*. Los resultados obtenidos evidencian que el origen y la historia adaptativa de la comunidad microbiana que conforma el *biofilm* son determinantes para su capacidad de amortiguar los efectos tóxicos del As. Estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar al *biofilm* no solo como un componente pasivo del ecosistema, sino como un actor dinámico que puede modificar decisivamente la exposición y la respuesta de los organismos acuáticos frente a contaminantes. Considerar bioensayos en un sistema de microcosmos si bien metodológicamente es complejo y los resultados son difíciles de interpretar es una herramienta más realista para abordar los problemas de la contaminación.

El *biofilm* como vector del contaminante

Además de actuar como modulador de la toxicidad, el *biofilm* desempeñó un rol clave como vector trófico de As, permitiendo evaluar los efectos diferenciales de las vías de exposición. La comparación entre la incorporación del metaloide a través del agua (exposición directa) y mediante el consumo de *biofilm* contaminado (exposición alimentaria) evidenció respuestas fisiológicas específicas que reflejan la relevancia del mecanismo de ingreso del contaminante en la determinación de sus efectos tóxicos.

La exposición al As por vía alimentaria generó una respuesta menos agresiva que la exposición a través del agua. Si bien se detectó un aumento de la actividad de GST en hígado, indicativo de la activación de mecanismos de detoxificación, no se observaron cambios significativos en CAT ni en TBARS, a diferencia de lo registrado en la exposición directa. Esta respuesta sugiere que el estrés oxidativo inducido por la vía dietaria fue más leve o que la biotransformación del tóxico por el *biofilm* o en el sistema digestivo y hepático evitó la acumulación de especies reactivas (Fontagné-Dicharry *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2020). Desde el punto de vista energético, todos los peces alimentados con *biofilm* (contaminado o no) presentaron mayores niveles de reservas (hidratos, lípidos y proteínas) y un menor gasto metabólico (ETS) en comparación con los peces expuestos directamente al As en el agua. Esto resultó en valores significativamente más altos del índice CEA, lo que refuerza la idea de que el *biofilm* aporta recursos nutricionales adicionales que mejoran el estado energético general

(Roeselers *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2022). Sin embargo, al comparar entre tratamientos alimentarios, los peces que consumieron *biofilm* contaminado mostraron una disminución significativa del contenido de lípidos y proteínas respecto a los que consumieron *biofilm* no contaminado, lo que indica una reducción en términos energéticos asociada a la incorporación, por ingesta, del metaloide.

Los resultados en órganos de contacto inicial también reflejaron diferencias claras entre las vías de ingreso del tóxico. En branquias, se observó un aumento significativo de los niveles de TBARS en los peces expuestos al As en agua. En cambio, en intestino, el aumento significativo de TBARS se registró en los peces que consumieron el *biofilm* contaminado. Esta diferenciación sugiere que el As induce una activación localizada de los mecanismos antioxidantes, acompañada de una marcada peroxidación lipídica, dependiendo del órgano con el que interactúa de forma primaria al ingresar al organismo: en la vía acuática, el epitelio branquial constituye el primer sitio de contacto con el contaminante mientras que, en la vía alimentaria, esta función recae sobre el epitelio intestinal (Lushchak *et al.*, 2009; Moussa *et al.*, 2022). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia funcional de los órganos de contacto con el medio como primeras líneas de defensa frente a contaminantes ambientales.

El análisis multivariado respaldó estas observaciones, mostrando patrones diferenciales según la vía de exposición indicando que, mientras que en ausencia de *biofilm* las respuestas al As se expresan predominantemente a través de alteraciones en los mecanismos antioxidantes, en presencia de este las diferencias fisiológicas asociadas a la exposición se manifiestan sobre todo en parámetros metabólicos. Esta dinámica se explicaría, ya sea porque el *biofilm* altera el medio o la interacción pez-arsénico (cuando solo está presente) o porque aporta nutrientes o mecanismos endógenos (cuando forma parte de la dieta del pez) (Roeselers *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2022).

La diferencia en la intensidad y naturaleza de la respuesta fisiológica puede atribuirse, al menos en parte, a los mecanismos de absorción del As en cada vía. En la exposición acuática, el metaloide se incorpora rápidamente a través del epitelio branquial, sin posibilidad de biotransformación previa, lo que incrementa su toxicidad. En cambio, en la vía alimentaria, el paso por el tracto digestivo, y por el *biofilm* mismo, permite cierta modulación, incluyendo procesos de detoxificación hepática y la conversión del arsénico a especies menos reactivas (arsenobetaína, DMA), reduciendo así su absorción y toxicidad sistémica (Ciardullo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2022). Si bien en esta tesis no se pudieron determinar otras especies del As ni en el

agua ni en el *biofilm* es posible que hayan ocurrido contribuyendo a disminuir la toxicidad del As.

Estos hallazgos confirman que el *biofilm* no solo actúa como modulador de la toxicidad, sino también como vector trófico de As, generando una exposición con efectos fisiológicos diferenciados y menos severos que la vía acuática. En contextos naturales, donde el *biofilm* constituye una fuente alimentaria habitual para peces como *Cnesterodon decemmaculatus*, esta vía puede contribuir a la carga corporal del contaminante, aunque con un perfil de toxicidad más atenuado.

Bioacumulación y transferencia de As

El *biofilm* demostró una alta capacidad para acumular As desde el medio acuático, alcanzando concentraciones notablemente superiores a las del agua, lo que confirma su rol como sumidero activo del metaloide (Bonet *et al.*, 2013; Battin *et al.*, 2016). Esta acumulación pone de manifiesto su potencial como reservorio y modulador de la biodisponibilidad del contaminante en sistemas acuáticos.

Al medir la bioacumulación en los peces, se observó que los individuos sin *biofilm* presentaron mayores concentraciones de As que aquellos expuestos en presencia de él. Esto sugiere que la presencia de *biofilm* en el agua reduce la incorporación de As por parte del pez, posiblemente al actuar como barrera físico-química que limita la fracción biodisponible del contaminante o al inducir su transformación a otras especies menos absorbibles por los peces (Tuulaikhuu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022). Además, los peces que consumieron *biofilm* contaminado bioacumularon en proporciones menores a la concentración presente en el *biofilm* ingerido, lo que se reflejó en valores de BAF inferiores a 1, a diferencia de los expuestos en agua que presentaron valores superiores a 1. Esto podría explicarse por una menor biodisponibilidad del As en el *biofilm* asociada a su unión a componentes estructurales o a la retención intracelular, o en los peces a procesos de biotransformación hepática tras la ingestión, que redujeron su absorción (Ciardullo *et al.*, 2008; Pei *et al.*, 2019). En esta tesis se midió As total, por lo que, se requerirían otros análisis para estudiar dichos procesos de biotransformación.

Estos resultados sugieren que el *biofilm* cumple una doble función en la dinámica del arsénico: por un lado, como acumulador eficiente del contaminante del medio, y por otro, como modulador de su transferencia hacia niveles tróficos superiores, resaltando su importancia ecológica en la regulación del destino y los efectos de contaminantes en ecosistemas acuáticos.

Cuencas del río Luján y Reconquista

La evaluación ambiental en las cuencas de los ríos Luján y Reconquista confirma un deterioro toxicológico profundo y persistente a lo largo de décadas, enmarcado en procesos de contaminación crónica que se han intensificado con el tiempo. Ambas cuencas muestran actualmente un estado ecológico comprometido, particularmente en los sectores urbanos e industrializados, donde convergen múltiples fuentes de contaminación de origen doméstico, industrial y difuso.

En la cuenca del río Reconquista, los niveles extremos de alteración observados en sus tramos medios reflejan un colapso funcional severo del ecosistema. Las condiciones registradas en estos sectores coinciden con antecedentes que identifican a este curso de agua como uno de los más contaminados del país (Salibián, 2006; Basílico *et al.*, 2022; Trípoli, 2024), con impactos que incluyen hipoxia, acumulación de nutrientes y pérdida de complejidad biótica. La persistencia de este escenario a lo largo del tiempo, pese a su visibilidad social y ambiental, da cuenta de la falta de avances sustanciales en términos de gestión y saneamiento.

La cuenca del río Luján presenta un deterioro ambiental evidente, con una calidad de agua comprometida incluso desde su nacimiento, donde se han registrado concentraciones elevadas de metales pesados. A lo largo de su recorrido, particularmente en los sectores urbanos e industriales, se intensifican las presiones antrópicas, lo que se refleja en parámetros fisicoquímicos alterados, como altos niveles de nutrientes, demanda biológica de oxígeno y contaminantes inorgánicos. Esta combinación de factores indica que el sistema se encuentra sometido a un estrés sostenido, sin evidencia de mejoras, lo que compromete su funcionalidad ecológica y su capacidad de recuperación (Castañé *et al.*, 2015; Basílico *et al.*, 2022; González Núñez *et al.*, 2024).

El *biofilm* como indicador de contaminación

Los resultados obtenidos en los diferentes sitios de muestreo de las cuencas del Luján y el Reconquista indicaron que el *biofilm* constituye un excelente integrador ecológico de las condiciones ambientales locales, reflejando tanto la calidad del agua como el grado de perturbación antrópica. Su utilidad como bioindicador se manifestó a través de múltiples niveles de análisis, incluyendo la estructura comunitaria y los biomarcadores de estrés.

