

ALGAS EN ECOTOXICOLOGÍA: Hacia el desarrollo de microbioensayos



Pirjo Huovinen^{1,2} & Iván Gómez^{1,2}

¹Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia

²Centro Fonmap de Investigación en Dinámica de Altas Latitudes (IDEAL)

pirjo.huovinen@uach.cl

Ecotoxicología – avances y nuevos desafíos

La publicación del libro *“Primavera silenciosa”* de Rachel Carson en 1962 atrajo la atención del público acerca del impacto catastrófico que el uso indiscriminado de pesticidas (ej. el insecticida DDT; clasificado ahora dentro del grupo de Polutantes Orgánicos Persistentes, POPs) generó en los ecosistemas naturales. Este libro fue uno de los impulsores del desarrollo de la ecotoxicología como disciplina (ver revisión de Werner y Hitzfeld 2012). El término “ecotoxicología” propuesto por Truhaut (1977) integró la ecología y toxicología, reflejando la creciente preocupación por los efectos dañinos de la contaminación del medio ambiente, que afecta no solo a los seres humanos, sino al resto de los organismos vivos y ecosistemas. La ecotoxicología por lo tanto se puede describir como una ciencia multidisciplinaria que estudia el destino y los efectos de los agentes contaminantes sobre organismos, poblaciones, comunidades y ecosistemas, aunque la definición del término ha ido cambiando con el tiempo (ver Newman y Unger 2003, Walker et al. 2006).

Durante las cinco décadas que han transcurrido desde la publicación del libro *“Primavera silenciosa”*, la ecotoxicología ha emergido como una importante disciplina científica, aportando fuertemente al desarrollo de nuevos conceptos y herramientas para la detección y predicción de riesgo (Werner y Hitzfeld 2012). Pese a los importantes avances, existen nuevos desafíos como es la evaluación ecotoxicológica de contaminantes emergentes, tales como nanomateriales, microplásticos, productos de cuidado personal y farmacéuticos (de uso veterinario y humano), estrógenos ambientales, etc. A pesar de la regulación global de la producción y uso de POPs impuesta en la Convención de Estocolmo de 2004, estas sustancias siguen presentes e implican un riesgo, principalmente por sus propiedades tales como persistencia, biomagnificación en la cadena trófica y transporte a largas distancias, incluso en ambientes considerados prístinos como el Ártico y Antártica. En los últimos años, el potencial impacto modificador causado por el cambio global (calentamiento, acidificación, aumento de la radiación UV solar, etc.) sobre la acción de los POPs y otros contaminantes

ha generado preocupación e interés de la comunidad científica (revisado por Werner y Hitzfeld 2012).

Herramientas metodológicas en ecotoxicología - Bioensayos de toxicidad

Según Paracelso (1493-1541) *“la dosis hace el veneno”* o sea ninguna sustancia química es tóxica si la dosis es demasiado baja, y por otro lado todas las sustancias químicas son tóxicas si la dosis es suficientemente alta. Efectivamente la relación entre la cantidad del contaminante a la cual un organismo está expuesta y el grado de los efectos tóxicos producidos es uno de los conceptos básicos de ecotoxicología y es la base de la evaluación de riesgo.

Los bioensayos de toxicidad son una de las herramientas más utilizadas en ecotoxicología para evaluar la toxicidad y relacionar la concentración del contaminante con la respuesta biológica (la relación **concentración-respuesta**). Principalmente se trata de tests monoespecíficos llevados a cabo en el laboratorio bajo condiciones controladas permitiendo establecer la relación entre el contaminante y su efecto biológico (**causa-efecto**). En estudios de terreno esto es mucho más difícil de determinar debido a la complejidad de los ecosistemas naturales. En los bioensayos se utilizan una amplia gama de organismos, entre ellos bacterias bioluminiscentes, algas, crustáceos y peces etc. La duración de los bioensayos depende del organismo a utilizar y su ciclo de vida, y de los parámetros a medir. La toxicidad **aguda** se produce dentro de un periodo corto (en general segundos-días), mientras la toxicidad **crónica** se desarrolla durante una exposición prolongada (días-años). Las respuestas biológicas que se miden pueden ser **letales** (mortalidad) o **subletales** (ej. crecimiento). Bioensayos de toxicidad proveen estimaciones sobre la concentración (CL₅₀ o concentración letal media) o dosis (DL₅₀ o dosis letal media) que es letal para el 50 % de los organismos (CE₅₀ en el caso de respuestas subletales). Además la información sobre las concentraciones más altas que no generan toxicidad (NOEC) y las más bajas que causan efecto (LOEC) son de utilidad para estimar niveles de exposición que no implican riesgo (ver revisión)

siones por Newman y Unger 2003, Walker et al. 2006, Taylor y Scroggins 2013).

