

Utilización del nematodo *Caenorhabditis elegans* en ensayos de toxicidad de muestras de agua

Ma. Florencia Kronberg^{1,2}, Araceli M. Clavijo², Aldana Moya², Olga Heredia², Eduardo A. Pagano^{1,2} y Eliana R. Munarriz^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales, CONICET; ²Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453 – C1417DSE - CABA, Argentina.

E-mail: kronberg@agro.uba.ar

RESUMEN: Durante los monitoreos de la contaminación del agua, es cada vez más frecuente que los estudios toxicológicos incluyan bioensayos con organismos indicadores capaces de revelar la presencia de contaminantes como metales pesados, pesticidas y cianotoxinas, y así proporcionar alertas tempranas de potenciales riesgos ambientales. Si bien los métodos analíticos normalmente utilizados son sensibles y confiables, requieren una serie 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. Uno de los organismos modelo ideales para este tipo de ensayos es el nematodo *Caenorhabditis elegans*. La mayoría de sus procesos fisiológicos básicos se encuentran conservados en organismos superiores, su mantenimiento en el laboratorio es barato y sencillo, y existe una gran variedad de herramientas de biología molecular para su manipulación, ofreciendo la posibilidad de estudiar en detalle los mecanismos biológicos implicados. En el marco de contribuir al mejoramiento del sistema de control de calidad de aguas, el objetivo de este trabajo es utilizar al nematodo *C. elegans* para el desarrollo de nuevos bioensayos que permitan la detección de contaminantes en aguas. Con el fin de establecer un protocolo de trabajo, se seleccionó como tóxico de referencia el Glifosato y se determinó la relación dosis-respuesta mediante la valoración del crecimiento corporal, la fertilidad y la reproducción. Consecutivamente, se estudió la aplicabilidad del bioensayo mediante la exposición de los nematodos a muestras de agua de la región pampeana durante la campaña 2013/2014 de soja, y se compararon los resultados con aquellos obtenidos con Glifosato. En conclusión, este trabajo demuestra que los bioensayos con *C. elegans* son una herramienta promisoriosa para el monitoreo de aguas en el campo de la toxicología ambiental.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de proteger el recurso hídrico para asegurar el suministro de agua potable para consumo humano, la conservación de los ecosistemas y las necesidades productivas, requiere la disponibilidad de agua de buena calidad y baja cantidad de contaminantes. Mientras que el uso de agroquímicos, los desechos industriales y los residuos urbanos deterioran este recurso, se hace imprescindible el diseño de nuevas herramientas de monitoreo y fiscalización de la calidad del agua.

Los bioensayos constituyen un complemento a las técnicas analíticas de evaluación de calidad de aguas, al sumar el análisis de la toxicidad de las muestras a la cuantificación de los contaminantes. 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 (Castillo Morales, 2004).

En este sentido, se plantea la necesidad de diseñar nuevos ensayos para la determinación de la presencia de tóxicos en aguas. Un poderoso enfoque para la realización de pruebas de toxicidad son los bioensayos alternativos con animales simples; diseñados con criterios de valoración sensibles y de manipulación fácil y rápida, que permiten analizar un gran número de muestras en un pequeño volumen y a bajo costo (Leung *et al.*, 2008; Giacomotto y Ségalat, 2010; Peterson *et al.*, 2008).

Uno de los organismos modelo ideales para ser utilizado en este tipo de ensayos es el nematodo *C. elegans* (Leung *et al.*, 2008; Cole *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2010; Avila *et al.*, 2012). Desde el año 1974 se ha utilizado como modelo biológico y ha sido fundamental para esclarecer mecanismos moleculares básicos como la transducción de señales, la muerte celular, el envejecimiento y la interferencia de ARN (Antoshechkin y Sternberg, 2007; Fire, 2007; Kamath *et al.*, 2003). Distintas características han acrecentado su popularidad como modelo animal. Una de las más atractivas es que la mayoría de sus procesos fisiológicos básicos y de respuesta a estrés se encuentran conservados en organismos superiores, incluyendo humanos (Yochem, 2006). Además, su mantenimiento en el laboratorio es barato y sencillo, su dieta se basa en la bacteria *Escherichia coli*, su ciclo de vida es corto y es capaz de generar un gran número de crías (300 huevos por hermafrodita) en un período corto de tiempo (Fig. 1).

C. elegans tiene un tamaño corporal pequeño (1,3 mm), que permite llevar a cabo ensayos *in vivo* en microplacas de 96 pocillos. Su cuerpo es transparente y su linaje celular es invariable, lo cual permite la observación de todas sus células desde el desarrollo embrionario hasta el animal adulto, y analizar la estructura de los órganos internos a través de un microscopio óptico (Yochem, 2006). Otra ventaja interesante, es que existe una gran variedad de herramientas de biología molecular, de ingeniería genética y bioinformáticas que facilitan el estudio en detalle de los mecanismos biológicos que puedan estar implicados (Antoshechkin y Sternberg, 2007; Fire, 2007; Kamath *et al.*, 2003).

