

MÁS PREGUNTAS QUE RESPUESTAS: APORTES AL CONOCIMIENTO DE LA ECOTOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *LEMNA GIBBA*

Tomás García

Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad de Humanidad y Ciencias – Universidad Nacional del Litoral

Directora: Gagneten, Ana María
Codirectora: Kergaravat, Silvina Vanesa

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: nanoecotoxicología, macrófita, nanomateriales

INTRODUCCIÓN

Los nanomateriales (NMs) representan una nueva clase de contaminantes emergentes y el conocimiento sobre su posible toxicidad es muy limitada (Richardson 2012; Garner et al., 2015; Poynton y Robinson 2018). Las nanopartículas (NPs) tienen propiedades físicas, químicas y biológicas únicas debido a su alta relación superficie-volumen. Sin embargo, las mismas características que las hacen atractivas, pueden generar un riesgo para el ser humano, la biota y el ambiente causando modificaciones estructurales o desequilibrios funcionales en los organismos.

Las plantas acuáticas poseen un rol preponderante en los ecosistemas debido a su posición en la base de las tramas tróficas, pudiendo transferir contaminantes a otros organismos (De la Rosa et al., 2017). *Lemna gibba* es un modelo biológico ampliamente utilizado debido a su alta sensibilidad frente a diferentes contaminantes, mostrando inhibición de varios procesos fisiológicos, del crecimiento y de producción de biomasa (Dewez et al., 2002, 2003; Ali et al. 2006; Van Hoeck et al., 2015; Oukarroum et al., 2015). En nuestro país se encuentra desde el norte (Jujuy, Salta, Formosa y Corrientes), hasta Chubut, en la Patagonia (Novara 2014).

OBJETIVOS

Evaluar los efectos ecotoxicológicos de las nanopartículas de plata sobre *L. gibba* como aporte al conocimiento de contaminantes emergentes sobre un organismo clave en los sistemas acuáticos regionales.

1. Título del proyecto: UNL 1-11: "Elaboración de un índice de sostenibilidad (indicadores ecológicos, económicos y sociales) de sistemas acuáticos de la provincia de Santa Fe"
Instrumento: CAID Orientado
Año convocatoria: 2017
Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral
Directora: Gagneten, Ana María
2. Título del proyecto: Nanoecotoxicología. VT42-UNL11805.
Instrumento: Proyecto de la Secretaría de Políticas Universitarias
Año de convocatoria: 2018
Organismo financiador: Ministerio de Educación
Directora: Gagneten, Ana María

METODOLOGÍA

Síntesis de nanopartículas de plata

Para la obtención de las nanopartículas de plata (NPsAg) se realizó una síntesis química ampliamente utilizada (Durán et al. 2019), donde el nitrato de plata fue reducido mediante borohidruro de sodio (NaBH_4) en baño de hielo. Para la misma se empleó un exceso de este último para reducir la plata iónica y estabilizar las nanopartículas sintetizadas. Para aumentar la estabilidad de la suspensión se utilizó polivinilpirridona (PVP) (Mulfinger et al. 2007; Mavani y Shah 2013). Las NPsAg obtenidas fueron caracterizadas mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y espectrofotometría UV-Vis.

Desarrollo de los cultivos stock de *L. gibba*

Las plantas utilizadas fueron obtenidas de un ambiente acuático no contaminado del valle de inundación del río Paraná (Reserva de la Ciudad Universitaria – RECU- Santa Fe). El cultivo stock y los ensayos de toxicidad se realizaron según el protocolo de la OECD 221 (2202). Se realizó un cultivo monoclonal por reproducción vegetativa aclimatado a condiciones de laboratorio y medio de cultivo durante ocho semanas. Los individuos de *L. gibba* fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (v/v) (entre 30 segundos y 5 minutos) y enjuagados en agua destilada estéril con el fin de minimizar las infecciones por patógenos. Las plantas se mantuvieron en el medio 20X AAP (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y EDTA disódicodihidrato). El mismo medio se utilizó en los ensayos de toxicidad.

