

Nueva herramienta de evaluación de la toxicidad de sedimentos costeros basada en la respuesta de microalgas bentónicas: desarrollo de un kit de medida de toxicidad

1. Presentación

Esta propuesta se presenta dentro de la modalidad Liderazgo e Innovación; categoría: Lucha contra la contaminación marítima y del litoral. El trabajo es presentado por Ignacio Moreno Garrido, con la participación de Julián Blasco Moreno y Cristiano Venícius de Matos Araújo, y ha sido llevado a cabo en el Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC). El proyecto de investigación se centró en el diseño de un kit de medida de toxicidad para evaluar la toxicidad de sedimentos costeros, basado en la respuesta de microalgas bentónicas, con objeto de monitorizar procesos de contaminación marina del litoral y así garantizar el mantenimiento del patrimonio natural y, por lo tanto, la biodiversidad de ecosistemas tan importantes como los costeros.

2. Contexto

Con el incremento en las actividades urbanas e industriales se hace necesario contar con herramientas que permitan monitorizar los procesos de contaminación marina en general y costera en particular. Los investigadores dedicados a la ecotoxicología han utilizado diferentes organismos en bioensayos de toxicidad, con objeto de obtener resultados sensibles y ambientalmente relevantes. Las especies seleccionadas deben cumplir ciertos requisitos para ser elegidas como objeto de estos bioensayos: deben ser organismos sensibles, representativos del hábitat analizado pero con un área de dispersión geográfica amplia (cosmopolitas), su relevancia ecológica debe ser elevada y, de ser posible, su mantenimiento en laboratorios debe implicar bajos costes y su manejo debe ser lo más sencillo posible. Durante los últimos años el uso de microalgas en bioensayos de toxicidad se ha visto

incrementado dada la relevancia ecológica de estos organismos, dada su elevada sensibilidad y debido a la posición básica en las cadenas tróficas. De verse afectado este escalón trófico, la perturbación se propagaría rápidamente al ecosistema completo. Sin embargo, la mayoría de los bioensayos de toxicidad se han realizado tradicionalmente sobre algas planctónicas, no prestándose suficiente atención al microfitobentos. El microfitobentos está conformado por especies eucarióticas fotosintéticas (principalmente diatomeas pennadas) y por cianobacteria que colonizan la superficie de los sedimentos de la zona intermareal. Estos organismos son importantes para la productividad, los flujos de materia y energía, y estabilidad del sedimento debido a los polisacáridos excretados. A pesar de la importancia del microfitobentos, no existen protocolos de medida de toxicidad basados en estos organismos.

Los sedimentos costeros el destino final de muchos contaminantes. Los valores de pH y niveles de salinidad marinos implican un drástico descenso en la solubilidad de potenciales contaminantes que llegan al litoral por vía húmeda. El sedimento costero actúa así como sumidero de estos contaminantes, pero también puede actuar como ulterior fuente de los mismos. En este sentido, se incrementa la importancia de los ensayos de toxicidad con sedimentos costeros como herramienta para la evaluación de riesgo ambiental.

El presente estudio se centró en el uso de diatomeas bentónicas como organismos de ensayo para la evaluación de la calidad del sedimento costero que era el hito básico del proyecto MECASEC (Microfitobentos para la Evaluación de la Calidad Ambiental de Sedimentos Estuáricos y Costeros: CTM2006-01473/MAR) y que se llevó a cabo entre Septiembre de 2006 y Octubre de 2009. El proyecto, financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, se basó en la hipótesis de que los elementos del microfitobentos son organismos adecuados para llevar a cabo ensayos de toxicidad con sedimentos costeros, dada su sensibilidad, la

posición e importancia en las redes tróficas y las ventajas que ofrecen en cuanto a facilidad de cultivo, disponibilidad constante, bajo coste de mantenimiento y de diseño experimental, así como por su rapidez de respuesta. El trabajo se justifica por la inexistencia de protocolos normalizados sobre ensayos de toxicidad con elementos del microfitobentos. El objetivo principal fue el desarrollo de un kit de medida de toxicidad sobre sedimentos marinos costeros utilizando microalgas marinas bentónicas, con objeto de crear una herramienta útil para establecer criterios de calidad ambiental dada la carencia de información, la importancia ecológica del microfitobentos y el creciente interés por parte de investigadores, empresas y organismos oficiales en detectar de manera rápida y eficaz posibles procesos de contaminación medioambiental.