En los últimos años se ha demostrado que los nematodos poseen criterios de valoración sensibles para realizar tests de toxicidad (Dhawan *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2004; Höss *et al.*, 2013). Por ejemplo, se han utilizado para analizar los riesgos potenciales de químicos (Yamamuro *et al.*, 2011; Sochova *et al.*, 2007), metales pesados (Chapman *et al.*, 2013; Swain *et al.*, 2004) y pesticidas (Ali y Rajini, 2012; Anbalagan *et al.*, 2013; Höss *et al.*, 2013). La sensibilidad de los mismos es comparable con la de aquellos que utilizan otros organismos (v.g. enquitreidos, lombrices, colémbolos, roedores) pero demandan menos tiempo y espacio (Boyd *et al.*, 2001; Kammenga y Riksen, 1996; Cole *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2004).

En este contexto, se estableció como objetivo de trabajo la optimización de un bioensayo rápido y sencillo para determinar la calidad de agua utilizando el nematodo *C. elegans* como modelo toxicológico. Para concertar el protocolo, se analizó la variación de tres respuestas del ciclo de vida del nematodo, crecimiento corporal, fertilidad y reproducción, al ser expuestos a concentraciones crecientes del agroquímico glifosato y

se determinó la relación dosis-respuesta. Posteriormente, se estudió la aplicabilidad del bioensayo a muestras de agua superficial o subterránea de la cuenca del Arroyo Pergamino durante la campaña de soja 2013/2014, una zona que registra un proceso de intensificación agrícola caracterizada por el uso creciente de agroquímicos. En conclusión, este trabajo demuestra que los bioensayos con *C. elegans* son una herramienta promisoría para el monitoreo de aguas en el campo de la toxicología ambiental.

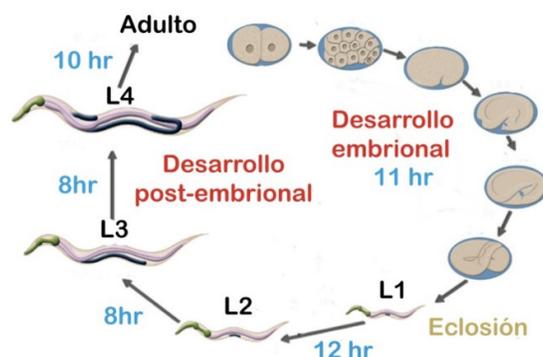


Figura 1 – Ciclo de vida de *C. elegans*. Los números en azul indican el tiempo que el animal pasa en un determinado estadio de desarrollo. Modificado de Altun y Hall (2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de nematodos

Se utilizó la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* var. Bristol, obtenida del Caenorhabditis Genetic Center (University of Minnesota, MN, USA) y mantenida en stocks a -70 °C. Los nematodos se crecieron rutinariamente siguiendo procedimientos generalizados en medio NGM (NaCl 3 g/L, peptona 2,5 g/L, colesterol 5 g/ml, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, agar 17 g/L, buffer fosfato 25 mM pH 6,0) con céspedes bacterianos de *Escherichia coli* OP50-1a a 20 °C (Brenner, 1974; Lewis y Fleming, 1995).

Para los ensayos de toxicidad, los nematodos se sincronizaron al estadio de desarrollo L1 utilizando el método de sincronización por cloro (Lewis y Fleming, 1995) y eclosión de los huevos en buffer M9 (Na₂HPO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO₄ 1 mM) en tubos de microcentrífuga con agitación suave durante 16 h a 20 °C.

Test de toxicidad con C. elegans

El bioensayo con *C. elegans* se desarrolló con pequeñas modificaciones siguiendo la metodología descrita por Höss *et al.* (2013) y acorde a métodos estándar (ISO, 2010). Se incubaron 10 nematodos en estadio L1 con distintas concentraciones de formulaciones comerciales de glifosato sal amida en buffer M9 (o con las

muestras de agua) y *E. coli* hasta $DO_{600nm} 2$ en un volumen final de 0,5 mL. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron durante 96 h a 20 °C. Transcurrido este tiempo, se detuvo el crecimiento de los nematodos por calor (20 min a 50 °C), se tiñeron por el agregado de 0,25 mL de solución de Rosa Bengala (0,5 g/L) y se almacenaron a 4 °C hasta la realización de las mediciones.

Los nematodos testeados se fotografiaron bajo el microscopio óptico con aumento de 40X. Se determinó la longitud del cuerpo de cada nematodo con ayuda del programa Image J (versión 1.48, National Institutes of Health, USA) y se calculó el crecimiento como la resta entre la longitud media del cuerpo antes y después de la incubación. La reproducción de los nematodos se obtuvo mediante el recuento en lupa de la descendencia L1 y se normalizó por el número de animales testeados. La fertilidad se cuantificó como el porcentaje de animales grávidos (≥ 1 huevo dentro del cuerpo).

Se expresaron los parámetros de crecimiento, reproducción y fertilidad como porcentaje de los valores medios para cada concentración (o muestra de agua) respecto a los obtenidos para un control en buffer M9.

