



Evaluación toxicológica de los sedimentos marinos del estero Huaylá, usando como bioindicador al nematodo *C. elegans*

Toxicological evaluation of the marine sediments of the Huaylá estero in Ecuador, using the *C. elegans* nematode as bioindicator

Víctor Hugo González Carrasco^{1a}, Lesly Patricia Tejada Benítez², Juan Carlos Pilaloe Tamayo^{1b}

^{1a}Universidad Técnica de Machala, Ecuador, ORCID: 0000-0002-9127-0342, E-mail: vgonzalez@utmachala.edu.ec

^{1b}ORCID: 0000-0002-0339-3052, E-mail: jpilaloe@utmachala.edu.ec

²Universidad de Cartagena, Colombia, ORCID: 0000-0003-3240-917X, E-mail: lpbenitez@gmail.com

Rec.: 24.03.2021 Acept.: 01.06.2021

Publicado el 30 de junio de 2021

Resumen

El Estero Huaylá, ubicado en la Provincia de El Oro (Ecuador) ha sido impactado, química y biológicamente, por diferentes actividades antropogénicas como la industria agrícola, camaronera, laboratorios de criaderos de larvas, aguas servidas y descargas directas de efluentes domésticos sin el tratamiento adecuado. En este trabajo se determinó la presencia de metales como el mercurio y el plomo en los sedimentos marinos y su toxicidad usando *Caenorhabditis elegans* como modelo. Muestras de sedimentos de nueve sitios del estero fueron secados y analizados para determinar el contenido de mercurio y plomo por espectrofotometría de absorción atómica con nebulización de llama y con la generación de hidruros con atomización en una celda de cuarzo. Para evaluar la toxicidad, *C. elegans* fue expuesto a extractos acuosos de los sedimentos, cambios en parámetros biológicos tales como mortalidad, locomoción, crecimiento, reproducción y bioquímicos fueron registrados a través de la expresión de genes como respuesta al estrés por metales y a estrés oxidativo a través de las cepas transgénicas *mtl-2::gfp* y *sod-4::gfp*, respectivamente. Los resultados demuestran que la concentración de mercurio fue elevada en todas las estaciones, y la de plomo fue baja. Los nemátodos silvestres expuestos a los extractos de los sedimentos mostraron efectos en la mortalidad, crecimiento, locomoción y reproducción. Los nemátodos transgénicos presentaron sobreexpresión de los genes *mtl-2* y *sod-4*. En general, las estaciones con mayor concentración de mercurio y mayor toxicidad fueron aquellas situadas en las distribuidoras de fertilizantes y cal para camaroneras y cerca de las estaciones de gasolina.

Palabras Clave: nematodos, metales, toxicidad.

Abstract

The Estero Huaylá, located in the Province of El Oro (Ecuador) has been impacted by the different human activities, such as agricultural industry, shrimp farms, larval breeding laboratories, sewage, and domestic effluent without treatment which are discharged directly into the waters of the estuary, contaminating it and neglecting all existing biological diversity. In this work, we evaluated the presence of metals in the marine sediments and their toxicity using the model organism *Caenorhabditis elegans*. Sediment samples from nine locations were dried and analyzed to determine the presence of mercury and lead by atomic absorption spectrophotometry with flame fogging and the generation of hydrides with atomization in a quartz cell. In assess the toxicity, *C. elegans* was exposed to aqueous extracts of sediments and changes in biological parameters such as survival, locomotion, growth and reproduction, and biochemical parameters such as changes in the expression of genes for stress response by metals and oxidative stress through the expression of *mtl-2::gfp* and *sod-4::gfp*, respectively. The results show that the mercury concentration was high at all points, and the lead concentration was low. The wild *C. elegans* exposed to the extracts of sediments showed effects on mortality, growth, locomotion and reproduction. The transgenic nematodes presented overexpression of the *mtl-2* and *sod-4* genes. In general, the points with the highest concentration of mercury and greater toxicity were those located in the distributors of fertilizers and lime for shrimp farms and near the gas stations.

Keywords: nematodes, metals, toxicity.

Introducción

La Provincia de El Oro-Ecuador es una de las zonas, en reserva de minerales, más ricas del Ecuador y además una de las provincias costeras que vierte sus aguas hacia el estero Huaylá; el cual es un cuerpo de agua que ha sido fuertemente impactado por diferentes actividades antropogénicas entre las que se destacan la industria agrícola, camaronera, laboratorios de criaderos de larvas, aguas servidas, así como descarga de efluentes domésticos sin el tratamiento adecuado. El estero Huaylá está sujeto a la acción intermareal, al descontrolado crecimiento poblacional, en su ribera izquierda, a la proliferación de diversas e incompatibles actividades generadoras de impactos ambientales a sus aguas, al suelo, al aire, a la biodiversidad y a la salud de sus habitantes. Este cuerpo de agua ha sido poco estudiado y se desconoce su estado toxicológico. Por lo anterior, en este trabajo se determinó la concentración de mercurio y plomo en los sedimentos del estero y su toxicidad usando el nematodo *Caenorhabditis elegans*. El empleo de *Caenorhabditis elegans* como modelo toxicológico ha sido ampliamente estudiado alrededor del mundo en muestras de sedimento tanto marino como de río, debido a que poseen ciclos de vida cortos, sensibilidad a diferentes tóxicos y versatilidad de parámetros de toxicidad. (Höss *et al.*, 1999; Höss *et al.*, 2010; Menzel *et al.*, 2009; Tejeda-Benitez *et al.*, 2016; Tuikka *et al.*, 2011)

