

Análisis cinético de biosensores acuáticos para un monitoreo ecotoxicológico temprano

¹Pamela Olivares-Ferretti, ¹Viviana Chávez, ²Matías Peredo-Parada, ^{1,3*}Jorge Parodi

¹Laboratorio de Investigación y Educación Biosocial Tonalli Ltda., Temuco, Chile.

²Plataforma de Investigación en Ecohidrología y Ecohidráulica, Ecohyd Ltda., Ñuñoa, Chile.

³Universidad Autónoma de Chile, Temuco, Chile.

*Jorge Parodi

Universidad Autónoma de Chile, Departamento de análisis de Datos, Temuco, Chile

jorge.parodi@uautonoma.cl

Jorge Parodi ORCID: 0000-0002-9117-5433

Pamela Olivares-Ferretti ORCID: 0000-0001-5759-3271

Título corto: Cinética de biosensores y ecotoxicología

Resumen

El uso de biosensores, como *Daphnia magna*, es clave para evaluar efectos tóxicos en cuerpos de agua superficiales continentales. Sin embargo, adolece de una metodología que no se ha revisado en décadas, lo que requiere tiempo y recursos, reduciendo así su efectividad. Nos propusimos evaluar el uso de parámetros cinéticos, como un indicador temprano y remoto en estudios ecotoxicológicos. Nuestros resultados indican que valores como la VCL, VSL y VAP se redujeron en más de un 50% al usar un compuesto tóxico disuelto en agua, como lo es el peróxido de hidrógeno; la motilidad total también disminuyó en un 50% al emplear este compuesto, pudiendo determinar una DL50 de 0,5 mM para dicho compuesto, relacionada con la CI50 de 0,7 mM para la motilidad. Al utilizar diversos compuesto, como nanomateriales, peróxido de hidrógeno, formalina y extracto de *Didymosphenia geminata*, pudimos determinar CI50 en los parámetros cinéticos, los cuales tuvieron un coeficiente de Pearson de 0,7 con las DL50 determinadas para las diferentes condiciones. Estos resultados sugieren que el estudio cinético tiene una relación directa con la mortalidad a las 24 horas y puede ser utilizado para estudios más rápidos de ecotoxicología y de forma remota en el futuro.

Palabras claves: Biosensores; *Daphnia magna*; Ecotoxicidad; Prevención; Viabilidad

Kinetic analysis of aquatic biosensors for early ecotoxicology monitoring

Abstract

The use of biosensors, such as *D. magna*, is key to assess toxic effects in inland surface water bodies. However, it suffers from a methodology that has not been reviewed for decades, which takes time and resources, reducing its timeliness. We set out to evaluate the use of kinetic studies as an early and remote indicator for the study of ecotoxicology tests. Our results indicate that parameters such as VCL, VSL and VAP were reduced by more than 50% when using a toxic compound dissolved in water, such as hydrogen peroxide, total motility was reduced by 50% also when using this compound and an LD50 of 0.5 mM for this compound could be determined, which was related to the CI50 of 0.7 mM for motility with this compound. When using different compounds, such as nanomaterial, hydrogen peroxide, formalin, and glucose, it was possible to determine CI50 in the kinetic parameters, which had a Pearson's coefficient of 0.7 with the LD50 determined for the different conditions. These results suggest that the kinetic study has a direct relationship with the mortality at 24 hrs and can be used for more rapid ecotoxicology and remote studies in the future.

Key Words: Biosensors; *Daphnia magna*; Ecotoxicity; Prevention; Viability

Introducción

La norma que regula las descargas de residuos líquidos, exige la ejecución de estudios de ecotoxicología para evaluar si los compuestos derramados o liberados al ambiente puedan tener efectos sobre los cuerpos de aguas. Para esto, se utilizan sistemas de biosensores, que corresponden a modelos biológicos sensibles a la contaminación ambiental. En el caso de sistemas de agua dulce, se emplea *Daphnia magna* y para sistemas de agua salada se usa *Artemia salina*.

Los bioensayos o pruebas de ecotoxicidad son herramientas útiles para determinar las concentraciones a las que algún elemento o compuesto genera respuestas negativas en organismos, lo que potencialmente puede representar problemas ambientales (Silva et al. 2003). Dado que la respuesta biológica es compleja y constituye la integración de distintos factores que pueden ser antagónicos y/o sinérgicos, el uso de bioensayos ha sido fuertemente recomendado para obtener una estimación más directa e integrada de la toxicidad ambiental (Ferrari et al., 1999).