3. Descripción

El primer paso de la investigación desarrollada se centró en evaluar la sensibilidad de respuesta ante un contaminante-tipo (cobre) de una diatomea bentónica (*Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Lewin and Reimann) seleccionada de entre varias especies del microfitobentos. Se estudiaron diferentes respuestas: crecimiento poblacional, fluorescencia de fotosíntesis y actividad celular. El objetivo era valorar la sensibilidad del organismo y compararla con los datos existentes para microalgas planctónicas. Los resultados mostraron que, independientemente de la respuesta medida, si el ensayo es realizado en matraz la sensibilidad es similar a la de otras especies de microalgas planctónicas. Los ensayos en microplaca podrían mostrar menos sensibilidad cuando se ven involucrados contaminantes que se adsorban a las paredes de los viales de exposición (Figura 1).

La fase siguiente se diseñó para evaluar si el almacenamiento (por 5 meses), en condiciones de frío y oscuridad, de células de *C. closterium*, podría afectar su crecimiento y su

sensibilidad al contaminante tipo elegido en ensayos de toxicidad. Semanalmente, se dispusieron células (previamente almacenadas) en condiciones normales de cultivo (óptimo de luz y temperatura) y se evaluaron las respuestas de crecimiento y sensibilidad. La sensibilidad de las algas almacenadas se mantuvo siempre dentro del rango establecido como aceptable (± 2 SD – desviación estándar), calculado a partir de un cultivo control mantenido bajo condiciones estándares, mostrando que células almacenadas pueden ser usadas en el kit de toxicidad propuesto (Figura 2).

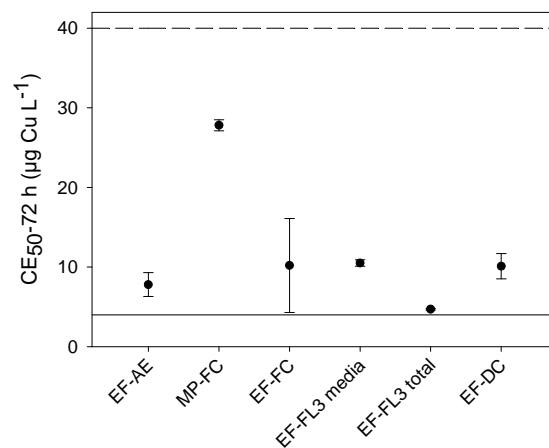


Figura 1: Valores de EC_{50,72h} (concentración que reduce en 50% la respuesta biológica, en este caso biomasa, a las 72 horas) para *C. closterium* expuesta al cobre. EF-AE (ensayo en matraz, respuesta: actividad esterasa); MP-FC (ensayo en microplaca, respuesta: fluorescencia de clorofila); EF-FC (ensayo en matraz, respuesta: fluorescencia de clorofila); EF-FL3 media (ensayo en matraz, respuesta: promedio de la fluorescencia de clorofila medida por citometría de flujo); EF-FL3 total (ensayo en matraz, respuesta: sumatorio de fluorescencia de clorofila de todas las células, medida por citometría de flujo); EF-DC (ensayo en matraz, respuesta: densidad celular). El rango entre las líneas representa los valores más sensibles de EC₅₀ para las especies de microalgas planctónicas.

Posteriormente, se evaluó el potencial del ensayo propuesto para discriminar diferentes niveles de toxicidad del sedimento de la zona intermareal del saco interno de la Bahía de Cádiz (Suroeste de España). Se evaluó también una metodología aplicada sobre el sedimento

para eliminar el efecto de la biota autóctona a través del uso del nitrógeno líquido. Los diferentes niveles de toxicidad del sedimento intermareal de la Bahía de Cádiz, constatando la capacidad del ensayo en discriminar la toxicidad asociada al sedimento, pueden apreciarse en la Figura 3. Estudio similar ha sido llevado a cabo en la Bahía de Algeciras, Estuario del Guadalquivir y Ría de Huelva.