Ensayo de toxicidad aguda con *L. gibba*

Se utilizó un inóculo formado por seis plantas con dos frondas cada una (un total de 12 frondas por unidad de ensayo). Se realizaron cinco concentraciones: 0,05 (C_1), 0,1 (C_2), 0,5 (C_3), 1 (C_4) y 5 (C_5) mg/L NPsAg, tres réplicas por tratamiento y control negativo (C_0). Los ensayos fueron semi-estáticos de 7 días en condiciones de laboratorio constantes [iluminación = (6500 - 10000) lux; fotoperíodo = 16L:8O; T = (24 ± 2) °C]. Finalizado el ensayo se evaluaron diferentes parámetros:

- Número de frondas y colonias: el conteo se realizó mediante un conteo directo en los días 0, 3, 5 y 7 de cada una de las réplicas ensayadas.
- Longitud de las raíces: finalizado el ensayo se fotografiaron las plantas de C_0 y de C_5 y empleó el programa Image-Pro Plus 6.0 para medir las raíces en cada caso.

Análisis de datos

Se calculó la concentración efectiva 50 (CE_{50}), la tasa media de crecimiento específico, el tiempo de duplicación y el porcentaje de inhibición del crecimiento (%Ir) (OECD, 2002). Posibles diferencias significativas entre los tratamientos y sus controles, previa comprobación del cumplimiento de las condiciones de normalidad y homocedasticidad de los datos fueron analizadas con ANOVA y test de Dunnet o con test Kruskal-Wallis y post test de Dunn. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Sigma Plot 12.0.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Las NPsAg presentaron un diámetro promedio de 47 ± 3 nm y el máximo de absorbancia fue observado a $\lambda_{\max} = 395$ nm. El número de colonias (Figura 1) presentó diferencias significativas respecto a C_0 en el día 3 en C_3 , C_4 y C_5 ($p < 0,05$), en el día 5 en C_1 - C_5 ($p < 0,004$), y en el día 7 en C_2 - C_5 ($p < 0,007$). Este alcanzó una disminución de 71% en C_5 respecto de control para el día 7. El número de frondas (Figura 2) presentó diferencias significativas respecto a C_0 en C_3 , C_4 y C_5 en el día 5 ($p < 0,04$) y en el día 7 ($p < 0,001$). Este alcanzó una disminución de 53% en C_5 para el día 7. Se encontraron diferencias significativas en la longitud de las raíces (Figura 3) en C_5 en relación a C_0 en el día 7 ($p < 0,001$), con una disminución de 31%.

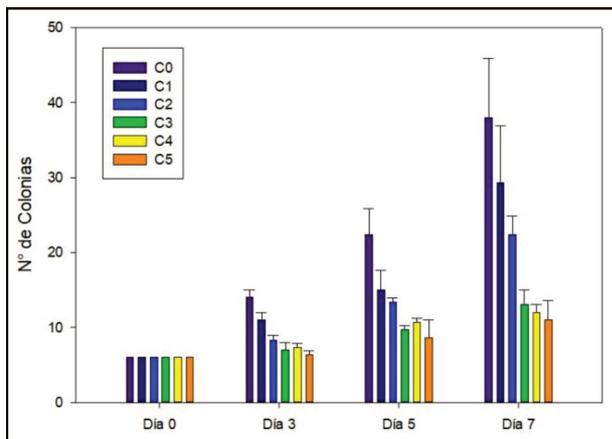


Figura 1: Número de colonias promedio con desvío estándar por concentración de NPsAg

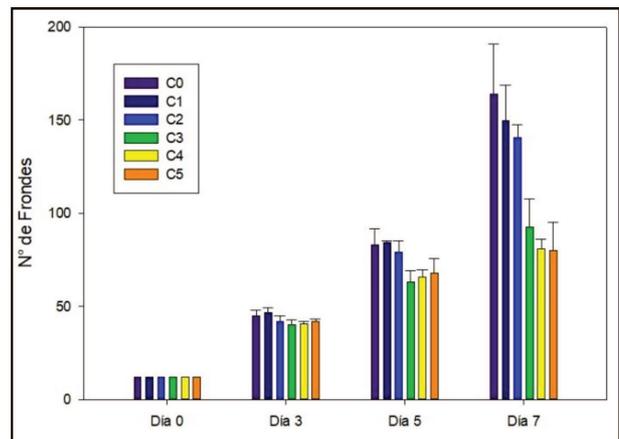


Figura 2: Número de frondas promedio con desvío estándar por concentración de NPsAg

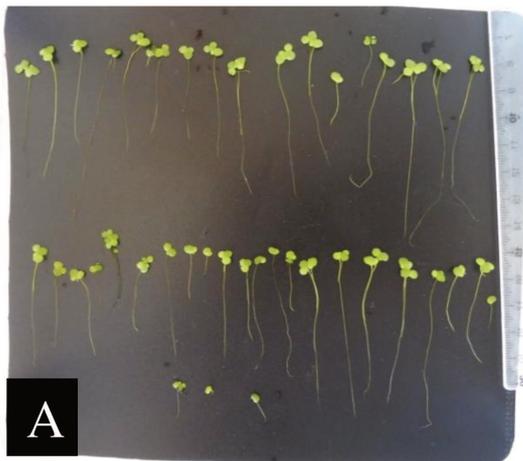


Figura 3: Longitud de las raíces observada en el día 7 en C_0 (A) y C_5 (B).