Materiales y métodos

Muestreo y preparación de sedimentos

Las muestras de sedimentos fueron colectadas en nueve sitios como se muestra en la Figura 1. El muestreo fue llevado a cabo entre los meses de noviembre y diciembre del 2017 en tiempo de mareas bajas. Para tal efecto se usó una draga Van Veen, tomando cuatro submuestras de 250 g en cada punto para completar tres muestras compuestas, cada una de 1 kg colocadas en bolsas de polietileno previamente rotulada. Todas las muestras fueron envasadas en bolsas de plástico y conservadas a 4 °C para evitar proliferación de bacterias presentes en ellas hasta su análisis. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C y posteriormente secadas a 40 °C en una estufa por cuatro días, trituradas y tamizadas hasta un tamaño de partícula menor de 63 µm.

Análisis de metales

Para el análisis de mercurio y plomo, a 1 g de muestra de sedimento seco, se añadió 15 mL de HNO₃ concentrado y 5 mL de HCl concentrado, en una parrilla eléctrica, evaporando la fase líquida a temperatura moderada. El soluto fue disuelto en 10 mL de solución

HCl 1:1 y se sometió a ebullición hasta un volumen de 5 mL. Esta solución fue filtrada directamente en un matraz volumétrico de 50 mL, lavándose el residuo con H₂O destilada, finalmente fue aforada y homogenizada para el análisis de mercurio y plomo por la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA), (Unicam Solar 329), con nebulización de llama.

Obtención de extracto acuoso

Se pesaron 15 g de sedimento seco y fueron mezclados vigorosamente en 15 mL de agua destilada y conservados por 24 horas a 4 °C (Anbalagan *et al.*, 2012). El sedimento húmedo fue colocado en dos cilindros de jeringa de 20 mL cada uno, rellenos con lana de vidrio (Power y de Pomerai, 1999). Los cilindros fueron colocados en tubos de plástico de 50 mL y centrifugados a 4500 rpm durante 10 min. Entre 5 y 8 mL de extracto líquido fueron recuperados de cada muestra de sedimento después de 2 a 4 centrifugaciones. Los extractos de sedimentos de cada muestra fueron reunidos y vueltos a centrifugar a 10000 rpm para eliminar todas las partículas de sedimento restantes.

Nemátodos y Bacterias

Las cepas de *C. elegans* Bristol N2 y de *E. coli* OP50 fueron donadas por el Dr Joel Meyer de Duke University (Estados Unidos), y las cepas BC20342, (mtl-2::gfp) y BC20333 (sod-4::gfp) fueron generados donativos de University of Nottingham (Reino Unido).

Ensayos de toxicidad

Las cepas de *C. elegans* fueron conservadas en agar K (KCl, NaCl, agar, peptona, colesterol, CaCl₂ y MgSO₄). Los medios fueron inoculados con *E. coli* OP50 como fuente de alimento y mantenidos a 16 °C. Para la sincronización por edad larval, los nematodos fueron tratados por diez minutos con solución blanqueadora con NaClO y NaOH, para que a las 14 h todos los huevos eclosionen y las larvas se encuentran en estado L1 (Phillip *et al.*, 1990).

Los ensayos de mortalidad se llevaron a cabo usando la cepa de tipo silvestre Bristol N2. Aproximadamente 10 individuos, previamente sincronizados, en edad L4 (tres días después de la oxidación alcalina), fueron usados para cada muestra de extracto. Se usaron placas de cultivo celular de 96 pozos. Los individuos fueron expuestos durante 24 h a 20 °C al extracto total y a una solución al 50% del extracto en agua miliQ, realizando cuatro réplicas para cada tratamiento. Para determinar el punto final fueron contados los individuos vivos y muertos al cabo de 24 horas usando un microscopio de disección, considerando como muertos aquellos individuos que no respondieron al estímulo cuando se picaban con un alambre (Shen *et al.*, 2009; Tejeda-

Benitez *et al.*, 2016).

Para el ensayo de crecimiento, se usaron aproximadamente 200 individuos en edad larval L1 (un día después de la sincronización) bajo dos concentraciones de los extractos acuoso s (extracto total y una solución 1:1 en agua miliQ) realizando cuatro réplicas por tratamiento en placas de cultivo celular de 24 pozos. Como fuente de alimento fue adicionada *E. coli* OP50. La longitud de los nematodos después de 72 h de exposición fue medida usando el microscopio de disección LW Scientific con un aumento de 4X y el software de análisis de imagen del mismo equipo (Arnold *et al.*, 2013; Tejada-Benitez *et al.*, 2016).

