

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL IMPACTO TOXICOLÓGICO DE NUEVOS NANOMATERIALES SOBRE *BIOFILMS* BACTERIANOS

Dalia de la Fuente-Vivas, Sara Collado, Natalia Fernández-Pampín, Nandita Dasgupta, Laura Gómez-Cuadrado, Rocío Barros, Sonia Martel Martín, Carlos Rumbo

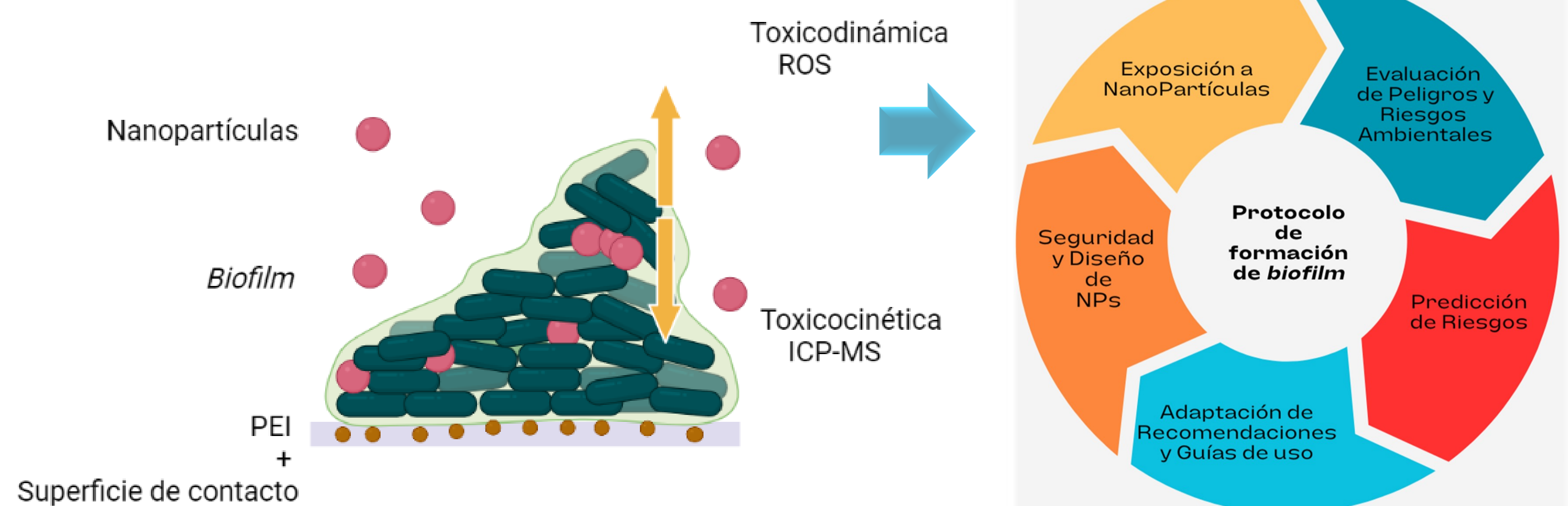
International Research Centre in Critical Raw Materials-ICCRAM, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001, Burgos, Spain

Corresponding author's e-mail: ddelafuente@ubu.es

Introducción

Durante los últimos años, el incremento del uso de nanopartículas (NP) en diversos ámbitos, como medicina o agricultura, despierta la necesidad de evaluar el riesgo que suponen para la salud y el medio ambiente. En este sentido, los *biofilms* se consideran excelentes candidatos para ser utilizados en estudios de eco-toxicidad, por su capacidad para acumular y responder rápidamente a xenobióticos. Sin embargo, no existe un protocolo estandarizado, habiendo únicamente un artículo publicado al respecto (Chaumet *et al.*, 2019).

Este trabajo aborda el desarrollo de una metodología para la ejecución de estudios de toxicocinética y toxicodinámica en *biofilms* formados por *Pseudomonas putida* tratados con nanopartículas (NP) de ZnO:Mn.



Marco de proyecto de DIAGONAL

Diseño del protocolo de ecotoxicidad en *biofilm*

1. Formación de *biofilm*

- Inóculo inicial: OD: 0,7 ($\approx 3-7 \times 10^7$ bacterias/mL)
- Medio de cultivo: MMD (Minimal media Davis formulation)
- T°: 37 °C
- Tiempo de incubación: 96 h
- Superficie: Placas pretratadas con polielectrolito (PEI) para favorecer la adhesión del *biofilm* al fondo de la placa.

