



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

PROYECTO FIP N° 2014-65 “IMPACTO DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DEL ECTOPARASITO *Caligus rogercresseyi*, SOBRE LOS RECURSOS CHORITO Y JAIBA MARMOLA”.

## INFORME FINAL

### RESPONSABLE DEL PROYECTO:

Dr. Kurt Paschke, Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, Sede Puerto Montt, [kpaschke@uach.cl](mailto:kpaschke@uach.cl)

### AUTORES DEL PRESENTE INFORME:

Paschke, Kurt; Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, Sede Puerto Montt  
Gebauer, Paulina; Centro I-Mar, Universidad de Los Lagos

Toro, Jorge; Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Universidad Austral de Chile

Pardo, Luis Miguel; Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Universidad Austral de Chile

Urbina, Mauricio; Biosciences, College of Life & Environmental Science, University of Exeter UK, actualmente Departamento de Zoología, Universidad de Concepción.

Cumillaf, Juan Pablo; Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, Sede Puerto Montt

PUERTO MONTT ENERO DE 2017

## RESUMEN EJECUTIVO

En el presente documento se describen las actividades realizadas y los resultados obtenidos en el proyecto FIP 2014-65 cuyo objetivo general es Determinar el impacto de los productos utilizados en el control del ectoparásito *Caligus rogercresseyi*, sobre los recursos chorito y jaiba marmola.

Objetivo 1. Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos. Se realizó una revisión de la literatura sobre los efectos de los principales compuestos utilizados por la industria para combatir el Caligus: Azametifos, peróxido de hidrogeno, deltametrina y cipermetrina. Los principales buscadores utilizados fueron Scopus y Science Direct. Los resultados obtenidos por ambos buscadores fueron revisados y comparados (~80% de similitud) de manera independiente y por consenso entre tres investigadores. Ninguna búsqueda fue limitada a año de publicación. Se seleccionaron mas de 130 artículos que cumplieron los criterios de búsqueda y pertinencia para el proyecto.

La revisión muestra que los quimioterapéuticos a las concentraciones utilizadas por la salmonicultura superan las concentraciones que provocan un 50 % de mortalidad en muchos de los organismos analizados. Del mismo modo, exposiciones con estos compuestos pueden desencadenar diferentes efectos subletales sobre el comportamiento, la reproducción, cambio en la asignación de energía corporal, sobre la viabilidad de hemocitos y en la función inmune, así como sobre la respuesta frente al estrés oxidativo (alteración de la actividad enzimática antioxidante, daño por peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas). En particular, para azametifos se ha reportado que disminuye la actividad de la acetilcolinesterasa involucrada en la transmisión del impulso nervioso.

La respuesta de las especies frente a estos compuestos dependerá de la especie evaluada, del estadio de desarrollo estudiado, de las concentraciones del compuesto y el tiempo de exposición, así como de la repetitividad de la exposición. Sin embargo, cabe mencionar que la mayoría de las evaluaciones reportadas son producto de exposiciones a los compuestos por tiempos mayores

a los utilizados por la industria. Se evidencia la falta de estudios en estadios tempranos del ciclo de vida de invertebrados marinos, tales como larvas, en comparación con estadios adultos, pese a que estadios tempranos presentan mayor sensibilidad a los compuestos y su desarrollo ocurre en el mismo cuerpo de agua que es utilizado para los baños. Adicionalmente se observó que hay pocos estudios que evalúen efectos subletales (conducta, respuestas fisiológicas, sistema inmune, reproductivas, etc.), concentrándose la mayoría en reportar valores de mortalidad y solo hasta 96 h post-exposición.

Objetivo 2. Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola (*Cancer edwardsii*), bajo condiciones controladas

Se realizaron exposiciones agudas y crónicas a distintas concentraciones de los compuestos experimentales en condiciones controladas de laboratorio. No se observó un efecto significativo de los diferentes compuestos en los porcentajes de viabilidad espermática, medidos con técnicas fluorescentes (mayor al 85%, incluyendo el control). En general no existieron mayores alteraciones en el tejido ovárico (análisis histológico) en las diferentes etapas de desarrollo gonádico producto de los cuatro compuestos tanto en exposiciones agudas como crónicas.