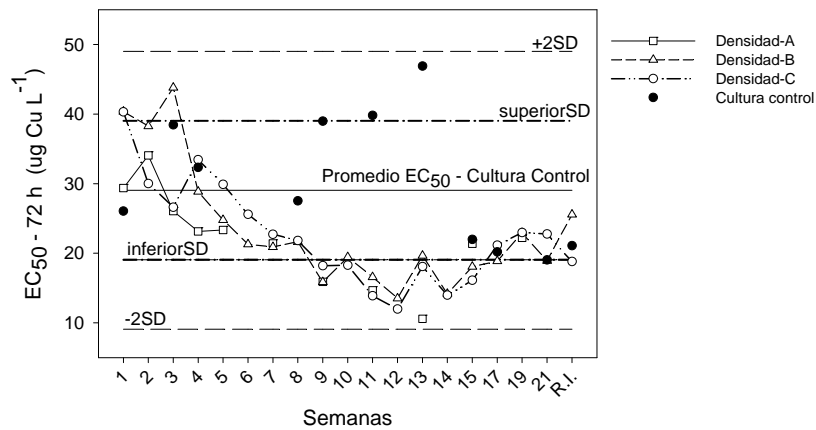


Figura 2: Análisis de la sensibilidad (medida como EC50_{72h} ante el cobre) de diferentes densidades celulares de *C. closterium* en función del tiempo de almacenamiento de los inóculos.

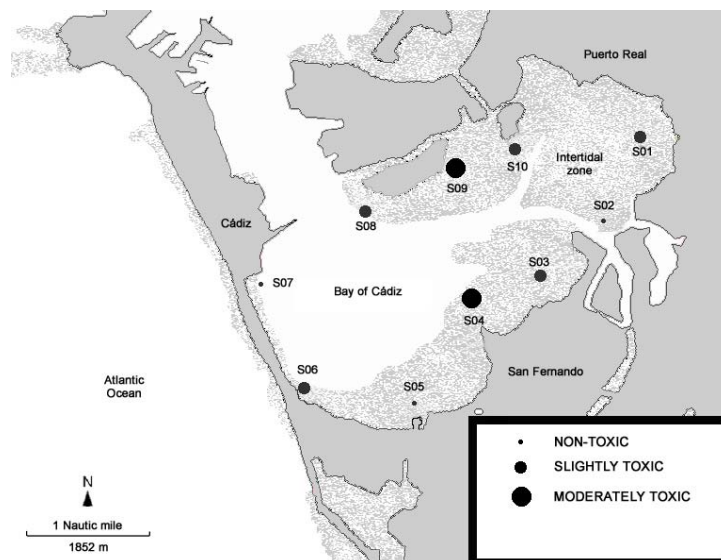


Figure 3: Análisis de los niveles de toxicidad de los sedimentos intermareales de la bahía de Cádiz basado en la respuesta de la microalga bentónica *C. closterium*.

4. Resultados:

Confirmada la viabilidad del método, se desarrolló el kit de medida de toxicidad. Se describe a continuación un resumen del protocolo usado para llevar a cabo los ensayos propuestos.

Materiales del kit: El kit está compuesto de pipetas Pasteur de plástico termoselladas que contienen el inóculo del alga; cloruro sódico anhidro; sulfato de sodio anhidro; dos soluciones stock (I y II) para la preparación de agua de mar artificial; solución nutritiva; solución de silicato; y medio de cultivo (f/2).

Almacenamiento del kit: Debe seguir las recomendaciones puestas en la Figura 4.

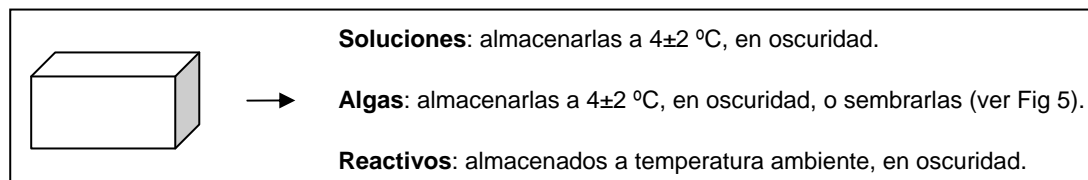


Figura 4: Procedimiento tras la recepción del kit de medida de toxicidad.