Diversos estudios con bioensayos se han sido utilizados para evaluar la toxicidad ambiental de diferentes contaminantes, como: metales pesados (Oliver et al., 2003; Madoni & Romeo, 2006), petróleo crudo (Alayo & Iannaccone, 2002) y pesticidas (Gustavson et al., 2000), determinados tanto en ambientes terrestres (Bierkens et al., 1998), marinos (Silva et al., 2003; Bellas et al., 2008), de agua dulce (Mkandawire, 2014) y sedimentarios (Ahlf et al., 2002).

A nivel internacional, se han estandarizado distintos protocolos de bioensayos para realizar evaluaciones toxicológicas (EPA, 1988; EPA, 1994; OCDE, 2003). En Chile, el Instituto Nacional de Normalización (INN) estableció el protocolo de bioensayo con las especies de *Daphnia* sp. y *Artemia* sp. (NCh 2083 of. 1999; protocolos de bioensayos de US EPA 2002).

Nuestros trabajos previos nos han permitido realizar análisis cinéticos a muy bajo costo, utilizando imágenes de video (Parodi et al 2021; Parodi 2017). Recientemente, mediante esta tecnología, pudimos evaluar el efecto de aguas con presencia de *Didymosphenia geminata* con estos parámetros, como reporteros de viabilidad (Olivares et al 2015).

Proponemos el uso de estudios cinéticos

tempranos y agudos como una forma de estimar los efectos en la viabilidad de los biosensores y permitir, de forma temprana, sugerir alteraciones en las fuentes de agua o realizar un monitoreo que posibilite una intervención temprana. Hemos validado nuestros protocolos para poder proporcionar una evaluación rápida de la toxicidad de diversos cuerpos de aguas. Esto nos permite considerar la transferencia de estas metodologías a empresas, con sistemas de monitoreo remoto que les permita tomar decisiones en tiempos más breves sobre las acciones que puedan afectar sus procesos productivos en las masas de agua que utilizan. La información presentada resume estas evaluaciones y nos permite proponer un sistema innovador, en el cual las alteraciones tempranas en la cinética se relacionan con la viabilidad de los biosensores de manera tardía.

Metodología

Mantenimiento de *Daphnia magna*

Los especímenes *D. magna* se manipularon de acuerdo con la norma NCh 2083:1999, manteniendo una temperatura constante de 16° C y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. El agua de cultivo para *D. magna* se preparó con 25 ml de solución salina (cloruro de calcio: 11,76 gr/L; sulfato de magnesio: 4,93 gr/L; bicarbonato sódico: 2,59 gr/L; cloruro de potasio: 0,23 gr/L), y se completó hasta 1.000 mL con agua filtrada destilada. Finalmente, el agua se aireó durante 24 horas antes de su uso. La densidad de cultivo aumentó de 10 a 15 organismos de *D. magna* por 200 mL de agua. Se colectaron neonatos y se sembraron 10 individuos por envase en 3 réplicas. Se mantuvieron las condiciones a 15 °C durante el experimento y se evaluaron las formas inmóviles como vivas después de 24 horas.

Ensayos cinéticos

Las formas de copepoditos se colectaron después de la eclosión y se observó su cinética durante un periodo de 5 días, en ausencia y presencia del compuesto. De 3 a 5 individuos fueron colocados en placas de plástico con agua aireada, en un volumen de 10 mL de agua de cultivo. Posteriormente, se transfirieron a un sistema de captura video y se registraron sus movimientos durante 2 minutos en la ausencia o presencia del compuesto, utilizando un estereomicroscopio

digital Crenova con un aumento de 10x. Los videos se digitalizaron con el programa Microcapture Pro. El análisis de los videos se realizó con el programa ImageJ, usando el complemento de CASA modificado. Se realizó un registro de la movilidad de la biomasa con los parámetros cinéticos, para posteriormente compáralos con el control.