Área de estudio y muestreo de aguas

Los muestreos se realizaron en el mes de septiembre durante la campaña 2013/2014 de soja en 20 puntos ubicados en una zona representativa de la cuenca media superior del Arroyo Pergamino (Provincia de Buenos Aires, Argentina), desde las nacientes hasta su paso por la ciudad cabecera (Fig. 2). Además, se ha elegido una subcuenca tributaria al Arroyo Pergamino que corresponde a su afluente el Arroyo Botija. Los puntos de muestreo se situaron en diferentes establecimientos privados y provinciales, y se ubicaron aguas arriba de la ciudad de Pergamino para evitar la posible influencia y contaminación de los efluentes urbanos, con excepción de los puntos 15 a 19 localizados en la ciudad.

La cuenca del arroyo Pergamino está ubicada al norte de la denominada Pampa Ondulada. El relieve de la zona se caracteriza por poseer planicies suavemente onduladas, recortadas por cañadas, arroyos y ríos. El clima es templado-húmedo. La precipitación media anual es de 970 mm, y durante el año existe alternancia entre períodos secos (invierno) y húmedos (primavera, verano y otoño), provocando déficit y excesos hídricos de diferente magnitud. Los principales acuíferos de la región poseen características hidrogeológicas e hidráulicas que permiten su aprovechamiento para diferentes usos. En la tabla 1 se enumeran los puntos de muestreo con sus principales características.

A campo se registraron las siguientes características fisicoquímicas con analizadores portátiles: temperatura (T), pH, total de sólidos disueltos (TSD), conductividad eléctrica (CE) y potencial de óxido reducción (ORP). Para su posterior análisis en el laboratorio, las muestras se tomaron en tubos estériles, se estabilizaron por acidificación con ácido clorhídrico y se guardaron a 4 °C hasta su uso.



Figura 2 - Mapa de los sitios de muestreo dentro de la Cuenca del Arroyo Pergamino. En azul se indican los distintos puntos de muestreo según la numeración indicada en la Tabla 1.

Determinaciones analíticas

Se acondicionó el pH de las muestras de agua y se analizó glifosato sal amida, y su metabolito ácido amino metilfosfónico (AMPA), mediante la determinación de sus derivados por HPLC en un equipo Agilent 1100 Series según Ibañez *et al.* (2005).

Finalmente, se determinó en las muestras de agua la concentración de cadmio, cobre, plomo, zinc, cromo, potasio, sodio, magnesio y calcio por espectroscopía de absorción atómica (APHA, 1995).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente con el programa GraphPadPrism® (versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las respuestas se graficaron en función de la concentración de glifosato sal amida y se calculó la concentración efectiva media y baja (CE_{10} y CE_{50}) aplicando el modelo sigmoidal. Se utilizó el análisis de la varianza seguido de la prueba de Dunnett para comparar los resultados de las muestras de agua con el control (con un nivel de confianza del 99%) y se estudió la correlación entre las variables con el análisis de Pearson (con un intervalo de confianza del 95%).

Tabla 1 -Puntos de muestreo

Muestra	Nombre	Tipo de muestra
1	Campo agrícola La buena vista	Subterránea molino
2	Campo agrícola y granja Capriotti	Subterránea molino 18m
3	Campo agrícola y granja Capriotti	Subterránea motor 70 m
4	Campo experimental Pionner	Subterránea con motor (10 años)
5	Campo experimental Pionner	Subterránea con motor (1 año)
6	Intersección A. Botija y RN 178	Superficial
7	Unión A.Botija y A. Pergamino	Superficial
8	Puente “La Cruz”	Superficial
9	Emprendimiento Chacas de Pergamino Baja	Subterránea freaímetro
10	Emprendimiento Chacas de Pergamino Alto	Subterránea freaímetro
11	Escuela Rural No 34 “JM. Moreno”	Subterránea molino
12	Puente “Madera”	Superficial
13	Campo Conrado	Subterránea (molino)
14	Arroyo del Basural	Superficial
15	Boulevard Pte. “Bs As”	Superficial
16	Boulevard Pte “Colon”	Superficial
17	Boulevard Pte “Gattone”	Superficial
18	Boulevard Pte “Rocha”	Superficial
19	Puentes A. Pergamino sobre la RP No8	Superficial
20	Lago Chacras	Superficial

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del bioensayo con nematodos y determinación de la toxicidad del agroquímico glifosato

Con el fin de optimizar un bioensayo de fácil ejecución y confiable, que permita analizar la toxicidad de muestras de agua a gran escala, se comenzó por estudiar la relación dosis-respuesta de tres parámetros del ciclo de vida del nematodo *C.elegans* al ser expuesto al agroquímico glifosato. Se seleccionó este herbicida como químico de referencia interna del laboratorio debido a que su utilización aumenta día a día y existe una demanda social de establecer el impacto que puede provocar este plaguicida en el medio ambiente. Además, se optó por trabajar con una formulación comercial del agroquímico, pues los principios activos están acompañados de otras sustancias químicas como surfactantes que pueden modificar la toxicidad final del producto. De hecho, se ha demostrado que las formulaciones y productos metabólicos de las formulaciones comerciales del glifosato (como el *Roundup*) causan la muerte de embriones, placentas, y células umbilicales humanos *in vitro* (Benachour y Séralini, 2009). Los efectos no son proporcionales a las concentraciones de

glifosato sino que dependen de la naturaleza de los adyuvantes usados en la formulación (El-Shenawy, 2009).

