

Artículo Original

Utilización del nemátodo *Caenorhabditis elegans* en ensayos de toxicidad en muestras de agua del río Calera, Ecuador

Use of the nematode *Caenorhabditis elegans* in toxicity tests in water samples from the Calera river, Ecuador

Juan Pilaloa-Tamayo^{1,a}, Víctor González-Carrasco^{1,b}, María Florencia-Kronberg^{2,c}, Thayana Núñez-Quezada^{1,d}, Sergio Valverde-Durán^{1,e}

Recibido: 25/07/2022 Aceptado: 30/11/2022 Publicado: 30/12/2022

Resumen

La provincia de El Oro es la zona minera de oro más importante del Ecuador, pero la actividad ha causado daños al ecosistema y a la salud humana, debido al vertimiento de residuos de extracción cargados de metales pesados al río Calera, que es afluente con el río Amarillo del río Puyango. Este trabajo presenta los resultados de la evaluación de la toxicidad del agua y sedimentos del río Calera utilizando el nematodo *Caenorhabditis elegans* como bioindicador para el monitoreo ambiental. La cuantificación de metales pesados por espectroscopía de absorción atómica en muestras recolectadas a lo largo del río Calera tanto en agua como en sedimentos, reveló que la concentración en agua estaba por debajo de los límites permisibles establecidos por la Norma Ambiental Ecuatoriana, mientras que en la muestra de sedimento los valores de concentración de los metales pesados excedieron considerablemente los límites permisibles, particularmente el Arsénico y el Cadmio, que fueron los que se detectaron con las concentraciones más altas. En los bioensayos con *C. elegans* sometidos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de 12, 18, 24 y 36 horas, no se detectó tasa de mortalidad en las muestras de agua analizadas, lo que se atribuye a la baja concentración de metales pesados. La mortalidad se presentó en todos los nematodos expuestos a muestras de sedimentos, principalmente en aquellas provenientes del sector donde se encuentran las plantas procesadoras del material rocoso.

Palabras clave: *C. elegans*; Toxicidad; Metales pesados; Bioindicador.

1 Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

2 Universidad de Buenos Aires. Argentina.

a Autor para correspondencia: jpilaloo@utmachala.edu.ec - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0339-3052>

b E-mail: vgonzalez@utmachala.edu.ec - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9127-0342>

c E-mail: kronberg@agro.uba.ar - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7070-3604>

d E-mail: tnunez@utmachala.edu.ec - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9872-9005>

e E-mail: svalverded@utmachala.edu.ec - ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0423-3883>

Citar como:

Pilaloo-Tamayo, J., González-Carrasco, V., Florencia-Kronberg, M., Núñez-Quezada, T. & Valverde-Durán, S. (2022). Utilización del nemátodo *Caenorhabditis elegans* en ensayos de toxicidad en muestras de agua del río Calera, Ecuador. *Ciencia e Investigación* 2022 25(2):11-16. doi: <https://doi.org/10.15381/ci.v25i2.23122>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

Abstract

The province of El Oro is the most important gold mining area in Ecuador, but the activity has caused damage to the ecosystem and human health, due to the dumping of extraction waste loaded with heavy metals into the Calera River, which is a tributary with the Yellow River of the Puyango river. This work presents the results of the evaluation of the toxicity of the water and sediments of the Calera River using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a bioindicator for environmental monitoring. The quantification of heavy metals by atomic absorption spectroscopy in samples collected along the Calera River, both in water and in sediments, revealed that the concentration in water was below the permissible limits established by the Ecuadorian Environmental Standard, while in the sediment sample, the concentration values of heavy metals considerably exceeded the permissible limits, particularly Arsenic and Cadmium, which were the ones detected with the highest concentrations. In the bioassays with *C. elegans* subjected to different concentrations and exposure times of 12, 18, 24 and 36 hours, no mortality rate was detected in the water samples analyzed, which is attributed to the low concentration of heavy metals. The exposure of the nematodes to the sediment extracts, induced mortality in all the samples, mainly in those coming from the sector in which the rock material processing plants are located.