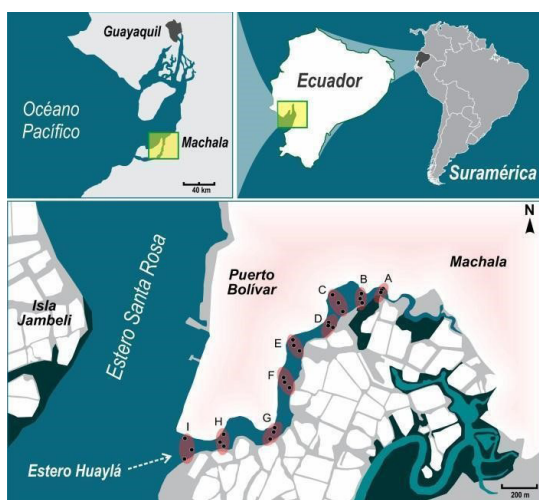


Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en el estero Huaylá

Los efectos de los extractos de sedimentos en la reproducción de las cepas de *C. elegans* tipo silvestre N2 fueron evaluados después de 72 h de exposición de larvas L4. Un adulto joven fue colocado en un plato con agar K, *E. coli* OP50 y 300 μ L de solución de extracto (extracto total y solución 1:1 en agua miliQ). Después de 72 h fueron contados el número de crías en todas las etapas larvales. Cuatro réplicas para cada tratamiento fueron realizadas (Höss *et al.*, 1999).

La locomoción de los nematodos fue evaluada por observación de los movimientos básicos después de la exposición a dos concentraciones de los extractos (extracto total y solución 1:1 en agua miliQ) durante 24 h. Cada nematodo N2 en etapa L4 fue transferido a un pocillo que contiene 60 μ L de medio K en la parte superior del agar. Después de un período de recuperación de 1 min, el número de curvamientos del cuerpo durante un intervalo de 20 s fue registrado. El curvamiento del cuerpo es observado como un cambio en la dirección de la parte de los nematodos que corresponde a la vulva superior de la faringe a lo largo

del eje Y suponiendo que los nematodos se desplazan a lo largo del eje X (Tejada-Benitez *et al.*, 2016; Xing *et al.*, 2009).

Para evaluar los cambios en la expresión de genes como respuesta al estrés, los nematodos se cultivaron en placas de agar K y luego fueron lavados usando medio K enfriado con hielo (53 mM NaCl, 32 mM KCl). Alícuotas iguales (10 μ L) de *C. elegans* en todas las etapas de cada cepa reportera fueron colocadas en microplacas negras de 96 pozos, no fluorescentes de fondo en U junto con las muestras de extractos y agua ultrafiltrada como control y cuatro réplicas para cada tratamiento. Las placas se incubaron a 20 °C, y las lecturas se realizaron a las 4 y 24 h. Después de reposar en hielo durante 15 min, la fluorescencia fue cuantificada mediante el uso de un lector de placas Perkin-Elmer Victor 1420, usando filtros de paso de banda a 485 y 525 nm para la excitación y emisión, respectivamente (Anbalagan *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron promediados para obtener un valor medio para cada sitio de muestreo. La normalidad de los datos fue evaluada aplicando la prueba de Shapiro Wilk, la homocedasticidad con el estadístico de Bartlett, y la independencia de los residuos mediante el contraste de Durbin-Watson. En los casos que no se cumplieron los supuestos del ANOVA, se realizaron análisis comparativos con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Resultados y discusión

Concentración de mercurio y plomo en los sedimentos

Las concentraciones promedio de mercurio y plomo en cada sitio de muestreo se presentan en la Figura 2. En general se presentaron altas concentraciones de mercurio (1 – 4.5 μ g/L) y bajas concentraciones de plomo (0.05 – 0.09 μ g/L) en la mayoría de las muestras.

Los resultados del análisis de varianza en los que se comparó la concentración de mercurio, por cada estación de muestreo evidencian que el menor y mayor promedio de este metal se presentó en las estaciones A (0.964 \pm 0.064 μ g/g) y D (4.345 \pm 1.268 μ g/g) respectivamente, presentando esta última diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con el resto de las estaciones; igualmente se observa que la distribución de los mayores promedios de este metal, ocurre en la parte central del estero (estaciones D-G).

Senior y Valarezo (2015), reportaron valores de concentración de Hg en el estero Santa Rosa el mismo que se une con el estero Huaylá, entre 367.5 mg/kg y 8755 mg/kg, promedio de 1471.05 mg/kg, valores

mayores a lo encontrado en el presente. Los autores consideran una extrema contaminación por este metal de acuerdo a la guía para calidad de sedimentos de la norma canadiense (0.10 mg/kg) y el valor de referencia de la norma Holandesa (0.3 mg/kg) (IADC/CEDA, 1997).

Para el caso del plomo, se observó que las estaciones A e I, fueron las que presentaron menor promedio de concentración del Pb (0.048 ± 0.005 y 0.090 ± 0.003 $\mu\text{g/g}$), aunque solo fueron estadísticamente diferentes con la estación G ($p < 0.05$), observándose además que la distribución de los mayores promedios, de forma similar que el Hg, en la zona central del estero.