En términos composicionales, se observaron diferencias marcadas en la comunidad de *biofilm* entre sitios. En los puntos menos impactados, como Nav y el control Lab, las comunidades estuvieron dominadas por clorofitas y diatomeas, con una presencia más equilibrada de microalgas. En cambio, en sitios con alto nivel de deterioro como R2, la estructura comunitaria cambió notablemente, con una mayor proporción de cianobacterias y la aparición de formas resistentes como ciliados y euglenoideos, lo que indica un estrés ambiental sostenido (Adani *et al.*, 2021; Kravetz *et al.*, 2023). Los índices de diversidad también reflejaron este patrón. Sitios menos contaminados presentaron valores más altos de riqueza específica, diversidad de Shannon y equitatividad de Pielou, mientras que los sitios más degradados mostraron una pérdida clara de complejidad comunitaria. Esta simplificación de la comunidad es un indicador común de ambientes sometidos a disturbios crónicos, como la contaminación química y orgánica (Fañani *et al.*, 2021).

Desde el punto de vista funcional, se registraron alteraciones significativas en los biomarcadores de estrés oxidativo en el *biofilm* de los sitios más contaminados, evidenciando no solo una situación de alteración a nivel comunidad, sino también una pérdida de capacidad funcional del *biofilm*. Esta combinación de respuestas, estructurales y funcionales, permitió discriminar con precisión los sitios con mayor deterioro ambiental, en concordancia con el gradiente de contaminación fisicoquímica de los sitios.

En conjunto, estos resultados demuestran que el *biofilm* no es solo un componente pasivo del ecosistema, sino una comunidad capaz de integrar señales de contaminación a nivel bioquímico, estructural y ecológico. Su monitoreo permite detectar alteraciones ambientales y evaluar con alta sensibilidad el estado de los cuerpos de agua, aportando información complementaria a las evaluaciones fisicoquímicas convencionales y resultando especialmente útil para el diagnóstico temprano en cuencas.

Conclusión general

Como conclusión general, a lo largo de esta tesis se ha evaluado, a través de distintos enfoques, los efectos del As sobre un pez nativo y el *biofilm* en un sistema de microcosmos, analizando la información desde un enfoque integral. Esto se llevó a cabo en concordancia con lo que “*One Health*” viene promoviendo hace años, donde la degradación del ambiente resultante de las actividades humanas plantea numerosas amenazas para la salud que son indefectiblemente complejas. La contaminación del agua, la bioacumulación y las relaciones en distintas escalas tróficas fueron analizadas en este trabajo. Los resultados obtenidos confirman

las hipótesis planteadas. De manera general el *biofilm* interactúa con los contaminantes, modulando su biodisponibilidad y, en consecuencia, los efectos tóxicos sobre *C. decemmaculatus*. Y, en particular, la respuesta de los biomarcadores de los peces difirió significativamente en presencia de *biofilm* frente a la exposición a As, tanto en escenarios de interacción directa como indirecta. El *biofilm* también respondió diferencialmente en sus biomarcadores frente a la exposición con el contaminante. Además, la presencia de *biofilm* en el ambiente redujo la bioacumulación de As en los peces, mientras que su ingestión como alimento resultó en una exposición trófica de menor impacto que la vía acuática. Por último, los *biofilms* recolectados en sitios con diferentes grados de impacto antrópico presentaron respuestas contrastantes en sus biomarcadores fisiológicos y estructurales, lo cual permite proponerlos como bioindicadores sensibles de programas de monitoreo en cuencas urbanas contaminadas.

Aspectos destacables

-  La exposición al As generó efectos fisiológicos marcados en *C. decemmaculatus*, con un perfil de respuesta concentración y tiempo-dependiente.
-  Se observó una transición desde respuestas antioxidantes tempranas hacia un deterioro metabólico crónico.
-  El hígado y los músculos resultaron ser órganos blanco principales.
-  El *biofilm* actuó como modulador de la toxicidad, alterando la interacción de los peces con el As, y de esta manera, sus respuestas fisiológicas, y eso dependió de su origen.
-  La exposición en agua provocó mayor bioacumulación y daño oxidativo en los peces que la vía alimentaria.
-  El *biofilm* mostró una alta capacidad de bioacumulación de arsénico, pero al ser ingerido por los peces, los niveles resultaron considerablemente más bajos, indicando que la vía alimentaria permitiría una eliminación más eficiente del tóxico, reduciendo su acumulación y efecto en el organismo.

- ✚ El arsénico causó mayor daño lipídico en el órgano barrera principal según la vía de exposición: branquias por contacto en el agua e intestino por ingesta, evidenciando un efecto órgano-específico asociado a la ruta de ingreso del tóxico.
- ✚ Se evidenció que el *biofilm* responde estructural y funcionalmente a los gradientes de contaminación, estableciendo su utilidad como bioindicador.



Lic. Mauro Javier Palacio



Dra. Natalia Ossana

Anexo

Técnicas fisicoquímicas

A continuación, se presenta la metodología utilizada para la medición de los parámetros fisicoquímicos en laboratorio a partir de las muestras de agua tomadas.

Dureza total

Se define como la suma de concentración de iones calcio y magnesio, expresados como carbonato de calcio, en mg/L (APHA, 2005). Para su determinación se colocaron 25 mL de muestra, medidos con pipeta, en un Erlenmeyer de 125 mL. Luego, se añadieron 1 mL de la solución *buffer* (NH_4Cl , NH_4OH (NH_3), EDTA, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), una punta de espátula de Negro de Eriocromo T (NET) y se agitó hasta obtener un color rosado/violáceo. Finalmente, se tituló con EDTA hasta alcanzar color azul. Se calculó la dureza según la siguiente fórmula:

$$\text{Dureza total} \left(\frac{\text{mg de CaCO}_3}{L} \right) = \frac{A \times B \times 1000}{\text{mL de muestra}}$$

donde,

A = mL utilizados de EDTA para la muestra

B = mg de CaCO_3 equivalentes a 1 mL de solución EDTA, que se calcula al valorar la solución de EDTA.

Alcalinidad

Es la capacidad de una solución para neutralizar ácidos y es la suma de todas las bases titulables (APHA, 2005). Por lo general se debe fundamentalmente a su contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos. Para su determinación se tomaron 50 mL de muestra con bureta y se colocaron en un Erlenmeyer de 125 mL. Se añadieron unas gotas de fenolftaleína, unas gotas de indicador mixto (0,02 g de rojo de metilo y 0,1 g de verde de bromocresol, diluidos en 100 mL de etanol) y se agitó hasta obtener un color azulado. Se valoró con H_2SO_4 0,01 N hasta viraje a color rosado/naranja. La alcalinidad se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mL H}_2\text{SO}_4(\text{total}) \times N \times 50000}{\text{ml muestra}} = \frac{\text{mg CaCO}_3}{L}$$

donde,

N = normalidad del ácido sulfúrico.

Cloruros

Este método se basa en la metodología estandarizada de APHA (2005). Se emplea nitrato de plata (AgNO_3) 0,1 N como titulante y cromato de potasio (K_2CrO_4) 10% m/v como indicador. Al alcanzar el punto final de la titulación, el color de la solución vira de amarillo a ladrillo debido a la formación de cromato de plata.

Previamente, se determina un factor de corrección (F) titulando una solución patrón de NaCl (0,1 N) con AgNO_3 . Para ello, se agregan 10 mL de NaCl y 1 mL de indicador, y se titula hasta el viraje de color. El factor F se calcula como:

$$F = \frac{10}{\text{mL AgNO}_3}$$

Luego, se toman 100 mL de muestra, se añade 1 mL de K_2CrO_4 y se titula con AgNO_3 hasta el viraje. También se realiza un blanco con agua destilada. La concentración de cloruros ($\text{mg Cl}^-/\text{L}$) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{mg Cl}^-/\text{L} = \frac{(A - B) \times F \times 35450}{V_m}$$

Donde:

A = volumen de AgNO_3 gastado en la muestra (mL)

B = volumen de AgNO_3 gastado en el blanco (mL)

F = factor del titulante AgNO_3

V_m = volumen de muestra analizada (mL)

35450 = peso equivalente del cloro multiplicado por 1000 para expresar en mg/L

Demanda biológica de oxígeno (DBO)

Es la cantidad de oxígeno necesaria para descomponer la materia orgánica presente por la acción bioquímica aeróbica (APHA, 2005). Para determinar DBO se prepararon las siguientes soluciones:

- Buffer Fosfato
- Sulfato de magnesio (2,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de calcio (2,75 g CaCl_2)
- Cloruro férrico (0,025 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Las soluciones anteriores se llevaron por separado a volumen final 100 mL con agua destilada. Para el agua de dilución se colocó 1 mL de las soluciones a, b, c y d por cada litro de solución de dilución. (pH = 7,2).

Para dilución al 100%, se tomaron 300 mL de muestra en botellas de DBO (DBO inicial [A] y final [B]). Para dilución al 50% se tomaron 150 mL de muestra y se llevaron a volumen final de 300 mL con agua de dilución.

