

Estandarización de la técnica de cultivo de *Daphnia* spp proveniente del lago de la Universidad Iberoamericana Puebla para bioensayo de ritmo cardiaco con etanol.

Monterrubio Palma, Daniela

2022-12-02

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5583>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Estandarización de la técnica de cultivo de *Daphnia* spp proveniente del lago de la Universidad Iberoamericana Puebla para bioensayo de ritmo cardiaco con etanol

Badillo Lavenant Andrés (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)¹, Jaimes Ayala Emiliano, (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)¹, Laiseca De La Cruz Ariatna (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)¹, Monterrubio Palma Daniela (tercer semestre en Ingeniería Biomédica, autor corresponsal)¹, Ramírez Rodríguez Rocío (profesor responsable y asesor)¹, Acevedo Escalante Manuel Francisco (profesor asesor)¹.

¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla México.

Resumen

El análisis de los efectos biológicos causados por contaminantes en medios acuíferos es esencial para determinar el grado de toxicidad con el que cuentan diversos ecosistemas, es por ello que microorganismos como el cladócer *Daphnia* suelen emplearse en bioensayos como método de análisis biológico para medir las reacciones fisiológicas y morfológicas que estos organismos presentan ante los agentes tóxicos u otras alteraciones en su ecosistema. El objetivo de este proyecto fue estandarizar una metodología de cultivo de *Daphnia* spp proveniente del lago de la Universidad Iberoamericana Puebla (IBERO Puebla) basada en el control de tres variables: pH (6-7), temperatura (19.8 ± 1.9 °C) y número de individuos; de igual manera, se evaluó el ritmo cardiaco de *Daphnia* spp en condiciones normales (367.2 ± 6.57 bpm) y en medio de cultivo con una concentración de 1% de etanol (316 ± 21.54 bpm al final de la prueba) para verificar la uniformidad de respuesta. Debido al crecimiento poblacional basado en el manejo correcto de las variables controladas, fue posible estandarizar una metodología de cultivo de *Daphnia* spp para su uso en bioensayos como el análisis del ritmo cardíaco con alcohol etílico.

Palabras clave: bioensayos, bioindicador, *Daphnia* spp, etanol, partenogénesis.

*Autor corresponsal: 194921@iberopuebla.mx

Introducción

Los bioensayos son pruebas realizadas sobre organismos vivos, los cuales tienen una gran sensibilidad a los cambios en el ambiente. El objetivo de estas pruebas es diagnosticar los efectos de agentes físicos y químicos por medio de reacciones fisiológicas tales como la tasa de mortalidad, crecimiento, cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos. El daño que las sustancias tóxicas pueden causar en un sistema biológico puede ser contrarrestado por reacciones adaptativas del organismo mediante diversos tipos de metabolismo de detoxificación, por lo tanto, en los bioensayos la toxicidad es evaluada por medio de la interacción entre los organismos y un agente externo [1]. Entre los organismos para pruebas de toxicidad se encuentra el cladócer *Daphnia* [2].

Daphnia es un crustáceo dulceacuícola de 5 a 6 mm en etapa adulta. Suelen ser los herbívoros dominantes de lagos y estanques; y desempeñan un papel importante en la determinación de la claridad del agua ya que filtran el agua al alimentarse de algas, fitoplancton y zooplancton [3]. En la Fig 1 se muestra la anatomía del género *Daphnia*. Este género comprende más de 20 especies, de las cuales las más conocidas son: *D. magna*, *D. pulex*, *D. longispina*, y *D. Strauss* [3].

Este género es ampliamente utilizado como bioindicador ambiental de agentes tóxicos por los siguientes criterios: a) amplia distribución geográfica b) el papel en la comunidad zooplancton en sistemas acuáticos, c) la

facilidad de cultivo en laboratorio, d) reproducción partenogénica, lo cual asegura uniformidad de respuesta, e) ciclo de vida corto, f) producción de un alto número de crías y g) el costo de equipamiento para su mantenimiento [4].