Senior y Valarezo (2015) en su investigación del estero Santa Rosa encontraron concentraciones de plomo superiores a los del estero Huaylá, entre 11.33 y 28.55 mg/kg, con promedio de 18.66 mg/kg, indicando contaminación por este metal, que puede ser producto de la actividad minera en esta zona, que está situada aguas abajo del estero Huaylá. Sadiq (1992) señala que los valores de Pb Total en los sedimentos no deben ser mayores a 5 mg/kg, valor que no es superado por ninguna de los nueve puntos seleccionados. Con relación a los valores de concentración de Pb, estos resultados del Pb demuestran que las concentraciones de las zonas de cada una de las localidades se distribuyen de una forma homogénea, pudiendo estar asociado a comportamientos de adsorción y desorción similares en todo el ecosistema.

Mortalidad

Los resultados de mortalidad obtenidos al exponer *C. elegans* a los extractos acuosos están mostrados en la Figura 3. Observando que la mortalidad fue mayor sobre el nemátodo por la exposición a los extractos totales de cada estación de muestreo, destacándose las estaciones D y E, como las de mayor mortalidad promedio (18%).

A pesar de que los resultados encontrados para la mortalidad en el presente estudio, resultan ser inferiores a los reportados por Tejeda-Benitez *et al.* (2016), para los sedimentos del Río Magdalena en (mortalidad *C. elegans*: 5 - 30%), uno de los más afectados por la contaminación química en Colombia, resulta preocupante que se registre este comportamiento, ya que existe una alta probabilidad de que se esté afectando una fracción importante de las poblaciones de organismo bentónicos del estero, a causa de la contaminación por los metales pesados analizados y otros elementos que no se hayan tenido en consideración durante el presente estudio.

Locomoción

Los resultados del efecto de exposición de los extractos de los sedimentos sobre la locomoción de los especímenes de *C. elegans*, medida a partir de la frecuencia de curvamientos del cuerpo, se muestran en la Figura 4. Con excepción de la estación de muestreo H, el resto tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la dilución 1:1 y el extracto total, siendo éste último extracto, quien disminuyó significativamente la locomoción de los especímenes de *C. elegans*. Se observa una fuerte disminución en los movimientos en los nematodos expuestos al extracto total de las muestras A, B, D y G, con una reducción hasta menos de 10 curvamientos en 20 s para estas muestras. El menor efecto en la locomoción lo presentaron los nematodos expuestos a las soluciones al 1:1 de las muestras G y H con un número de curvamientos en 20 s cercano a 20.

Crecimiento

La comparación del promedio de longitud total de los especímenes de *C. elegans* expuestos a los extractos de sedimentos de cada punto de muestreo se muestran en la Figura 5. Se puede observar que la muestra de nematodos expuesta al control tiene en promedio una longitud de 400 μm , mientras que la longitud de los nematodos expuestos a los extractos de sedimentos disminuyó considerablemente incluso hasta valores inferiores a 150 μm , validado por la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las estaciones de muestreo y el control. Por otro lado, las soluciones de extracto 1:1 causaron menos efecto en la reducción del crecimiento que los extractos totales. Además, también se observó diferencia significativa entre el sitio de muestreo G con el B y F; entre el H y el resto de sitios a excepción del G, y entre el I con el B, F y H.

El efecto de los extractos de sedimentos del estero Huaylá en el crecimiento de *C. elegans* fue similar al reportado en un estudio con los sedimentos del Río Magdalena, los nemátodos expuestos inhibieron la frecuencia de curvamientos del cuerpo hasta un 61% (Tejeda-Benitez L., 2016).

En el análisis del crecimiento de los nematodos, se observó un efecto mayor en el extracto total que en la solución al 50%, sugiriendo que el efecto de los extractos de sedimentos en el desarrollo del cuerpo de los nemátodos es dependiente de la concentración. Algunos investigadores han encontrado que el mercurio interfiere en el crecimiento de *C. elegans* (Helmcke *et al.*, 2009; McElwee & Freedman, 2011). Este metal fue hallado en los sedimentos estudiados en este trabajo, como también en algunos suelos y sedimentos evaluados con *C. elegans* y en los cuales se evaluó el efecto en su crecimiento. Por ejemplo, los sedimentos

del Río Magdalena inhibieron el crecimiento del nematodo hasta un 38% (Tejeda-Benitez, 2016). En otro estudio, *C. elegans* expuesto a sedimentos de agua dulce con bajo nivel de contaminación antropogénica experimentaron inhibición del 25% en el crecimiento (Höss *et al.*, 2010). Por otro lado, *C. elegans* expuesta a extractos de sedimentos de tres ríos alemanes sufrieron inhibición entre el 47 y el 93% (Tuikka *et al.*, 2011). *C. elegans* expuestos a 22 muestras de suelos contaminados inhibieron su crecimiento entre 10 y 60% (Höss *et al.*, 1999). Asimismo, los suelos contaminados del estado de Luisiana después del Katrina también inhibieron el crecimiento de *C. elegans* (Harmon & Wyatt, 2008).

Reproducción

El análisis comparativo de Kruskal Wallis (K), para la mediana de la producción de crías se presenta en la Figura 6. Se observa que no hubo diferencias estadísticamente significativas (p -valor > 0.05), entre los efectos ejercidos por los extractos de sedimentos procedentes de cada estación de muestreo y el tratamiento control, a pesar de estos resultados, en la misma figura se observa una ligera superioridad en el número de crías en los organismos expuestos a los extractos de la estación de muestreo F, seguido de la B y el Control. A pesar de la baja significancia hallada, se puede observar una ligera superioridad en el número de cría de los organismos expuestos a los sedimentos de las estaciones A, C e I (Fig. 6).

