



PROGRAMA DE INVESTIGACION EN ECOTOXICOLOGIA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJAN



Evaluación de la ecotoxicidad de una muestra de
lixiviado sobre el alga unicelular
Pseudokirchneriella subcapitata (ex*Selenastrum
capricornutum*)

Profesionales Participantes:

Dra. María Elena SAENZ

Dr. Walter DI MARZIO

Empresa Consultante: INDUSER Grupo Induser SRL

Octubre 2022



INDICE

| | Página |
|--|--------|
| Introducción | 4 |
| Ensayos de ecotoxicidad sobre el alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>) | 6 |
| Conclusiones | 15 |
| Bibliografía | 16 |



INTRODUCCION

Según el Plan de Trabajo acordado entre el Organismo Consultante, INDUSER Grupo Induser SRL y el PROGRAMA DE INVESTIGACION EN ECOTOXICOLOGIA (en adelante PRIET), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján en el presente *Informe* se reportan los resultados alcanzados en la evaluación de la ecotoxicidad de una muestra de lixiviado suministrada por Induser SRL. La misma arribó al PRIET en adecuadas condiciones de preservación y embalaje.

La muestra recibida estaba rotulada como se indica:

Protocolo Q355546 (barro de planta de lavado) muestra líquida lixiviado

Se realizaron ensayos con el alga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata* o *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente conocida como *Selenastrum capricornutum*) siguiendo los procedimientos descriptos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, US EPA.

De esta manera, los ensayos de inhibición de crecimiento utilizando como organismo de prueba la especie de alga *P. subcapitata*, se realizaron siguiendo la norma US EPA (2002), “US EPA - Test Method: Green Alga, *Selenastrum capricornutum*, Growth Test Method 1003.0” y los protocolos armonizados US EPA (1996). También se han incluido algunas consideraciones mencionadas en los procedimientos armonizados por US EPA, para la aplicación de ensayos de inhibición de crecimiento algal en US EPA (2012).

El ensayo de ecotoxicidad implica la exposición de un número representativo de ejemplares de la especie de prueba seleccionada, a una serie de concentraciones crecientes de la muestra a ser evaluada, en condiciones controladas del medio de cultivo, fotoperíodo y temperatura. La duración de la exposición es una variable que depende de la condición



aguda o crónica del ensayo y del ciclo de vida del organismo expuesto. Los ensayos de ecotoxicidad permiten evaluar los efectos de una exposición puntual al tóxico o muestra problema, durante un corto período de tiempo en relación con el ciclo de la vida de la población de prueba (entre 24 hs y pocos días). En el caso de *P. subcapitata* (ex *Selenastrum capricornutum*) de 4 días o 96 horas



ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO ALGAL CON *P. subcapitata* (ex *Selenastrum capricornutum*)

Objetivo de los ensayos

El objetivo de los ensayos ecotoxicológicos con algas dulceacuícolas consiste en determinar la inhibición del crecimiento de la especie de alga Clorofita *Selenastrum capricornutum*, actualmente denominada *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korschikov) Hindák 1990, ejercida por las muestras analizadas, en ensayos estáticos (sin renovación de medio) de 96 horas de duración (US EPA 1996; US EPA 2002; USEPA 2012). Para este fin, los organismos de prueba en crecimiento exponencial son cultivados en la muestra en condiciones controladas de laboratorio por un período de 96 horas. La respuesta de la población es medida en términos de cambios en densidad celular, contenido en clorofila “a” o absorbancia.

A pesar del corto período de tiempo de duración del ensayo, se realiza la evaluación del efecto sobre varias generaciones del organismo de prueba, debido a su alta tasa de crecimiento. Por esta razón es que los ensayos de inhibición de crecimiento algal son considerados evaluaciones de efectos crónicos ejercidas por la muestra analizada.

Las respuestas obtenidas, se utilizan con el fin de obtener datos de fitotoxicidad de las muestras sobre el organismo de prueba utilizado. La inhibición del crecimiento de una serie de cultivos algales ejercida por varias diluciones de la muestra se compara con el crecimiento medio de cultivos controles no expuestos. Con el fin de analizar la respuesta de los efectos ecotóxicos, los cultivos controles y tratados son mantenidos en condiciones óptimas de nutrientes, temperatura y luz continua, por un período de tiempo determinado. Al final del tiempo de exposición se realiza la evaluación de la biomasa en los cultivos controles y tratados. El crecimiento y la inhibición del crecimiento son cuantificados como biomasa algal en función del tiempo. La biomasa algal es determinada como número de células, pudiéndose realizar también otras determinaciones de la misma



mediante fluorescencia y densidad óptica, utilizando factores de conversión mediante la construcción de curvas de calibración.