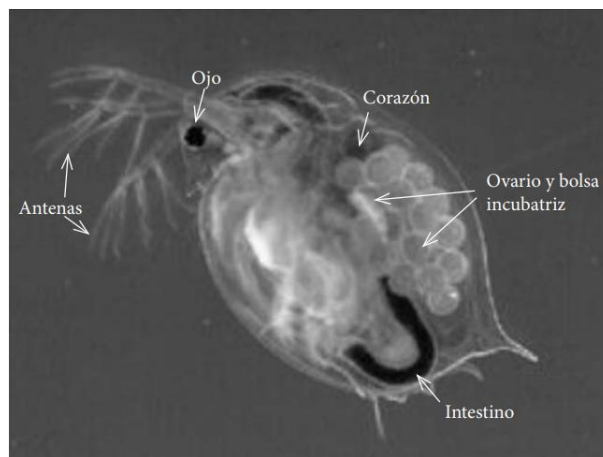


Fig. 1. Anatomía del género *Daphnia* [1]

Por tal motivo, *Daphnia* se ha empleado en diversas investigaciones, tal es el caso del estudio realizado por Corotto y colaboradores [5] donde se realizan pruebas con anestesia para determinar si la inmovilización en animales depende mayormente del tronco cerebral o la médula espinal. De igual manera, en la investigación realizada por

Ocampo et al. [6] las pruebas se realizan con nanopartículas de dióxido de titanio con el fin de determinar el impacto ambiental de las diferentes estructuras cristalinas de dicho compuesto.

Para adquirir *Daphnia* hay dos maneras. La primera es en colecciones biológicas; la cual tiene como principal ventaja que se conoce el subgénero de la especie y se tiene la certeza de que no hay especies externas que se mezclen con *Daphnia*; sin embargo, sus desventajas son la dificultad de *Daphnia* para adaptarse a las nuevas condiciones del laboratorio, lo que provoca una disminución en la población y se requiere hacer el gasto nuevamente si toda la población muere. Por otro lado, el aislamiento de ejemplares provenientes de cuerpos de agua tiene como ventajas que *Daphnia* ya está adaptada a las condiciones ambientales de donde se va a cultivar; sin embargo, es necesario identificarla taxonómicamente mediante la asesoría de un experto. Aunque el cultivo de *Daphnia* es relativamente sencillo [7], en algunos casos la adaptación de *Daphnia* a sus nuevas condiciones provoca una disminución en la población. Por esta razón, en Ronco y colaboradores [7], se explican técnicas de cultivo, las cuales incluyen las especificaciones del agua dura reconstituida que manejan los autores; el cultivo, alimentación y mantenimiento de los organismos; la limpieza y mantenimiento del medio de cultivo; y el control de calidad del cultivo.

Una de las sustancias utilizadas en bioensayos es el alcohol etílico (etanol): compuesto orgánico líquido, incoloro e inflamable. Es el constituyente fundamental de las bebidas alcohólicas clasificadas como fermentadas con un contenido alcohólico entre el 4 y el 20% v/v (volumen de soluto por cada 100 unidades de volumen de la solución). El etanol es una sustancia de fácil acceso ya que la podemos encontrar dentro del laboratorio y de acuerdo con Corotto y colaboradores [5], una de las ventajas de este compuesto con *Daphnia*, es que los efectos que produce en los cambios de ritmo cardíaco en este microorganismo son reversibles y dependientes de la dosis administrada. También se expone que la media de la frecuencia cardíaca inicial de *Daphnia* es de 354 latidos por minuto (rango: 91-521 latidos por minuto). A concentración de 1% de etanol la disminución en la frecuencia cardíaca es leve y transitoria inmediatamente después de que se aplica. A concentración de 5% de etanol la media se reduce a la mitad de su valor inicial. Con concentración de 10% de etanol, ésta disminuye el 20% de su valor inicial [5]. En el presente proyecto, las pruebas realizadas con etanol se basan en la investigación anterior y se realizarán para verificar que *Daphnia* spp sea apta para la realización de distintos bioensayos.