Keywords: *C. elegans*; Toxicity; Heavy metals; Bioindicator.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es una sustancia esencial para el funcionamiento de los procesos físicos, químicos y biológicos e indispensable para el medio ambiente y todos los elementos vivos del planeta y, por lo tanto, es un recurso que debe ser administrado en beneficio de la humanidad, lo cual implica asumir responsabilidades relacionadas con su contabilización, conservación y control de uso adecuado, así como reglamentar la asignación de derechos de uso.¹

Disponer de agua de buena calidad es imprescindible para garantizar el suministro de agua potable para consumo humano, mantenimiento y conservación de los ecosistemas y para cubrir las necesidades productivas. Sin embargo, la raza humana ha contribuido al deterioro del agua por el uso abusivo de este recurso en el mundo y, por lo tanto, debe responsabilizarse colectivamente de las labores de monitoreo, fiscalización y saneamiento de su calidad.²⁻⁴

La contaminación por metales pesados es un problema mundial debido a los riesgos que representan para la salud. Aunque muchos metales son esenciales para la vida, pueden ser dañinos para el hombre, los animales, las plantas y los microorganismos si alcanzan niveles tóxicos.⁵ Los metales pesados como Cadmio, Plomo, Mercurio y Arsénico son los contaminantes predominantes de los afluentes de agua y sedimentos debido a su toxicidad, persistencia y al ser no biodegradable. Los organismos acuáticos como algunos peces, así como vegetales absorben fácilmente estos metales pesados debido a su alta solubilidad en los ambientes acuáticos y finalmente pueden acumularse en el cuerpo humano a través de la cadena alimentaria.^{6,7}

La actividad de minería artesanal e ilegal en Ecuador ha provocado graves daños en los sectores cercanos a ríos o efluentes por efecto de la contaminación por metales pesados, sobre todo en las partes altas de la cuenca del río Puyango (Zaruma y Portovelo) en la Provincia El Oro. La explotación del oro y plata se realiza mediante

la extracción del mineral en bruto y el tratamiento de los minerales en plantas de procesamiento ubicadas en la orilla de los ríos Calera y Amarillo en las que se llevan a cabo los procesos de enriquecimiento del mineral desde la reducción del mineral en bruto mediante molinos, hasta la fase de lixiviación en el que se emplea cianuro (CN-) y cuyos desechos forman relaves cargados de metales pesados altamente tóxicos que son vertidos a los ríos causando graves impactos ambientales⁸, por sus características específicas de bioacumulación y biodisponibilidad.⁹

Siendo el Río Calera uno de los más afectados por la gran cantidad de vertido de relaves producto de la actividad minera, se justifica la realización de estudios que permitan determinar el grado de afectación que puede generar en la comunidad aledaña. Para esos fines, entre las técnicas de monitoreo ambiental, los bioensayos constituyen un complemento a las técnicas analíticas de evaluación de calidad de aguas al sumar a la cuantificación de los contaminantes la determinación de su toxicidad. Si bien los métodos analíticos son sensibles y confiables, el costo de los equipos es extremadamente elevado al igual que los reactivos y estándares necesarios para su utilización. Además, requieren un set de patrones de referencia conocidos, limitando su espectro de detección. Debido a que las muestras ambientales pueden contener tóxicos indefinidos, las agencias de protección ambiental recomiendan incluir un indicador animal para complementar el análisis de las muestras.^{2,10,11}

En este orden de ideas, este trabajo presenta la evaluación de la toxicidad del agua y sedimento del río Calera usando al nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), un organismo modelo que, por sus características fisiológicas, genéticas, tiempo de vida corto y facilidades de mantenerlo en laboratorio^{12,13}, ha resultado ser un excelente bioindicador para monitorear la toxicidad de muestras de agua y sedimentos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de muestras de agua y sedimento