Exposiciones agudas (24h) de 7 y 36 individuos en 100 L permitieron evaluar la mortalidad provocada por los cuatro compuestos sobre adultos de jaiba. Para Cipermetrina se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $1.806 \pm 0.22$  y  $14.64 \pm 0.27$  ppb dependiendo de la densidad de animales, inferior a la Concentración recomendada por el fabricante CRF. Deltametrina presentó una  $CL_{50}$  de  $0.803 \pm 0.21$  y  $3.255 \pm 0.21$  ppb. La exposición a Peróxido por 24h no provocó mortalidad, pero si un daño severo (los animales flotaron). Se pudo observar que el 50% de los individuos se dañaron severamente a concentraciones de peróxido entre 1000 y 1500 ppm.

Adultos de jaiba mostraron un efecto diferencial en la tasa metabólica y actividad de la enzima antioxidante catalasa en músculo y hepatopáncreas dependiendo del compuesto al que fueron expuestos. Exposiciones agudas a azametifos y deltametrina provocaron un aumento de la tasa metabólica. Con Cipermetrina no se observó un efecto en esta variable mientras que con peróxido de hidrógeno la tasa metabólica tendió a disminuir excepto en la concentración mas alta

(2000ppm) donde se observó un gran incremento. Todos los compuestos tuvieron un efecto sobre la actividad de la enzima antioxidante catalasa CAT, aunque en algunos el efecto se evidenció en músculo y en otros en hepatopáncreas de jaiba. Luego de exposiciones crónicas por 6 h diarias a cipermetrina y peróxido no se observó un efecto sobre la tasa metabólica, pero esta variable aumentó en forma lineal con el incremento de la concentración de deltametrina y azametifos. CAT luego de exposiciones crónicas a cipermetrina, deltametrina y peróxido disminuyó al incrementar las concentraciones de los compuestos. Azametifos no afectó la actividad de CAT pero disminuyó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, especialmente luego de exposiciones crónicas

Todos los fármacos utilizados contra el Caligus, cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrogeno, por la industria salmonera a las concentraciones y tiempo de exposición recomendadas por el fabricante tienen efectos letales en el primer estadio larval de *C. edwardsii*. En general se observó que las larvas Zoea I de *C. edwardsii* fueron más sensibles a los quimioterapéuticos utilizados contra el control del Caligus que las larvas de centolla y siendo el último estadio larval de esta especie más sensible que el primero. El 100% de las larvas de *C. edwardsii* murieron a una concentración 100 veces menor a la recomendada por el fabricante para la cipermetrina a las 24 horas post- exposición. A las 48 horas post exposición el 100% de las larvas murieron al ser expuestas una concentración de deltametrina 20 veces menor a la utilizada contra el Caligus. Una concentración 10 veces menor de azametifos que CRF mató el 100% de las larvas de *C. edwardsii* después de 72 horas de exposición y por último el 50% de las larvas murieron al ser sometidas a peróxido a CRF luego de 96 horas post-exposición. En el caso de las larvas de centolla el 100% de las larvas se encuentran moribundas y/o muertas a CRF de cipermetrina a las 96 horas post-exposición. Para la deltametrina el 100% de las larvas están muertas o moribundas a concentraciones 33% inferiores a CRF. Una concentración superior 200 ppb de azametifos a la utilizada contra la caligidosis genera el 100% de larvas de *L. santolla* muertas y/o moribundas. Por último, el 50% de las larvas de *L. santolla* son afectadas por concentraciones de 2000 ppm (1500 ppm CRF) de peróxido de hidrogeno después de 96 horas post

aplicación. Presentándose este quimioterapéutico como el menos dañino para las especies no objetivo evaluadas en este estudio. Exposiciones crónicas sobre larvas de jaiba marmola indican que cerca del 100% de larvas fueron afectadas luego de 4 días de aplicaciones por 20 min de Peróxido de hidrogeno a 1500 ppm y aproximadamente el 80% de ellas fueron afectadas a 375 y 750 ppm. En azametifos, el 44% de las larvas murieron a 0.0625 – 0.25 ppb, y 54% a 0.5 ppb después de 7 días de aplicaciones por 30 min.