Los protocolos estandarizados de los métodos para bioensayos de toxicidad han sido desarrollados por diferentes organizaciones (ej. ISO, OECD, US EPA, EC, ASTM) durante las últimas cuatro décadas para asegurar la obtención de información confiable y reproducible (revisado por Taylor y Scroggins 2013). Estos protocolos tienen utilidad en la clasificación de toxicidad de sustancias químicas, en monitoreos ambientales, en la evaluación de riesgo y toma de decisión, etc.

La interpretación de los resultados de bioensayos de toxicidad requiere considerar ciertas restricciones, tales como la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos en laboratorio con organismos de cultivo a las condiciones naturales. Con un bioensayo realizado en una especie individual no es posible generalizar los efectos de un contaminante ya que las especies responden de manera diferente. La corta duración de un bioensayo agudo presenta una desventaja ya que no permite observar la posible adaptación del organismo en el tiempo y de este modo se podría sobreestimar el riesgo. Además, para observar efectos adversos a corto plazo (especialmente mortalidad), se requiere usar concentraciones bastante altas que pueden superar las concentraciones encontradas en los sistemas acuáticos naturales donde el nivel de contaminación se puede atenuar a niveles bajo la línea de toxicidad aguda. Es por ello que la evaluación de los efectos subletales de una exposición prolongada a bajas concentraciones de contaminante (bioensayo crónico), si bien entrega resultados de mayor relevancia ecológica, implican claramente mayores desafíos metodológicos (ej. ensayos de mas larga duración que consideren parte considerable de la vida del organismo, o que las respuestas a medir incluyan procesos complejos, tales como la reproducción).

Uso de microalgas en bioensayos de toxicidad

El uso de bioensayos con microalgas en estudios de contaminación acuática comenzó con las evaluaciones de eutroficación por nutrientes. La implementación del "algal assay bottle test" usando la microalga verde *Selenastrum capricornutum* en la década de 1960 sentó las bases para el desarrollo posterior de las técnicas de bioensayos de toxicidad en microalgas (revisado por Nyholm y Peterson 1997). El bioensayo de toxicidad con microalgas más utilizado es la determinación de la inhibición de crecimiento bajo exposición a algún contaminante en un cultivo estático durante 72-96 horas. Esta técnica se lleva a cabo bajo iluminación continua y en general, manteniendo el cultivo en movimiento (agitación o aireación) para el equilibrio de CO₂. Para la estimación de crecimiento o biomasa, se mide diferentes variables, como son la densidad de células (con microscopio o contador de partículas), la cantidad de clorofila (con métodos de extracción), la densidad óptica (usando espectrofotómetros), la fluorescencia in vivo (mediante fluorímetros), y también la fotosíntesis (basada en la asimilación de ¹⁴C). Es importante considerar que las diferentes respuestas de las microalgas dependen de su sensibilidad a los contaminantes, y además de

la condición fisiológica del cultivo que puede afectar el tamaño celular o la cantidad de clorofila por célula (Nyholm y Peterson 1997). Un aspecto importante es que las especies utilizadas en bioensayos deben ser de fácil cultivo en laboratorio, y se han usado especies de un amplio rango taxonómico tanto de agua dulce como marinas. Entre las especies más utilizadas se puede mencionar al alga verde de agua dulce *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente *Selenastrum capricornutum*) (Fig. 1A-B), y que esta incluida dentro de las especies recomendadas en los protocolos definidos por varias instituciones de estandarización (ej. ISO, OECD, INN Chile).