Con relación a la reproducción, la ligera superioridad en el número de cría de los organismos expuestos a los sedimentos de las estaciones A, C e I, puede estar asociado con la presencia de disruptores endocrinos que interfieren con el normal funcionamiento de las hormonas causando alteraciones en las funciones reproductivas del animal. Dentro de este grupo se encuentran algunos metales como Cu, Co, Cr, Ni, Mn, Zn, Cd, Pb y Hg por su capacidad de interactuar o interferir en las funciones hormonales (Reid *et al.*, 2015). Sin embargo, muchos otros contaminantes tales como pesticidas organoclorados son potentes disruptores endocrinos y también podrían estar presente en los sedimentos del estero de Huaylá, aunque no fueron determinados en este estudio.

En otro estudio con muestras de sedimentos de ríos, (Höss *et al.*, 1999) reportaron que los nemátodos expuestos experimentaron una disminución hasta de un 40% en el tamaño de la cría en comparación con el control, mientras que, para Tejeda *et al.* (2016) la reducción fue en promedio de 23% en relación con el control.

Expresión de genes de respuesta al estrés.

La expresión de genes *mtl-2* y *sod-4* en términos

de fluorescencia relativa se muestra en la Figura 7. Los resultados obtenidos mostraron que el gen *sod-4* experimentó sobre expresión respecto al control, especialmente en la estación de muestreo I, donde se registró la mayor fluorescencia relativa de la cepa de *C. elegans*, alcanzando casi tres veces el nivel de expresión del tratamiento control. Con relación a la expresión del gen *mtl-2*, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre las estaciones de muestreo D y E, con la estación I; caracterizándose las primeras por que los especímenes mantuvieron un perfil de subexpresión de este gen con respecto al control, mientras que para los organismos expuestos a los extractos de la estación I, el perfil fue de sobreexpresión.

Una manera de verificar el efecto toxicológico de una sustancia, es mediante la identificación del grado de expresión de algunos genes encargados de la producción de moléculas protectoras frente al estrés oxidativo al interior celular. Basado en las pruebas realizadas, se puede afirmar que la maquinaria antioxidante de *C. elegans*, incluye el grupo de proteínas de la superóxido dismutasa (SODs), las cuales catalizan la conversión del anión superóxido a H_2O_2 y oxígeno molecular. *C. elegans* posee cinco genes que codifican SODs: *sod-1*, *sod-2*, *sod-3*, *sod-4* y *sod-5*. El gen *sod-1* codifica Cu/Zn SODs, que está presente en el citosol, pero que también ha sido encontrado en la membrana mitocondrial. El gen *sod-4* expresa dos isoformas extracelulares de Cu/Zn SOD (Back *et al.*, 2010). La sobreexpresión de *sod-4* en los nemátodos expuestos a las muestras de sedimentos se encuentra posiblemente relacionada con la presencia de compuestos que generan la formación de especies reactivas de oxígeno, activando la expresión de genes antioxidantes tales como *sod-4*. En un estudio con extracto acuoso de suelos provenientes de una mina de plomo y zinc abandonada en España, la expresión de *sod-4* alcanzó a ser cuatro veces la del control usando nemátodos transgénicos GFP (Anbalagan *et al.*, 2012). En cuanto al gen *mtl-2*, algunos autores han mostrado que *C. elegans* es altamente sensible a los metales, a través de la expresión de metalotioneínas (MTs) codificadas por los genes *mtl-1* y *mtl-2* (Wang *et al.*, 2010). Las MTs son unas proteínas pequeñas ricas en cisteína con alta afinidad por metales (Monteiro *et al.*, 2014). Están involucradas en la reclusión, transporte, detoxificación y protección contra metales (Höckner *et al.*, 2011). La unión de metales a las MTs promueve la expresión del gen *mtl-2*, el cual está relacionado con el alto contenido de metales en estos sitios. Cuando los nemátodos son expuestos a exceso de iones metálicos, se induce la expresión de MTs, previniendo así la acumulación de metales y el daño citosólico (Polak

et al., 2014). De esta manera, las MTs detoxifican y protegen la célula contra antioxidantes (Back *et al.*, 2010). En el estudio de suelos provenientes de una mina de plomo y zinc usando cepas transgénicas, la expresión de *mtl-2* sobrepasó dos veces la del control (Anbalagan *et al.*, 2012).

Análisis Multivariado de Agrupación.

La agrupación de las estaciones de muestreo, a partir del contenido de metales y la de los parámetros utilizados para evaluar la toxicidad con el nemátodo *C. elegans* (Longitud total, locomoción y número de crías), se muestra en el dendograma de la figura 8, el cual obtuvo a partir del cálculo del índice de similitud, basada en la distancia Euclidiana. Este análisis permitió identificar a una distancia superior a 10, dos grupos, el primero conformado por los puntos de muestreo A, B, D y E, y el segundo por los puntos C, I, G, F y H. El análisis de este patrón de agrupación permitió identificar, con excepción de la estación C, la existencia de un gradiente de distribución espacial de

las variables analizadas, lo cual puede estar relacionado con el efecto diferencial de las actividades económicas que se desarrollan en las zonas aledañas al área de estudio.