Es importante indicar que, si bien las larvas pueden sobrevivir por algunos días post-exposición a algunas concentraciones utilizadas para algunos compuestos en condiciones de laboratorio, en condiciones de campo probablemente sean fácil presa de depredadores y además precipiten rápidamente al fondo debido que pierden la capacidad para nadar, así como pierden la capacidad de alimentarse, teniendo como consecuencia altas probabilidades de morir. Cabe destacar que, en términos generales, en *C. edwardsii* las larvas resultaron mas sensibles que los adultos a las mismas concentraciones experimentales a pesar de que los tiempos de exposición fueron menores.

Objetivo 3. Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito (*Mytilus chilensis*) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas

Se comprobó la identidad taxonómica de los animales experimentales confirmando que se utilizó *Mytilus chilensis*. Se estimaron los parámetros Tasa de Aclaramiento y Potencial de Crecimiento luego de una exposición aguda por 48h a 7 concentraciones de peróxido y 7 de azametifos mas sus respectivos controles. Se evidenció una casi nula tasa de aclaramiento en los choritos experimentales y el potencial de crecimiento es negativo para todas las concentraciones de peróxido evaluadas. Por el contrario, los animales expuestos a azametifos presentaron tasas de alimentación y potenciales de crecimiento positivos, y solo a las mayores concentraciones evaluadas los valores son menores al control.

Este mayor efecto de Peróxido de Hidrógeno en comparación con Azametifos es aún más notorio sobre viabilidad de gametos, donde por sobre 300 ppm de peróxido se produjo una disminución significativa en movimiento de los

espermatozoides y una baja en el recuento de los ovocitos sin destrucción celular y, especialmente sobre larvas de *Mytilus chilensis*, donde menos que un 5% sobrevive luego de ser expuestas a concentraciones de peróxido de hidrógeno 30 veces menores a la CRF. Para Azametifos el efecto sobre la sobrevivencia larval de *M. chilensis* también es significativo a concentraciones 30 veces menores que CRF con solo un 20%. El experimento de fijación de larvas en presencia de Azametifos mostró una reducción del número de larvas asentadas. Al utilizar 100 ppb (CRF) el número de larvas asentadas se redujo en un 90% respecto a los controles y cuando la concentración fue 1 ppb el asentamiento se redujo en un 44% luego de 96 h post exposición.

Objetivo 4. Determinar la concentración que alcanza el azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas y Objetivo 5. Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas

La concentración de los compuestos durante el baño al interior de la lona fue, en general, homogénea tanto para peróxido de hidrógeno como para azametifos. Durante las evaluaciones de ambos compuestos se evidenció una caída de la concentración importante a los 10 min del retiro de la lona. Del mismo modo, a los 10 m de la jaula tratada los valores cayeron bajo los límites de cuantificación de los métodos. Sin embargo, estas conclusiones deben ser considerados sitio-especificas puesto que hay características ambientales de los centros de cultivo como exposición al viento, corrientes de marea y otros factores hidrográficos que pueden influir en la dilución y/o dispersión de los productos químicos.

En términos generales, los resultados del presente proyecto indican que hay un efecto significativo de los compuestos utilizados sobre todos los estadios de desarrollo estudiados en chorito y jaiba en casi todas las variables analizadas. El efecto observado es diferente para cada compuesto dependiendo de la especie estudiada y estado de desarrollo analizado, siendo los estadios tempranos del desarrollo los afectados en forma más severa. La viabilidad de los estadios analizados se vio severamente afectada en todas las condiciones por concentraciones inferiores a la CRF. Mientras que para chorito el peróxido de hidrógeno provocó mayores efectos en las variables estudiadas, al compararlo