Se midió el oxígeno disuelto en la DBO inicial (A). Los frascos B se cerraron inmediatamente sin dejar burbujas de agua y se mantuvieron durante 5 días a 20°C en incubadora en oscuridad. Al finalizar los 5 días se midió el oxígeno disuelto final. Se calculó el consumo de oxígeno para cada dilución según:

$$\frac{mg\ O_2}{L} = \frac{OD_{inicial} - OD_{final}}{\% \text{ dilución}} \times 100$$

Demanda química de oxígeno (DQO)

Es la cantidad de oxígeno consumido por los cuerpos reductores presentes en el agua sin la intervención de los organismos vivos (APHA, 2005). Para su determinación se prepararon las siguientes soluciones:

- A. Solución de digestión: se colocaron 1,022 g de $K_2Cr_2O_7$, previamente secado a 150°C durante 2 horas, 167 mL de H_2SO_4 cc y 33,3 g de $HgSO_4$ en 500 mL de agua destilada. Se llevó la solución a volumen de 1 L con agua destilada.
- B. Reactivo de ácido sulfúrico: se pesaron 5,06 g de Ag_2SO_4 y se agregaron a 500 mL de H_2SO_4 . Se dejó estacionar durante 2 días para su dilución.
- C. Standard de ftalato ácido de potasio (KHP): se secó el KHP hasta su peso constante a 110°C. se disolvieron 425 mg en 1000 mL de agua destilada.

Se lavaron tubos de vidrio (con tapa) con H_2SO_4 20%. Se colocó 1,5 mL de solución de digestión y 3,5 mL de solución B unos días antes de la determinación. En cada tubo se colocaron 2,5 mL de muestra y se prepararon un blanco y los patrones. Se colocaron los tubos en el digestor y se calentaron a 150°C durante 2 horas. Se homogeneizaron los tubos y se dejaron reposar 24 horas. Se leyeron el blanco, las muestras y los patrones a 420 nm y se calculó la DQO a partir de la curva de calibración obtenida.

Fósforo reactivo soluble (PRS)

El ortofosfato (PO_4^{3-}) es un nutriente esencial para el crecimiento de los organismos y puede llegar a comportarse como limitante de la productividad primaria del ambiente acuático. Se determinó según (APHA, 2005).

Reactivos utilizados:

- A. Molibdato amónico ($Mo_7O_{24}(NH_4)_4 \cdot 4H_2O$): 20 g en 500 mL de agua bidestilada.

- B. Ácido sulfúrico (5N).
- C. Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$): 1,76 g en 100 mL de agua bidestilada, se conservó alicuotado a $-20^{\circ}C$ en un recipiente de plástico.
- D. Tartrato de antimonio de potasio ($C_4H_4O_6$ (SbO)K. $\frac{1}{2} H_2O$): Se disolvió 1,371 g en 500 mL de agua bidestilada, se conservó a $4^{\circ}C$.
- E. Solución patrón: se disolvió 219,5 mg de H_2KPO_4 en 1 L bidestilada (solución madre: 1 mL = 50 μg P). Se tomaron 50 mL de la solución madre y se diluyeron en 1000 mL de agua bidestilada (solución hija: 1 mL = 2,5 μg P).
- F. Reactivo mixto: se mezclaron 6 mL de D, 20 mL de B, 12 mL de C y 2 mL de D.

A partir de la solución madre se realizaron los patrones necesarios para la curva patrón. Las muestras de agua se filtraron con filtro MG-F 0,7 μm . Se colocaron 10 mL de la muestra filtrada en un tubo de ensayo y se agregaron 1,6 mL de reactivo mixto. Se realizó un blanco y una curva patrón de la misma manera. Luego de 10 minutos se leyeron las muestras a 880 nm en espectrofotómetro.

Amonio

Este método cuantifica amonio en muestras de agua mediante una reacción colorimétrica sensible, basada en la formación de un compuesto azul (índico) a partir de la reacción del amonio con fenol e hipoclorito en presencia de nitroferricianuro (APHA, 2005).

Reactivos utilizados:

- A. Reactivo comercial A: contiene fenol (532 mmol/L) y nitroferricianuro de sodio (0,85 mmol/L).
- B. Reactivo comercial B: contiene hipoclorito de sodio (36,6 mmol/L) e hidróxido de sodio (0,625 mol/L).
- C. Solución patrón: se elabora una solución madre (100 μg N/mL o 122 μg NH_3 /mL), disolviendo 381,9 mg de cloruro de amonio (NH_4Cl), previamente secado a $100^{\circ}C$ durante 24 horas, en 1000 mL de agua miliQ. Esta solución se conserva en heladera. Luego, se prepara una solución hija (0,5 μg N/mL o 0,607 μg NH_3 /mL) tomando 5 mL de la solución madre y llevándolos a 1000 mL con agua miliQ en un matraz aforado. A partir de esta última se preparan los patrones de la curva de calibración.

Las muestras de agua se filtraron con filtro MG-F 0,7 μm . Se colocaron 10 mL de la muestra filtrada en un tubo de ensayo y se agregaron 200 μL de Reactivo A y 200 μL de Reactivo B. Se realizó un blanco y una curva patrón de la misma manera. Se incubaron durante 2 horas a $37^{\circ}C$

en baño termostático. Finalizada la incubación, se midió la absorbancia a 635 nm en espectrofotómetro y se calcularon los μg de $\text{NH}_3\text{-N/L}$ a partir de la curva de calibración obtenida.

Nitritos

Este método cuantifica nitritos en muestras de agua mediante una reacción colorimétrica sensible, basada en la formación de un complejo azoico coloreado a partir de la reacción de los nitritos con sulfanilamida y N-(1-naftil)etilendiamina en medio ácido fosfórico (APHA, 2005).

Se prepararon las siguientes soluciones para su determinación:

- A. Solución de Sulfanilamida: se disolvieron 10 g de sulfanilamida en ácido fosfórico (100 mL ácido fosfórico en 800 mL de agua bidestilada) y 1 g de N-(1 naftil) etilendiamina en un volumen total de 1000 mL completándolo con agua destilada.
- B. Solución patrón: se disolvieron 1,232 g de NaNO_2 (99%) previamente secado durante una hora a 110°C en 1000 ml de agua bidestilada (solución madre: 1 ml = 250 μg N). A partir de ella, se prepara una solución hija (50 μg N/mL) diluyendo 100 mL de la madre en 500 mL de agua miliQ, y luego una solución nieta (0,5 μg N/mL) diluyendo 1 mL de la hija en 100 mL de agua miliQ. Esta última se utiliza para preparar la curva de calibración.

La determinación se realizó por duplicado sobre las muestras previamente filtradas (filtro MG-F 0,7 μm). Se colocaron 10 mL de muestra en cada tubo e inmediatamente se agregaron 0,4 mL de la solución A. Se taparon y se mezclaron con *vortex*. Se realizó un blanco y la curva de calibración de la misma manera. Luego de 10 min se leyeron en espectrofotómetro a 543 nm.

Cálculo del Índice de Calidad del Agua (ICA – Berón, 1984)

Este índice, propuesto por Berón (1984), toma en consideración 6 parámetros físico-químicos: temperatura (T°), cloruros (Cl^-), Amonio (NH_4^+), demanda biológica de oxígeno (DBO), oxígeno disuelto (OD) y % de saturación de oxígeno. A los mismos se les asignó un valor de peso o importancia en el índice (w). De esta forma, se asignó un valor máximo (3) a los valores de amonio y DBO. A los valores de OD se les asignó un valor inferior (2); dado que el mismo es expresado como concentración y porcentaje de saturación, y se les asigna a ambos el mismo valor (1), con el objeto de considerar las variaciones de temperatura y condiciones de sobresaturación. Y, finalmente, la importancia específica de cloruros y temperatura dentro del ICA fue todavía menor (1).

El índice final se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ICA = \frac{\sum q}{\sum w}$$

donde,

ICA: índice de calidad de agua, número entre 0 y 10.

q: clasificación ponderada del parámetro, obtenido de acuerdo a las tablas de clasificación (Tabla A.1).

w: peso relativo del parámetro (número entre 1 y 10), donde $\sum_{i=1}^n w_i = 10$ si todos los parámetros pueden ser computados; n: número de parámetros.

temperatura		cloruros		N-amoniaco	
°C	clas.	mg/l	clas.	mg/l	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
				> 10,0	0

D.B.O.		oxígeno disuelto			
mg/l	clas.	% saturación	clas.	mg/l	clas.
0 - 2	30	> 90 - 105	10	> 9	10
> 2 - 4	27	> 80 - 90	8	> 8 - 9	8
> 4 - 6	24	> 105 - 120	6	> 6 - 8	6
> 6 - 10	18	> 60 - 80	4	> 4 - 6	4
> 10 - 15	12	> 120	2	> 1 - 4	2
> 15 - 25	6	> 40 - 60	0	0 - 1	0
> 25 - 50	3	> 10 - 40			
> 50	0	0 - 10			

Tabla A.1. Tabla de clasificación ponderada para cada uno de los parámetros fisicoquímicos utilizados.

