



## Evaluación de la toxicidad del sedimento de un arroyo analizando las alteraciones nucleares, movilidad, densidad y tamaño celular de *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae)

**María Mercedes Nicolosi Gelis, Micaela Ailén Mujica, Joaquín Cochero, Máximo A. Simonetti, Jorge Donadelli y Nora Gómez**

Instituto de Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet", Bv 120 n°1462, CP 1900, La Plata, Argentina. CONICET, UNLP  
Email: mercedesnicolosi@ilpla.edu.ar

### RESUMEN

En este trabajo se reporta las respuestas de *Nitzschia palea* (Kütz.) W.Sm. 1856 vinculadas a la densidad, el tamaño celular, las alteraciones nucleares (localización anormal y membrana nuclear estallada) y la movilidad (velocidad, distancia y aceleración) relacionadas a la exposición del elutriado del sedimento de un arroyo pampeano expuesto a actividad agrícola. Los resultados demostraron que los descriptores empleados para analizar la respuesta de *N. palea* a la exposición del elutriado fueron significativas, revelando su potencial como biomonitor de efectos tóxicos. Palabras claves: PESTICIDAS – ELUTRIADO - BIOMONITOR

### Introducción

Los sistemas lóticos que atraviesan la llanura Pampeana se encuentran afectados principalmente por actividades agrícolas-ganaderas, actividades industriales y el avance progresivo de la urbanización que se asienta en la región (Rodríguez Capítulo et al., 2010). Como consecuencia, los cuerpos de agua reciben directa o indirectamente descargas de diferentes tipos de contaminantes. El deterioro de la calidad de agua es mayormente causado por el ingreso de nutrientes, metales pesados, agentes patogénicos, pesticidas, herbicidas, y sedimento como consecuencia de dragados y canalizaciones (Nora Gómez y Licursi, 2001). En estos ambientes, los sedimentos acumulan muchas de las sustancias tóxicas que ingresan a los cursos de agua (Mac Loughlin et al., 2017; Ronco et al., 2008). Estos contaminantes pueden ser resuspendidos de forma natural, por procesos físicos o biológicos (bioturbación), o por la actividad humana, generando la removilización y redistribución de los contaminantes a la columna de agua desde los sedimentos.

En este sentido, el uso de organismos bentónicos, como las diatomeas, resulta muy útil para evaluar la calidad del sedimento.

Las diatomeas constituyen uno de los principales componentes del biofilm epipélico en los arroyos de la llanura Pampeana (Gómez y Licursi, 2001) y forman parte de los grupos de organismos más utilizados internacionalmente para evaluaciones de calidad de agua, particularmente en ríos y arroyos.

El objetivo de este trabajo fue analizar las respuestas de descriptores tales como la movilidad, anomalías nucleares (localización anormal de núcleo, ruptura de la membrana nuclear), densidad y el tamaño celular de *Nitzschia palea* a elutriados procedentes de sedimento de un arroyo con impacto agrícola, para proponerlos como posibles biomonitores para la evaluación de toxicidad de sedimentos

### Materiales y métodos

Para la realización del ensayo de toxicidad se colectaron muestras de sedimento de la cuenca media del arroyo Carnaval. Este arroyo y sus tributarios pertenecen a una cuenca periurbana de 100 km<sup>2</sup> cercana a la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires Argentina. En la cuenca alta y media de este arroyo los principales usos del suelo son la horticultura, floricultura y cultivos de soja, maíz y trigo. En el sitio seleccionado para este estudio (34°55'16,07"S - 58°6'36,09"O), el arroyo

atravesaba un campo de soja en el que se emplean agroquímicos periódicamente. En mayo de 2018 se extrajo 1 kg de sedimento procedente de los 5 cm superficiales del lecho del arroyo. Para el ensayo en laboratorio se utilizó un monocultivo de *Nitzschia palea* (NPAL), previamente aislado de sedimentos del Arroyo Martín y cultivado en medio de cultivo de diatomeas diluido (1:2) según (Guillard y Lorenzen, 1972). El bioensayo se inició con un inóculo proveniente del cultivo en fase de crecimiento exponencial. Para la obtención de los elutriados se siguió una modificación del protocolo de Pica Granados y Trujillo Domínguez (2008), utilizando medio de cultivo. El bioensayo se inició con una siembra de un inóculo de 10000 células/ml en el laboratorio de bioensayos con temperatura controlada (25 °C) y luz natural. Cada siembra se realizó en frascos de vidrio de 200 ml conteniendo 90 ml de medio de cultivo (controles) o elutriado (tratamiento) y 10 ml del cultivo de NPAL. Se utilizaron 5 réplicas para cada día de muestreo: día 0 (comienzo de la experiencia), a las 24 hs (T1), a las 48 hs (T2), a las 72 hs (T3) y a la semana de exposición (T4). Además, un control de elutriados sin diatomeas fue usado para medir cualquier posible degradación de pesticidas debido al medio.