Análisis de Correlaciones

Los resultados del análisis de correlación (*r*) por rangos de Spearman, se muestran en el Cuadro 1. Hubo valores del coeficiente *r*, intermedios (40 – 50%), significativos ($p < 0.05$) y positivos, sólo para la correlación entre los metales Hg y Pb y entre la locomoción de los especímenes expuestos a una disolución 1:1, con el Pb. Contrario a este comportamiento, la producción de crías se vio afectada negativamente en un 43%, por la concentración de Hg y en un 52% por el Pb presente en los sedimentos. Este último elemento también se correlacionó inversamente con la mortalidad de los especímenes de *C. elegans* expuestos a los dos extractos (dilución 1:1, y Extracto total).

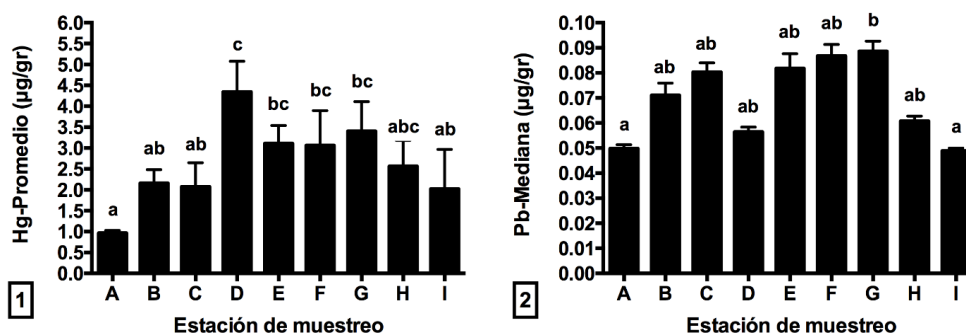


Figura 2. Distribución de la concentración de mercurio y plomo en sedimentos marinos del estero Huaylá, Ecuador. ANOVA para Hg (1) y Kruskal Wallis para Pb (2). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p -valor < 0.05).

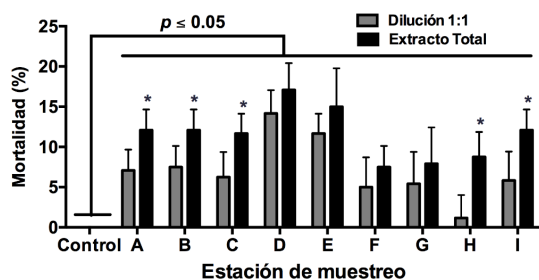


Figura 3. Efecto de los extractos acuosos del sedimento marino del estero Huaylá, sobre la mortalidad de *C. elegans*. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control ($p < 0.05$)

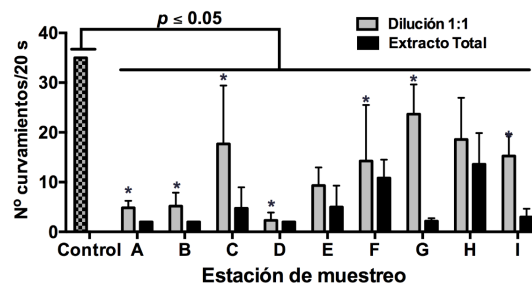


Figura 4. Efectos de los extractos en la locomoción. La línea de intercepción entre el control y la línea horizontal que reúne a las estaciones de muestreo, indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el primero y las estaciones. *Indica diferencias significativas entre los extractos de cada estación de muestreo.

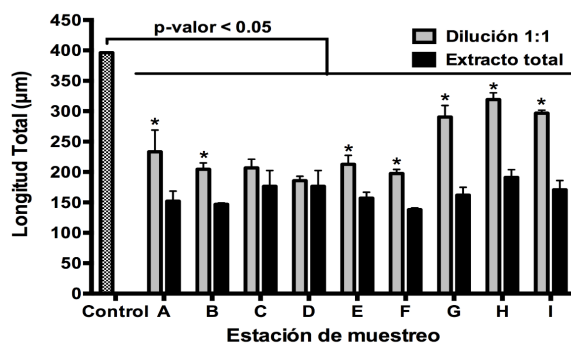


Figura 5. ANOVA para el promedio de longitud del cuerpo. La línea de intersección entre el control y la línea horizontal que reúne a las estaciones de muestreo, indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el primero y la estaciones. * Indica diferencias significativas entre los extractos ($p < 0.05$) para cada estación de muestreo.

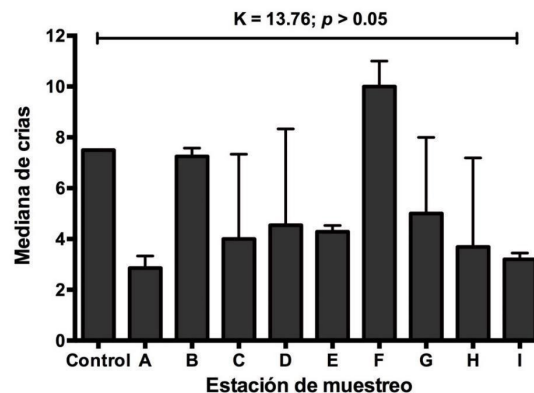


Figura 6. Tamaño de la cría. La barra superior indica que no existen diferencias significativas entre las medianas de las estaciones de muestreo y el control ($p > 0.05$).