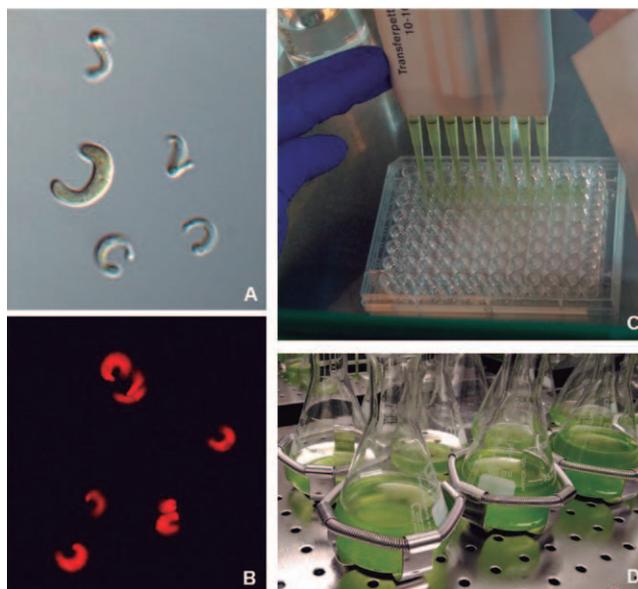


Figura 1. Microalga verde *Raphidocelis subcapitata* (con microscopio óptico (A) y epifluorescente (B)) utilizado en bioensayos de toxicidad. Preparación de bioensayo en microescala utilizando placas de multipocillo (C) en comparación con bioensayo tradicional en matraces Erlenmeyer de mayor volumen (D). (Fotografía: D. Osman, R. Fuentes).

Dentro de las ventajas del uso de microalgas en bioensayos de toxicidad se encuentra la sensibilidad relativa de estos organismos a contaminantes, se consideran costo-efectivos, son en general más fáciles de mantener en condiciones experimentales de laboratorio comparado a animales, lo que evita también conflictos bioéticos por el uso animales en bioensayos. Debido a su rápido ciclo de división celular, las respuestas de toxicidad aguda pueden ocurrir dentro de pocas horas de exposición, y las respuestas subletales de toxicidad crónica se puede medir también dentro de un periodo bastante corto (días). Las respuestas de las microalgas representan a una población y no sólo a células individuales, lo que permite inferir las respuestas de diferentes generaciones. Como desafíos prácticos se puede mencionar la selección de medio de cultivo idóneo para cada especie y contaminante, el agotamiento de los nutrientes y el aumento del pH durante el bioensayo en el cultivo a medida que aumenta la biomasa, etc. Las características de medio de cultivo, por ejemplo, el pH o la concentración de sustancias quelantes, pueden afectar la toxicidad de ciertas sustancias químicas, tales como los metales pesados (ver revisión por Nyholm y Peterson 1997).

Hacia el desarrollo de los bioensayos en microescala

Los avances en la instrumentación y técnicas de medición de alta resolución, tales como la estimación de biomasa mediante la detección de clorofila *in vivo*, han permitido desarrollar bioensayos en microescala (revisado por Blaise 2013). El uso de placas de multipocillo y la reducción de volumen (hasta a 200 μ l por pocillo; Fig. 1C) permite examinar un gran número de muestras y réplicas reduciendo considerablemente el uso de reactivos y materiales con la consiguiente disminución de residuos, y costos asociados con los bioensayos. Pese a estos avances, persisten desafíos como es el control de pH y crecimiento exponencial del cultivo en condiciones estáticas en las placas ya que en los ensayos en microescala usando placas de multipocillos ej. la aireación es técnicamente difícil de implementar. En los bioensayos tradicionales (comúnmente llevado a cabo en un matraz Erlenmeyer de mayor volumen; Fig. 1D) se utiliza aireación o agitación constante para evitar cambios de pH, y para conseguir un crecimiento exponencial y una constante tasa de crecimiento específico. En general se trabaja con una baja concentración inicial de células, de esta forma manteniendo una biomasa suficientemente baja para evitar los cambios de pH en el cultivo durante el ensayo. Sin embargo, bajo estas condiciones con baja biomasa de algas se requiere métodos altamente sensitivos para una medición precisa de las respuestas.