Durante la experiencia se midieron parámetros fisicoquímicos (pH, conductividad, temperatura y oxígeno disuelto) en cada unidad experimental. También se analizaron las concentraciones de nutrientes al comienzo, a las 72 hs y al final de la experiencia (APHA, 2012). Además, se midieron concentraciones de metales pesados (Cr, Cd, Zn, Cu) por espectrofotometría de absorción atómica usando (Espectrofotómetro Buck 200), y pesticidas (organofosforados y organoclorados) por GC-ECD/GC-MS en los elutriados.

Las variables biológicas medidas fueron:

Densidad celular: mediante recuentos en 1 ml con cámara de Neubauer, bajo microscopio óptico a una magnificación de 200X.

Tamaño celular: Se midió el largo de 10 diatomeas seleccionadas al azar, por réplica.

Alteraciones nucleares (localización anormal del núcleo; ruptura de membrana nuclear): se tiñeron las muestras con Hoechst 33342 y se analizaron a una magnificación de 600X.

Movilidad: a partir de una submuestra de 1ml colocada en una cámara de Sedgewick-Rafter con un aumento de 200X y una cámara Olympus QColor5 se filmaron videos de 30 seg y 5 cuadros /seg. Para cada réplica se filmaron 10 videos de campos escogidos al azar. El movimiento de cada diatomea fue medido

utilizando el software abierto Tracker (<https://physlets.org/tracker>). Se midieron las variables: velocidad ( $\mu\text{m sec}^{-1}$ ), distancia ( $\mu\text{m}$ ) y aceleración ( $\mu\text{m sec}^{-2}$ ).

Las diferencias entre control y tratamiento de las medidas biológicas fueron testeadas usando un ANOVA 2 vías (Tratamiento y Tiempo).

## Resultados

La conductividad, temperatura y oxígeno disuelto no mostraron diferencias significativas entre Control y Tratamiento a lo largo de la experiencia (ANOVA, Tratamiento\*Fecha  $p < 0,05$ ). El pH fue significativamente mayor en el Control. En los elutriados, la concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de nitratos fue de  $0,08 \pm 0,03$ , de amonio  $< 0,001$ , de nitritos  $0,11 \pm 0,04$ , y de fosfatos  $0,26 \pm 0,03$ . La concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de Zn medida en los elutriados fue de 0,16 y la de Cu fue de 0,012, las concentraciones de Cd y Cr estuvieron por debajo del límite de detección, mientras la concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de endosulfán  $\alpha$  fue de 1,1 la de endosulfán  $\beta$  de 0,5 la de endosulfán sulfato 0,2 y la de lindano 0,18.

La densidad de NPAL en los controles aumentó desde T0 ( $85 \pm 26 \text{ cél ml}^{-1}$ ) hasta T4 ( $657,6 \pm 272,9 \text{ cél ml}^{-1}$ ), mientras que en los tratamientos no hubo diferencias significativas entre T0 ( $146,2 \pm 72,7 \text{ cél ml}^{-1}$ ) y T4 ( $362,8 \pm 307,1 \text{ cél ml}^{-1}$ ). Al final de la experiencia la densidad de NPAL fue significativamente mayor en los controles que en los tratamientos. En cuanto al tamaño celular, el largo no varió significativamente en todos los tiempos en el control ( $22,4 \pm 0,37 \mu\text{m}$ ), mientras que en los tratamientos la media del largo celular disminuyó significativamente de  $22,6 \pm 0,61 \mu\text{m}$  en T0-T3 a  $20,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$  en T4. Además, en último tiempo la longitud media de las células fue significativamente menor en los tratamientos con respecto a los controles.

Todas las medidas de movilidad (velocidad media, aceleración y distancia recorrida) fueron significativamente menores en los tratamientos a partir de T2 hasta el final del experimento cuando se comparan con los controles. La velocidad media en los tratamientos fue de  $1,3 \pm 0,33 \mu\text{m/seg}$ , mientras que en los controles fue de  $2,9 \pm 0,49 \mu\text{m/seg}$ . La aceleración media en los tratamientos fue de  $3,2 \pm 0,6 \mu\text{m/seg}^2$ , y en los controles fue de  $6,4 \pm 1,71 \mu\text{m/seg}^2$ . La distancia media, fue de  $48,3 \pm 13,79 \mu\text{m}$  en los tratamientos, mientras que en los controles fue de  $85,7 \pm 16,77 \mu\text{m}$ .