Este estudio fue realizado en el Río Calera, en tres puntos a lo largo de una sección de 2,660 m que se indica en la Fig. 1. Todas las muestras se tomaron a orilla del río. Las muestras de agua se colectaron a nivel superficial en botellas opacas de 1L y las de sedimento (0,5 Kg) excavando a una profundidad de 10 cm y colocando la muestra en bolsas de polietileno con cierre hermético. Todas las muestras fueron refrigeradas a 5 °C en un cooler con hielo, y finalmente almacenadas en el laboratorio a -20 °C en un congelador.¹⁴

2.2. Preparación y análisis de muestras

Cada muestra de sedimento se disgregó con un mortero de porcelana y fue tamizada a través de una malla metálica de 63 micras para la obtención de la fracción fina y luego almacenada a -20 °C. Para la obtención de extracto líquido, se utilizaron 15 g de la fracción previamente obtenida, la que se mezcló con 15 mL de agua destilada

en vaso de precipitación de 50 mL (1:1) se dejó reposar a 4 °C durante 24 h previa homogenización. Transcurrido el tiempo se volvió a suspender el sedimento y se traspasó a tubos de extracción los que fueron preparados anteriormente con micro malla metálica y lana de vidrio para retener la mayor cantidad de sedimentos, repitiendo el procedimiento hasta obtener un volumen suficiente de la muestra (10-15 mL de extracto).

Los metales pesados analizados en esta investigación fueron Arsénico (As), Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Mercurio (Hg) fueron cuantificados en un equipo de espectrofotometría de absorción atómica con flama de acetileno de marca Perkin Elmer 300. Para realizar la calibración se utilizaron concentraciones de patrones preparados y establecidos a partir de una solución estándar (1000 mg/L) para cada metal.^{14,15}

2.3. BIOENSAYOS

Como organismo bioindicador se empleó al nematodo *C. elegans* (Cepa silvestre N2), cuyo mantenimiento y sincronización de los cultivos para garantizar que las



Figura 1. Mapa de la localidad de muestreo. Se indican los tres puntos de muestreo (coordenadas en Tabla 1).

larvas se encontraran en una etapa de desarrollo homogéneo (L1) siguió el protocolo descrito por Sykora¹³ y Tejada.¹⁶

Los bioensayos para el cálculo de la concentración letal media (CL50), se realizaron empleando nematodos en estado larvario L4, que fueron transferidos a cada dilución del extracto de sedimento o del agua de cada muestra, por triplicado, con la ayuda de un asa de platino. Como control se empleó Medio K. Con la ayuda de un estereomicroscopio se realizaron las observaciones para determinar los nematodos vivos y muertos al cabo de 12, 18, 24 y 36 horas.^{16,17}

3. RESULTADOS

Las siguientes tablas y gráficos evidencian los resultados obtenidos en esta investigación. A continuación, se detalla la cuantificación, la procedencia, concentración letal media de mercurio, cadmio, plomo y arsénico.

4. DISCUSIÓN

En la tabla 1, se muestran las concentraciones de los metales pesados analizados en las muestras de agua y sedimento colectadas en los puntos de muestreo. En las tres estaciones muestreadas, la concentración de metales pesados en agua estuvo por debajo de los límites permisibles establecidos en la Norma ambiental de Ecuador, mientras que, en la muestra para sedimentos, los valores de concentración de metales pesados superaron

sustancialmente los límites permisibles siendo Arsénico y Cadmio los metales que fueron detectados con las concentraciones más elevadas.

En los nematodos expuestos a diferentes concentraciones de las muestras de agua con tiempos de exposición de 12, 18, 24 y 36 horas, la tasa de mortalidad fue nula (datos no mostrados) lo que se atribuye a la baja concentración de metales pesados presentes en el agua (tabla 1) que estuvieron muy por debajo de los límites permisibles establecidos en la Norma de calidad ambiental ecuatoriana y de descarga de efluentes al recurso agua del Ecuador.¹⁸

Por otro lado, cuando los nematodos fueron expuestos a los extractos de sedimento se produjeron niveles de mortalidad, permitieron calcular los valores de CL50 para cada tiempo de exposición y dilución de la muestra de extracto de sedimento (Tabla 2).