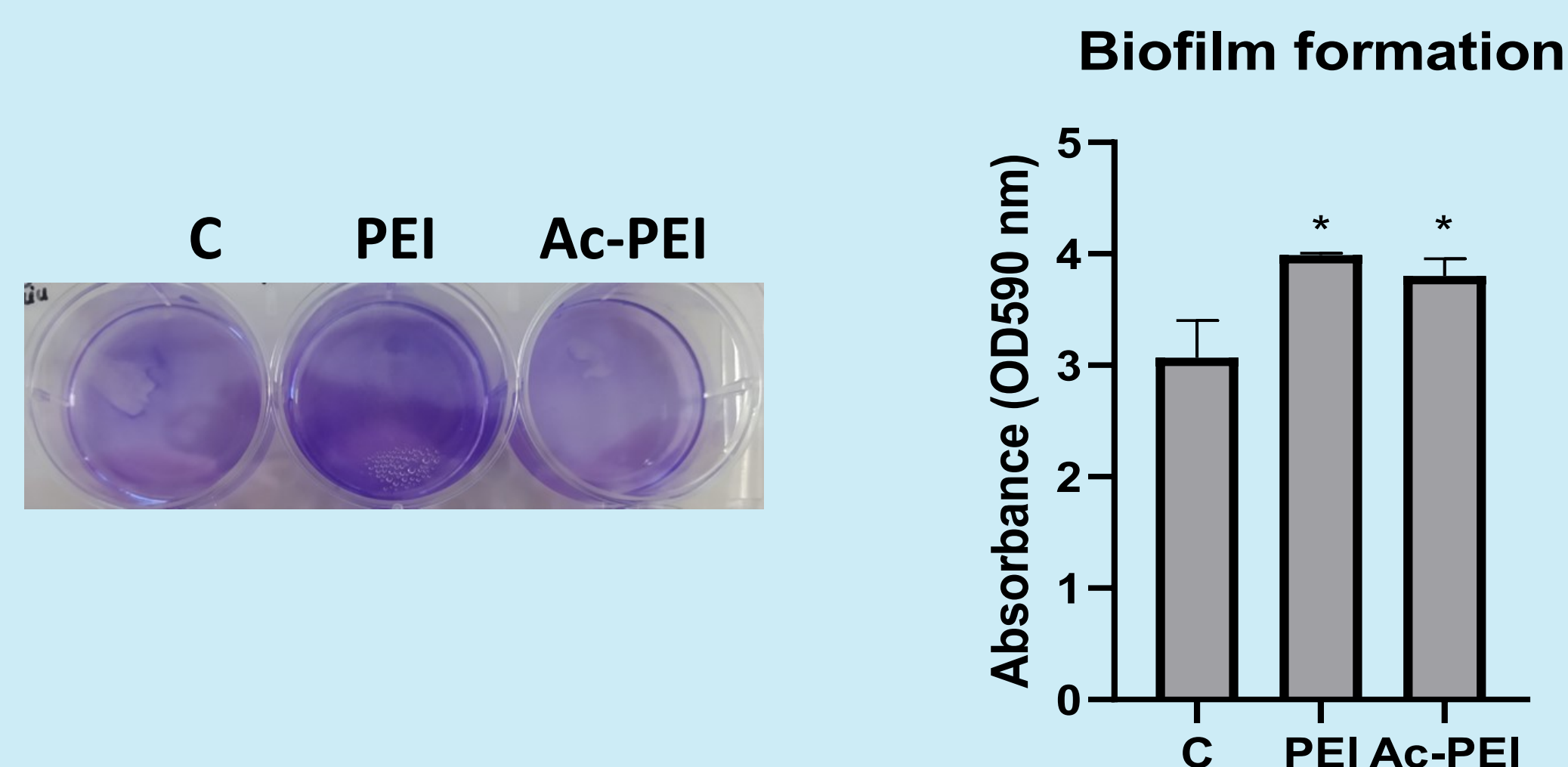


Figura 1. Ensayo *in vitro* para la detección de *biofilm* en placa de poliestireno tratado con polielectrolitos: PEI y Acetil-PEI. Todas las muestras se testaron por triplicado. Tinción con cristal violeta (izquierda), cuantificación de la absorbancia a 590 nm (derecha).

2. Toxicodinámica - Análisis de estrés oxidativo (ROS)

- Estudio de ROS mediante marcaje con CM-H2DCFDA durante 2h, 30 °C, 120 rpm. Uso de H₂O₂ como inductor de estrés oxidativo.

Previamente se ha estudiado ROS sobre bacterias en estado plactónico.

3. Toxicocinética – ICP-MS:

- Exposición del *biofilm* a NP durante distintos tiempos (0, 24, 48, 72 h).
- Análisis de la composición iónica (ICP-MS):
Fracción 1: sobrenadante que cubre el *biofilm* (entorno ambiental).
Fracción 2: biomasa de *biofilm* (absorción de NP).