Organismo de prueba utilizado

Los ensayos de inhibición del crecimiento algal se realizaron con la especie *Pseudokirchneriella subcapitata* CCAP 278/4 mediante la exposición de poblaciones de esta especie a una serie de diluciones de la muestra evaluadas. Esta especie pertenece a la División Chlorophyta, Clase Chlorophyceae Orden Chlorococcales, Familia Oocystaceae.

La cepa de *P. subcapitata* CCAP 278/4 fue adquirida originalmente de la colección de referencia internacional *Colección de Cultivos de Algas y Protozoos* (CCAP) del Institute of Freshwater Ecology, Reino Unido. Actualmente es mantenida en condiciones estériles en medios sólidos con agar, bajo condiciones controladas de luz y temperatura, en el cepario del Programa de Investigaciones en Ecotoxicología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján. Subcultivos de esta cepa en condiciones estériles son preservados viables en medios sólidos a 4 °C en heladera para su mantenimiento a largo plazo.

Descripción de las condiciones de aclimatación

Se iniciaron cultivos de aclimatación trasladando un repique desde los medios sólidos a medios nutritivos líquidos, en condiciones de esterilidad. Estos cultivos se mantuvieron en condiciones de laboratorio durante una semana, a partir de la cuál se iniciaron cultivos “madres”, mediante la transferencia de 1 ml de cultivo a 100 ml de medio nutritivo. La incubación de estos cultivos se realizó a una temperatura de 24 °C +/- 1°C, bajo luz blanco frío continua con una intensidad de 86 +/- 8,6 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y con agitación continua a 100 c.p.m. en una cámara agitadora orbital. Con el objetivo de mantener una población algal en activo crecimiento, se realizó la transferencia de 1 ml de cultivo a 100 ml de medio



nutritivo nuevo, en forma semanal. Todo el material utilizado y el medio nutritivo fue previamente autoclavado, y las transferencias se realizaron bajo condiciones estériles en una cámara de flujo laminar.

Se prepararon 4 (cuatro) soluciones nutritivas correspondientes a macronutrientes y 1 (una) solución de micronutrientes. El medio de cultivo se preparó agregando 1 ml de cada solución indicada en ese orden y llevando a 1 litro con agua Milli Q. Se realizó la agitación del medio y se ajustó el pH a 7,5 +/- 0,1. La concentración final de cada componente y cada elemento en el medio de cultivo se presenta en la Tabla 1. Posteriormente el medio se filtró a través de una membrana de tamaño de poro 0,45 µm en tren de vacío. El medio nutritivo así obtenido fue luego autoclavado a 121 °C y 1 atmósfera de presión.

Tabla 1. Concentraciones finales de macronutrientes y micronutrientes en el medio de cultivo

| Macronutrientes | Concentración (mg/L) | Elemento | Concentración (mg/L) |
|--|----------------------|----------|----------------------|
| NaNO ₃ | 25,5 | N | 4,20 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 12,2 | Mg | 2,90 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 4,41 | Ca | 1,20 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 14,7 | S | 1,91 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,04 | P | 0,186 |
| NaHCO ₃ | 15,0 | Na | 11,0 |
| | | K | 0,469 |
| | | C | 2,14 |
| Micronutrientes | | | |
| H ₃ BO ₃ | 185,0 | B | 32,5 |
| MnCl ₂ 4H ₂ O | 416,0 | Mn | 115,0 |
| ZnCl ₂ | 3,27 | Zn | 1,57 |
| FeCl ₃ 6H ₂ O | 160,0 | Fe | 33,1 |
| CoCl ₂ 6H ₂ O | 1,43 | Co | 0,354 |
| Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O | 7,26 | Mo | 2,88 |
| CuCl ₂ 2H ₂ O | 0,012 | Cu | 0,004 |
| Na ₂ EDTA2H ₂ O | 300 | -- | -- |
| Na ₂ SeO ₄ | 2,39 | Se | 0,91 |



Materiales utilizados

Se utilizaron Erlenmeyers de vidrio de 250 ml de capacidad previamente lavados y autoclavados, de manera de asegurar la ausencia de contaminación e interferencia proveniente de tanto sustancias orgánicas e inorgánicas, como de microorganismos. Estos recipientes fueron colocados en una cámara incubadora con agitación orbital marca “Forma” que permite el mantenimiento de las condiciones experimentales en forma homogénea, mediante control de temperatura, luz y agitación durante toda la duración del ensayo. La determinación de la intensidad lumínica fue estimada con un luxímetro. El material volumétrico utilizado para preparar las distintas diluciones fue autoclavado antes de su utilización. Tanto las pipetas como los tips de distinto volumen fueron autoclavados utilizando los distintos contenedores para tal fin (portapipetas, portatips autoclavables).