Compuestos

Las *D. magna* se enfrentaron a cuatro compuestos: de peróxido de hidrogeno a 0,1 mM, de formalina a 100 ppm obtenida desde una solución al 37% usada para el control de hongos en peces de pisciculturas de agua dulce, de un extracto de *D. geminata* a una concentración de 50 ppm y de ácido gálico a una concentración de 10 ppm.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando el programa GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.). Los datos fueron ordenados y

tratados con pruebas estadísticas de normalidad, con una prueba de ANOVA de dos vías y un post test de Bonferroni. En los gráficos se presentó el promedio \pm SEM, considerando un $P < 0,5$ como significativo. La correlación de los datos se estimó por regresión simple utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

Viabilidad

Las formas neonatas de *D. magna* fueron expuestas durante 24 horas a los diferentes compuestos, en concentraciones previamente descritas como DL50. Esto permitió observar las formas móviles como indicadores de viabilidad. Después de 24 horas, el 50% de las formas permanecieron móviles, lo que indica una reducción del 50% en la viabilidad en todas las condiciones, como se muestra en la Figura 1.

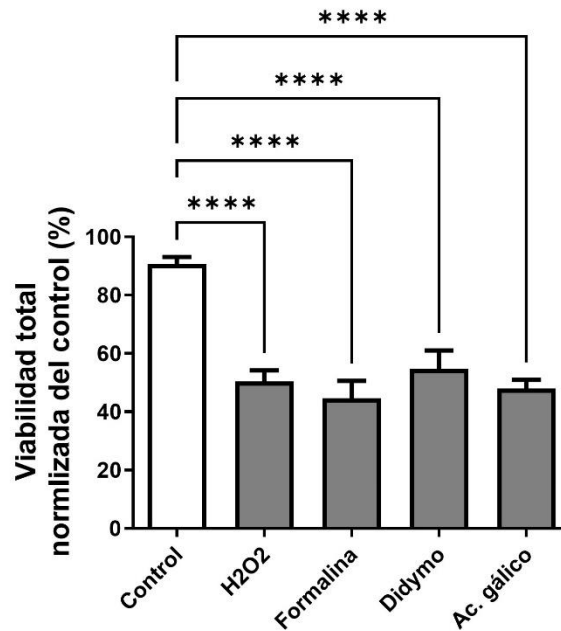


Figura 1. Gráfico de viabilidad de las formas neonatas de *D. magna*, expuestas 24 horas en agua de cultivo aireada, en las distintas condiciones. Las barras son representación de promedio \pm SEM.

Cinética

En las mismas condiciones mencionadas anteriormente, las formas adultas de *D. magna* fueron expuestas durante 5 minutos a los compuestos. Luego, se registró un video de sus movimientos y se analizaron los principales parámetros cinéticos. El

porcentaje de movilidad, se redujo en un 40% en todas las condiciones, mientras que la velocidad curvilínea (VCL) disminuyó en más del 50%. También se observaron alteraciones en la velocidad en línea recta (VSL) y la trayectoria promedio de velocidad (VAP), como se ilustra en la Figura 2.

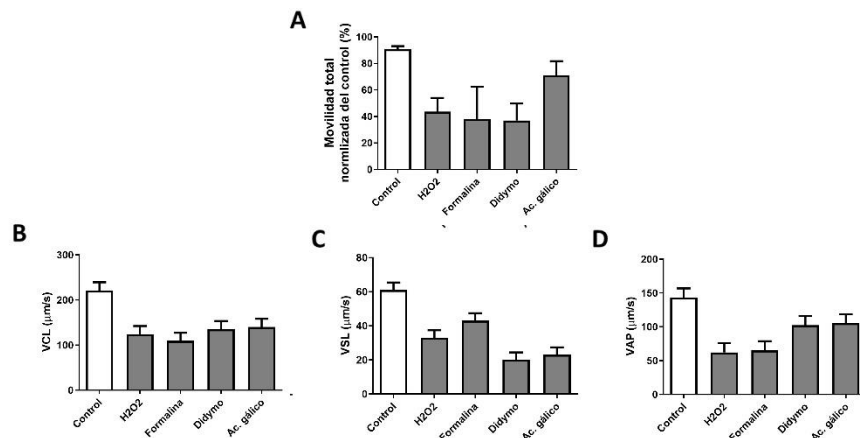


Figura 2. Gráfico de los cambios cinéticos de las formas neonatas de *D. magna*, expuestas 24 horas en agua de cultivo aireada, en las distintas condiciones. En A el valor del estudio de porcentaje de motilidad. Además de los valores cinéticos VCL (B), VSL (C) y VAP (D). Las barras son representación de promedio \pm SEM.