Anteriormente, dentro de la IBERO Puebla, *Daphnia* spp ha provenido de Monterrey, pero ha sido complicado mantener la temperatura controlada. Dado que, dentro del campus se cuenta con un lago artificial en donde crece una gran diversidad de microorganismos, entre ellos *Daphnia*, es posible colectarlos y adaptarlos a las condiciones de laboratorio para futuros bioensayos dentro de la Universidad, lo cual favorecerá a estudiantes e

investigadores para emplearlos en diversas pruebas de toxicidad, al contar con un cultivo de estos cladóceros los estudiantes podrán realizar distintas pruebas de bioensayos con *Daphnia* spp, lo que abre un campo nuevo de experimentación con microorganismos para la comunidad universitaria.

Actualmente no existe una metodología de crianza de *Daphnia* spp dentro de la comunidad universitaria. Por ello, el objetivo de este proyecto es estandarizar una metodología de crianza para *Daphnia* spp del lago de la Universidad IBERO Puebla aplicables a bioensayos.

Metodología

Medio de cultivo

Se recolectaron 2 L de agua del lago de la Universidad IBERO Puebla con la finalidad de filtrarla con ayuda de una bomba de vacío marca EVAR ® modelo EV.40 serie 07-02 y esterilizarla con la autoclave All American 1925X.

Análisis químico del agua del lago de la IBERO Puebla

Se realizó un análisis químico del agua del lago de la IBERO Puebla de cloruros, sulfatos, calcio, magnesio, sodio, potasio y carbonatos en el laboratorio Lab Bio Indu. Esto se realizó con el fin de revisar la presencia de estos minerales en el agua, tal como lo recomienda Contardo et. al. [8].

Recolección de *Daphnia* spp

El lago de la IBERO Puebla, con coordenadas: 19°01'56"N 98°14'28"W, es un sistema léntico artificial el cual es alimentado por las precipitaciones pluviales como se muestra en la Fig. 2.

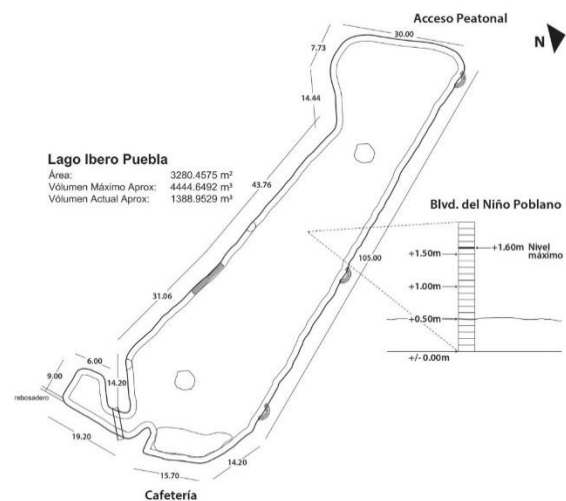


Fig. 2. Lago Ibero Puebla, vista aérea.

Se recolectaron dos muestras de 1 L. del lago de IBERO Puebla, se midieron *in situ* la temperatura y el pH. Las muestras se observaron en un microscopio binocular

marca LEICA DM500 para revisar la presencia de *Daphnia*.

Crianza de *Daphnia* spp

Los ejemplares se colocaron en 5 frascos de 50 mL (réplicas) con agua del lago esterilizada como medio de cultivo (se colocaron 10 ejemplares de *Daphnia* spp en cada frasco). La dieta de *Daphnia* spp consistió en alga espirulina de la marca “Tree essentials”, administrada tres veces a la semana, como lo recomendado por Martín y colaboradores [9].

Monitoreo de condiciones del laboratorio

Se monitoreó el pH, la temperatura y la cantidad de individuos diariamente de lunes a viernes por 12 semanas. El pH se midió con un potenciómetro de bolsillo marca GroLine ® modelo Hanna y la temperatura con un termómetro de mercurio; mientras que el conteo de individuos se hizo manualmente. Finalmente, el fotoperiodo fue de 12 horas luz con 12 de oscuridad.

