

## CIANOTOX. KITS DE BIOSENSADO DE CIANOTOXINAS.

Ezequiel Alba Posse<sup>1</sup>, Yamila Gándola<sup>2</sup>, Ariana Rossen<sup>3</sup>, Macarena Alvarez,<sup>4</sup> Alejandro Nadra<sup>5</sup> y Javier Gasulla<sup>6</sup>

1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, C1425FQB Buenos Aires, Argentina. jeap95@gmail.com
2. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. yamigandola@gmail.com
3. Laboratorio Experimental de Tecnologías Sustentables. Subgerencia Centro de Tecnología del Uso del Agua. Instituto Nacional del Agua Buenos Aires, Argentina. arianarossen@gmail.com
4. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, C1425FQB Buenos Aires, Argentina. alvarezmacarena923@gmail.com
5. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, C1425FQB Buenos Aires, Argentina. anadra@qi.fcen.uba.ar
6. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, C1425FQB Buenos Aires, Argentina. +541164756389. jvr.gasulla@gmail.com

### Introducción. Floraciones tóxicas de cianobacterias

Las floraciones de cianobacterias son un problema ambiental y sanitario en incremento, tanto en frecuencia como en intensidad. Se producen debido a la eutrofización de los cuerpos de agua dulce por exceso de nutrientes. Este fenómeno está altamente relacionado con la descarga de efluentes urbanos, industriales y agroindustriales, y se acentúa con el aumento de las temperaturas en un contexto de calentamiento global (Bonilla et al, 2023).

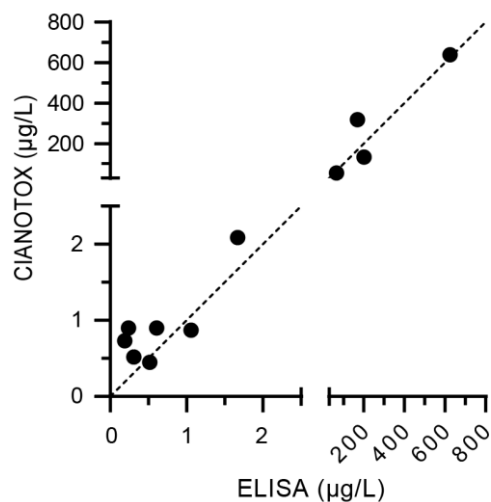
Las cianobacterias son capaces de producir cianotoxinas, un arsenal de compuestos de elevada toxicidad para los humanos y otros animales. Entre estas, las más frecuentes son las microcistinas (MCs), de toxicidad hepática (Aguilera et al, 2023). Si bien existen métodos de detección de MCs, estos tienen un muy elevado costo y requieren equipamiento de laboratorio habitualmente no disponible cerca de los sitios afectados (Pírez et al, 2013). En nuestro país, existe una fuerte demanda por contar con métodos más económicos como alternativa a los kits importados o a los métodos instrumentales, que permitan un monitoreo frecuente de la presencia de cianotoxinas. Buscamos responder a las necesidades de dos grupos de demandantes. En primer lugar, instituciones que cuentan con laboratorios analíticos, como Organismos de Gestión de Cuencas, Plantas potabilizadoras y otras Agencias gubernamentales. Por otra parte, otros actores más “domésticos” (que no disponen de laboratorios propios) afectados por las floraciones de cianobacterias como guardavidas, clubes náuticos, piscicultores, etc. Ambos grupos se beneficiarían del desarrollo de un kit de detección *in situ* que no requiera ningún equipamiento, ni entrenamiento especializado.

### CIANOTOX-Lab. Desarrollo de un kit de laboratorio

Para responder a la primera demanda, desarrollamos un kit de biosensado de microcistinas (MCs) en agua basado en la inhibición de la actividad de la serin-treonin fosfatasa 1 (PP1) humana. Para lograrlo, expresamos y purificamos la proteína

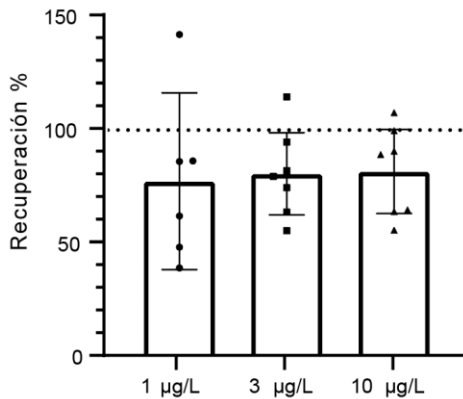
PP1 recombinante en bacterias *Escherichia coli*. Durante los últimos 3 años, ajustamos las condiciones de reacción que mejoran la sensibilidad, actividad, y especificidad del kit. Además, medimos el efecto de cambios en el pH, salinidad, y presencia de diversos metales.