Determinación de biomasa y densidad celular

Para la determinación de la biomasa algal se utilizó el método fluorométrico, determinando el contenido en clorofila “a” *in vivo* de los cultivos, mediante un fluorómetro marca “Turner” M 700, utilizando lentes de emisión y excitación apropiados para tal fin.

La densidad celular se determinó mediante el conteo de células de una serie de diluciones de un cultivo de *P. subcapitata* utilizando una cámara de recuento de Neubauer. Se realizaron dos conteos por dilución de 400 células cada uno, en un microscopio marca Nikon Eclipse 6000. Se realizó una curva de calibración para obtener factores de conversión entre la densidad celular y la absorbancia a 750 nm de longitud de onda, mediante la lectura de una alícuota de las diluciones de los cultivos en un espectrofotómetro marca “Shimadzu”.

Preparación de las soluciones de prueba

De acuerdo con las indicaciones de US EPA (1996), US EPA (2002) y US EPA (2012), se realizaron ensayos a fin de determinar el rango de acción tóxica de las muestras



estudiadas. A partir de estos ensayos, se diseñaron ensayos que consistieron en diluciones en forma de una serie geométrica obtenida a partir de la aplicación de un factor de dilución de 0,5. Con anterioridad a la preparación de las distintas diluciones, se agregó 1 ml de cada una de las cinco soluciones utilizadas para preparar el medio nutritivo de mantenimiento, por litro de la muestra. Este procedimiento se realiza a fin de evitar los falsos negativos, debido a la baja concentración de nutrientes que pueden contener las muestras. De esta manera, se asegura que las distintas diluciones de las muestras contengan, al menos, la misma concentración de nutrientes que los cultivos controles (US EPA 2002). El medio de dilución utilizado en la preparación de las distintas proporciones de las muestras a evaluar fue el medio nutritivo utilizado en los cultivos de mantenimiento indicado en la Tabla 1, previamente autoclavado. Las distintas diluciones de las muestras así preparadas se fraccionaron colocando 100 ml de cada una en recipientes de 250 ml de capacidad. Los controles consistieron en 100 ml de medio nutritivo algal descrito con anterioridad. Tanto las diluciones de las muestras evaluadas como los controles se prepararon por cuadruplicado.

Preparación del inóculo

El inóculo algal se preparó 3 horas antes del inicio de los ensayos. El mismo se obtuvo a partir de cultivos algales de 4-7 días de edad. Los cultivos de esta edad aseguran que el 90 % de las células que constituye el cultivo se encuentran en activo crecimiento, resultando la población en fase de crecimiento exponencial. Esta fase es la óptima para el inicio de los ensayos debido al excelente estado fisiológico de las células.

Los cultivos algales se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos, a fin de concentrar las células para la preparación del inóculo. La densidad del inóculo fue preparada de manera tal de proveer una densidad inicial conocida en cada uno de los recipientes. La resuspensión de los pellets obtenidos fue realizada con medio nutritivo, obteniendo así el inóculo para su incorporación en cada uno de los recipientes controles y tratados.



Comienzo del ensayo

El ensayo comenzó al agregar 1 ml del inóculo algal preparado, a cada uno de los recipientes del ensayo. Antes del agregado del inóculo la suspensión algal fue agitada a fin de evitar la sedimentación de las células. En este momento se realizó las determinaciones turbiedad y contenido en clorofila “a” a fin de obtener las lecturas a tiempo cero. Cada uno de los tratamientos y los cultivos controles se realizaron por cuadruplicado. Luego de la inoculación, los recipientes se colocaron en la cámara incubadora con agitación orbital, de manera aleatoria, provista de iluminación.

Condiciones de incubación

La incubación se realizó bajo luz continua blanca fría con una intensidad de 86 +/- 8,6 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, a una temperatura de 24 °C +/- 1°C, y con agitación continua a 100 c.p.m. La posición de los recipientes en la cámara de cultivo fue cambiada aleatoriamente cada 24 horas, a fin de reducir las posibles diferencias espaciales en temperatura y fotoperíodo, si bien la cámara incubadora está diseñada para disminuir estas variaciones.