La proporción de núcleos con ruptura de membrana fue significativamente mayor en los

tratamientos a partir de T1. Lo mismo ocurrió con la proporción de núcleos mal localizados. Los p-valores del ANOVA 2 vías para las variables biológicas se muestran en la tabla 1.

**Tabla1.** p-valores del ANOVA 2 vías de los descriptores de *N. palea* analizados

Tratamiento	tiempo	T*t	
Densidad	0,40	0,00	0,04
Longitud	0,31	0,02	0,00
Velocidad	0,00	0,00	0,00
Aceleración	0,00	0,00	0,00
Distancia	0,01	0,01	0,01
Ruptura de membrana	0,01	0,01	0,83
Loc. anormal	0,03	0,12	0,55

### Discusión

Los resultados de esta experiencia demuestran que la densidad, el tamaño celular, la movilidad y el estado de los núcleos de NPAL se ven afectados cuando son expuestos al elutriado de los sedimentos del arroyo Carnaval, los cuales presentaron concentraciones de endosulfán y lindano superiores a los niveles guía para la protección de la vida acuática establecidos por la secretaría de recursos hídricos de la Nación ( $\leq 0,007$  ul/L,  $\leq 0,02$  ul/L respectivamente).

Varios autores han registrado que la densidad de las diatomeas resulta afectada negativamente frente a la exposición a metales y pesticidas (Pandey et al., 2017). Por otra parte la reducción del tamaño celular, además de estar relacionado con la forma de reproducción asexual que presentan las diatomeas, también ha sido reportada como una respuesta a la exposición a tóxicos, tales como metales pesados y pesticidas (Pandey et al., 2018). En cuanto a la movilidad, las medidas respondieron negativamente a la exposición al elutriado. Nuestro resultado concuerda con los obtenidos por Cohn et al. (2003) quien reporta menores valores de velocidad frente a la exposición a elutriados tóxicos. Pandey y Bergey (2016), sugirieron que la movilidad resultó ser una buena herramienta para indicar contaminación por Zn y Cu, sin embargo, las concentraciones registradas por ellos fueron mucho mayores que las detectadas en este trabajo.

Las alteraciones nucleares (localización anormal y ruptura de membrana) fueron mayores en los tratamientos, coincidiendo con los resultados reportados por Debenest et al. (2008) y Licursi y Gómez (2013). Se puede concluir que los descriptores utilizados en este estudio son útiles

para evaluar la toxicidad de elutriados, y pueden ser propuestos como biomonitores de toxicidad de sedimento.

### Referencias

- APHA. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater..
- Cohn, S.A., Farrell, J.F., Munro, J.D., Ragland, R.L., Weitzell, R.E. y Wibisono, B.L. 2003. The effect of temperature and mixed species composition on diatom motility and adhesion. *Diatom Research*, 18(2):225–243.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F. y Pinelli, E. 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquatic Toxicology*, 88(1):88–94.
- Gómez, N. y Licursi, M. 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology*, 35(2):173–181.
- Guillard, R.R.L. y Lorenzen, C.J. 1972. Yellow green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology*, 8:10–14.
- Licursi, M. y Gómez, N. 2013. Short-term toxicity of hexavalent-chromium to epipsammic diatoms of a microtidal estuary (Río de la Plata): Responses from the individual cell to the community structure. *Aquatic Toxicology*, 134–135:82–91.
- Mac Loughlin, T.M., Peluso, L. y Marino, D.J.G. 2017. Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci. Total Environment*, 598:572–580.
- Pandey, L.K., Bergey, E.A., Lyu, J., Park, J., Choi, S., Lee, H. y Han, T. 2017. The use of diatoms in ecotoxicology and bioassessment: Insights, advances and challenges. *Water Research*, 118:39–58.
- Pandey, L.K., Lavoie, I., Morin, S., Park, J., Lyu, J., Choi, S. y Han, T. 2018. River water quality assessment based on a multi-descriptor approach including chemistry, diatom assemblage structure, and non-taxonomical diatom metrics. *Ecol. Indicators*, 84:140–151.
- Rodrigues Capítulo, A.R., Gómez, N., Giorgi, A., y Feijóo, C. 2010. Global changes in pampean lowland streams (Argentina): Implications for biodiversity and functioning. *Hydrobiologia*, 657(1):53–70.
- Ronco, A., Peluso, L., Jurado, M., Rossini, G.B. y Salibian, A. 2008. Screening of Sediment Pollution in Tributaries From the southwestern coast of the Río de la Plata Estuary. *Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis*, 15(1):67–75.