con azametifos, en jaiba el peróxido provocó efectos menos perjudiciales. Para esta última especie, donde se analizaron cuatro compuestos químicos, el efecto de piretroides sobre el desarrollo larval de jaiba y centolla es devastador, presentando un efecto significativo en la sobrevivencia larval a concentraciones órdenes de magnitud menores a la CRF. Mas aún, para el caso de larvas de jaiba, las concentraciones letales en algunos de los compuestos estudiados, están por debajo del límite de detección del compuesto por parte de los laboratorios comerciales y esto representa una situación muy preocupante. Esto es especialmente importante al contrastar los resultados obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio con la información obtenida de terreno o campo. Si bien, el enfoque del proyecto era marcadamente de laboratorio, dos de los objetivos buscaban tener una aproximación a las condiciones experimentadas en terreno. El efecto de dilución/degradación de los compuestos utilizados en los baños sugiere que no hay presencia cuantificable del compuesto a poca distancia (o tiempo) del lugar de aplicación, sin embargo, esto es debido a la capacidad limitada de detección y cuantificación del compuesto por parte de los laboratorios comerciales, dado que en los experimentos de laboratorio los efectos de concentraciones nominales por debajo de los límites de detección del compuesto son evidentes. Dicho de otra forma, el efecto de los compuestos sobre los diferentes estadios de desarrollo de los animales estudiados podría estarse generando, aunque el compuesto no pueda ser cuantificado en el ambiente por la metodología utilizada en el presente proyecto y por los laboratorios comerciales. La principal dificultad radica entonces en la estimación de la cantidad de compuesto en el ambiente y el tiempo y frecuencia al que los animales podrían estar expuestos en condiciones de campo (objetivos no requeridos en el presente proyecto).

Otro aspecto interesante dice relación con el concepto de aplicar baños basados en la concentración del compuesto en el medio y no en términos de concentración de compuesto por unidad de biomasa a tratar. La importancia de suministrar compuestos químicos terapéuticos basados en dosis relativas a la biomasa, reconocida por la medicina tanto humana como animal, no se aplica a los tratamientos con baños en acuicultura. En el presente proyecto se observó un aumento de la  $CL_{50}$  cuando la biomasa de animales tratada era mayor. Una

hipótesis explicatoria estaría dada por la disponibilidad de compuesto por gramo de animal, ie. igual concentración, pero distinta concentración-peso específica. Finalmente, dadas las características de los experimentos realizados en laboratorio en términos de condiciones controladas y calidad del agua utilizada, aclimatación de animales, etc., la aplicabilidad directa a condiciones de terreno debe hacerse con cautela considerando que las condiciones de terreno son más complejas, donde interactúan mas factores que los analizados en el presente proyecto. Se requiere mucho mayor información del comportamiento de los compuestos en terreno, tanto en la columna de agua como su potencial acumulación en material particulado y sedimentos, así como en la flora y fauna marina tanto pelágica como bentónica, así como su transferencia o flujo en la trama trófica. Del mismo modo como se sugiere cautela al extrapolar los datos obtenidos en laboratorio a condiciones de terreno, la información obtenida es concluyente en términos de evaluación del efecto negativo de la mayoría de los compuestos utilizados como quimioterapéutico para el control de Caligus sobre diferentes etapas del ciclo de vida de dos especies de importancia ecológica y socioeconómica para el país.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## INDICE GENERAL

2	INDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	7
3	OBJETIVOS GENERALES .....	24
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
4.1	Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos .....	24
4.2	Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ), bajo condiciones controladas .....	24
4.3	Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito ( <i>Mytilus chilensis</i> ) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas.....	24
4.4	Determinar la concentración que alcanza el azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas.....	24
4.5	Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas .....	24
5	ANTECEDENTES .....	25
6	METODOLOGÍA DE TRABAJO POR OBJETIVO .....	28
6.1	Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos.....	28
6.1.1	Búsqueda y selección de artículos relevantes .....	28
6.1.2	Validación de la búsqueda .....	29
6.2	Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ), bajo condiciones controladas .....	30