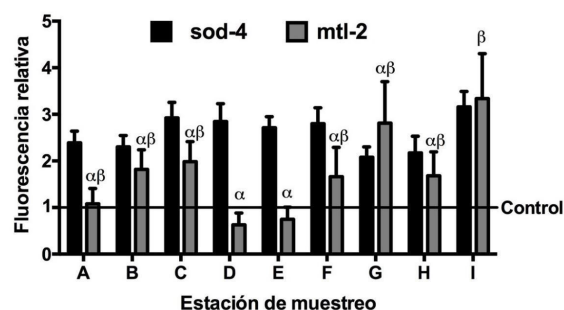


Figura 7. Expresión de genes de respuesta al estrés. Símbolos diferentes para cada gen, entre las estaciones de muestreo, indica diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$. En el caso del gen *sod-4*, no se incluyeron símbolos, por no presentar diferencias ($p > 0.05$) entre las estaciones.

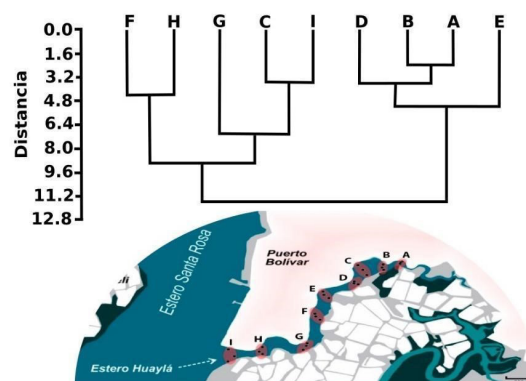


Figura 8. Dendrograma de similaridad

Cuadro 1. Correlación unilateral de Spearman

	N	Hg ($\mu\text{g/g}$) r (p-valor)	Pb ($\mu\text{g/g}$) r (p-valor)
Hg ($\mu\text{g/g}$)	27	-	0.41 (0.02)
Pb ($\mu\text{g/g}$)	27	0.41 (0.02)	-
Locomoción (E. Total)	27	0.18 (0.18)	0.31 (0.06)
Locomoción (Dil. 1:1)	27	0.06 (0.38)	0.41 (0.02)
Crías/individuo	27	-0.43 (0.01)	-0.52 (0.00)
Longitud	27	-0.02 (0.46)	-0.09 (0.33)
Mortalidad (E. Total)	27	0.02 (0.46)	-0.53 (0.00)
Mortalidad (Dil. 1:1)	27	0.07 (0.37)	-0.24 (0.00)
Fluorescencia Sod-4	27	-0.36 (0.03)	-0.07 (0.36)
Fluorescencia mtl-2	27	0.12 (0.27)	-0.02 (0.46)

E. Total= Extracto total, Dil= Dilución. Números marcados indican correlaciones significativas ($p < 0.05$).

Conclusiones

La determinación de mercurio y plomo en los sedimentos superficiales del estero Huaylá de la parroquia de Puerto Bolívar (Ecuador) y su comparación con estándares internacionales dejan en evidencia que este estero se encuentra fuertemente contaminado con relación al mercurio, y poco contaminado con respecto al plomo. Se destacó la estación D con el mayor contenido de mercurio. La concentración de plomo se mantuvo prácticamente constante, variando en un reducido rango de valores.

Los *C. elegans* silvestres expuestos a los extractos de los sedimentos superficiales del estero Huaylá de la parroquia de Puerto Bolívar (Ecuador) mostraron efectos en la mortalidad, crecimiento, locomoción y reproducción, destacándose las estaciones D y E, como las de mayor mortalidad promedio, las muestras recolectadas en las estaciones A, B, D y G, con una reducción en la frecuencia de curvamientos del cuerpo, G, H e I como las de mayor disminución en la longitud del cuerpo, F con mayor efecto en el tamaño de la progenie y la estación I con las mayores sobreexpresiones de los genes *mtl-2* y *sod-4*.

Los nemátodos transgénicos expuestos a los extractos de los sedimentos marinos recolectados en el estero Huaylá de la parroquia de Puerto Bolívar (Ecuador) mostraron sobreexpresión de los genes *mtl-2* y *sod-4* la cual pudo ser medida a través de la emisión de fluorescencia.

La exposición de *C. elegans* a los extractos de sedimentos del estero Huaylá no tuvieron efectos estadísticamente significativos en la reproducción.

Se evidenció una fuerte asociación entre la presencia de metales pesados y parámetros de toxicidad como mortalidad y reproducción.