ICA										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Semejante a cloacal crudo séptico			Polución elevada			Polución		Polución leve		Pureza original

Tabla A.2. Escala de valores de calidad de agua de 0 a 10, donde el 0 es un agua muy contaminada y 10 una muestra prístina.

Complemento estadístico

Tablas de “loadings” de los PCA (Capítulo 1)

A continuación, se presentan las tablas con los *loadings* de cada uno de los 12 análisis de componentes principales (PCA) realizados en el “Capítulo 1: Ensayo de exposición a arsénico de *Cnesterodon decemmaculatus* en presencia de *biofilm*”.

Peces sin *biofilm* (Figura 31, pág. 83)

	8 días		21 días	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Hígado GSH	0,40	0,12	0,34	0,22
Hígado Catalasa	0,31	0,00	0,19	0,21
Hígado GST	0,27	0,30	0,15	0,12
Hígado TBARS	0,12	0,29	0,06	0,32
Branquias GSH	-0,27	0,42	-0,09	-0,24
Branquias GST	0,00	0,31	0,24	-0,34
Branquias TBARS	-0,17	0,52	-0,35	-0,14
Cerebro AChE	-0,11	-0,09	0,25	0,09
Músculo AChE	0,21	0,21	0,07	0,49
Músculo ETS	0,35	0,09	0,29	-0,23
Músculo Lípidos	-0,07	-0,14	-0,45	0,05
Músculo HdC	-0,26	-0,10	-0,06	0,25
Músculo Proteínas	0,24	-0,33	PC 1	PC 2
CEA	-0,31	-0,13	0,34	0,22
Factor de condición	-0,27	0,21	0,19	0,21
Índice hepatosomático	-0,27	-0,04	0,15	0,12

Peces con *biofilm* de Nav (Figura 32, pág. 85)

	8 días		21 días	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Hígado GSH	0,24	0,22	0,07	0,00
Hígado Catalasa	0,12	0,21	0,10	0,40
Hígado GST	0,34	0,20	0,02	0,45
Hígado TBARS	0,16	0,19	0,24	-0,36
Branquias GSH	0,18	0,44	-0,27	0,21
Branquias GST	-0,26	-0,16	-0,21	-0,07
Branquias TBARS	0,15	0,41	-0,18	0,09
Cerebro AChE	-0,10	0,32	-0,10	-0,33
Músculo AChE	0,31	-0,17	0,29	-0,11
Músculo ETS	-0,31	0,25	-0,33	-0,38
Músculo Lípidos	0,04	0,34	0,39	-0,01

Músculo HdC	-0,10	0,09	-0,19	0,15
Músculo Proteínas	0,41	-0,29	0,39	-0,10
CEA	0,52	-0,17	0,40	0,27
Factor de condición	0,07	0,03	-0,26	0,28
Índice hepatosomático	-0,09	-0,10	0,07	0,05

Peces con *biofilm* de R1 a los 8 días (Figura 33, pág. 87)

	8 días		21 días	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Hígado GSH	0,32	-0,16	0,00	0,13
Hígado Catalasa	-0,04	0,06	0,24	0,18
Hígado GST	0,11	-0,01	0,11	0,32
Hígado TBARS	0,13	0,37	0,34	-0,11
Branquias GSH	-0,11	0,17	-0,11	0,28
Branquias GST	-0,30	-0,06	0,23	-0,41
Branquias TBARS	-0,19	0,43	-0,34	0,35
Cerebro AChE	0,12	0,06	-0,41	0,22
Músculo AChE	0,31	0,14	-0,02	0,03
Músculo ETS	-0,14	-0,28	-0,33	-0,37
Músculo Lípidos	0,41	-0,17	0,19	0,09
Músculo HdC	-0,20	-0,45	0,00	0,21
Músculo Proteínas	0,25	0,06	0,38	-0,11
CEA	0,37	0,25	0,35	0,35
Factor de condición	0,15	-0,45	0,19	0,25
Índice hepatosomático	-0,40	0,15	-0,13	-0,20

Comparación de concentraciones entre los grupos a 8 días (Figura 34, pág. 89)

	AP		0,5 mg As/L		1 mg As/L	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Hígado GSH	0,12	0,32	0,34	0,28	0,29	0,25
Hígado Catalasa	-0,14	-0,10	0,25	0,20	-0,22	0,03
Hígado GST	0,27	-0,20	0,34	0,00	-0,04	0,24
Hígado TBARS	0,09	0,20	0,30	0,06	0,27	0,38
Branquias GSH	-0,06	0,12	-0,03	0,11	0,34	0,36
Branquias GST	-0,50	-0,09	0,38	0,06	0,18	-0,35
Branquias TBARS	0,06	-0,06	0,28	-0,22	0,41	0,21
Cerebro AChE	-0,01	0,00	-0,11	-0,22	-0,05	-0,08
Músculo AChE	0,16	0,43	0,24	-0,34	-0,16	0,13
Músculo ETS	-0,27	0,46	0,36	0,07	0,36	-0,06
Músculo Lípidos	0,06	0,42	-0,14	0,07	-0,06	0,10
Músculo HdC	-0,02	0,25	-0,11	0,60	0,22	-0,43
Músculo Proteínas	0,41	0,20	0,17	-0,03	-0,17	0,10

CEA	0,51	-0,15	-0,33	-0,02	-0,36	0,34
Factor de condición	0,10	0,25	-0,02	0,52	0,32	0,01
Índice hepatosomático	-0,29	0,16	-0,18	-0,01	0,10	-0,30

Comparación de concentraciones entre los grupos a 21 días (Figura 35, pág. 91)

	AP		0,5 mg As/L		1 mg As/L	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Hígado GSH	0,17	0,09	-0,22	0,15	0,24	0,04
Hígado Catalasa	-0,20	0,07	0,15	0,42	0,35	0,06
Hígado GST	-0,27	0,05	0,10	0,50	0,33	-0,08
Hígado TBARS	-0,09	0,19	0,29	-0,02	0,30	0,15
Branquias GSH	0,33	0,15	-0,41	-0,06	-0,28	0,24
Branquias GST	-0,17	-0,32	-0,26	-0,06	0,04	-0,10
Branquias TBARS	0,39	0,17	-0,25	0,08	-0,37	0,16
Cerebro AChE	0,44	0,03	-0,19	-0,33	-0,01	-0,42
Músculo AChE	0,07	0,13	0,38	-0,31	0,32	0,07
Músculo ETS	0,19	-0,44	-0,31	-0,07	-0,21	-0,45
Músculo Lípidos	0,00	0,51	0,16	-0,28	-0,20	0,38
Músculo HdC	0,36	0,13	-0,20	0,25	-0,19	0,19
Músculo Proteínas	-0,27	0,23	0,21	-0,01	0,23	0,21
CEA	-0,14	0,51	0,33	-0,04	0,11	0,51
Factor de condición	0,31	0,01	0,19	0,40	0,05	0,03
Índice hepatosomático	0,11	0,02	0,10	-0,18	-0,33	0,10

Bibliografía

- Adani, F., Su, M., Dell'Orto, M., D'Imporzano, G., Bani, A., y Dumbrell, A. J. (2021) The structure and diversity of microalgae-microbial consortia isolated from various local organic wastes. *Available at SSRN 3934226*.
- Affione Di Cristóforo, C., Juárez, Á. B., Moretton, J., y Magdaleno, A. (2021). Efectos de metales pesados, glifosato y sus mezclas binarias sobre el crecimiento de algas verdes. *Ecología Austral*, 31(1), 053-064.
- Ahmed, M. K., Habibullah-Al-Mamun, M., Parvin, E., Akter, M. S., y Khan, M. S. (2013). Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6), 903-909.
- Amé, M. V., Ballesteros, M. L., Bistoni, M. D. L. Á., Hued, A. C., Monferrán, M. V., y Wunderlin, D. A. (2019). Effects of river pollution on its biota: Results from a 20-year study in the Suquía River Basin (Córdoba, Argentina). *Pollution of Water Bodies in Latin America: Impact of Contaminants on Species of Ecological Interest*, 177-200. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27296-8_11
- Amer, A., Kashfa, B., y Bibi, A. (2017). Microbial β -glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied y Environmental Microbiology*, 5(1), 31-46.
- Amiard, J. C., Caquet, T., y Lagadic, L. (2021). Use of biomarkers for environmental quality assessment. *Crc Press*.
- Ananth, S., Mathivanan, V., Aravindh, S., y Sangeetha, V. (2014). Impact of arsenic metal toxicant on biochemical changes in the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *International Journal of Modern Research and Review*, 2, 74-78.
- APHA, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. Washington, DC.
- Arnosti, C. (2003). Microbial extracellular enzymes and their role in dissolved organic matter cycling. In *Aquatic Ecosystems* (pp. 315-342). Academic Press.
- Artigas, J., Romani, A. M., Gaudes, A., Munoz, I., y Sabater, S. (2009). Organic matter availability structures microbial biomass and activity in a Mediterranean stream. *Freshwater biology*, 54(10), 2025-2036.
- AVMA-American Veterinary Medical Association. Guidelines for the Euthanasia of Animals. (2013). Edition Available from URL: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., y Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014(1), 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Babaniyi, G. G., Olagoke, O. V., y Aransiola, S. A. (2023). Extracellular enzymatic activity of bacteria in aquatic ecosystems. *Microbiology for cleaner production and environmental sustainability* (pp. 277-300). CRC Press.
- Ballesteros, M. L., Rivetti, N. G., Morillo, D. O., Bertrand, L., Amé, M. V., y Bistoni, M. A. (2017). Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Science of The Total Environment*, 595, 711–722. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.203