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

6.2.1	Experimentos en adultos de jaiba marmola .....	30
6.2.1.1	Experimento para evaluar toxicidad aguda sobre mortalidad y reproducción (viabilidad espermática, histología de gónada).....	30
6.2.1.2	Experimentos para toxicidad aguda sobre EC <sub>50</sub> en adultos de jaiba .....	33
6.2.1.3	Experimento para evaluar toxicidad crónica sobre mortalidad y reproducción (histología de gónada) y EC <sub>50</sub> en adultos de jaiba.....	37
6.2.2	Experimentos en larvas de jaiba marmola y centolla.....	38
6.2.2.1	Exposición aguda a cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en larvas de <i>C. edwardsii</i> y <i>L. santolla</i> .....	38
6.2.2.2	Exposición crónica en larvas de <i>C. edwardsii</i> .....	42
6.3	Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito ( <i>Mytilus chilensis</i> ) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas.....	43
6.3.1	Metodología para experimentos fisiológicos .....	48
6.3.2	Experimentos de fecundación .....	57
6.3.3	Efecto del Peróxido de Hidrogeno y Azametifos sobre larvas pediveligeras de <i>Mytilus chilensis</i> .....	58
6.3.4	Efecto de peróxido de hidrogeno y azametifos los patrones reproductivos de <i>Mytilus chilensis</i> .....	60
6.3.5	Ensayo crónico en adultos .....	62
7	Determinar la concentración que alcanza azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas.....	63
8	Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas .....	63
8.1	Estimación de concentraciones dentro y fuera de la jaula durante y posterior a un baño con lona cerrada de azametifos y peróxido de hidrógeno. ....	63
8.1.1	Mediciones de concentración dentro de la jaula.....	63
8.1.2	Mediciones fuera de la jaula, posterior a liberación de la lona .....	66



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

8.1.3	Los sitios de estudio y particularidades de los centros.....	69
8.1.4	Temperatura y oxígeno disuelto durante el muestreo.....	86
9	RESULTADOS POR OBJETIVO .....	87
9.1	Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos.....	87
9.1.1	Azametifos (organofosforado) .....	89
9.1.2	Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	97
9.1.3	Deltametrina .....	105
9.1.4	Cipermetrina .....	111
9.2	Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ), bajo condiciones controladas .....	121
9.2.1	Experimentos en adultos de jaiba marmola .....	121
9.2.1.1	Exposición aguda en la viabilidad espermática y en el tejido ovárico.....	121
9.2.1.2	Exposición crónica en el tejido ovárico.....	127
9.2.1.3	Exposición aguda sobre la mortalidad de adultos de <i>C. edwardsii</i> .....	133
9.2.1.4	Exposición aguda sobre EC <sub>50</sub> .....	140
9.2.1.5	Exposición crónica sobre EC <sub>50</sub> .....	156
9.2.2	Experimentos en larvas de jaiba marmola y centolla.....	163
9.2.2.1	Exposición aguda de larvas de <i>C. edwardsii</i> .....	163
9.2.2.2	Exposición crónica de larvas de <i>C. edwardsii</i> .....	175
9.2.2.3	Exposición aguda de larvas de <i>Lithodes santolla</i> .....	178
9.3	Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito ( <i>Mytilus chilensis</i> ) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas.....	193
9.3.1	Resultados de los experimentos fisiológicos .....	193
9.3.2	Efecto en la fecundación de <i>Mytilus chilensis</i> .....	203



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

9.3.3	Resultados de los experimentos larvales.....	207
9.3.4	Resultados de los análisis reproductivos .....	212
9.3.5	Resultados del ensayo crónico en adultos de <i>Mytilus chilensis</i> .....	219
9.4	Determinar la concentración que alcanza el azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas .....	225
9.4.1	Correntometría.....	225
9.4.2	Temperatura y oxígeno disuelto durante el muestreo.....	238
9.4.3	Estimación de concentraciones dentro y fuera de la jaula durante y posterior a un baño con lona cerrada de azametifos. ....	241
9.5	Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas ...	245
9.5.1	Estimación de concentraciones dentro y fuera de la jaula durante y posterior a un baño con lona cerrada de peróxido de hidrógeno. ....	245
10	DISCUSION.....	249
10.1	Revisión bibliográfica. ....	249
10.2	Efectos de cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ).....	251
10.2.1	Efectos en la etapa adulta de jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ).....	251
10.2.2	Efectos de cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en larvas de jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ) y centolla ( <i>Lithodes santolla</i> ).....	259
10.3	Efectos de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito ( <i>Mytilus chilensis</i> ) .....	265
10.4	Determinación de la concentración de azametifos y peróxido de hidrogeno en condiciones de campo.....	268
11	CONCLUSIONES.....	272
11.1	Revisión bibliográfica. ....	272
11.2	Efectos de cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ).....	272