Limpieza de los frascos

Semanalmente se reemplazó el medio de cultivo en cada uno de los frascos. Este proceso se realizó aforando 5 frascos de 50 mL con medio de cultivo fresco y colocando 10 ejemplares de *Daphnia* spp a cada frasco usando pipetas para reiniciar la cantidad de individuos con el fin de no sobrepoblar los frascos. Este proceso se realizó usando a los individuos del mismo frasco.

Medición del ritmo cardiaco sin etanol

Primero se tomó de manera aleatoria un ejemplar de *Daphnia* spp por cada réplica (5 individuos en total) para colocarlos en un portaobjetos y observarlos en el microscopio Leica DM500. En el microscopio, se grabó un video de un minuto por cada ejemplar asegurándose de que se viera claramente el corazón. Después, se seleccionaron 15 segundos de la grabación en donde el corazón se viera claramente y se ralentizó la velocidad del video. Finalmente, se contaron manualmente los latidos en ese lapso, pasaron a Excel y obtuvo la cantidad de latidos por minuto (bpm) de cada individuo para obtener un promedio y la desviación estándar del ritmo cardiaco de *Daphnia* spp.

Prueba con etanol

Se hizo medio de cultivo con etanol al 1% (49.5 mL de medio de cultivo con 0.5 mL de etanol) y se seleccionaron aleatoriamente 5 individuos de *Daphnia* spp (uno de cada frasco) diferentes a los tomados para medir el ritmo cardiaco sin etanol. La prueba duró por 35 minutos, siendo que se observó el ritmo cardiaco tres veces: después de los primeros 15 minutos, al transcurrir otros 10, y al final de la prueba. Luego, se observó cada individuo por el microscopio para medir su ritmo cardiaco utilizando la misma técnica que en la medición del ritmo cardiaco sin

etanol. Sin embargo, en este caso se realizó una gráfica con los promedios obtenidos en cada lapso.

Ética

No se requirieron permisos especiales para el manejo de *Daphnia* y la realización de estos bioensayos de acuerdo con la Normativa Oficial Mexicana (NMX-AA-087-1995-SCFI). El proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Iberoamericana Puebla antes de llevar a cabo cualquier tipo de experimentación.

Resultados y discusión

El análisis químico del agua de la IBERO Puebla reflejó la presencia de cloruros, sulfatos, calcio, magnesio, sodio y potasio como se muestra en la Tabla 1, lo que concuerda con los minerales utilizados para el agua reconstituida usada en el cultivo de Contardo y colaboradores [8]. Lo anterior, muestra que el agua del lago de la IBERO Puebla funciona bien como medio de cultivo para *Daphnia* spp. Sin embargo, la ausencia de carbonatos en el agua muestra que el caparazón de *Daphnia* spp debe de estar compuesto de los demás elementos.

Tabla 1: Resultados del análisis químico del agua del lago de la Universidad IBERO Puebla realizado por el laboratorio Lab Bio Indu.

	Resultado
Sulfatos + (SO ₄ ²⁻)	47.21 mg/L
Cloruros (Cl ⁻)	<9.88 mg/L
Calcio (Ca ²⁺)	34.524 mg/L
Magnesio (Mg ²⁺)	10.425 mg/L
Potasio (K ⁺)	1.990 mg/L
Carbonatos (CO ₃ ²⁻)	0.0 mg/L
Sodio (Na ⁺)	12.070 mg/L

A lo largo del cultivo de *Daphnia* spp se monitorearon las condiciones de cada frasco. Con respecto a la temperatura, al momento de la recolección de *Daphnia* spp en agosto fue de 22 °C, pero fue disminuyendo, dando un promedio de 19.8 ± 1.9 °C como se indica en la Tabla 2. Con respecto al pH, este estuvo en un rango de 6 a 7 (Tabla 2). Por otra parte, el número de individuos de *Daphnia* spp varió en un rango de 1 a 74, siendo que siempre había *Daphnia* spp en todos los frascos, como se puede observar en la Fig. 3; sin embargo, se encontró la presencia de ácaros en el agua de los frascos, los cuales se habían estado incluyendo en la cuenta hasta el 10 de octubre. Ya que la población de *Daphnia* spp se reinició semanalmente a 10, la gráfica se elaboró con los promedios de la cantidad de individuos en todos los frascos el día 1, el día 2 y así sucesivamente de todas las semanas.