Existen algunas propuestas y recomendaciones para la implementación de los métodos de bioensayos en microescala (Blaise y Vasseur 2005, Blaise 2013). Nuestros laboratorios en la Universidad Austral de Chile (Ecotoxicología Acuática y Ecofisiología y Fotobiología de Algas) están aplicando nuevas técnicas de alta resolución utilizando fluorescencia *in vivo* de Pulso Amplitud Modulada (PAM) asociada a clorofila del fotosistema II como respuestas fisiológicas de microalgas (Fig. 2C-D), en combinación con otros métodos de fluorescencia *in vivo* para estimar el crecimiento (Fig. 2A-B), y de este modo detectar y cuantificar estrés de contaminación y cambio global

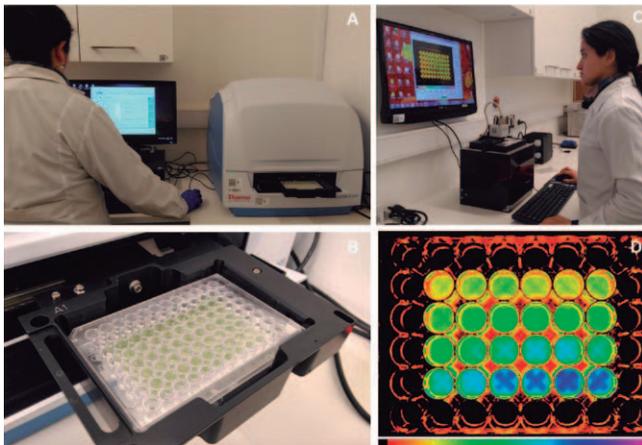


Figura 2. Técnicas de fluorescencia *in vivo* de clorofila aplicados en bioensayos de microescala con microalgas permitiendo una medición rápida de tasa de crecimiento (como fluorescencia *in vivo* (RFU) con fluorímetro VarioscanFlash; A-B) y respuestas fisiológicas (fluorímetro IMAGING-PAM; C-D). (Fotografía: D. Osman, R. Fuentes).

(temperatura, radiación UV). Además se está probando las condiciones de cultivo y densidades de células en placas de multipocillo para optimizar el crecimiento del cultivo durante un ensayo sin mayores alteraciones de pH y por otro lado la detección precisa y sensitiva de las respuestas tanto fisiológicas como de crecimiento.

Desafíos y direcciones futuras

Con estos nuevos avances se tiene como objetivo mejorar la sensibilidad de los microbioensayos de toxicidad con microalgas y profundizar los conocimientos científicos y herramientas prácticas para ampliar la aplicación de estas técnicas en el futuro. Los nuevos desafíos de la ecotoxicología implican la necesidad del constante desarrollo y mejoramiento de las técnicas para detectar y evaluar el impacto de los contaminantes, por lo tanto en esta línea el desarrollo de microbioensayos sensibles es altamente relevante. Además se ha identificado como uno de los desafíos pendientes la evaluación de los efectos subletales de la exposición crónica que provocan sustancias en concentraciones reales en el medio ambiente (revisiones por Werner y Hitzfeld 2012, Taylor y Scroggins 2013).

Finalmente, en los últimos años la ecotoxicología ha comenzado a transitar hacia nuevas aproximaciones tales como la toxicogenómica, la bioinformática y toxicología computacional, que influenciará la ecotoxicología en el futuro (Taylor y Scroggins 2013).

Financiamiento:

Proyecto FONDECYT 1161129, Centro Fondap-IDEAL (Grant 15150003) CONICYT.

Referencias

- Blaise C, Vasseur P (2005)** Algal microplate toxicity test. En: Blaise C, Féraud JF (eds) Small-scale freshwater toxicity investigations. Vol 1. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 137-179.
- Blaise C (2013)** Microbiotests in ecotoxicology. En: J.-F. Féraud JF, Blaise C (Eds.), Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. pp. 721-728. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Carson R (1962)** Silent spring. Houghton-Mifflin Co., Boston.
- Newman MC, Unger MA (2003)** Fundamentals of ecotoxicology. Lewis Publishers. 2. Ed.
- Nyholm N, Peterson HG (1997)** Laboratory bioassays with microalgae. En: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS (Eds), Plants for Environmental Studies. CRC Press. pp. 225-276. ISBN: 978-1-56670-028-3.
- Taylor LN, Scroggins RP (2013)** Biological test methods in ecotoxicology. En: J.-F. Féraud JF, Blaise C (Eds.), Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. pp. 197-204. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Truhaut R (1977)** Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotoxicol. Environ. Saf. 1: 151-173.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2006)** Principles of ecotoxicology. CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Werner I, Hitzfeld B (2012)** 50 years of ecotoxicology since Silent Spring – A review. GAIA 21/3:217-224.