La CE_{50} obtenida fue de 1,94 mg/L. El tiempo de duplicación las frondas resultó de entre 1,7 y 2 días, para el C_0 y C_5 respectivamente, con diferencias significativas respecto al control en C_3 , C_4 y C_5 ($p < 0,001$). El porcentaje de inhibición del crecimiento en el día 7 resultó de 3,4% en C_1 y de 27,6% en C_5 .

Estos resultados permiten concluir que las nanopartículas de plata afectaron significativamente distintos puntos finales de *L. gibba* luego un ensayo de 7 días, aunque los efectos se manifestaron en distintos momentos a medida que transcurría el ensayo. Los parámetros afectados fueron: crecimiento, tiempo de duplicación de frondas, número de colonias y longitud de las raíces.

El estudio desarrollado alerta sobre posibles efectos que contaminantes emergentes, como las nanopartículas de plata, podrían tener sobre organismos acuáticos de ecosistemas regionales. Son necesarios nuevos ensayos para extender el análisis hacia los datos de otros puntos finales, como área de las frondas, peso (seco y húmedo), contenido de pigmentos y proteínas.

Agradecimientos

Se agradece a la Lic. Natalí Romero por su asistencia y asesoramiento durante todo el trabajo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Ali N. A., Dewez D., Didur O., Popovic R.** 2006. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. *Photosyn. Res.*, 89, 81–87.
- De la Rosa G., Garcia-Castaneda C., Vazquez-Nunez E., Alonso-Castro A. J., Basurto- Islas G., Mendoza A., Cruz-Jimenez G., Molina C.** 2017. Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: Implications on future design. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 226-235.
- Dewez D., Dautremepuits C., Jeandet P., Vernet G., Popovic R.** 2003. Effects of methanol on photosynthetic processes and growth of *Lemna gibba*. *Photochem. and Photobiol.*, 78, 420–424.
- Dewez D., Marchand M., Eullaffroy P., Popovic R.** 2002. Evaluation of the effects of diuron and its derivatives on *Lemna gibba* using a fluorescence toxicity index. *Environ. Toxicol.*, 17, 493–501.
- Durán N., Rolimb W. R., Durán M., Fávoro W. J., Seabra A. B.** 2019. Nanotoxicology of silver nanoparticles: toxicity in animals and humans. *Quim. Nova*, 42 (2), 206-213.
- Garner K. L., Suh S., Lenihan H. S., Keller A. A.** 2015. Species sensitivity distributions for engineered nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.*, 49, 5753–5759.
- Mavani K., Shah M.** 2013. An eco-friendly approach for fabrication of silver nanoparticles by using ascorbic acid from various native sources. *Int. J. Adv. Res.*, 12, 41-48
- Novara L. J.** 2014. Lemnaceae. *Aportes Botánicos de Salta - Serie Flora*, 11 (19). pp. 1-16.
- Organization for Economic Cooperation and Development -OECD-** 2002. Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 221 *Lemna sp.* Growth Inhibition Test. OECD Publication Service, Paris.
- Oukarroum A., Barhoumi L., Samadani M., Dewez D.** 2015. Toxic effects of nickel oxide bulk and nanoparticles on the aquatic plant *Lemna gibba* L. *Biomed Res. Int.* 501326.
- Poynton H. C., Robinson W. E.** 2018. Contaminants of Emerging Concern, With an Emphasis on Nanomaterials and Pharmaceuticals. *Green Chemistry, An Inclusive Approach Chapter 3.7*, 291-315.
- Richardson S. D., Ternes T. A.** 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.*, 83, 4614–4648.
- Mulfinger L., Solomon S. D., Bahadory M., Jeyarajasingam A. V., Rutkowsky S. A., Boritz C.** 2007. Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ.* 84, 322–325.
- Van Hoeck A., Horemans N., Monsieurs P., Cao H.X., Vandenhove H., Blust R.** 2015. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 1-13.