



## **INFORME FINAL**

**Evaluación del efecto del biocida “SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate®” sobre la viabilidad de células vegetativas de *Alexandrium catenella* en condiciones de laboratorio**

**Empresa solicitante: Prorganik.**

### **Equipo de trabajo**

Daniel Varela, Universidad de Los Lagos  
Miriam Seguel, Universidad Austral de Chile  
Javier Paredes, Universidad de Los Lagos  
Daniela Uribe, Universidad de Los Lagos

### **Laboratorio de Experimentación**

Centro i~mar,  
Universidad de Los Lagos, Puerto Montt

Febrero 2019

## **Objetivo**

El objetivo del bioensayo fue **evaluar el efecto del biocida “SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate” sobre la viabilidad de las células vegetativas de *A. catenella***. Para esto se estimaron tasas de crecimiento y densidad celular, como variables respuesta que permitan evidenciar los efectos del biocida sobre la viabilidad de *A. catenella*. Es decir, si las células o la población celular de esta especie, están vivas o muertas después de ser expuestas por un tiempo a una determinada concentración del biocida.

En este contexto, se consideró que un tratamiento fue efectivo, es decir, que las células no son viables (o están muertas), cuando las células expuestas al biocida, y luego inoculadas en un matraz con medio de cultivo, mostraron una densidad celular cero y la tasa de crecimiento fue cero o negativa, después de 21 días de cultivo bajo condiciones óptimas de crecimiento para la especie.

## Metodología

El bioensayo evaluó el efecto de la exposición de células de *A. catenella* a dos concentraciones del biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate (Anexo 1) por 15 minutos celular (Tabla 1), sobre la tasa crecimiento y la densidad.

**Tabla 1.** Tratamientos utilizados para la evaluación del biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate sobre respuestas de crecimiento de *A. catenella*.

Tiempo (min)	Concentración (%)
15	0 (control)
15	1
15	4

El biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate necesario para la experiencia fue provisto por la empresa Prorganik Ltda (Anexo 1). Para el bioensayo se usó una cepa de *A. catenella* proveniente de la región Sur Austral de Chile (clon: A(IM)P1P3). En cada tratamiento se utilizó un volumen de 15 ml de cultivo de *A. catenella*, dispuestos en una multiplaca de cultivo celular estéril, a una concentración aproximada de 3000 cél/mL (con 3 réplicas por tratamiento, además de 1 control; Ver tabla 1 y anexo 3). Las células expuestas al biocida de cada uno de los tratamientos fueron consecuentemente utilizadas como inóculos para iniciar nuevos cultivos, y evaluar así los efectos del biocida sobre las respuestas de crecimiento. Los 15 ml de cultivo expuestos a cada tratamiento fueron filtrados a través de un tamiz de 20 micrómetros de abertura de poro. Las células retenidas en el tamiz fueron lavadas con medio de cultivo estéril (medio L1) y depositadas en un matraz Erlenmeyer, adicionando medio de cultivo L1 hasta un volumen final de 100 ml. Estos matraces con células se mantuvieron en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (15°C), irradiancia ( $30 - 40 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ), fotoperiodo (16:8 h luz: oscuridad) y salinidad (30 PSU). Las células inoculadas en los matraces se mantuvieron en cultivo por 21 días.

Para estimar la densidad celular en las incubaciones derivadas de los tratamientos, cada 2 días se tomaron muestras de células de cada uno de los matraces en cultivo. En los días 1, 3 y 5 de cultivo las muestras fueron fijadas con lugol y contadas usando una cámara

Sedgewick-Rafter bajo un microscopio invertido (Olympus CKX 42). Mientras que en los días 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 de cultivo, las muestras fueron observadas y contadas sin fijar (in vivo) bajo el microscopio como ya se indicó. Una vez obtenidos los datos de densidad se calculó la tasa de crecimiento y la densidad celular por cada tratamiento. Esta última variable correspondió a la densidad alcanzada al día 21 de cultivo.