El sedimento: Tras ser recolectada la muestra (capa superficial, ± 0.5 cm), el sedimento debe ser almacenado a 4°C , en oscuridad por un tiempo máximo de 2 semanas. Con un máximo de 24 h de antelación al inicio del ensayo, las muestras deben ser homogeneizadas y dispuestas en una bandeja formando una fina capa sobre la cual se verterá nitrógeno líquido hasta que las muestras queden totalmente congeladas. Las muestras deben ser descongeladas inmediatamente a temperatura ambiente, quedando listas para el ensayo. Se utiliza este procedimiento con objeto de eliminar la biota autóctona y evitar así falsos negativos (presencia de organismos similares al organismo de ensayo), o falsos positivos (debido a los depredadores y competidores del organismo de ensayo). Métodos como la remoción manual de la macrofauna, tamizado, congelación, calentamiento, esterilización química e irradiación usados para reducir estos efectos no son efectivos cuando se trata de microorganismos o no son recomendables para estos ensayos, por alterar demasiado las condiciones del sedimento

Protocolo: El protocolo para los bioensayos se resume en las Figuras 5 y 6.

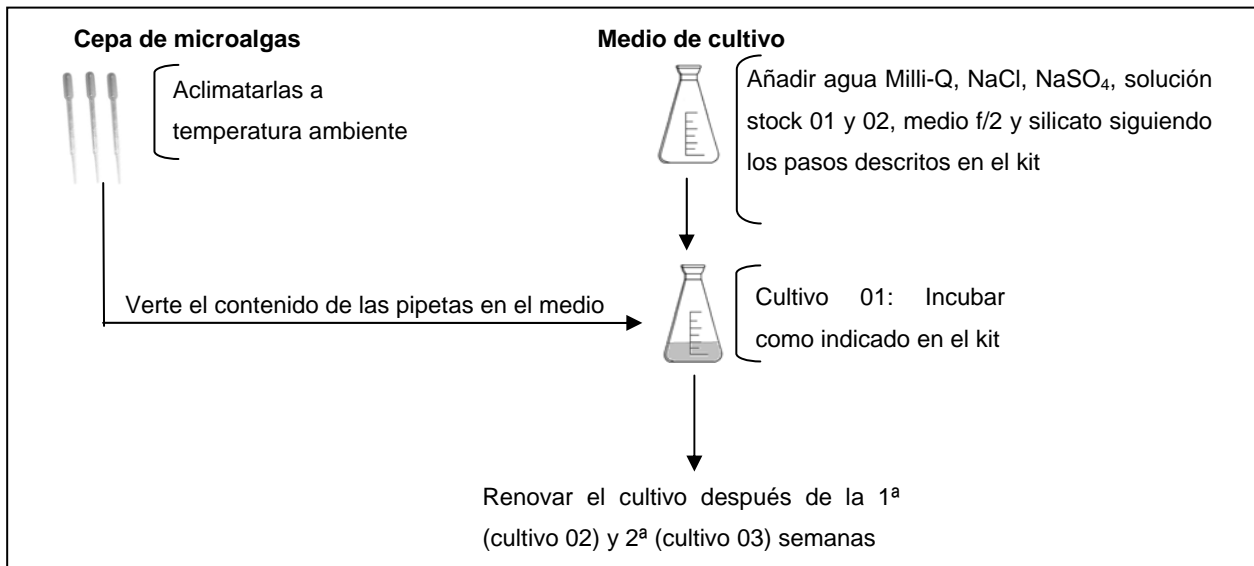
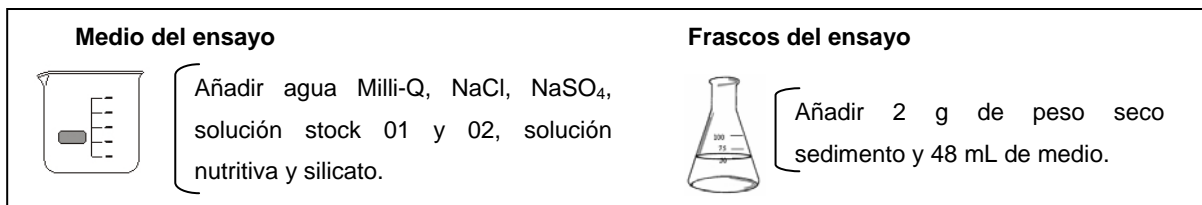


Figura 5: Preparación del cultivo de la microalga.