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

11.3 Efectos de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito ( <i>Mytilus chilensis</i> ) .....	275
11.4 Determinación de la concentración de azametifos y peróxido de hidrogeno en condiciones de campo .....	275
12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	279
13 ANEXOS .....	290



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 2 INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Resumen general del proceso de búsqueda para cada compuesto, organismo, palabras clave utilizadas, y los números de documentos encontrados y seleccionados. ....	29
Tabla II. Concentraciones y tiempos de exposición a utilizar en los respectivos tratamientos. CRF: concentración recomendada por el fabricante.....	40
Tabla III. Concentraciones de azametifos y peróxido de hidrógeno, y tiempos de exposición para los experimentos crónicos de las larvas de <i>C. edwardsii</i> .....	42
Tabla IV Resumen de las concentraciones de azametifos necesarias para matar al 50 % de la población, en diferentes especies marinas. (s) determinaciones realizadas con sedimento ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ), ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición.....	93
Tabla V Resumen de las concentraciones de azametifos necesarias afectar (en %) a diferentes especies marinas. (s) determinaciones realizadas con sedimento ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ), Conc: concentración; ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición.....	94
Tabla VI. Resumen de las concentraciones de peróxido de hidrógeno necesarias para matar al 50% de la población, en diferentes especies de crustáceos de agua dulce y salada. No se encontró esta información para bivalvos. ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición.....	100
Tabla VII. Resumen de las concentraciones de deltametrina necesarias para matar al 50 % de la población, en diferentes especies de crustáceos de agua dulce y salada, y algunos poliquetos. No se encontró esta información para bivalvos. ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición.....	107
Tabla VIII. Resumen de las contracciones de cipermetrina necesarias para matar al 50 % de la población ( $\text{LC}_{50}$ ), en diferentes especies de crustáceos de marinos, de agua dulce (*) y estuarinos (**) y rotíferos de agua marinos y de agua dulce. (s) determinaciones	



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

realizadas con sedimento ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ), $\text{LC}_{50}$ : promedio (Intervalo de confianza del 95 %). ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición + recuperación.....	116
Tabla IX. Análisis de varianza para comprar los efectos de los diferentes compuestos sobre la viabilidad espermática. Se compara el control y los diferentes niveles (concentraciones) de cada producto. ....	123
Tabla X. Efectos en el ovario de hembras de <i>Cancer edwardsii</i> producto de la exposición de diferentes compuestos en distintas concentraciones por 24 h .....	124
Tabla XI. Estados gonadales del ovario de las hembras en los experimentos de exposición aguda .....	127
Tabla XII. Efectos en el ovario de hembras de <i>Cancer edwardsii</i> producto de la exposición crónica de diferentes compuestos en distintas concentraciones.....	129
Tabla XIII. Estados gonadales del ovario de las hembras en los experimentos de exposición crónica .....	133
Tabla XIV Proporción de jaibas (media $\pm$ ds) no-reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de azametifos (0: control, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas. ....	140
Tabla XV Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de azametifos por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas. ....	140
Tabla XVI. Proporción de jaibas (media $\pm$ ds) no-reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de cipermetrina (0: control, 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15, 30, 60 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas. ....	141
Tabla XVII Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de cipermetrina por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas. ....	141