Se expusieron animales L1 a concentraciones crecientes de glifosato sal amida durante 96 h a 20 °C en buffer M9 con *E. coli* suficiente, como se ha descrito en materiales y métodos. Se determinó la longitud del cuerpo, la descendencia y la gravidez de los animales tratados, y con estos datos se calculó el crecimiento, la reproducción y la fertilidad respecto a un control en buffer M9. En la Fig. 3 se muestran las curvas dosis-respuestas obtenidas para los tres parámetros, crecimiento, reproducción y fertilidad, en función de la concentración de glifosato y el ajuste sigmoidal realizado sobre cada una de ellas.

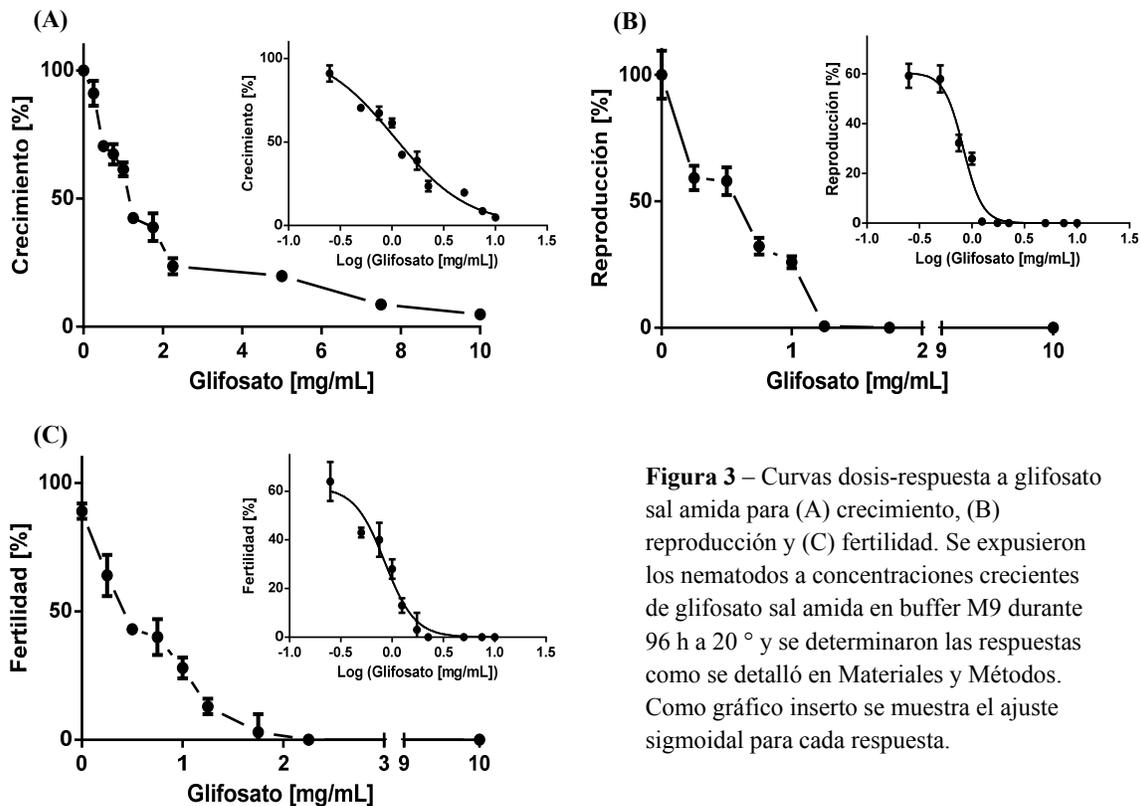


Figura 3 – Curvas dosis-respuesta a glifosato sal amida para (A) crecimiento, (B) reproducción y (C) fertilidad. Se expusieron los nematodos a concentraciones crecientes de glifosato sal amida en buffer M9 durante 96 h a 20 ° y se determinaron las respuestas como se detalló en Materiales y Métodos. Como gráfico inserto se muestra el ajuste sigmoidal para cada respuesta.

Los resultados demuestran que tanto el crecimiento de *C. elegans* como la reproducción y la fertilidad fueron inhibidos por el tratamiento con glifosato de manera concentración-dependiente. En la Tabla 2 se enumeran los valores de las concentraciones efectivas CE_{10} y CE_{50} derivadas del ajuste del modelo sigmoidal, así como también los parámetros estadísticos del análisis realizado. Las tres variables se ajustaron apropiadamente al modelo propuesto, y la reproducción y fertilidad demostraron ser más sensibles al glifosato que el crecimiento.