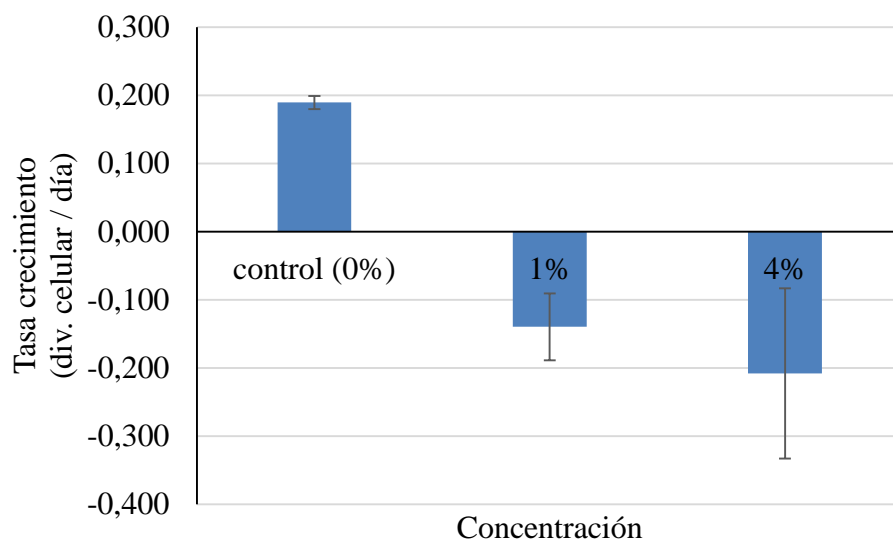
Finalmente, los datos fueron analizados utilizando un modelo estadístico de análisis de varianza (ANOVA). Cuando se observaron efectos significativos se realizó un análisis a posteriori de Tukey.

Como información complementaria se evaluaron los cambios morfológicos de las células de *A. catenella* en cada tratamiento (integridad celular, coloración y movilidad), para lo cual se generó un registro fotográfico.

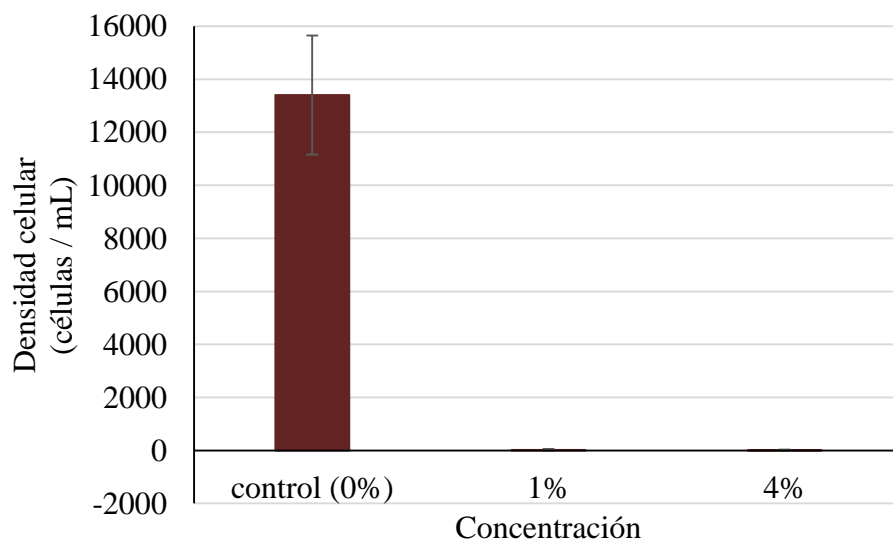
## **Resultados**

### *Respuestas de crecimiento*

Todos los cultivos de *A. catenella* expuestos a diferentes concentraciones del biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate mostraron tasas de crecimiento negativas, por el contrario, en el control se observaron tasas de crecimiento positivas (Figura 1). Además, el ANOVA mostró que las diferencias entre los cultivos tratados con el biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate y el control fueron significativas ( $P < 0,01$ . Anexo 2). Sin embargo, no se observaron diferencias en las tasas de crecimiento entre los tratamientos al 1% y 4% ( $P > 0,01$ . Anexo 2). La menor tasa de crecimiento se observó en los cultivos de las células vegetativas expuestas por 15 minutos a una concentración de 4% (-0,295 div. células/día) y la más alta tasa fue observada en los cultivos de control (0,197 div. células/día) (Figura 1). Por su parte, la densidad celular alcanzada luego de mantener las células en cultivo por 21 días fue de 24 y 13 células/mL para los tratamientos de 1% y 4% respectivamente Mientras que el control mostró en promedio 13407 células/mL (Figura 2). El ANOVA mostró que las diferencias de densidad celular entre los cultivos tratados con el biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate y el control fueron significativas ( $P < 0,01$ . Anexo 2). Sin embargo, no se observaron diferencias en las densidades celulares entre los tratamientos al 1% y 4% ( $P > 0,01$ . Anexo 2).