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tabla XVIII Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de deltametrina por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas. ....	142
Tabla XIX Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de peróxido por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas. ....	142
Tabla XX. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) ( $\text{media} \pm \text{ds}$ ) de jaibas después de 24, 48, 72 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de azametifos (0: control, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas. ....	143
Tabla XXI. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) ( $\text{media} \pm \text{ds}$ ) de jaibas después de 24, 48, 72 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de cipermetrina (0: control, 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15, 30, 60 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.....	145
Tabla XXII. Relación entre el Consumo de Oxígeno-peso específico ( $\text{ugO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de jaibas después de exposición crónica a distintas concentraciones de compuestos. Para cada concentración se utilizaron 6-9 jaibas. ....	158
Tabla XXIII. Correlaciones entre las variables fisiológicas determinadas para animales adultos de <i>Mytilus chilensis</i> expuestos a azametifos. T. acla = Tasa de aclaramiento; C.Oxig = consumo de oxígeno; T.Exc = Tasa de excreción; T.abs = Tasa de absorción; E. abs = Eficiencia de absorción; C.Poten = Crecimiento Potencial. ....	199
Tabla XXIV. Resultados de los tamaños de los ovocitos maduros de las hembras de <i>Mytilus chilensis</i> provenientes de las localidades de Caleta Amargos y Bahía Yal. El número entre paréntesis corresponde a la desviación estándar. ....	212
Tabla XXV. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase llenante.....	226
Tabla XXVI. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase vaciante.....	227
Tabla XXVII. Frecuencias en % de la dirección de la corriente por profundidad. ....	228
Tabla XXVIII. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente. ....	231



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tabla XXIX. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase llenante.....	234
Tabla XXX. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase vaciante.....	235
Tabla XXXI. Frecuencias en % de la dirección de la corriente por profundidad. ....	235
Figura 1. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con <i>sybr safe</i> que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la digestión con: <i>Xba</i> I (primer COIXba). <i>M. chilensis</i> de la localidad de Caleta Amargo, Chile (líneas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), <i>M. galloprovincialis</i> (línea 2) proveniente de Tumbes, Concepción.....	45
Figura 2. Resultados de la degradación de Peróxido de Hidrogeno [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] – marca “Europharma” en unidades experimentales de 7 litros de agua de mar filtrada para las concentraciones de 50 ppm (mínima) y 1500 ppm (1500 ppm es la concentración recomendada por el fabricante para su uso en contra de la caligidosis en salmonicultura), durante 7 horas. Los envases tuvieron 10 ejemplares ( <i>Mytilus chilensis</i> ) de aproximadamente 5 cm de largo (línea negra y azul).....	47
Figura 3. A) Adición de Peróxido de Hidrogeno en las bateas experimentales durante los tratamientos. B) Diseño experimental con 3 réplicas para cada concentración (50, 100, 300, 750, 1500, 2000, 3000 ppm) más una batea control [sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]. Cada batea contuvo 10 animales en un volumen de 7 litros de agua de mar filtrada. Para la exposición con el compuesto azametifos se utilizó el mismo diseño (concentraciones utilizadas = 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb). ....	49
Figura 4. Diseño experimental para las determinaciones de las tasas de aclaramiento. Este diseño se utilizó para los experimentos con Peróxido de hidrogeno [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] y Azametifos [C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS]. La exposición a los compuestos se llevó a cabo en bateas que contuvieron un volumen de siete litros de agua de mar. Las estimaciones de la tasa de aclaramiento se realizaron en envases de vidrio que contuvieron 800 ml de agua de mar filtrada y con aireación.....	52