Tabla 2 –Parámetros de las curvas dosis-respuesta de glifosato sal amida en *C. elegans*

Parámetro	Crecimiento	Reproducción	Fertilidad
CE ₁₀ [mg/mL]	6,4	1,3	1,8
Intervalo de confianza 95%	5,3 a 7,8	1,2 a 1,5	1,5 a 2,1
CE ₅₀ [mg/mL]	1,1	0,8	0,8
Intervalo de confianza 95%	0,8 a 1,4	0,8 a 0,9	0,7 a 0,9
R ²	0,9653	0,9630	0,9435

Utilización del bioensayo para analizar la calidad de aguas

Una vez establecido el protocolo del ensayo, se estudió su aplicabilidad para la determinación de la toxicidad de 20 muestras de agua (superficial o subterránea) de la cuenca del arroyo Pergamino durante la campaña de soja 2013/2014 (Tabla 1). En la Fig. 4 se muestran los resultados del bioensayo con *C. elegans*. Para complementar el análisis de las muestras se determinaron varias características físicoquímicas (Tabla 3), la concentración de algunos cationes (Tabla 4), y la presencia de glifosato y su metabolito AMPA (en todos los casos se observaron valores despreciables).

Según los resultados del test de Dunnett, tanto el valor de crecimiento, como el de reproducción y fertilidad dieron diferencias significativas en las muestras 2, 7 a 9 y 15 a 19 ($P < 0,0001$).

Con las muestras 7 y 8, correspondientes a la unión de los A. Botija y Pergamino, y Puente “La Cruz”(punto aguas abajo de esta confluencia), el crecimiento fue prácticamente nulo (al igual que la fertilidad y la reproducción). Esto podría atribuirse a que estos puntos forman parte de una zona de mayor acumulación de material orgánico y desechos por encontrarse en la confluencia de dos arroyos. En concordancia con esta idea, los valores registrados de TSD, CE y de los cationes potasio, sodio, magnesio y calcio fueron altos en estos puntos (ver Tabla 3 y 4).

Un contexto similar se observó en las muestras 15 a 19, puntos de muestro ubicados en la ciudad de Pergamino, y donde la inhibición del crecimiento, la fertilidad y la reproducción de *C. elegans* fue cercana al 100%. La toxicidad de estas muestras corresponde al depósito de efluentes urbanos, hecho que se refleja en los altos niveles de TSD, CE y de los cationes potasio, sodio, magnesio y calcio (Tabla 3 y 4).

Otro punto con valores de respuesta bajos en el bioensayo es la muestra 9, tomada en un terreno bajo del emprendimiento Chacras de Pergamino, y que podría formar parte de una zona colectora de agua de escorrentía afectada por la acumulación de tóxicos. En este caso los parámetros físicoquímicos de la muestra no reflejaron valores tan altos como en las demás muestras tóxicas. Así como ocurre en la muestra 2, que provocó valores intermedios de crecimiento y fertilidad. Si bien deben realizarse más estudios para determinar cuáles son los orígenes de la toxicidad, una de las posibles causas podría hallarse en que ambas

muestras contienen las concentraciones más altas de zinc detectadas en el muestreo (Tabla 4). Existen varios estudios que demuestran que el zinc tiene efectos tóxicos en *C. elegans* (Wah Chu y Chow, 2002; Harrington *et al.*, 2012). Consecuentemente, es posible que el zinc en estas muestras esté actuando sinérgicamente con otros metales pesados y contaminantes no analizados en este trabajo, induciendo el efecto inhibitorio observado.