Los resultados encontrados plantean interrogantes como en las muestras de agua analizadas no se pudo detectar niveles de metales pesados que sobrepasen los límites establecidos por la normativa ambiental aun cuando, en el sector analizado, el río está expuesto al vertido de desechos tóxicos. Una explicación es que el agua del río fluye dinámicamente y por tanto una manera de detectar residuos tóxicos sería muestreando en el momento en que las plantas mineras de la zona vierten sus desechos al Río Calera.

Tabla 1. Concentraciones de metales pesados (mg/L) en agua y sedimentos (sombreado) en tres puntos del Río Calera

Muestra	Coordenadas	Hg(total)	Cd(total)	Pb(total)	As(total)
1	-3.70384, -79.63516	<0,001	0,002	<0,001	0,003
		0,221	6,564	3,310	71,141
2	-3.7142, -79.63441	<0,001	0,002	<0,001	0,003
		0,121	4,254	5,630	78,142
3	-3.72783, -79.63521	<0,001	0,002	<0,001	0,003
		0,171	3,001	0,098	30,101
Valores de referencia		0,006 mg/L	0,003mg/L	0,01 mg/L	0,1mg/L

Tabla 2. Tabla de concentración letal media obtenida

Estación	Tiempo de exposición	CL50	CL Inferior 95,0%	CL Superior 95,0%
1	12	91,6494	86,9823	97,0031
1	18	75,2657	71,495	79,3047
1	24	60,9699	57,6952	64,2654
1	36	47,162	44,0832	50,1395
2	12	51,7649	40,313	66,8882
2	18	44,1512	32,77,27	58,1191
2	24	34,078	23,2672	45,8384
2	36	24,1537	14,6355	33,5789
3	12	86,1234	81,775	91,026
3	18	69,0459	65,3846	72,8668
3	24	55,8965	52,5881	59,1599
3	36	44,5809	41,457	47,576

Por el contrario, los sedimentos del área estudiada si poseen niveles alarmantes de metales pesados lo cual pone en evidencia que hay vertido de desechos tóxicos al río y éstos al ingresar al cuerpo de agua quedan retenidos en el sedimento debido a que se asocian con partículas pequeñas, predominantemente por efecto de la adsorción y precipitación, lo cual es un fenómeno dependiente de los parámetros granulométricos y la composición mineral de los sedimentos.¹⁹

En la Fig. 2 se muestra, como varían los valores de CL50 en los nematodos con cada tiempo de exposición en los tres puntos de muestreo y, al comparar las concentraciones de metales pesados detectadas en cada punto (Tabla 1), la muestra N° 2 es la que presenta los mayores niveles de toxicidad puesto que se alcanzan el 50% de mortalidad a diluciones mayores de los extractos de sedimento en comparación con las muestras obtenidas por encima y por debajo del punto N°2, precisamente el que se localiza frente al sector en donde se encuentran las plantas que procesan el mineral para la explotación aurífera.

Es resaltante que los resultados reflejen tasas de mortalidad de *C. elegans* superiores a las reportados por Tejada¹⁶, González²⁰ y Clavijo²¹ en bioensayos con sedimentos del Río Magdalena, uno de los más afectados por la contaminación por metales pesados en Colombia.

Los valores de metales pesados encontrados en el río Calera son elevados, y pone en evidencia la necesidad imperiosa de realizar más evaluaciones, adoptar acciones de remediación y controlar las descargas de metales pesados en ese cuerpo de agua, debido a que junto al Río Amarillo, dan origen al Río Puyango que ya forma parte del territorio peruano y que ha sido motivo del surgimiento de conflictos internacionales a causa de la contaminación generada en territorio ecuatoriano.