El día siguiente

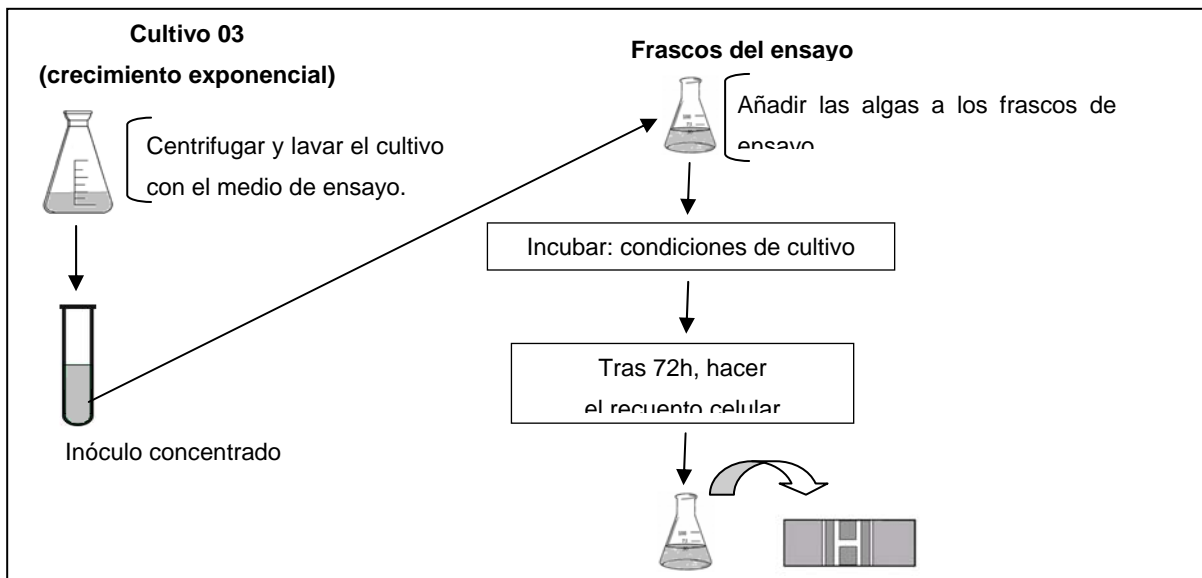


Figura 6: Esquema del ensayo de de toxicidad. El volumen de 1000 mL sugerido para el medio utilizado en el ensayo sirve únicamente como referencia. El volumen preparado real dependerá de las necesidades del bioensayo concreto.

5. Sinergias y Redes

La integración del método con otras instituciones de España y Portugal, implicadas en los estudios de evaluación ambiental, se concretó a partir de la transferencia de la tecnología desarrollada a través de un proyecto de intercalibración como un paso previo a la estandarización del método. Se desarrolló dicho ensayo interlaboratorio para evaluar la facilidad de realización del ensayo y su precisión. De los 21 ensayos de toxicidad realizados entre los laboratorios, 18 ensayos fueron considerados aceptables (80%), constatando la viabilidad del método (Fig. 7). El criterio de aceptabilidad ha sido determinado a través del factor Z-score que se calculó según la fórmula:

$$Z - score = \frac{X_{lab} - X}{IQR_{(n)}}$$

donde X_{lab} es el resultados de un laboratorio, X es la mediana de los resultados de todos los laboratorios y $IQR_{(n)}$ es el rango intercuartil normalizado. El $IQR_{(n)}$ es determinado por el rango intercuartil multiplicado por 0.7413 (factor es tomado de la distribución normal).

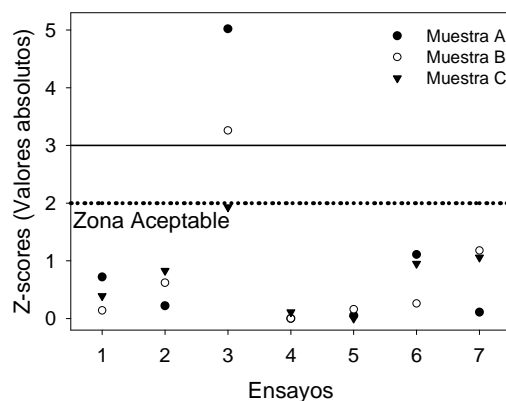


Figura 7: Valores de Z-score para los ensayos con 3 diferentes realizados por 7 laboratorios en el ejercicio interlaboratorio. Valores por debajo del 2 son considerados aceptables.