**Figura 1.** Tasa de crecimiento de *A. catenella* obtenida en diferentes concentraciones del biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate.

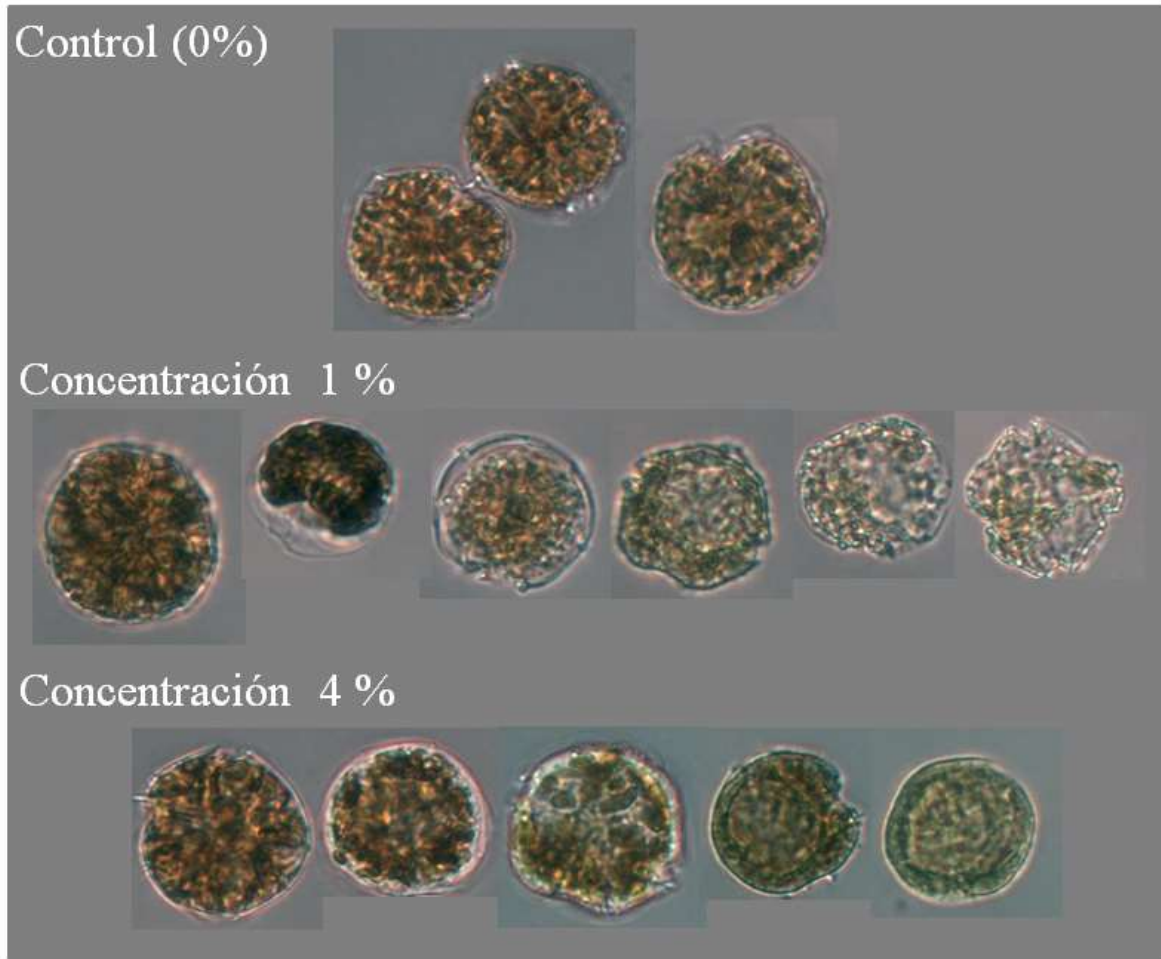


**Figura 2.** Densidad celular de *A. catenella* obtenida en diferentes concentraciones biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate.