Correlación

Los datos de cinética y viabilidad se representaron en un gráfico de correlación. Se evaluó si los cambios cinéticos tenían una relación directamente proporcional con la viabilidad. En la Figura 3, se observa la relación entre la cinética y la viabilidad con los

diferentes compuestos. Se evidencia que a medida que la reducción en la cinética es mayor, la viabilidad disminuye. La Tabla 1 resume los valores de coeficiente de Pearson para las condiciones, mostrando una relación positiva entre los dos parámetros

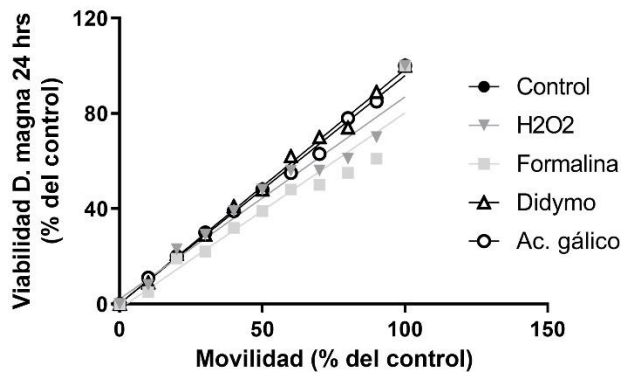


Figura 3. Correlación entre las mediciones movilidad total de las formas neonatas de *D. magna*, expuestas 24 horas en agua de cultivo aireada, en las distintas condiciones y la viabilidad. Los puntos son representación de promedio \pm SEM.

Tabla 1. Resumen del valor del Coeficiente de Pearson para las distintas condiciones en la relación movilidad y viabilidad.

Condición	Coefficiente Pearson
H2O2	0.9
Formalina	0.86
Didymo	0.78
Ac. gálico	0.87

Discusion

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que el análisis cinético de modelos de biosensores está directamente relacionados con la viabilidad de estos, ofreciendo una observación más eficiente en términos de costos y tiempo. Trabajos previos usando técnicas similares permitieron evaluar el impacto de componentes acuáticos, sobre células espermáticas, estableciendo una correlación entre su viabilidad y cambios en su cinética (Olivares et al 2015; Parodi et al 2021). Este enfoque también se aplicó para analizar los efectos de compuestos en el agua con la presencia de *D. geminata*, evidenciando cambios en la cinética y la viabilidad de estos bioreporteros. Asimismo, el modelo se empleó en la búsqueda de compuestos farmacológicos para el control de ectoparásitos, centrándose en cambios cinéticos agudos observables con esta técnica (Parodi et al 2021).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el análisis cinético guarda relación con la viabilidad. La exposición a concentraciones de DL50 resultó en una disminución tanto en la viabilidad (Figura 1) y como en la cinética (Figura 2). La correlación entre ambos aspectos, al ser evaluada, mostró una proporción directa con un coeficiente de Pearson superior a 0,5, según se presenta en la Figura 3 y la Tabla 1. Estos hallazgos indican que la observación rápida de la cinética de los biosensores puede indicar viabilidad, sugiriendo que a menor cinética, menor viabilidad.

No obstante, es importante señalar que las observaciones realizadas, tanto por nosotros y como por otros investigadores, señalan que elevados parámetros cinéticos también pueden conducir a la muerte de los biosensores, posiblemente asociados a cambios en la energía. Por lo tanto, realizar correlaciones con moléculas estimuladoras también deben ser consideradas para establecer una relación más robusta entre los valores de cinética y viabilidad.

Consideramos que las aplicaciones de este modelo son amplias en la industria. Especialmente en aquellas donde las descargas de compuestos son un problema logístico. La toma de muestras y el envío de las mismas para pruebas de viabilidad en una masa de formas neonatas, puede aumentar significativamente el tiempo de los ensayos.

Nuestro modelo basado en el análisis de videos y su cuantificación cinética, ofrece una oportunidad para las empresas que pueden enviar imágenes del movimiento para su análisis y recibir comentarios en horas para evaluar los efectos de sus descargas y determinar los pasos a seguir. Esperamos destacar este desarrollo a la industria y promover su aplicación incluso en ausencia de una normativa ambiental específica al respecto.