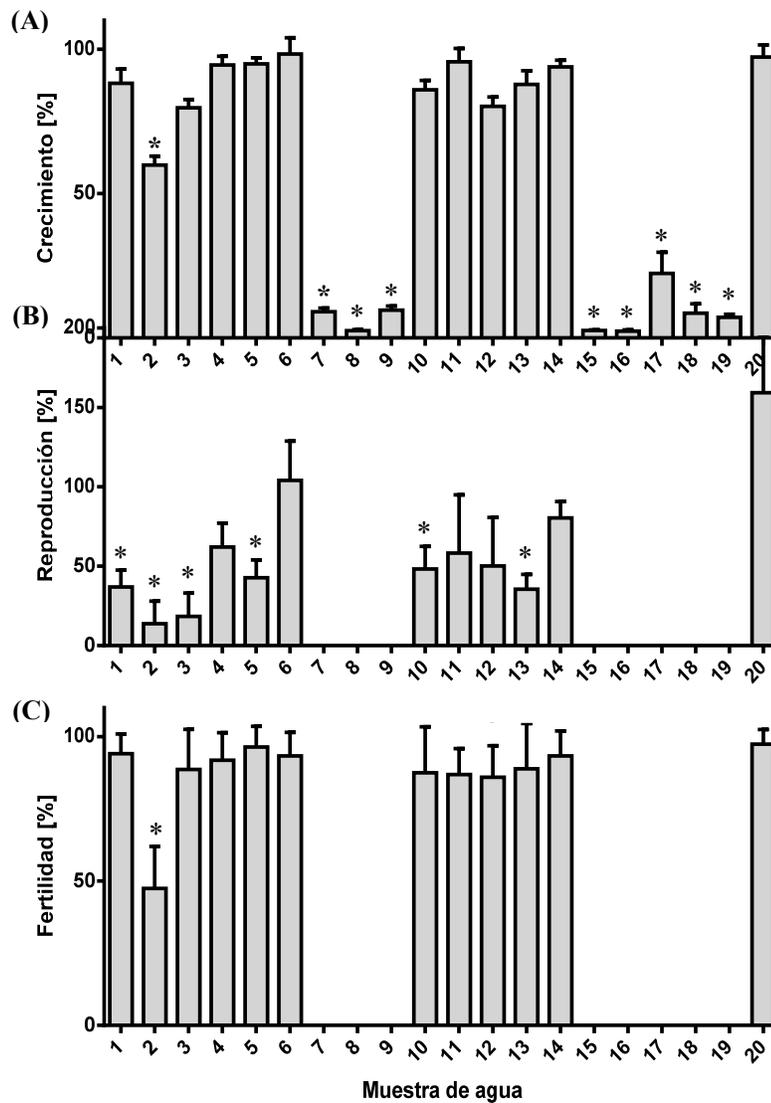


Figura 4 - Efecto del tratamiento con muestras de agua en el (A) crecimiento, (B) reproducción y (C) fertilidad de *C. elegans*. Los nematodos se expusieron a las muestras de agua y se determinaron las tres respuestas de los animales luego de 96 h de incubación a 20 °C. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes. * $P < 0.01$.

La Tabla 5 muestra los resultados de los coeficientes de correlación de Pearson y sus probabilidades asociadas de la comparación entre las variables del bioensayo y las propiedades fisicoquímicas de las

muestras de agua. Tanto el crecimiento como la fertilidad reflejaron una dependencia inversamente proporcional y altamente significativa con TSD y CE ($P < 0,0001$). La reproducción mostró el mismo comportamiento frente a estas características fisicoquímicas pero con un nivel significativo menor ($P < 0,01$), posiblemente relacionado con el error asociado a esta determinación. Además, se ha observado las mismas tendencias negativas entre las tres variables y la concentración de potasio, sodio, magnesio y calcio de las muestras (Tabla 5).

Las correlaciones existentes entre el bioensayo y las propiedades fisicoquímicas validan el uso del nematodo *C. elegans* como modelo toxicológico para la evaluación de los recursos hídricos. De tal manera que mediante el uso del bioensayo se detecta la presencia de tóxicos en las muestras 7-8 y 15-19, las cuales se consideran nocivas para la salud al presentar una TSD mayor al límite de concentración establecido por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O., 1987).

Tabla 3 - Características fisicoquímicas de las muestras de agua

Muestra	T [°C]	pH	TSD ^a [ppm]	CE ^b [μS]	ORP [mV]
1	19,0	7,88	485	975	71
2	19,4	7,41	750	1505	117
3	19,5	7,58	756	1495	107
4	14,5	8,40	593	1189	89
5	19,0	8,25	692	1388	126
6	20,0	8,65	1042	2103	103
7	17,9	8,66	2000	3999	77
8	17,4	8,69	2000	3999	79
9	18,2	7,60	614	1233	126
10	18,9	7,58	505	1007	127
11	18,4	8,04	609	1220	130
12	18,5	8,35	1166	2338	112
13	20,0	7,97	593	1190	128
14	21,5	9,05	830	1643	106
15	18,7	8,50	2000	3999	107
16	19,0	8,61	2000	3999	102
17	18,0	8,58	2000	3999	94
18	17,5	8,55	2000	3999	113
19	19,8	8,66	2000	3999	108
20	19,9	9,70	562	1150	68