Finalización del ensayo

El ensayo fue finalizado luego de 96 horas de iniciado. Al final de este tiempo de incubación, se determinó la densidad celular y la biomasa algal según indicado con anterioridad. A partir de estos resultados se estimó el porcentaje de inhibición de crecimiento algal, de acuerdo con la expresión:

$$\% I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

donde:

C: número de células presente en los controles.

T: número de células presentes en cada tratamiento.



Análisis estadístico

Con el fin de analizar las diferencias observadas, se realizó un análisis de la varianza. Previamente, se realizaron los tests de normalidad de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas de Bartlett y Hartley. Cumplidas estas condiciones se realizó el test paramétrico de Dunnett a fin de analizar las diferencias observadas entre el crecimiento de las poblaciones algales controles y aquellas expuestas a la muestra. La estimación del CENO y CEO se realizó mediante Anova combinado con test de Dunnett. La CE25 y CE50 a las 96 horas de exposición y sus intervalos de confianza se calcularon de acuerdo con los métodos recomendados en US EPA (2002).

A continuación, se resumen las condiciones de realización de los ensayos, así como los criterios de aceptabilidad de los mismos:

RESUMEN DE LAS CONDICIONES DE ENSAYO Y LOS CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD PARA LOS ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO ALGAL CON *P. subcapitata*

1. Tipo de ensayo: Estático sin renovación
2. Duración del ensayo: 96 horas.
3. Temperatura: $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
4. Tipo de luz: "Cool-white".
5. Intensidad de luz: $86 \pm 8,6 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$
6. Fotoperíodo: luz continua
7. Tamaño de la cámara para ensayo: 250 mL.
8. Volumen de la solución para ensayo: 100 mL
9. Renovación de solución de ensayo: ninguna
10. Edad de los organismos para ensayo: 4 a 6 días



11. Número de organismos por cámara de ensayo: 50000 células/mL.
12. Número de réplicas por concentración: 4
13. Régimen de alimentación: Sin alimentación.
14. Limpieza de cámara de ensayo: No es necesaria.
15. Aireación de la solución para ensayo: agitación continua de los cultivos a 100 c.p.m.
16. Medio control: medio nutritivo algal preparado con agua MilliQ
17. Agua de dilución: medio nutritivo algal
19. Factor de dilución: 0,5
20. Variable de respuesta: crecimiento (clorofila “a” *in vivo* por fluorescencia, densidad celular).
21. Criterio de aceptación del ensayo: A las 96 horas, un mínimo de 1×10^6 células/ml en los controles. Coeficiente de variación entre réplicas menor o igual al 20%.

RESULTADOS

En la **Tabla 2** se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición de crecimiento algal con la especie *Pseudokirchneriella subcapitata* (ex *Selenastrum capricornutum*) realizados con la muestra denominada **Protocolo Q355546**. Cada resultado representa la media de cuatro réplicas. El desvío estándar se indica entre paréntesis.



Tabla 2. Resultados obtenidos luego de la incubación de *P. subcapitata* en medio control y en las diferentes diluciones de la muestra **Protocolo Q355546** por un período de 96 horas.

| Dilución (%) | Densidad celular (Células/ml x 10 ⁶) | Contenido Clorofila “a” <i>in vivo</i> (µg/L) | % Inhibición |
|--------------|---|--|--------------|
| 0 (Control) | 2,58 (0,12) | 47.75 (2.22) | - |
| 25 | 2.50 (0,19) | 46.25 (3.59) | 3.14 |
| 50 | 2.33 (0,13) | 43.25 (2.36) | 9.42 |
| 100 | 2.12 (0.14) | 39.25 (2.63) | 17.80 |



Conclusiones

El lixiviado estudiado, Protocolo Q355546, resultó NO Ecotóxico sobre el crecimiento poblacional del alga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata* para la muestra al 100% y ninguna de las diluciones ensayadas, en los términos de la Resolución (OPDS) 4173/16.



BIBLIOGRAFÍA

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1996. Algal Toxicity, Tiers I and II. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.5400. EPA 712-C-96-164.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2002. *Selenastrum capricornutum* growth test. In: short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. PA-821-R-02-013. Office of Water. Washington D.C.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 2012. Ecological Effects test guidelines. OCSPP 850.4500: Algal toxicity. EPA 712-C-006. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (7101). Washington D.C

Prof. Dr. WD Di Marzio
Inv. CONICET - Director PRIET
DCB UNLU

ecotoxicologia@aae.org.ar wdimarzio@conicet.gov.ar
www.priet.unlu.edu.ar www.aae.org.ar