- Banaee, M. (2020). Alkaline phosphatase activity as a biochemical biomarker in aqua-toxicological studies. *International Journal of Aquatic Biology*, 8(2), 143-147.
- Barranguet, C., Charantoni, E., Plans, M., y Admiraal, W. (2000). Short-term response of monospecific and natural algal *biofilms* to copper exposure. *European journal of phycology*, 35(4), 397-406.
- Barrera, M., Bustos, M., y Pineda, D. (2020). Evaluación de contaminantes en la cuenca del río Reconquista: Un análisis de la situación actual y sus implicaciones para la salud pública. *Revista Argentina de Salud Pública*, 12(3), 180-194.
- Basílico, G., Magdaleno, A., Paz, M., Moretton, J., Faggi, A., y de Cabo, L. (2017). Sewage pollution: genotoxicity assessment and phytoremediation of nutrients excess with *Hydrocotyle ranunculoides*. *Environmental monitoring and assessment*, 189, 1-12.
- Basílico, G., Ionno, V., Iglesias, G., Olivelli, M. S., y de Cabo, L. (2022). Sediment pollution in aquatic environments of the metropolitan region of Buenos Aires, Argentina. *Hazardous and Trace Materials in Soil and Plants* (pp. 97-110). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91632-5.00006-9>.
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., y Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream *biofilms*. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251–263. doi:10.1038/nrmicro.2016.15
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O. Z., Wattiaux, R., Jacques, P., y De Duve, C. (1964). Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 92(1), 179.
- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., Núñez, A. A. G., Palacio, M. J., y Ferrari, L. (2019). Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment*, 650, 1779-1786.
- 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, Argentina.
- Bhattacharya, P., Welch, A. H., Stollenwerk, K. G., McLaughlin, M. J., Bundschuh, J., y Panaullah, G. (2007). Arsenic in the environment: Biology and chemistry. *Science of the Total Environment*, 379(2), 109-120.
- Bianco, K. A., Bernal-Rey, D. L., Menendez-Helman, R. J., y Kristoff, G. (2023). Lethality and acetylcholinesterase inhibition in a native invertebrate species exposed to water samples of an impacted stream (Reconquista River basin, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 110(6), 108.
- Bieczynski, F., Paineofilú, J. C., Venturino, A., y Luquet, C. M. (2021). Expression and function of ABC proteins in fish intestine. *Frontiers in Physiology*, 12, 791834.

- Bligh, E. G., y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Bonet, B., Corcoll, N., Acuña, V., Sigg, L., Behra, R., y Guasch, H. (2013). Seasonal changes in antioxidant enzyme activities of freshwater *biofilms* in a metal polluted Mediterranean stream. *Science of the total environment*, 444, 60-72.
- Bonifacio, A. F., Zambrano, M. J., y Hued, A. C. (2020). Integrated ecotoxicological assessment of the complex interactions between chlorpyrifos and glyphosate on a non-target species *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Chemosphere*, 261, 127782.
- Bonnineau, C., Tlili, A., Faggiano, L., Montuelle, B., y Guasch, H. (2013). The use of antioxidant enzymes in freshwater *biofilms*: Temporal variability vs. toxicological responses. *Aquatic toxicology*, 136, 60-71.
- Brandts, I., Cánovas, M., Tvarijonaviciute, A., Llorca, M., Vega, A., Farré, M., ... y Teles, M. (2022). Nanoplastics are bioaccumulated in fish liver and muscle and cause DNA damage after a chronic exposure. *Environmental research*, 212, 113433. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113433>.
- Bundschuh, J., Armienta, M. A., Morales-Simfors, N., Alam, M. A., López, D. L., Delgado Quezada, V., ... y Ahmad, A. (2021). Arsenic in Latin America: New findings on source, mobilization and mobility in human environments in 20 countries based on decadal research 2010-2020. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(16), 1727-1865.
- Burger, J. (2006). Bioindicators: a review of their use in the environmental literature 1970–2005. *Environmental Bioindicators*, 1(2), 136-144.
- Burns, A., y Ryder, D. S. (2001). Potential for *biofilms* as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecological Management and Restoration*, 2(1), 53–64. doi:10.1046/j.1442-8903.2001.00069.x
- Burns, R. G., y Dick, R. P. (2002). Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications. *CRC press*.
- Caro-Gamboa, L. J., Forero-Castro, M., y Dallos-Báez, A. E. (2020). Cholinesterase inhibition as a biomarker for the surveillance of the occupationally exposed population to organophosphate pesticides. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3).
- Caroll, N. V. (1956). The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. biol. Chem.*, 220, 583-589.
- Carriquiriborde, P. (2021). Principios de ecotoxicología. *Libros de Cátedra*.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, 43, 53-73.
- Castañé, P. M., Rovedatti, M. G., Topalián, M. L., y Salibián, A. (2006). Spatial and temporal trends of physicochemical parameters in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Environmental monitoring and assessment*, 117, 135-144.

- Castañé, P. M., Sánchez-Caro, A., y Salibián, A. (2015). Water quality of the Luján river, a lowland watercourse near the metropolitan area of Buenos Aires (Argentina). *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-14.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M. J., Scarabotti, P. A., y Wunderlin, D. A. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157(11), 3025-3033.
- Ciardullo, S., Aureli, F., Coni, E., Guandalini, E., Iosi, F., Raggi, A., ... y Cubadda, F. (2008). Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(7), 2442-2451.
- Cirelli, A. F., y Ojeda, C. (2008). Wastewater management in Greater Buenos Aires, Argentina. *Desalination*, 218(1-3), 52-61.
- Cochero, J., Nicolosi Gelis, M. M., Sathicq, M. B., y Gomez, N. (2018). *Biofilm* early-stage development in two nutrient-rich streams with different urban impacts. *River Research and Applications*, 34(7), 755-764.
- Cui, D., Zhang, P., Li, H., Zhang, Z., Song, Y., y Yang, Z. (2020). The dynamic effects of different inorganic arsenic species in crucian carp (*Carassius auratus*) liver during chronic dietborne exposure: bioaccumulation, biotransformation and oxidative stress. *Science of the Total Environment*, 727, 138737. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138737>
- da Cruz Nizer, W. S., Adams, M. E., Allison, K. N., Montgomery, M. C., Mosher, H., Cassol, E., y Overhage, J. (2024). Oxidative stress responses in *biofilms*. *Biofilm*, 100203.
- Dar, S. A., y Bhat, R. A. (2019). Aquatic pollution stress and role of biofilms as environment cleanup technology. In *Fresh water pollution dynamics and remediation* (pp. 293-318). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8277-2_16
- Das, S., Unni, B., Bhattacharjee, M., Wann, S. B., y Rao, P. G. (2012). Toxicological effects of arsenic exposure in a freshwater teleost fish, *Channa punctatus*. *African Journal of Biotechnology*, 11(19), 4447-4454.
- De Castilhos Ghisi, N., Larentis, C., de Oliveira, E. C., Neves, M. P., Zavaski, A. G., de Almeida Roque, A., ... Delariva, R. L. (2020). Environmental assessment of Neotropical streams using fish as bioindicators: a multibiomarker and integrated approach. *Hydrobiologia*. doi:10.1007/s10750-020-04460-2
- De Coen, W. M., y Janssen, C. R. (2003). The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental toxicology and chemistry*, 22(7), 1632-1641.
- De Diego G.A. (2021). Análisis metagenómico en *biofilms* de ecosistemas acuáticos sometidos a contaminación por As y su efecto en *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). Tesis de grado, Universidad nacional de Luján (UNLu).