### *Evaluación morfológica*

Las imágenes registradas inmediatamente después de aplicar los tratamientos (día 1 de cultivo) mostraron que las células expuestas a concentraciones de 1% y 4% de SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate tuvieron diferentes grados de decoloración (Figura 3). Por el contrario, en el control se observaron células normales, es decir con coloración café-verdoso, pared celular íntegra y con movimiento (Figura 3).

A medida que transcurrió el tiempo de cultivo, la decoloración de las células se hizo más severa en los tratamientos de 1% y 4%, como se observó en las imágenes registradas al noveno y decimoséptimo día de cultivo (Figura 4 y 5). No obstante, en estos tratamientos también fueron observadas células normales en baja densidad (Figura 4 y 5). Para el tratamiento con 1% de biocida se observaron células normales en los tres matraces que actuaron como réplicas, mientras que la presencia de células normales en el tratamiento del 4% fue observada solo en una de las réplicas.



**Figura 3.** Imágenes de *A. catenella* luego del aplicar los tratamientos (día 1).

Control (0%)



Concentración 1 %

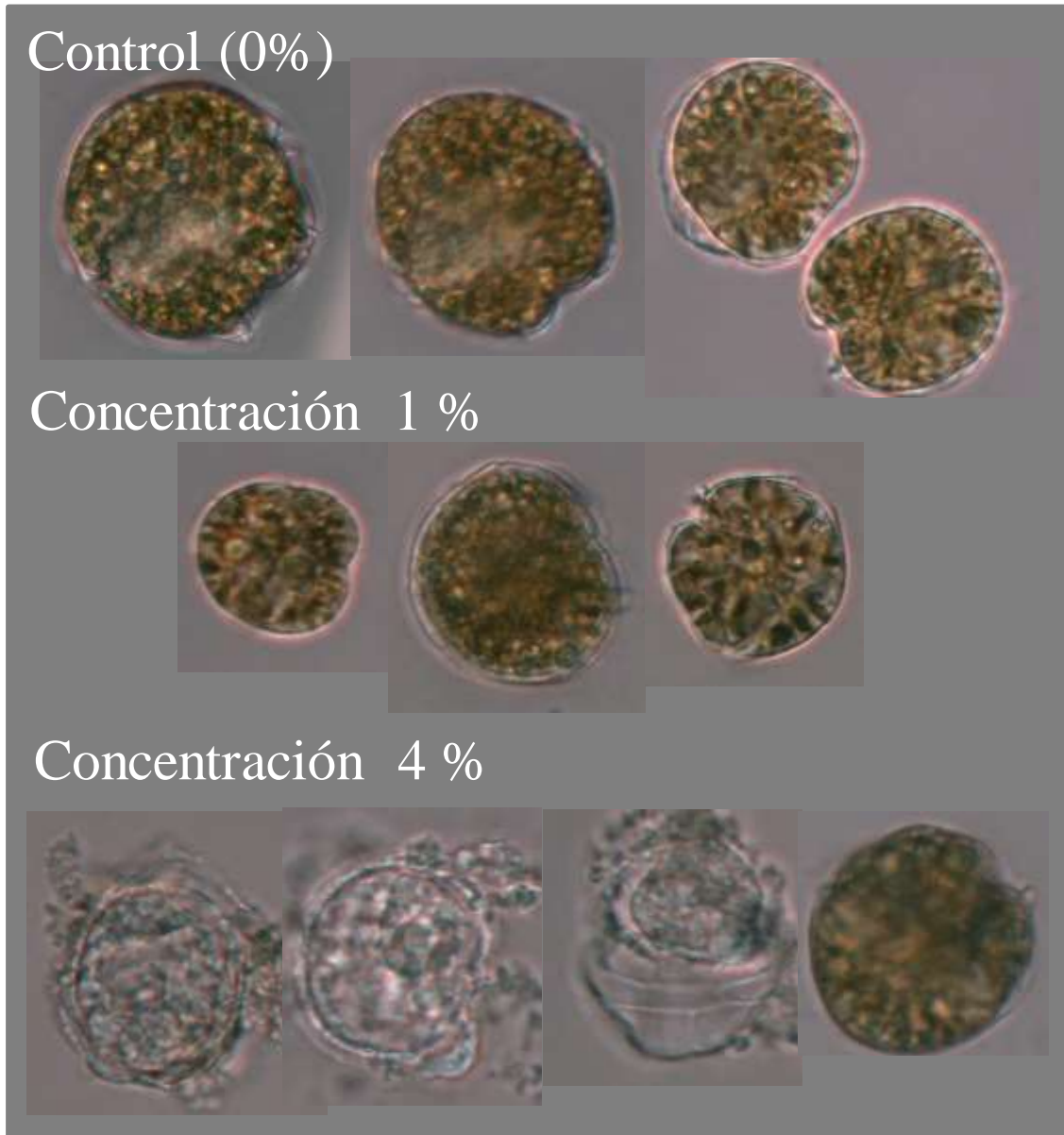


Concentración 4 %



**Figura 4.** Imágenes de *A. catenella* al noveno día de cultivo.





**Figura 5.** Imágenes de *A. catenella* al decimoséptimo día de cultivo.

## **Conclusión**

Las tasas de crecimiento negativas evidenciaron que las células expuestas al biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate a concentraciones de 1% y 4%, por 15 minutos, generaron una significativa mortalidad de *Alexandrium catenella*. No obstante, la presencia de células vivas al vigésimo primer día de cultivo, aún en baja densidad, indicó que las concentraciones del biocida al 1% y 4% no lograron generar la mortalidad de toda la población de células vegetativas.