La primera versión del kit fue validada en colaboración con laboratorios de diferentes entidades entre las que cabe mencionar: Autoridad del Agua de la Provincia de Buenos Aires, Comisión Técnica Mixta de Salto Grande; Instituto Nacional el Agua; Autoridad Interjurisdiccional de Cuenca de los Ríos Limay, Negro y Neuquén, ABSA. Obtuvimos resultados muy prometedores tanto en el límite de detección (0,4 µg/L de MC-LR), como en el rango de linealidad (0,4-5 µg/L). La cuantificación de MC mostró alta correlación con los kits de ELISA importados, que dominan actualmente el mercado (Figura 1).



**Figura 1.-** Correlación entre la MC obtenida en el ensayo de PP1 comparado con los de un ELISA comercial para diferentes muestras ambientales. Imagen extraída de (Alba Posse et al, 2023).

Además, se buscó cuantificar el efecto matriz en diversas muestras de agua no tóxicas mediante ensayos de *spike* de MC. Pese a la gran diversidad en las muestras ambientales analizadas, la recuperación promedio obtenida fue cercana al 80% (Figura 2).



**Figura 2.-** Ensayo de recuperación. Se inocularon muestras ambientales con concentraciones conocidas de MC y se midieron MC posteriormente. Imagen extraída de (Alba Posse et al, 2023).

Nuestro kit cuantifica microcistinas totales en placas multiwell (Alba Posse et al, 2023) y se encuentra disponible para su utilización en laboratorios a un costo hasta 10 veces menor que sus variantes importadas..

### CIANOTOX-Field. Detección *in situ* de MC

Para responder a la segunda demanda, estamos desarrollando un dispositivo -también basado en la inhibición de PP1-, para detectar MCs *in situ*. A diferencia de su contraparte de laboratorio, diseñado para ser cuantitativo, esta variante prioriza la simplicidad de uso (no requiere personal capacitado) y la posibilidad de una toma temprana de decisiones. Es por esto que buscamos que el dispositivo de campo sea semicuantitativo, permitiendo rápidamente determinar si la concentración de MCs es superior a los valores guía correspondientes a diferentes actividades (i.e. consumo crónico > 1 µg/L; consumo agudo > 12 µg/L; actividades recreativas >24 µg/L) (Chorus y Welker, 2021) (Figura 3).



**Figura 3.-** Prototipo provisorio de CIANOTOX-Field. En cada pocillo se colocarán los reactivos y PP1 adecuados para el control y los 3 rangos de medición..

Adicionalmente, este kit podrá ser utilizado sin la necesidad de contar con ningún tipo de equipamiento más que un celular con cámara. Una vez finalizada la reacción, se tomará una fotografía, y una aplicación móvil, mediante un programa de análisis de imágenes, cuantificará el rango de MCs presentes en la muestra. De esta forma, se podrá facilitar también la geolocalización, análisis y difusión de los resultados obtenidos.

### Perspectivas

La plataforma CIANOTOX intenta cubrir dos necesidades con respecto a la medición local de microcistinas: por un lado, el dispositivo de laboratorio busca disminuir los costos asociados al monitoreo. Dicha reducción de costos es acompañada con que los insumos son producidos mayormente a nivel nacional, disminuyendo los problemas de importación y los plazos inciertos de entrega, a veces incompatibles con problemas de urgencia sanitaria-ambiental. Esperamos que nuestro desarrollo incentive el monitoreo frecuente por parte de los responsables del recurso hídrico. Por otro lado, el dispositivo de campo facilitará la alerta rápida, y trabajará al servicio de la toma temprana de decisiones por parte de los organismos responsables del recurso hídrico.

### Referencias

Aguilera, Anabella, Viviana Almanza, Signe Haakonsson, Hilda Palacio, Gilberto A. Benitez Rodas, Mário U. G. Barros, José Capelo-Neto, Roberto Urrutía, Luis Aubriot, and Sylvia Bonilla (2023). "Cyanobacterial Bloom Monitoring and Assessment in Latin America." *Harmful Algae*. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102429>.

Alba Posse, Ezequiel Jorge, Carolina González, Pedro Carriquiriborde, Alejandro Nadra, and Javier Gasulla (2023). "Optimization and Validation of a Protein Phosphatase Inhibition Assay for Accessible Microcystin Detection." *Talanta* 255 (April): 124174.

Bonilla, Sylvia, Anabella Aguilera, Luis Aubriot, Vera Huszar, Viviana Almanza, Signe Haakonsson, Irina Izaguirre (2023). "Nutrients and Not Temperature Are the Key Drivers for Cyanobacterial Biomass in the Americas." *Harmful Algae* 121 (January): 102367.

Chorus, Ingrid, and Martin Welker (2021). "Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management". Taylor & Francis.

Pírez, Macarena, Gualberto Gonzalez-Sapienza, Daniel Sienna, Graciela Ferrari, Michael Last, Jerold A. Last, and Beatriz M. Brena (2013). "Limited Analytical Capacity for Cyanotoxins in Developing Countries May Hide Serious Environmental Health Problems: Simple and Affordable Methods May Be the Answer." *Journal of Environmental Management* 114 (January): 63–71.

### Palabras Clave

Cianotoxinas, Floraciones algales nocivas, Biosensores