Además, se puede notar que *Daphnia* spp se alimentó de la espirulina, ya que al esterilizarse el agua el 27 de septiembre (semana 6), *Daphnia* spp continuó con un comportamiento similar.

Tabla 2: Características fisicoquímicas de *Daphnia* spp. En donde se compara las condiciones obtenidas (segunda columna) en el laboratorio desde la semana 1 hasta la semana 10, las condiciones del lago de la Universidad IBERO Puebla el 19 de agosto del 2022 (tercera columna) y las condiciones encontradas bibliográficamente (cuarta columna).

	Condiciones en laboratorio	Condiciones en Lago de la IBERO Puebla en la recolección de <i>Daphnia</i>	Condiciones bibliográficas [10]
pH	6.3 ± 0.5	7.7	7 ± 0.5
Temperatura (°C)	19.8 ± 1.9	22	20 ± 2

Cantidad de individuos en cada día de la semana

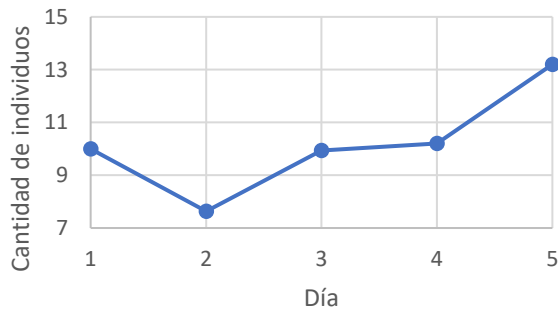


Fig. 3: promedio de la cantidad de individuos que hubo a lo largo de las 12 semanas que duro el proyecto, con desviación estándar de 0, 2.44, 7.64, 10.61, y 14.73 correspondientes al día 1, 2, 3, 4, y 5, respectivamente.

Para observar los individuos de *Daphnia* spp, se buscó una vista lateral como se muestra en la Fig. 4. En la medición del ritmo cardiaco sin etanol el promedio de los 5 ejemplares de *Daphnia* spp fue de 367.2 ± 6.57 bpm. Mientras que en la prueba con etanol se obtuvieron promedios de 356 ± 16.73 bpm, 341.6 ± 14.59 bpm, y 316 ± 21.54 bpm para los primeros 15 minutos, los siguientes 10 minutos y los últimos 10 minutos de la prueba, conforme el individuo permanecía más tiempo en el medio de cultivo con etanol, el ritmo cardiaco disminuía. Estos resultados se muestran en la Fig. 5.



Fig. 4: *Daphnia* spp observada a través del microscopio indicando su corazón.

Latidos por minuto de *Daphnia* spp con etanol

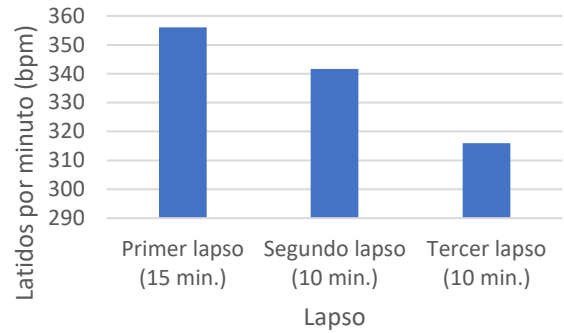


Fig. 5: Se presentan los promedios de los 5 individuos sometidos al etanol. Se realizó un promedio de los 5 en cada lapso de los 35 minutos que duró la prueba.