**Anexo 1. Ficha técnica del biocida utilizado en el bioensayo.**



Industrial Cleaners, Solvents & Specialty Products

**SC-1000 Aqueous Cleaner Concentrate**

**Ficha Técnica**

**DESCRIPCION:**

**SC-1000 Aqueous Cleaner Concentrate** es nuestro sistema tensioactivo no iónico más versátil y potente utilizado en una variedad de aplicaciones industriales y comerciales. Compuesto de alcoholes grasos, ácidos grasos libres y ésteres grasos, SC-1000 es una solución coloidal que crea un agente de liberación de hidrocarburos único capaz de remover una gran carga de residuos. La mezcla de acción poderosa de limpieza del SC-1000, es capaz de provocar que la larga cadena de hidrocarburos que incluye grasas orgánicas e inorgánicas, aceites, proteínas y azúcares, sean repelidas de la superficie de manera tal que puedan ser enjuagadas con agua, sin dañar o alterar la superficie a limpiar. SC-1000 No es el típico detergente cáustico o solvente en base a petróleo, por lo tanto no dañará ni alterará la superficie a limpiar.

**SC -1000 cumple con los requisitos:**

Aprobación **SEREMI SALUD** Región Metropolitana N° 1812000002016 declarado satisfactorio no peligroso para la salud humana según artículo 4080019 MROAL ley 19164  
Resolución **DIRECTEMAR** N° 1280008/190 del 08 Febrero 2017 autoriza su uso en navíos, artefactos náuticos y otras instalaciones flotantes en aguas dulces y agua de mar



- USEPA Design for the Environment (DfE)
- USEPA National Oil & Hazardous Substances Pollution Contingency Plan (NCP)
- USEPA Vessel General Permit (VGP) Compliant
- USDA BioPreferred e Program
- EU REACH Pre-registered
- CEPAS Reg. 25334 North Sea
- USDOA A1 General Cleaning & L1 Drain/Sewer Acceptable
- California's SOAQM as a Clean Air Solvent
- OSHA 29-CFR Ch. XVII 1910.1200 and 40 CFR Ch. 1, Subparts C & D
- USEPA 600, 4-00, 027 for aquatic toxicity
- USEPA 601 & 602 for VOC testing
- NSN 6850-01-474-1273 (5 gal.), 6850-01-474-1311 (55 gal.)