5. CONCLUSIONES

Esta investigación presenta los resultados de la evaluación de la toxicidad del agua y sedimentos del río Calera. La cuantificación de metales pesados reveló que la concentración en agua estaba por debajo de los límites permisibles establecidos por la Norma Ambiental Ecuatoriana, mientras que en la muestra de sedimento los valores de concentración de los metales pesados excedieron considerablemente los límites permisibles, particularmente el arsénico y el cadmio con valores de 4,254 mg/L y 78,142 mg/L. La mortalidad se presentó en todos los nematodos expuestos a muestras de sedimentos, principalmente en aquella provenientes del sector donde operan las plantas procesadoras del material rocoso.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández Cirelli, Alicia. El agua: un recurso esencial. Química Viva 2012[citado el 06 de junio de 2022];11 (3):147-170. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86325090002>
2. Morales, G.C. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. IDRC ;2007.
3. Anand, P. B. Right to water and access to water: an assessment. Journal of International Development, 2007 [citado el 19 de febrero de 2022];19(4), 511-526. Disponible en: <http://dx.doi.org/510.1002/jid.1386>
4. Gómez-Gutiérrez, A., Miralles, M.J., Corbella, I., García, S., Navarro, S. & Llebaria, X. La calidad sanitaria del agua de consumo. *Gaceta sanitaria / S.E.S.P.A.S.*, 2016[citado el 03 de marzo de 2022];30:63–68. Disponible en: 10.1016/j.gaceta.2016.04.012
5. Covarrubias, S.A. & Cabriales, J.J.P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 2017[citado el 24 de febrero de 2022];33:7–21.Disponible en: <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>

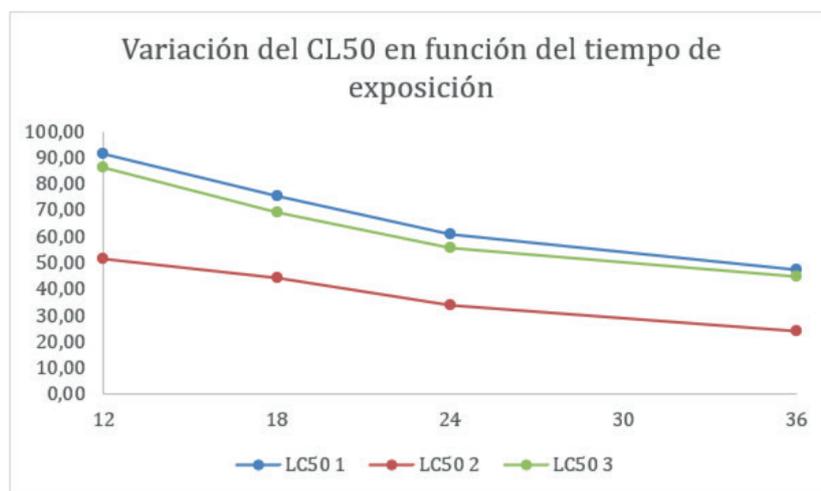


Figura 2. Variación del CL50 en los nematodos con cada tiempo de exposición en los tres puntos de muestreo.