Límite de medición para ^aTSD 2000 ppm y para ^bCE 3999 μS

Tabla 4- Concentración de cationes de las muestras de agua

Muestra	Concentración del catión [mg/L]								
	cadmio	cobre	plomo	zinc	cromo	potasio	sodio	magnesio	calcio
1	ND	ND	ND	0,004	ND	77,16	83,34	6,46	7,48
2	ND	ND	ND	0,072	ND	98,74	123,7	8,94	17,20
3	ND	ND	ND	0,031	ND	81,38	123,98	9,02	18,16
4	ND	ND	ND	ND	ND	55,06	116,16	3,88	6,38
5	ND	ND	ND	ND	ND	55,58	124,72	4,60	6,52
6	ND	ND	ND	0,036	ND	90,12	147,98	10,46	17,80
7	ND	ND	ND	ND	ND	197,52	162,96	39,2	49,06
8	ND	ND	ND	ND	ND	197,96	161,5	40,12	50,06
9	ND	ND	ND	0,047	ND	75,86	111,12	6,54	11,54
10	ND	ND	ND	ND	ND	86,18	89,18	7,84	11,26
11	ND	ND	ND	ND	ND	51,78	112,26	3,34	4,36
12	ND	ND	ND	0,026	ND	91,68	152,62	12,46	23,08
13	ND	ND	ND	ND	ND	57,08	115,84	3,54	4,64
14	ND	ND	ND	ND	ND	99,96	137,54	5,74	15,54
15	ND	ND	ND	ND	ND	190,98	159,98	39,34	51,12
16	ND	ND	ND	ND	ND	189,04	163,22	38,88	48,32
17	ND	ND	ND	ND	ND	185,70	161,60	38,98	49,72
18	ND	ND	ND	ND	ND	189,54	162,66	39,12	49,12
19	ND	ND	ND	ND	ND	191,40	163,54	39,30	46,72
20	ND	ND	ND	ND	ND	60,56	112,74	3,30	4,72

ND, no detectado

Tabla 5 – Análisis de correlación de Pearson

Propiedad fisicoquímica	Variable del bioensayo		
	Crecimiento	Reproducción	Fertilidad
pH	-0,0996 ($P = 0,6761$)	0,4365 ($P = 0,0544$)	-0,1038 ($P = 0,6632$)
TSD	-0,8455 ($P < 0,0001$)	-0,5871 ($P = 0,0065$)	-0,8402 ($P < 0,0001$)
CE	-0,8452 ($P < 0,0001$)	-0,5840 ($P = 0,0069$)	-0,8401 ($P < 0,0001$)
ORP	0,1189 ($P = 0,6175$)	-0,1991 ($P = 0,4000$)	0,1002 ($P = 0,6742$)
K	-0,8819 ($P < 0,0001$)	-0,6333 ($P = 0,0027$)	-0,8734 ($P < 0,0001$)
Na	-0,6754 ($P = 0,0011$)	-0,4098 ($P = 0,0728$)	-0,6782 ($P = 0,0010$)
Mg	-0,8856 ($P < 0,0001$)	-0,6455 ($P = 0,0021$)	-0,8770 ($P < 0,0001$)
Ca	-0,8762 ($P < 0,0001$)	-0,6441 ($P = 0,0022$)	-0,8663 ($P < 0,0001$)

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados aquí demuestran la validez del uso del nematodo *C. elegans* como modelo toxicológico estableciéndose como una herramienta integral de evaluación de la toxicidad de los recursos hídricos. La exposición crónica a algunas muestras de agua afecta significativamente el crecimiento, la fertilidad y la reproducción de *C. elegans*, indicando que presentan algún tipo de tóxico que está afectando el normal desarrollo del animal. Estos resultados, en conjunto con los análisis físicoquímicos y analíticos de las muestras, revelan la presencia de niveles relevantes de tóxicos en las zonas analizadas de la cuenca Pergamino.

Existe una disposición en los últimos años hacia el desarrollo de herramientas apropiadas para la evaluación de la toxicidad de agua. Así surge la necesidad de validar nuevos bioensayos apropiados para el análisis de la calidad del agua, ya que el control analítico exhaustivo de las muestras de agua es costoso y resulta muy complejo, dada la extensa lista de todos los posibles contaminantes. De ahí la ventaja de la evaluación de la toxicidad utilizando bioensayos con animales simples, que además permite analizar los efectos de la interacción de contaminantes presentes en la muestra, analizando además la presencia de nuevos tóxicos.

Una de las ventajas de la utilización de este organismo en estudios toxicológicos, es que existen numerosas herramientas que permiten estudiar en detalle y fácilmente los procesos fisiológicos y los caminos moleculares que puedan estar afectados, permitiendo en un futuro analizar las causas de las variaciones en estas respuestas e, incluso, diseñar bioensayos inteligentes que permitan detectar grupos específicos de contaminantes con cepas transgénicas del nematodo que sensibilicen y faciliten la detección.

A su vez, el uso de *C. elegans* como herramienta toxicológica, permitirá ampliar el conocimiento de la situación toxicológica actual en la Provincia de Buenos Aires, dando a los entes reguladores nuevas herramientas para la ampliación de las normativas de gestión integral de los recursos hídricos con el fin de tomar decisiones para proteger el ambiente, la biodiversidad y la salud de los trabajadores y de la población en general. Esto tiene relevancia a nivel mundial debido a la importancia del análisis toxicológico de los plaguicidas utilizados en el sector agrícola y a la necesidad de desarrollar nuevos modelos alternativos para el diagnóstico de la calidad de agua.

Agradecimientos. Este trabajo fue subsidiado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científicas (PID) y Técnicas y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

REFERENCIAS

Ali, S. J., y P. S. Rajini. 2012. Elicitation of dopaminergic features of Parkinson's disease in *C. elegans* by monocrotophos, an organophosphorous insecticide. *CNS and Neurological Disorders - Drug Targets*, 11, pp. 993-1000.