Literatura citada

- Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourouniotti, M. (2012). Uso de cepas informadoras transgénicas de GFP del nematodo *Caenorhabditis elegans* para investigar los patrones de respuestas al estrés inducidas por pesticidas y extractos orgánicos de suelos agrícolas. *Ecotoxicology*, 22, 72–85.
- Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourouniotti, M. et al. (2013). Uso de cepas informadoras transgénicas de GFP del nematodo *Caenorhabditis elegans* para investigar los patrones de respuestas al estrés inducidas por pesticidas y extractos orgánicos de suelos agrícolas. *Ecotoxicology*, 22, 72–85.
- Arnold, M., Badireddy, A., Wiesner, M., Di Giulio, R., & Meyer, J. (2013). Cerium oxide nanoparticles are more toxic than equimolar bulk cerium oxide in *Caenorhabditis elegans*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *Archivos de Toxicología y Contaminación Ambiental Volumen*, 65(0), 224–233.
- Back, P., Matthijssens, F., Vlaeminck, C., Braeckman, B. P., & Vanfleteren, J. R. (2010). Effects of sod gene overexpression and deletion mutation on the expression profiles of reporter genes of major detoxification pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 45(7–8), 603–610. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.014>
- Harmon, S. M., & Wyatt, D. E. (2008). Evaluation of post-Katrina flooded soils for contaminants and toxicity to the soil invertebrates *Eisenia fetida* and *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 70(10), 1857–1864. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.007>
- Helmcke, K. J., Syversen, T., Miller, D. M., & Aschner, M. (2009). Characterization of the effects of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(2), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.013>
- Höckner, M., Dallinger, R., & Stürzenbaum, S. R. (2011). Nematode and snail metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 1057–1065. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0826-3>
- Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., & Steinberg, C. (1999). Growth and fertility of *Caenorhabditis elegans* (nematoda) in unpolluted freshwater sediments: Response to particle size distribution and organic content. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(0), 2921–2925.
- Höss, S., Ahlf, W., Fahnenstich, C., Gilberg, D., Hollert, H., Melbye, K., Meller, M., Hammers-Wirtz, M., Heininger, P., Neumann-Hensel, H., Ottermanns, R., Ratte, H. T., Seiler, T. B., Spira, D., Weber, J., & Feiler, U. (2010). Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination-Determination of toxicity thresholds. *Environmental Pollution*, 158(9), 2999–3010. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.013>
- IADC/CEDA. (1997). *Environmental Aspects of Dredging, guide 3: investigation, interpretation and Impact*.
- McElwee, M. K., & Freedman, J. H. (2011). Comparative toxicology of mercurials in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(9), 2135–2141. <https://doi.org/10.1002/etc.603>
- Menzel, R., Swain, S. C., Hoess, S., Claus, E., Menzel,

- S., Steinberg, C. E. W., Reifferscheid, G., & Stürzenbaum, S. R. (2009). Gene expression profiling to characterize sediment toxicity - A pilot study using *Caenorhabditis elegans* whole genome microarrays. *BMC Genomics*, *10*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-160>
- Monteiro, L., Brinke, M., dos Santos, G., Traunspurger, W., & Moens, T. (2014). Effects of heavy metals on free-living nematodes: A multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. *European Journal of Soil Biology*, *62*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.02.005>
- Phillip L. Williams David B. Dusenbery, & Dusenbery, D. B. (1990). AQUATIC TOXICITY TESTING USING THE NEMATODE, CAENORHABDITIS ELEGANS Environmental Protection Agency @ PA) has pub-. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *9*(10), 1285–1290.
- Polak, N., Read, D. S., Jurkschat, K., Matzke, M., Kelly, F. J., Spurgeon, D. J., & Stürzenbaum, S. R. (2014). Metalloproteins and phytochelatin synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *160*(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.12.001>
- Power, R., de Pomerai, D. (1999). Efecto de las entradas de metales individuales y apareadas en el suelo sobre un nematodo transgénico inducible por estrés. *Archivos de Toxicología y Contaminación Ambiental*, *37*, 503–511.
- Reid, A., Sherry, T. J., Yücel, D., Llamosas, E., & Nicholas, H. R. (2015). The C-terminal binding protein (CTBP-1) regulates dorsal SMD axonal morphology in *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience*, *311*, 216–230. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.026>
- Sadiq, M. (1992). *Química de metales tóxicos en entornos marinos*. <http://hdl.handle.net/1969.3/22623>
- Senior, W. (2015). *INFORME FINAL Universidad Técnica de Machala (UTMACH) – Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE)*.
- Shen, L., Xiao, J., Ye, H., & Wang, D. (2009). Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *28*(1), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.009>
- Tejeda-Benitez, L., Flegal, R., Odigie, K., & Olivero-Verbel, J. (2016). Pollution by metals and toxicity assessment using *Caenorhabditis elegans* in sediments from the Magdalena River, Colombia. *Environmental Pollution*, *212*, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.057>
- Tejeda-Benitez L., O.-V. J. (2016). *Caenorhabditis elegans*, un modelo biológico para la investigación en toxicología. *Revisiones de Contaminación Ambiental y Toxicología*, *237*, 1–35.
- Tuikka, A. I., Schmitt, C., Höss, S., Bandow, N., von der Ohe, P. C., de Zwart, D., de Deckere, E., Streck, G., Mothes, S., van Hattum, B., Kocan, A., Brix, R., Brack, W., Barceló, D., Sormunen, A. J., & Kukkonen, J. V. K. (2011). Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *74*(1), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.038>
- XING, X., DU, M., ZHANG, Y., & WANG, D. (2009). Adverse effects of metal exposure on chemotaxis towards water-soluble attractants regulated mainly by ASE sensory neuron in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Sciences*, *21*(12), 1684–1694. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62474-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62474-2)