**INSTRUCCIONES DE USO:**

Enjuagar la superficie para eliminar la suciedad de partículas sueltas antes de limpiarlo. El producto debe ser diluido con agua dependiendo de la aplicación específica. Puede ser que se necesite menos producto si se aplica aumentando la temperatura, tiempo de permanencia o agitación. Enjuagar con agua para remover la suciedad y restos de producto. En superficies duras y lisas puede observarse una película o lamina o también quiebre del agua. Uso en plantas de procesos: cámaras de frío, cintas, mesas, utensilios, pisos, etc., SC-1000 es especialmente recomendado para ser usado en plantas de procesamiento abordo.

El producto SC -1000 bajo ninguna circunstancia se debe aplicar ni disponer en el medio ambiente acuático de acuerdo al artículo 142 de la Ley de Navegación N° 2.222/1978

**LOS PRODUCTOS SAFE CARE SON:**

- No-tóxico
- No-reactivo
- No-cancerígeno
- Auténticamente biodegradable
- Derivado de recursos renovables
- Seguro de usar, almacenar y desechar

**SAFE CARE NO CONTIENE:**

- Derivados de petróleo
- Éteres de Glicol
- Terpenos
- Fibras Sintéticas
- Constructores & reactivos
- Cáusticos

<b>Diluciones sugeridas:</b>	<b>Limpeza difícil:</b>	50% - 20%
	<b>Limpeza promedio:</b>	20% - 5%
	<b>Limpeza Mantenición:</b>	5% - 0.5%

**PROPIEDADES BÁSICAS:**

<b>Apariencia:</b>	Transparente, líquido ámbar
<b>Olor:</b>	Olor suave
<b>Solubilidad en agua:</b>	100% Soluble
<b>Punto de ebullición:</b>	100°C (212°F)
<b>Punto de Llama:</b>	No
<b>Gravedad específica:</b>	~1.01 @60/60°F
<b>Rango pH</b>	9.9 – 10.9
<b>HLB:</b>	13.65

La información contenida en este documento se considera que es correcta, incluyendo los datos de las pruebas de laboratorio. Los usuarios de productos SAFE CARE deben realizar sus propias pruebas para determinar la efectividad del producto para sus aplicaciones específicas

A Division of **GEMTEK** Products

3808 North 28<sup>th</sup> Avenue • Phoenix, AZ 85017 • 602-285-8566 • FAX 602-285-7241 • [www.gemtek.com](http://www.gemtek.com) versión en español revisada 10 de Febrero 2017 Carolia Schell BQ MSc., DT Prorganik

**Anexo 2.** (A) Tabla ANOVA para la tasa crecimiento y (B) para la densidad celular. **A.1** y **B.1** Tukey a posteriori test del efecto principal de la concentración para la tasa de crecimiento y densidad máxima celular respectivamente. Similares letras indican que no existen diferencias significativas.

**A**

Tasa de crecimiento				
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Concentración	0.270611	2	22.429	1.64E-03
Residuales	0.036195	6		

**A.1**

Tukey a posteriori test			
Concentración	control (0%)	1%	4%
Tukey	b	a	a

**B**

Densidad celular				
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Concentración	116.24	2	28.729	8.45E-04
Residuales	12.138	6		

**B.1**

Tukey a posteriori test			
Concentración	control (0%)	1%	4%
Tukey	b	a	a

**Anexo 3.** Densidad celular de *A. catenella* observada en los 21 días de cultivo, luego de haber sido expuestas por 15 minutos 0, 1% y 4% del biocida SC1000 Aqueous Cleaner Concentrate.

Matraz	Tiempo (min)	Conc. (%)	Días de muestreo										
			1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
			Muestras fijadas			Muestras sin fijar							
<b>1</b>	15	0	460	400	920	1560	2460	3580	5240	9040	9420	14880	15940
<b>2</b>	15	0	480	360	620	1080	2580	2340	4140	7980	10200	10380	11660
<b>3</b>	15	0	300	720	760	920	2260	2740	3700	4940	6540	9660	12620
<b>4</b>	15	1	400	20	160	20	40	40	60	20	0	33	60
<b>5</b>	15	1	400	80	120	20	40	20	20	20	0	13	7
<b>6</b>	15	1	220	20	60	0	60	60	60	40	0	7	7
<b>7</b>	15	4	260	120	40	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>8</b>	15	4	320	200	140	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>9</b>	15	4	240	100	180	0	0	0	0	40	40	13	40