- de Diego, G. A., Penas-Steinhardt, A., Ferro, J. P., Palacio, M. J., Ossana, N. A., Eissa, B. L., y Belforte, F. (2022). Impact of exposure to arsenic on the bacterial microbiota associated with river *biofilms* in the Pampas region. *Aquatic Toxicology*, 252, 106319.
- de la Torre, F. R., Ferrari, L., y Salibián, A. (2000). Long-term in situ toxicity bioassays of the Reconquista River (Argentina) water with *Cyprinus carpio* as sentinel organism. *Water, air, and soil pollution*, 121, 205-215.
- De la Torre, F. R., Ferrari, L., y Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, 59(4), 577-583.
- Di Giulio R. T. y Hinton D. E. (2008) The toxicology of fishes. CRC Press, Florida.
- Dong, Y., Gao, M., Qiu, W., y Song, Z. (2020). Effects of microplastic on arsenic accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* in a freshwater environment. *Journal of Hazardous Materials*, 405, 124232.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Erickson, R. J., Mount, D. R., Highland, T. L., Hockett, J. R., Jenson, C. T., y Lahren, T. J. (2019). The relative importance of waterborne and dietborne As exposure on survival and growth of juvenile fathead minnows. *Aquatic Toxicology*, 211, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.008>
- Facey, D. E., Blazer, V. S., Gasper, M. M., y Turcotte, C. L. (2005). Using fish biomarkers to monitor improvements in environmental quality. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17(3), 263-266.
- Fanslow, D. L., Nalepa, T. F., y Johengen, T. H. (2001). Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia*, 448, 61-70.
- Fañani, A. B., Cibils-Martina, L., Casset, M. A., Banegas, B. P., Poretti, T. I., y Rocha, L. (2021). Specific indicator invertebrates of urbanized habitats in tributary streams of the Luján River basin (Buenos Aires, Argentina). In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 57, p. 12). EDP Sciences.
- Farag, A. M., Woodward, D. F., Goldstein, J. N., Brumbaugh, W., y Meyer, J. S. (1998). Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, *biofilm*, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur d'Alene River Basin, Idaho. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 119-127. doi:10.1007/s002449900295
- Ferrari L., Benítez, J., Ficella M., Mastrángelo M., Palacio M., Somma A. y Trípoli L. (2017). Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. Ed. EdunLu.
- Flemming, H. C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., ... y Wuertz, S. (2023). The *biofilm* matrix: multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), 70-86. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>

- Fontagné-Dicharry, S., Larroquet, L., Dias, K., Cluzeaud, M., Heraud, C., y Corlay, D. (2018). Effects of dietary oxidized fish oil supplementation on oxidative stress and antioxidant defense system in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish y shellfish immunology*, 74, 43-51.
- Frings, C. S., y Dunn, R. T. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *American journal of clinical pathology*, 53(1), 89-91.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/53.1.89>
- Fulton, M. H., y Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(1), 37-45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Gambino, M., y Cappitelli, F. (2016). Mini-review: *Biofilm* responses to oxidative stress. *Biofouling*, 32(2), 167-178.
- Georgieva, E., Yancheva, V., Velcheva, I., Iliev, I., Vasileva, T., Bivolarski, V., ... y Stoyanova, S. (2016). Histological and biochemical changes in liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) under metal exposure. *North-Western Journal of Zoology*, 12(2).
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of free radicals in biology y medicine*, 1(2), 87-95.
- Gómez, N., Sierra, M. V., Cocherro, J., Licursi, M., y Bauer, D. E. (2009). Epipellic *biofilms* as indicators of environmental changes in lowland fluvial systems. *Biofilms: formation, development and properties*, 259-290.
- González, D., Juárez, A. B., Krug, C. P., Santos, M., y Vera, M. S. (2019). Freshwater periphyton response to technical-grade and two commercial formulations of glyphosate. *Ecología Austral*, 29(01).
- González Núñez, A. A., Ferro, J. P., Campos, L. B., Eissa, B. L., Mastrángelo, M. M., Ferrari, L., y Ossana, N. A. (2022). Evaluation of the acute effects of arsenic on adults of the neotropical native fish *Cnesterodon decemmaculatus* using a set of biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(5), 1246-1259.
- González Núñez, A. A. G., Palacio, M. J., Tripoli, L. I., Pighin, A. F., y Ossana, N. A. (2024). Environmental health in the upper-middle Luján River basin from a multi-biomarker approach. *Environmental Pollution*, 359, 124541.
- González Núñez, A. A. (2025) Evaluación ecotoxicológica de poblaciones naturales y de cultivo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) expuestas a arsénico. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires (UBA).
- Graziano, M., Giorgi, A., y Feijoó, C. (2020). Multiple stressors and social-ecological traps in Pampean streams (Argentina): a conceptual model. *Science of The Total Environment*, 142785. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142785
- Griboff, J., Horacek, M., Wunderlin, D. A., y Monferran, M. V. (2018). Bioaccumulation and trophic transfer of metals, As and Se through a freshwater food web affected by anthropic pollution in Córdoba, Argentina. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 275-284.

- Guasch, H., Ginebreda, A., y Geiszinger, A. (Eds.). (2012). Emerging and priority pollutants in rivers: bringing science into river management plans (Vol. 19). *Springer Science y Business Media*.
- Guasch, H., Bonet, B., Bonnineau, C., y Barral, L. (2017). Microbial biomarkers. *Microbial ecotoxicology*, 251-281.
- Guerrieri, N., Fantozzi, L., Lami, A., Musazzi, S., Austoni, M., Orrù, A., ... y Scaglioni, L. (2022). *Biofilm* and Rivers: The Natural Association to Reduce Metals in Waters. *Toxics*, 10(12), 791.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., y Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University press*.
- Holt, E. A., y Miller, S. W. (2011). Bioindicators: using organisms to measure. *Nature*, 3, 8-13.
- Horton, A. A., Fairhurst, S., y Bus, J. S. (1987). Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 18(1), 27-79.
- Hou, J., You, G., Xu, Y., Wang, C., Wang, P., Miao, L., ... y Yang, Y. (2016). Antioxidant enzyme activities as biomarkers of fluvial *biofilm* to ZnO NPs ecotoxicity and the Integrated Biomarker Responses (IBR) assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 10-17.
- Hua, X., Huang, X., Tian, J., Dong, D., Liang, D., y Guo, Z. (2019). Migration and distribution of cadmium in aquatic environment: The important role of natural *biofilms*. *Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.246
- Huang, C. T., Xu, K. D., McFeters, G. A., y Stewart, P. S. (1998). Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and *biofilms* in response to phosphate starvation. *Applied and environmental microbiology*, 64(4), 1526-1531.
- Iheanacho, S. C., y Odo, G. E. (2020). Dietary exposure to polyvinyl chloride microparticles induced oxidative stress and hepatic damage in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(17), 21159-21173.
- INDEC. (2022). *Censo nacional de población, hogares y viviendas 2022*. Instituto Nacional de Estadística y Censos. <https://www.indec.gob.ar>
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) (2008) Calidad ambiental-Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. Norma N°29112/2008
- Jakubowski, W., y Walkowiak, B. (2015). Resistance of oxidative stress in *biofilm* and planktonic cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 300-308.
- Jasim, B. M. (2017). Impact of certain heavy metals on histology and physiology of fishes: Interpretative study. *Annual Research y Review in Biology*, 19(6), 1-21.

- Juárez A. (2017). Microalgas como modelo biológico en estudios de contaminación ambiental: efecto de herbicidas y antibióticos sobre la fisiología, morfología, ultraestructura y parámetros de estrés oxidativo. En: Menone M. y Pérez D. (eds.) *Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental*. P 9-31. ISBN: 978-987-544-756-1.
- Juncos, R., Arcagni, M., Squadrone, S., Rizzo, A., Arribére, M., Barriga, J. P., ... y Guevara, S. R. (2019). Interspecific differences in the bioaccumulation of arsenic of three Patagonian top predator fish: Organ distribution and arsenic speciation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 168, 431-442.
- Kravetz, S., Rodriguez Castro, M. C., Vilches, C., Huta, F., y Giorgi, A. D. N. (2023). Hongos y algas como indicadores de la calidad del agua de un arroyo urbano. *Asociación Argentina de Ecología; Ecología Austral*; 33; 2; 8-2023; 567-582.
- Kuczynski, D. (2016). New records of pathogenic bacteria from urban rivers in Argentina. *Journal of Tropical Life Science*, 6(3), 94925.
- Kumar, R., y Banerjee, T. K. (2014). Estimation of Arsenic Toxicity by Analysis of Certain Marker Enzymes of the Air-Breathing Catfish *Clarias batrachus* (Linn.). *CLEAN–Soil, Air, Water*, 42(5), 690-695.
- Kumar, V. S., Sarkar, D. J., Das, B. K., Samanta, S., Tripathi, G., Sarkar, S. D., y Nag, S. K. (2025). Utilizing microalgae *biofilm* for reducing arsenic toxicity on fish grown in contaminated waters: An innovative solution for safer and cleaner aquaculture in arsenic endemic areas. *Aquaculture*, 599, 742121.
- Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A. K., Ahsan, J., Ghosh, A. K., Wang, H., y DeBoeck, G. (2016). Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), 43–64. doi:10.1007/s10311-016-0588-9
- Kwong, R. W., y Niyogi, S. (2012). Cadmium transport in isolated enterocytes of freshwater rainbow trout: Interactions with zinc and iron, effects of complexation with cysteine, and an ATPase-coupled efflux. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 155(2), 238-246.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C. S., Simoniello, M. F., Colussi, C. L., ... y Sigrist, M. (2019). First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5(10).
- Lam, P. K. S. (2009). Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean y Coastal Management*, 52(7), 348–354. doi:10.1016/j.ocecoaman.2009
- Li, C., Li, P., Tan, Y. M., Lam, S. H., Chan, E. C., y Gong, Z. (2016). Metabolomic characterizations of liver injury caused by acute arsenic toxicity in zebrafish. *PLoS One*, 11(3), e0151225.
- Licursi, M., Gómez, N., y Bauer, D. E. (2021). Contaminación en cuerpos de agua de la cuenca del río Luján: fuentes y efectos sobre la biota acuática. *Ecotoxicología y Ambiente*, 15(1), 55-70.

- Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., y Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013(1), 321213.
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire*, Vol. 154, No. 6, 427-430 ref. 43.
- Lompré, J. S., Giarratano, E., Gil, M. N., Bertrand, L., y Malanga, G. (2023). Oxidative stress response of scallop *Aequipecten tehuelchus* from Patagonia Argentina exposed to inorganic arsenic. *Regional Studies in Marine Science*, 62, 102944. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.102944>.
- López, O. C. F., Duverne, L. B., Mazieres, J. O., y Salibián, A. (2013). Microbiological pollution of surface water in the upper-middle basin of the Reconquista river (Argentina): 2010-2011 monitoring. *International Journal of Environment and Health*, 6(3), 276. doi:10.1504/ijenvh.2013.054087
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. Y Randal R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lucinda, P. H. (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon* garman, 1895 (cyprinodontiformes: poeciliidae: poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3, 259-270.
- Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Torous, I. M., Nazarchuk, T. Y., Storey, K. B., y Lushchak, V. I. (2009a). Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. *Chemosphere*, 75(1), 56–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.05
- Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Lozinsky, O. V., Storey, J. M., Storey, K. B., y Lushchak, V. I. (2009b). Chromium(III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. *Aquatic Toxicology*, 93(1), 45–52. doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.007
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Macirella, R., Curcio, V., Ahmed, A. I., Talarico, F., Sesti, S., Paravani, E., ... y Brunelli, E. (2023). Morphological and functional alterations in zebrafish (*Danio rerio*) liver after exposure to two ecologically relevant concentrations of lead. *Fishes*, 8(7), 342.
- Magellan, K., Barral-Fraga, L., Rovira, M., Srean, P., Urrea, G., García-Berthou, E., y Guasch, H. (2014). Behavioural and physical effects of arsenic exposure in fish are aggravated by aquatic algae. *Aquatic Toxicology*, 156, 116–124. doi:10.1016/j.aquatox.2014.08.006
- Maggioni, T., Hued, A. C., Monferrán, M. V., Bonansea, R. I., Galanti, L. N., y Amé, M. V. (2012). Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution in the Middle-Lower Basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(3), 337–353. doi:10.1007/s00244-012-9785-0

- Mandal, B. K., y Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: A review. *Talanta*, 58(1), 201-235.
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0)
- Marcovecchio, J. E. (2004). The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as bioindicators of heavy metals pollution in La Plata river estuary, Argentina. *Science of the Total Environment*, 323(1-3), 219-226. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.09.029
- Margalef, R (1951). Diversidad de Especies en las Comunidades Naturales. Publicaciones del Instituto de Biología Aplicada., 9, 5–27.
- Mastrángelo, M. M., Valdés, M. E., Eissa, B., Ossana, N. A., Barceló, D., Sabater, S., ... y Giorgi, A. D. N. (2022). Occurrence and accumulation of pharmaceutical products in water and biota of urban lowland rivers. *Science of the Total Environment*, 828, 154303.
- McComb, R. B., Bowers Jr, G. N., y Posen, S. (2013). Alkaline phosphatase. *Springer Science y Business Media*.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., y Salibián, A. (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 6-9.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., y Salibián, A. (2015). Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 236-241.
- Mishra, S., Huang, Y., Li, J., Wu, X., Zhou, Z., Lei, Q., ... y Chen, S. (2022). Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. *Chemosphere*, 294, 133609.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133609>.
- Molero A. M. y Pisanó A. (1987). Estadíos de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 47, 115–125.
- Morales, G. C. (Ed.). (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. *International Development Research Centre (IDRC)*.
- Moussa, M. A., Mohamed, H. R. H., y Abdel-Khalek, A. A. (2022). The antioxidant defense capacities and histological alterations in the livers and gills of two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*, as indicative signs of the Batts drain pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(47), 71731-71741.
- Nader, G. M., Proaño, P. S., y Cicerone, D. S. (2013). Water quality assessment of a polluted urban river. *International Journal of Environment and Health*, 6(4), 307-319.
- Nishida, Y. (2011). The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 142, 375-384.
- Oakes, K. D., y Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 447-463.

- Ohkawa, H., Ohishi, N., y Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Okwuosa, O. B., Eyo, J. E., y Omovwohwovie, E. E. (2019). Role of fish as bioindicators: A Review. *Iconic Research And Engineering Journal*, 2(11), 1456-8880.
- Oremland, R. S., y Stolz, J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621), 939-944.
- Ossana N A (2011). Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires (UBA).
- Ossana, N. A., Castañé, P. M., y Salibián, A. (2013). Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista river (Argentina). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 65, 486-497.
- Ossana, N. A., Eissa, B. L., Baudou, F. G., Castañé, P. M., Soloneski, S., y Ferrari, L. (2016). Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 73-81.
- Painefilú, J. C., Pascual, M. M., Bieczynski, F., Laspoumaderes, C., González, C., Villanueva, S. S. M., y Luquet, C. M. (2019). Ex vivo and in vivo effects of arsenite on GST and ABCC2 activity and expression in the middle intestine of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 108566. doi:10.1016/j.cbpc.2019.108566
- Palacio M.J. (2020). Distintas poblaciones de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a un contaminante emergente: biomarcadores bioquímicos y del metabolismo intermediario. Tesis de grado, Universidad Nacional de Luján (UNLu).
- Pandey, P. K., y Kumar, V. S. (2022). *Biofilm* in aquaculture production. In *Advances in fisheries biotechnology* (pp. 401-422). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Parmar, T. K., Rawtani, D., y Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in life science*, 9(2), 110-118.
- Pei, J., Zuo, J., Wang, X., Yin, J., Liu, L., y Fan, W. (2019). The bioaccumulation and tissue distribution of arsenic species in tilapia. *International journal of environmental research and public health*, 16(5), 757.
- Peluso, L., Bulus Rossini, G., Salibián, A., y Ronco, A. (2013). Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 5993-6002.
- Pérez-Iglesias, J. M., Bach, N. C., Colombetti, P. L., Acuña, P., Colman-Lerner, J. E., González, S. P., Brodeur, J. C., y Almeida, C. A. (2023). Biomonitoring of Alterations in Fish That Inhabit Anthropic Aquatic Environments in a Basin from Semi-Arid Regions. *Toxics*, 11(1), 73. <https://doi.org/10.3390/toxics11010073>
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of theoretical biology*, 13, 131-144.

- Pottinger, T. G., y Calder, G. M. (1995). Physiological stress in fish during toxicological procedures: a potentially confounding factor. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10(2), 135-146.
- Pu, Y., Ngan, W. Y., Yao, Y., y Habimana, O. (2019). Could benthic *biofilm* analyses be used as a reliable proxy for freshwater environmental health? *Environmental Pollution*, 252, 440-449.
- Puntoriero, M. L., Volpedo, A. V., y Fernández Cirelli, A. (2014). Arsenic, fluoride, and vanadium in surface water (Chasicó Lake, Argentina). *Frontiers in Environmental Science*, 2, 23.
- Puntoriero, M. L., Cirelli, A. F., y Volpedo, A. V. (2015). Geochemical mechanisms controlling the chemical composition of groundwater and surface water in the southwest of the Pampean plain (Argentina). *Journal of Geochemical Exploration*, 150, 64-72.
- Puntoriero, M. L., Fernández Cirelli, A., y Volpedo, A. V. (2018). Histopathological changes in liver and gills of *Odontesthes bonariensis* inhabiting a lake with high concentrations of arsenic and fluoride (Chasicó Lake, Buenos Aires province). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(1), 69-77. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.01.06>
- Qiu, D., Yu, Z., Zhang, X., Wen, C., y Yan, C. (2024). Influence of extracellular polymeric substances on arsenic bioaccumulation and biotransformation in *biofilms*. *Chemosphere*, 349, 140798. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140798>.
- Rigacci, L. N., Giorgi, A. D., Vilches, C. S., Ossana, N. A., y Salibián, A. (2013). Effect of a reservoir in the water quality of the Reconquista River, Buenos Aires, Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 9161-9168.
- Rigacci L. N. (2019). Análisis de la capacidad de depuración de la represa ing. Roggero, Buenos Aires (Argentina). Tesis doctoral, Universidad Nacional del Comahue (UNCOMA).
- Rodríguez Castro, M. C., Urrea, G., y Guasch, H. (2015). Influence of the interaction between phosphate and arsenate on periphyton's growth and its nutrient uptake capacity. *Science of the total environment*, 503, 122-132.
- Rodríguez Castro, M. C., Marcó P, L., Ranieri, M. C., Vázquez, C., y Giorgi, A. (2017). Arsenic in the health of ecosystems: spatial distribution in water, sediment and aquatic biota of Pampean streams. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189, 1-12.
- Roeselers, G., Loosdrecht, M. V., y Muyzer, G. (2008). Phototrophic *biofilms* and their potential applications. *Journal of applied phycology*, 20, 227-235.
- Romaní, A. M., y Sabater, S. (1999). Epilithic ectoenzyme activity in a nutrient-rich Mediterranean river. *Aquatic Sciences*, 61, 122-132.
- Romaní, A. M., Fischer, H., Mille-Lindblom, C., y Tranvik, L. J. (2006). Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, 87(10), 2559-2569.