6. Londoño Franco, L.F., Londoño Muñoz, P.T. & Muñoz García, F.G. LOS RIESGOS DE LOS METALES PESADOS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL. *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 2016 [citado el 08 de marzo de 2022]; 14(2): 145-152 Disponible en: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153).
7. Abdu, N, Abdullahi, A.A. & Abdulkadir, A. Heavy metals and soil microbes. *Environmental chemistry letters*. 2017 [citado el 15 de enero de 2022]; 15(1):65-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0587-x>
8. Oviedo-Anchundia, R., Moina-Quimí, E., Naranjo-Morán, J., & Barcos-Arias, M. Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera. *Bionatura* 2017 [citado el 09 de marzo de 2022]; 2:437-441. Disponible en: <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.5>
9. Bravo, M.L., Luna, J.S., Abad, C.Q., Osorio, M.S. & Rodríguez, J.P. Actividad minera y su impacto en la salud humana / The mining and its impact on human health. *CIENCIA UNEMI* 2016 [citado el 15 de febrero de 2022];9(17):92-100. Disponible en: <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss17.2016pp92-100p>
10. Bae, J.-S. & Freeman, H.S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments*. 2007 [citado el 15 de enero de 2022];73(1):81–85. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.10.015>
11. Clavijo, A., Kronberg, M.F., Rossen, A., Moya, A., Calvo, D., Salatino, S.E., Pagano, E., Morábito, J.A. & Munarriz, E. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. *Science of the Total Environment* 2016 [citado el 7 de julio de 2022];569–570:252–261. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.057>
12. Igiri, B.E., Okoduwa, S.I.R., Idoko, G.O., Akabuogu, E.P., Adeyi, A.O. & Ejiogu, I.K. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of toxicology* 2018 [citado el 05 de marzo de 2022] Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>
13. Sykora, V., Laboratorio Experimental de Tecnologías Sustentables, Centro del Uso del Agua, Instituto Nacional del Agua, Buenos Aires, Argentina
14. González Carrasco, V. H., Tejada Benítez, L. P., & Pilaloo Tamayo, J. C. (2021). Evaluación toxicológica de los sedimentos marinos del estero Huaylá, usando como bioindicador al nematodo *C. elegans*. *Ciencia Y Tecnología* 2021 [citado el 24 de febrero de 2022];14(1):61–69. Disponible en: <https://doi.org/10.18779/cyt.v14i1.460>
15. Gamero, M. F. S., Contreras, C. D. R., Pérez, S. L. F., & Pérez, F. J. M. (2021). Determinación de metales pesados en material particulado atmosférico por espectroscopía de absorción atómica: validación. *Revista Politécnica* 2021 [citado el 20 de febrero de 2022];17(34):153-169.
16. Tejada, B. & Olivero, T. Perfil toxicológico de los sedimentos del río Magdalena usando como modelo biológico 'Caenorhabditis elegans'. Universidad Internacional de Andalucía., 2016.
17. Hitchcock, D., Black, M. & Williams, P. Investigaciones sobre el uso del nematodo *Caenorhabditis elegans* para pruebas de toxicidad de aguas residuales municipales e industriales. *Archivos de contaminación ambiental y toxicología* 1997 [citado el 24 de febrero de 2022];33: 252–260. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s002449900251>
18. Tapia, N.L. Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua (Anexo 1, Libro VI de la Calidad Ambiental, del Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente). Ministerio del Ambiente, República del Ecuador. Report number: Registro Oficial -- Edición Especial N° 387. 2015
19. Rodríguez, H.R. CONTAMINACIÓN DE SEDIMENTOS DEL RIO ANOIA POR METALES PESADOS (BARCELONA - ESPAÑA). *Revista Investigación & Desarrollo* 2005 [citado el 11 de marzo de 2022];5(1), 103-116, Disponible en: <https://doi.org/10.23881/idupbo.005.1-8i>
20. González, V., Valle, S., Nirchio, M., Olivero, J., Tejada, L., Valdelamar, J., et al. Evaluación del riesgo de contaminación por metales pesados (Hg y Pb) en sedimentos marinos del Estero Huaylá, Puerto Bolívar, Ecuador. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 2018 [citado el 05 de marzo de 2022]; 21(41): 75–82 Disponible en: <https://doi.org/10.15381/iigeo.v21i41.14995>
21. Clavijo, A., Calvo, D., Kronberg, M.F., Díaz, S., et al. Aplicación de bioensayos ecotoxicológicos para evaluar la calidad del agua del arroyo Cañuelas (Buenos Aires, Argentina). *Tecnología y ciencias del agua* 2021 [citado el 15 de abril de 2022]; 12(1): 261–312. Disponible en: <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2021-01-07>

Agradecimiento

Queremos agradecer al Dr. Mauro Nirchio, por la lectura crítica del manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

Fuente de financiamiento

Este trabajo fue realizado con financiamiento de la Universidad Técnica de Machala (Proyecto)