- Altun, Z. F., y D. H. Hall. 2012. Handbook of *C. elegans* Anatomy: WormAtlas, <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
- Anbalagan, C., I. Lafayette, M. Antoniou-Kourouniotti, C. Gutierrez, J. R. Martin, D. K. Chowdhuri, y D. I. De Pomerai. 2013. Use of transgenic GFP reporter strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* to investigate the patterns of stress responses induced by pesticides and by organic extracts from agricultural soils. *Ecotoxicology*, 22, pp. 72-85.
- Anderson, G. L., R. D. Cole, y P. L. Williams. 2004. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, pp. 1235-1240.
- Antoshechkin, I., y P. W. Sternberg. 2007. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat Rev Genet.*, 8, pp. 518-532.
- APHA, A. P. H. A. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th edition
- Avila, D., K. Helmcke, y M. Aschner. 2012. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. *Human and Experimental Toxicology*, 31, pp. 236-243.
- Benachour, N., y G. Séralini. 2009. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chem Res Toxicol*, 22, pp. 97-105.
- Boyd, W. A., M. V. Smith, G. E. Kissling, y J. H. Freedman. 2010. Medium- and high-throughput screening of neurotoxicants using *C. elegans*. *Neurotoxicology and Teratology*, 32, pp. 68-73.
- Boyd, W. A., V. A. Stringer, y P. L. Williams. 2001. Metal LC50s of a soil nematode compared to published earthworm data. *Environ Toxicol Risk Assess*, 10, pp. 223- 235.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, pp. 71-94.
- Castillo Morales, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. . IDRC/IMTA Ediciones.
- Cole, R. D., G. L. Anderson, y P. L. Williams. 2004. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194, pp. 248-256.
- Chapman, E., G. Dave, y J. Murimboh. 2013. A review of metal (Pb and Zn) sensitive and pH tolerant bioassay organisms for risk screening of metal-contaminated acidic soils. *Environmental Pollution*, 179, pp. 326-342.
- Dhawan, R., D. Dusenbery, y P. Williams. 1999. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health A*, 58, pp. 451-462.
- El-Shenawy, N. S. 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, pp. 379-385.
- Fire, A. 2007. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ*, 14, pp. 6966 – 6984.
- Giacomotto, J., y L. Ségalat. 2010. High-throughput screening and small animal models, where are we? *British Journal of Pharmacology*, 160, pp. 204-216.
- Harrington, J. M., W. A. Boyd, M. V. Smith, J. R. Rice, J. H. Freedman, y A. L. Crumbliss. 2012. Amelioration of metal-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*: utility of chelating agents in the bioremediation of metals. *Toxicol Sci*, 129, pp. 49-56.
- Höss, S., R. Menzel, F. Gessler, H. T. Nguyen, H. A. Jehle, y W. Traunspurger. 2013. Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 178, pp. 147-151.
- Ibañez, M., O. J. Pozo, J. V. Sancho, F. J. López, y F. Hernández. 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1081, pp. 145-155.
- ISO. 2010. Determination of the Toxic Effect of Sediment and Soil Samples on Growth, Fertility and Reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda): Water Quality
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen, y J. Ahringer. 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421, pp. 231-237.
- Kammenga, J. E., y J. A. Riksen. 1996. Comparing differences in species sensitivity to toxicants: phenotypic plasticity versus concentration- response relationships. *Environ Toxicol Chem*, 15, pp. 1649-1653.
- Leung, M. C. K., P. L. Williams, A. Benedetto, C. Au, K. J. Helmcke, M. Aschner, y J. N. Meyer. 2008. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological Sciences*, 106, pp. 5-28.

- Lewis, J. A., y J. T. Fleming. 1995. Basic culture methods: *Caenorhabditis Elegans*: Modern Biological Analysis of an Organism, H. F. Epstein, Shakes, D.C. H. F. Epstein, Shakes, D.C.
- Peterson, R. T., R. Nass, W. A. Boyd, J. H. Freedman, K. Dong, y T. Narahashi. 2008. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *NeuroToxicology*, 29, pp. 546-555.
- Sochova, I., J. Hofman, y I. Holoubek. 2007. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environment International*, 33, pp. 798-804.
- Swain, S. C., K. Keusekotten, R. Baumeister, y S. R. Sturzenbaum. 2004. *C. elegans* Metallothioneins: New Insights into the Phenotypic Effects of Cadmium Toxicosis. *Journal of Molecular Biology*, 341, pp. 951-959.
- W.H.O. 1987. Guías para la calidad del agua potable Ediciones.
- Wah Chu, K., y K. L. Chow. 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquat Toxicol*, 61, pp. 53-64.
- Yamamuro, D., R. Uchida, Y. Takahashi, R. Masuma, y H. Tomoda. 2011. Screening for Microbial Metabolites Affecting Phenotype of *Caenorhabditis elegans*. *Biol. Pharm. Bull.*, 34, pp. 1619-1623.
- Yochem, J. K. 2006. Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis. *WormBook* : the online review of *C. elegans* biology, pp. 1-47.