- Romaní, A. M., Guasch, H., y Balaguer, M. D. (2016). *Aquatic biofilms. Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment Caister. Norfolk, UK: Academic Press.*
- Rosso, J. J., Troncoso, J. J., y Fernández Cirelli, A. (2011). Geographic distribution of arsenic and trace metals in lotic ecosystems of the Pampa Plain, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 129-132.
- Roux, C., Madru, C., Navarro, D. M., Jan, G., Mazzella, N., Moreira, A., ... y Morin, S. (2024). Impact of urban pollution on freshwater *biofilms*: Oxidative stress, photosynthesis and lipid responses. *Journal of Hazardous Materials*, 472, 134523.
- Roy, B., Maitra, D., Sarkar, S., Podder, R., Das, T., Ghosh, J., y Mitra, A. K. (2024). *Biofilm* and metallothioneins: A dual approach to bioremediate the heavy metal menace. *Environmental Quality Management*, 33(4), 659–676. <https://doi.org/10.1002/tqem.22139>
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C., y Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The *biofilm* as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1425–1434. doi:10.1007/s00216-006-1051-8
- Sager, E., Scarcia, P., Marino, D., Mac Loughlin, T., Rossi, A., y de La Torre, F. (2022). Oxidative stress responses after exposure to triclosan sublethal concentrations: An integrated biomarker approach with a native (*Corydoras paleatus*) and a model fish species (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85(7), 291-306.
- Salibián, A. (2006). Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 35-65.
- Salibián A. (2014). Los fármacos como contaminantes emergentes de los ambientes acuáticos. *Revista Farmacéutica Reviews* (Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, Argentina) 156 (1/2), pp. 76-92. ISSN 0034-9496
- Satapute, P., Paidi, M. K., Kurjogi, M., y Jogaiah, S. (2019). Physiological adaptation and spectral annotation of Arsenic and Cadmium heavy metal-resistant and susceptible strain *Pseudomonas taiwanensis*. *Environmental pollution*, 251, 555-563.
- Schenone, N., Volpedo, A. V., y Cirelli, A. F. (2007). Trace metal contents in water and sediments in Samborombón Bay wetland, Argentina. *Wetlands Ecology and Management*, 15, 303-310.
- Schulte, P. M. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *Journal of Experimental Biology*, 217(1), 23-34.
- Sevak, P., y Pushkar, B. (2024). Arsenic pollution cycle, toxicity and sustainable remediation technologies: A comprehensive review and bibliometric analysis. *Journal of Environmental Management*, 349, 119504.

- Shahjahan, M., Taslima, K., Rahman, M. S., Al-Emran, M. D., Alam, S. I., y Faggio, C. (2022). Effects of heavy metals on fish physiology – a review. *Chemosphere*, 300, 134519. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134519>.
- Shannon, C.E. y Weaver W. (1949). The mathematical theory of communication. *Science*. 185:27–39
- Shi, X., Xu, W., Che, X., Cui, J., Shang, X., Teng, X., y Jia, Z. (2023). Effect of arsenic stress on the intestinal structural integrity and intestinal flora abundance of *Cyprinus carpio*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1179397. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1179397>
- Silva Busso, A. (2010). Geología, hidrología e hidrogeología en la cuenca del río Luján. *Información ambiental de la cuenca del río Luján*, 97-122.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148), 688-688.
- Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H., y Follstad Shah, J. J. (2009). Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature*, 462(7274), 795-798.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., y Svobodova, Z. (2009). REVIEWS Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*, 30(1), 2.
- Smedley, P. L., y Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517-568.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., y Blust, R. (2004). Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution*, 129(1), 99-112.
- Sørensen, T. (1948). A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Biol Skrifter/Kongelige Danske Videnskabernes Selskab.*, 5, 1.
- Spagnoli, S., Lawrence, C., y Kent, M. L. (2016). Stress in fish as model organisms. In *Fish Physiology* (Vol. 35, pp. 541-564). Academic Press.
- Streble, H., y Krauter, D. (1987). Atlas de los microorganismos de agua dulce: la vida en una gota de agua: libro de clasificación con 1700 ilustraciones. Omega.
- Tiscornia, G., Laporta, P., y Forte, M. (2017). Estudio de la presencia de arsénico en aguas subterráneas y superficiales en la cuenca del río Reconquista. *Acta Hidrológica Latinoamericana*, 25(4), 332-341.
- Torremorell, A. M., Mastrángelo, M. M., Padulles, M. L., Rodríguez Castro, C., Vilches, C, Hegoburu, C, Riva, P., Sánchez Caro, A., Zunino, E., Mauad, M., Vega, B., Rocha, L., Poretti, T, Casset M. A., Camilli, E., Pighin, A. y Giorgi A. (2022). Río Luján: Deterioro de la calidad del agua desde sus nacientes, p. 145-150. En: Bohn, V., Díaz, M. S., Estrada, V. G., Martínez, A. M., Piccolo, M. C. y Siniscalchi A. G. (eds.): *XI Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos. Libro digital*. Universidad Nacional del Sur. ISBN: 978-987-1648-45-0.

- Tripoli, L. I. (2024). Estudio de la histología hepática del pez de agua dulce *Cnesterodon decemmaculatus* (Teleostei, Cyprinodontiformes) provenientes de ambientes con disímil grado de contaminación. Tesis de grado, Universidad Nacional de Luján (UNLu).
- Tufo, A. E., Vázquez, S., Porzionato, N. F., Grimalizzi, M. C., Prados, M. B., Sica, M., y Curutchet, G. (2021). Contamination alters the physicochemical and textural characteristics of clays in the sediments of the Peri urban Reconquista river, affecting the associated indigenous microorganisms. *Minerals*, 11(3), 242.
- Tuulaikhuu, B.-A., Bonet, B., y Guasch, H. (2016). Effects of low arsenic concentration exposure on freshwater fish in the presence of fluvial *biofilms*. *Science of The Total Environment*, 544, 467–475. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.126
- UICN – International Union for Conservation of Nature. Red List available online: www.iucnredlist.org.
- Van der Oost, R., Beyer, J., y Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Verslycke, T., Roast, S. D., Widdows, J., Jones, M. B., y Janssen, C. R. (2004). Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 306(1), 1-16.
- Vilches, C., Casco, M. A., y Giorgi, A. (2016). El perifiton como indicador de contaminación difusa: el caso de la cuenca superior del río Reconquista (Buenos Aires, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 51(4), 579-595.
- Villaamil Lepori, E. C., Saez, J. M., y Álvarez, A. (2020). Oxidative stress biomarkers in native freshwater fish exposed to arsenic: Implications for ecotoxicology in South America. *Environmental Pollution*, 261, 114148.
- Walker, C.H., Sibly, R.M., Sibly, R.M., y Peakall, D.B. (2012). Principles of Ecotoxicology (4th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11767>
- Walker, C. (2014). Ecotoxicology: effects of pollutants on the natural environment. CRC Press.
- Wang, Z. Q., Li, Y. B., Tan, X. P., He, W. X., Xie, W., Megharaj, M., y Wei, G. H. (2017). Effect of arsenate contamination on free, immobilized and soil alkaline phosphatases: activity, kinetics and thermodynamics. *European Journal of Soil Science*, 68(1), 126-135.
- Wang, Y., Ezemaduka, A. N., Li, Z., Chen, Z., y Song, C. (2017). Joint toxicity of arsenic, copper and glyphosate on behavior, reproduction and heat shock protein response in *Caenorhabditis elegans*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 98, 465-471.
- Whitehead, A., Clark, B. W., Reid, N. M., Hahn, M. E., y Nacci, D. (2017). When evolution is the solution to pollution: Key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evolutionary applications*, 10(8), 762-783.

- Yin, H., Xu, L., y Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111(10), 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Young, B. J., Cristos, D. S., Crespo, D. C., Somoza, G. M., y Carriquiriborde, P. (2020). Effects of 17 α -ethinylestradiol on sex ratio, gonadal histology and perianal hyperpigmentation of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) during a full-lifecycle exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111176.
- Zambrano, M. J., Rautenberg, G. E., Bonifacio, A. F., Filippi, I., Amé, M. V., Bonansea, R. I., y Hued, A. C. (2018). Effects of water quality on aspects of reproductive biology of *Cnesterodon decemmaculatus*. *Science of the Total Environment*, 645, 10-21.
- Zar, J. H. (2010). Biostatistical analysis pearson prentice-hall. *Upper Saddle River, NJ*.
- Zhang, W., Wang, Y., Lee, O. O., Tian, R., Cao, H., Gao, Z., ... y Qian, P. Y. (2013). Adaptation of intertidal *biofilm* communities is driven by metal ion and oxidative stresses. *Scientific reports*, 3(1), 3180.
- Zhang, J., Tan, Q. G., Huang, L., Ye, Z., Wang, X., Xiao, T., ... y Yan, B. (2022). Intestinal uptake and low transformation increase the bioaccumulation of inorganic arsenic in freshwater zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*, 434, 128904. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128904>
- Zheng, J. L., Luo, Z., Zhu, Q. L., Hu, W., Zhuo, M. Q., Pan, Y. X., ... y Chen, Q. L. (2015). Different effect of dietborne and waterborne Zn exposure on lipid deposition and metabolism in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquatic Toxicology*, 159, 90-98.