Resultados de toxicodinámica

Estudio del efecto de NP de ZnO:Mn en los niveles de ROS producidos por *biofilm* de *Pseudomonas putida*

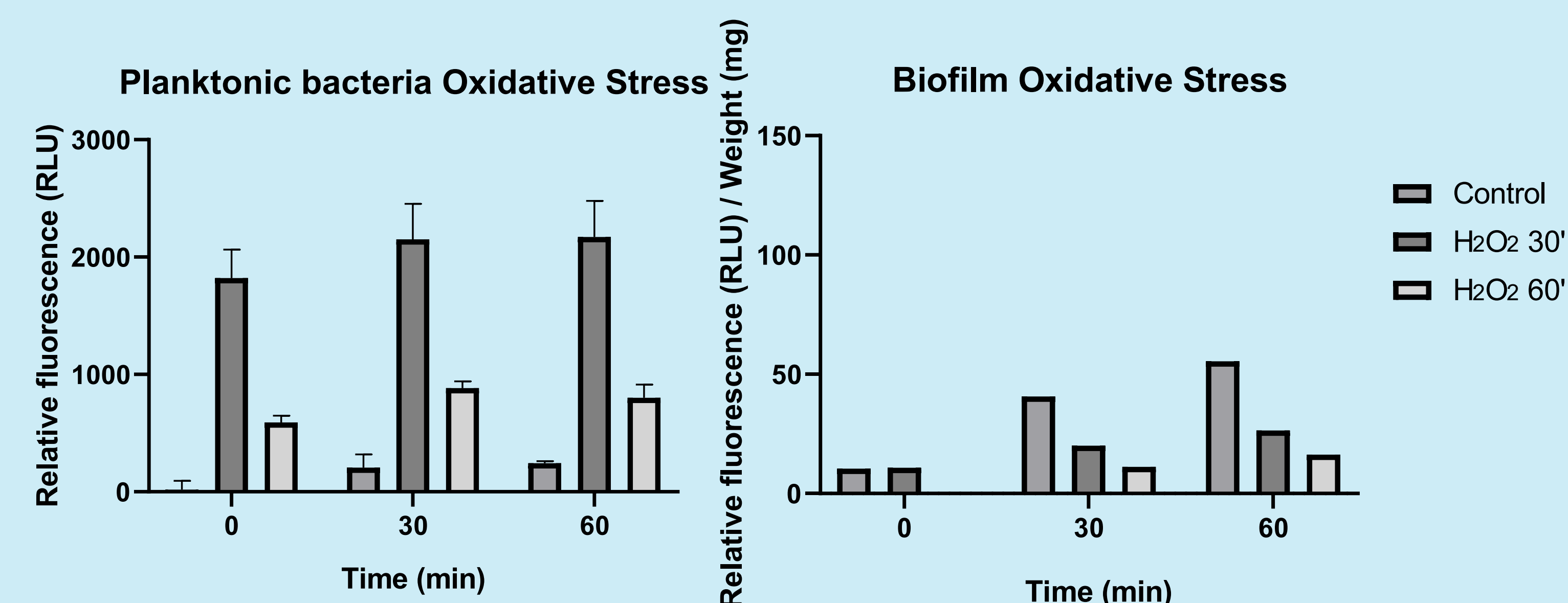


Figura 2. Niveles de ROS de *P. putida* expuestas a 325 mM de H₂O₂ durante 30 y 60 min en estado plactónico (izquierda) y *biofilm* (derecha).

Estudio de toxicocinética

Estudio del efecto del tratamiento con NP de ZnO:Mn sobre el medio circundante y el *biofilm*.

ICP-MS	Zn	Mn
Fracción 1 (µg/mL)	44,67	3,18
Fracción 2 (µg/mg)	2,73	0,29

Figure 3. Análisis de los componentes iónicos de la ZnO:Mn (100 µg/mL) expuestos a *biofilm* durante 24 h por ICP-MS.

Conclusiones

- No se observa el mismo efecto de estrés oxidativo en estado plactónico y *biofilm* de *P. putida* al ser expuesto al H₂O₂. Se requiere un inductor de estrés adecuado para *biofilm*.
- Las NP de ZnO:Mn parecen ser absorbidas en muy bajas concentraciones por el *biofilm* en comparación con la concentración de iones encontrada en el sobrenadante. Se requiere añadir un estudio de viabilidad de *biofilm* (toxicodinámica).
- Esta metodología podría ser útil para la evaluación de riesgos de NPs.

Referencias:

- Chaumet, B., Morin, S., Hourtané, O., Artigas, J., Delest, B., Eon, M., & Mazzella, N. (2019). Flow conditions influence diuron toxicokinetics and toxicodynamics in freshwater *biofilms*. *Science of the Total Environment*, 652, 1242–1251. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.265>

Agradecimientos:

Diagonal EU Project ICCARM - UBU



DIAGONAL



ICCRAM – Universidad de Burgos



@DIAGONALproject



@ICCRAM_UBU