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

Emplear el agua de donde provenía *Daphnia* spp naturalmente y esterilizarla como medio de cultivo fue fundamental para evitar disminuciones en la población. Mantener un pH y temperatura similares al lago de la Universidad IBERO Puebla favoreció la adaptación de los individuos a las condiciones en el laboratorio. Dado que hubo réplicas (los 5 frascos), se puede comprobar que estas son las condiciones que favorecen el crecimiento del cultivo de *Daphnia* spp proveniente del lago de la Universidad IBERO Puebla.

Por otra parte, se pudo comprobar la uniformidad de respuesta mediante la prueba de etanol, ya que se obtuvieron valores parecidos a investigaciones hechas anteriormente. Por lo que, fue posible corroborar que la metodología de crianza tuvo resultados positivos.

En cuanto al análisis físico químico del agua del lago de la IBERO Puebla, se encontró una discrepancia en la empleabilidad del carbonato en el hábitat natural de *Daphnia*, ya que en la bibliografía se utilizaron concentraciones de carbonato para la crianza de *Daphnia*; sin embargo, los análisis fisicoquímicos del lago reflejan concentraciones nulas.

Este método de crianza ayuda a proveer de microorganismos a los proyectos de la comunidad de la IBERO Puebla que necesiten realizar bioensayos con poblaciones genéticamente uniformes.

Referencias

- [1] C. Díaz, Y. Pica y A. Ronco, «Ensayos de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*,» de *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*, CDMX, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2008, pp. 17-32.
- [2] M. Bundschuh, R. Rosenfeldt, R. Schulz y F. Seitz, «Nanoparticle toxicity in *Daphnia magna* reproduction studies: The importance of,» *Aquatic Toxicology*, vol. 126, pp. 163-168, 2012.
- [3] «Hanazato, Takayuki; Dodson, Stanley,» *Limnology and Oceanography*, vol. 40, n° 4, pp. 700-709, 1995.
- [4] C. López, A. Espinosa y J. Alape, «Variación en las características del ciclo de vida en individuos de *Daphnia magna*, proveniente de diferentes camadas,» *Acta Biológica Colombiana*, vol. 3, n° 2, pp. 93-104, 1996.
- [5] F. Corotto, D. Ceballos, A. Lee y L. Vinson, «Making the Most of the *Daphnia* Heart Rate Lab: Optimizing the Use of Ethanol, Nicotine & Caffeine,» *The American Biology Teacher*, vol. 72, n° 3, pp. 176-179, 2010.
- [6] L. Ocampo, M. Botero y L. Restrepo, «Evaluación del crecimiento de un cultivo de *Daphnia magna* alimentado con *Saccharomyces cerevisiae* y un enriquecimiento con avena soya,» *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, vol. 23, n° 1, pp. 78-85, 2010.
- [7] A. Ronco, M. Díaz y Y. Pica, «Conceptos generales,» de *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*, Ottawa, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004, pp. 17-22.
- [8] J. Contardo, Implementación del bioensayo de toxicidad crónica con *Daphnia magna*, Chile: Universidad Mayor, 2009.
- [9] K. Martín y J. Ruiz, The effect of hydrophobic gases on the nervous system of *Daphnia magna*, Monterrey: Centro de Investigación y Estudios Avanzados, 2021.
- [10] M. Núñez y J. Hurtado, «Bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado,» *Revista Peruana de Biología*, vol. 12, n° 1, pp. 165-170, 2005.
- [11] C. Band, «Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas,» de *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 2007, pp. 1-15.
- [12] L. Torrentera y A. Tacon, «La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura,» 1989. [En línea]. Available: <https://www.fao.org/3/ab473s/AB473S00.htm#TOC>.
- [13] A. Lanteri, V. Confalonieri y M. Rodriguero, «Formas curiosas de reproducción animal, la partenogénesis,» *Ciencia hoy*, vol. 20, n° 119, pp. 15-22, 2010.