Conclusiones

Este estudio revela una correlación directa entre el análisis cinético de biosensores, utilizando *D. magna*, y su viabilidad, observando una disminución significativa en ambas características tras la exposición a concentraciones DL50 de los compuestos. La relación positiva respaldada por el coeficiente de Pearson sugiere que la cinética puede ofrecer una evaluación rápida de la salud de los biosensores. Aunque se requieren más investigaciones, este enfoque muestra prometedoras aplicaciones en la industria para el monitoreo ambiental de descargas de compuestos, facilitando análisis remotos para decisiones más ágiles en los procesos productivos. Este estudio sienta las bases para la potencial implementación de este enfoque, resaltando su utilidad en la gestión ambiental, incluso en ausencia de normativas específicas.

Agradecimientos

Agradecemos a Ecohyd por el acceso a muestra de agua, Tonalli Ltda, por el acceso a equipos y material biológico

Referencias

Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., & Ricking, M. (2002). A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality a German Approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *Journal of Soils and Sediments*, 2(1), 37-42.

Alayo, M., & Iannacone, J. (2002). Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, Diesel 2 y Diesel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (Rotifera: Monogononta). *Gayana (Concepción)*, 66(1), 45-58.

- Bellas, J., Saco-Álvarez, L., Nieto, Ó., & Beiras, R. (2008). Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo-larval bioassays. *Marine pollution bulletin*, 57(6), 493-502.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., Van Den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, R., & Schoeters, G. (1998). Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37(14), 2935-2947.
- Ferrari, B., Radetski, C. M., Veber, A. M., & Ferard, J. F. (1999). Ecotoxicological assessment of solid wastes: A combined liquid-and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(6), 1195-1202.
- Fuentes ME, Quiñones RA, Gutiérrez MH, Pantoja S. (2015) Growth and respiration of fungal species isolated from the coastal zone off Central-southern Chile. *Fungal Ecology* 13, 135-149
- Gustavson, K. E., Sonsthagen, S. A., Crunkilton, R. A., & Harkin, J. M. (2000). Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analyses. *Environmental Toxicology*, 15(5), 421-430.
- Holt, E.A. and Miller, S.W., 2011. Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*. 3: 8-13.
- Johnson TW, Sparrow FK (1961) Fungi in Oceans and Estuaries. J. Cramer, Weinheim
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E (1979) *Marine Mycology: The Higher Fungi*. Academic Press, New York
- Madoni, P., & Romeo, M. G. (2006). Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution*, 141(1), 1-7.
- Mkandawire, M., Teixeira da Silva, J. A., & Dudel, E. G. (2014). The Lemna bioassay: contemporary issues as the most standardized plant bioassay for aquatic ecotoxicology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 4(2), 154-197.
- NCh 2083. Of. 1999. Aguas – Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Instituto Nacional de Normalización, INN – Chile.
- OECD. 1993. *Daphnia* sp. acute immobilization test and reproduction test, Method 202, OECD Guidelines for Testing chemicals.
- Oliver, I., Alberto, J., & Alvaríño Flores, L. (2003). Efecto Ecotoxicológico agudo del Mercurio sobre Larvas del "Muy Muy" *Emerita analoga* (Stimpson)(Decapoda: Hippidae) procedentes de cuatro localidades de Lima. *Ecología Aplicada*, 2(1), 111-115.
- Pamela Olivares, Paola Orellana, Guillermo Guerra, Matías Peredo-Parada, Viviana Chavez, Alfredo Ramirez, Jorge Parodi: Water contaminated with *Didymosphenia geminata* generates changes in *Salmo salar* spermatozoa activation times. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 04/2015; DOI:10.1016/j.aquatox.2015.03.022
- Parodi, Jorge, Hernandez, Klaudia, Pizarro, María Olivares-Ferreti, Pamela & Sanchez, Rodrigo A low-cost screening system for kinetic analysis of *caligus rogercresseyi*; new focus on pharmacological study of caligidosis disease 2021, *Aquaculture Research*, 52 (11) <https://doi.org/10.1111/are.15447>
- Parodi, J., Guerra, G., Cuevas, M., Ramirez-Reveco, A., Romero, F., 2017. Effects of storage time on the motility, mortality and calcium levels of Atlantic salmon *Salmo salar* spermatozoa. *J Fish Biol* 90, 1506-1516.
- Silva, J., Torrejón, G., & Bay-Schmith, E. (2003). Calibration of the acute toxicity bioassay with *Daphnia pulex* (CRUSTACEA: CLADOCERA) using a reference toxicant. *Gayana (Concepc.)*, 67(1), 87-96.
- Vasseur, P., and Cossu-Leguille, C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28: 711-717.