Asimismo, el 80% de la variabilidad intralaboratorio (replicabilidad) varió de 0.5 a 35%, y la variabilidad interlaboratorio (reproducibilidad) estuvo entre 17-31%, constatando la

reproducibilidad del método. La colaboración con otras instituciones asociada a la transferencia de tecnología mostró la total viabilidad del método propuesto.

El fin último del presente estudio ha sido crear una herramienta útil para establecer criterios de calidad ambiental del sedimento a fin de controlar la contaminación en las zonas costeras. Los resultados obtenidos aportan valiosa información para el avance de los estudios de evaluación de la calidad ambiental. Se ofrece, así, una nueva y útil herramienta en el ámbito de la Ecotoxicología, abriendo una promisoriosa línea de investigación en lo que se refiere al uso de componentes del microfítobentos en los ensayos de toxicidad con sedimentos completos.

5. Comunicación

Se presentaron, en el ámbito del proyecto, comunicaciones en los siguientes congresos: PRIMO 14 – 14th International Symposium on Pollutant Response in Marine Organisms, Florianópolis, Brasil, 2007 (póster); 7th Iberian and 4th Iberoamerican Congress of Contamination and Toxicology, Lisboa, Portugal, 2008 (Póster + comunicación oral); 5th SETAC World Congress, Sidney, Australia, 2008 (Póster); XIV Seminario Ibérico de Química Marina, Cádiz, España, 2008 (Comunicación oral); XV Seminario Ibérico de Química Marina, Vigo, España, 2010 (Comunicación oral). Se publicó, además, un artículo divulgativo en la revista *Algas*, publicación oficial de la Sociedad Española de Ficología (nº 40, Diciembre de 2008) y otro más en la revista *Época* (Domingo, 6 de Diciembre de 2009).

Se generaron, además las siguientes publicaciones (revistas SCI) y capítulos de libro:

Moreno-Garrido, I.; Lubián, L.M.; Jiménez, B.; Soares, A.M.V.M. & Blasco, J. 2007. Estuarine toxicity tests on diatoms: Sensitivity comparison for three species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 71: 278-286.

- Moreno-Garrido, I. 2008. Immobilized microalgae: current techniques and uses (review). *Bioresource Technology*, 99: 3949-3064.
- Araujo CVM; Diz FR; Moreno-Garrido I; Lubián LM; Blasco J. 2008. Effects of cold-dark storage on growth of *Cylindrotheca closterium* and its sensitivity to copper. *Chemosphere*, 72: 1366-1372.
- Araújo CVM; Diz FR; Laiz L; Lubián LM; Blasco J; Moreno-Garrido I. 2009. Integrative assessment of the Bay of Cádiz (spain): an ecotoxicological and chemical approach *Environment International*, 35: 831-841.
- Moreno-Garrido I; Araujo CVM; Blasco J. 2009. Microphytobenthos In: Marine Phytoplankton. ed. Hauppauge, NY: Oceanography and Ocean Engineering Series, Nova Publishers, 2009, p. 1-44.
- Araújo CVM; Tornero V; Lubián LM; Blasco J; van Bergeijk SA; Cañavate P; Cid A; Franco D; Prado R; Bartual A; López MG; Ribeiro R; Moreira-Santos M; Torreblanca A; Jurado B; Moreno-Garrido I. 2010. Ring test for whole-sediment toxicity assay with -a- benthic marine diatom. *Science of the Total Environment*, 408: 822-828.
- Araújo CVM; Diz FR; Tornero V; Lubián LM; Blasco J; Moreno-Garrido I. 2010. Ranking sediment samples from three spanish estuaries in relation to its toxicity for two benthic species: the microalga *Cylindrotheca closterium* and the copepod *Tisbe battagliai*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(2): 393-400.
- Araujo CVM; Diz FR; Lubián LM; Blasco J; Moreno-Garrido I. 2010. Sensitivity of *Cylindrotheca closterium* to copper: influence of three test endpoints and two test methods. *Science of the Total Environment*, 408: 3696-3703.
- Araujo, CVM; Blasco J; Moreno-Garrido I. 2010. Microphytobenthos in ecotoxicology: a review of the use of marine benthic diatoms in bioassays. *Environment International*, 36: 637-646.