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 5. Cultivo de microalgas ( <i>Isochrysis galbana</i> –T-iso) utilizada para la aclimatación y para las estimaciones de parámetros fisiológicos (i.e., tasa de aclaramiento, tasa de ingestión, eficiencia de absorción). .....	53
Figura 6. Fotografía que muestra la medición del consumo de oxígeno mediante un sensor de fibra óptica con compensación de temperatura (Fibox3).....	55
Figura 7. Diagrama del experimento para determinar el efecto sobre larvas competentes de <i>Mytilus</i> al ser expuestas a los compuestos Peróxido de Hidrógeno y Azametifos. Las unidades experimentales se mantuvieron en bateas con agua circulante a través de un Chiller para mantener una temperatura de 14 + 1°C. Cada unidad experimental tuvo 2.5 L de agua de mar (filtrada y esterilizada con luz UV) a una salinidad de 30 psu, aeración constante y un trozo de 10 cm de malla netlon.....	60
Figura 8. Esquema de los puntos de muestreo dentro y fuera (radios de impacto) de las jaulas de cultivo, representados por las boyas naranjas y B) Jaula en proceso de baño con quimioterapéutico, se muestra la lona reducida para el baño y las estructuras de toma de muestra posesionadas. ....	65
Figura 9 . A, estructura de soporte de 12 botellas Schott de muestreo con sistema de flotación. B, accionamiento manual de llenado por mensajeros de monofilamento. ....	66
Figura 10. Modelo SEPA (2008), la elipse naranja representa la “pluma de dispersión” y la línea central de la elipse corresponde a la zona de muestreo de la masa de agua con el quimioterapéutico. ....	67
Figura 11. Liberación de los derivadores con GPS al agua post baño con quimioterapéutico, para seguimiento de la pluma de dispersión. ....	68
Figura 12. Representación geográfica de la ACS 2 y 14. ....	69
Figura 13. Correntómetro Perfilador Acústico Doppler .....	71
Figura 14. Indicación geográfica del lugar de instalación de equipo correntómetro, Centro A.....	71
Figura 15. Se muestra sistema de distribución de peróxido de hidrógeno (Manguera amarilla perforada) y lona instalada. ....	72



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 16. Dirección y velocidad de corriente respecto al cetro en el momento de la toma de muestras. Letras A, B, C y D representan las posiciones de las estructuras soportante de botellas de muestreo. Puntos rojos representan la toma de muestras fuera de la jaula. ....	74
Figura 17. Indicación geográfica del lugar de instalación de equipo correntómetro, Centro B.....	75
Figura 18. Correntómetro euleriano de punto fijo. ....	76
Figura 19. Instalación de correntómetros en módulo del Centro B.....	76
Figura 20. Secuencia de muestreo de agua durante aplicación de compuestos caligicidas A, finalización de la aplicación (Tiempo 1). B, antes de la liberación de la lona (Tiempo 2). C, posterior a 10 minutos de la liberación de la lona (Tiempo 3).....	78
Figura 21. A, seguimiento de los derivadores (visto desde el módulo) para obtención muestras de agua de la pluma de dispersión de los quimioterapéuticos. B, se muestran 2 de los tres derivadores vistos desde la lancha. ....	79
Figura 22. Seguimiento con toma de muestra en la línea de derivadores, post baño con peróxido de hidrógeno.....	80
Figura 23. Ubicación geográfica del lugar de muestreo durante baño de azametifos, Centro C (Círculo rojo) .....	81
Figura 24. Previo al inicio de baño. Flecha azul indica manguera de aspersion del compuesto azametifos y flecha roja muestra lona de baño en posicionada. ....	83
Figura 25. Posicionamiento de estructuras de muestreo durante baño con azametifos en Centro C. ....	83
Figura 26. Seguimiento de derivadores con toma de muestra en la línea imaginaria central de derivadores, post baño con azametifos en Centro C.....	84
Figura 27. Trayectoria de los derivadores y los puntos referenciales de toma de muestras en Centro C. ....	85
Figura 28. Estructura de azametifos (Pfenning et al., 1999; Rawn et al., 2009) .....	90



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 29. Aplicación de la técnica fluorescente para la estimación de viabilidad, espermios verdes = vivos, espermios rojos = muertos. ....	121
Figura 30. Media del porcentaje de viabilidad de espermios dentro del receptáculo seminal en hembras expuestas a diferentes niveles de compuestos. Línea continua representa la media del control y las discontinuas su desviación estándar. D1,D2, ... Deltametrina; C1,C2, ... Cipermetrina; A1,A2, ... Azametifos; P1,P2, ... Peróxido.....	122
Figura 31. Mortalidad de adultos de <i>C. edwardsii</i> concentración-dependiente Cipermetrina. (Ajuste sigmoideo concentración-dependiente $CL_{50} \pm ES$ (error estándar ES; $r^2=0.934$ ) .	134
Figura 32. Mortalidad de adultos de <i>C. edwardsii</i> concentración-dependiente Deltametrina. (Ajuste sigmoideo concentración-dependiente $CL_{50} \pm ES$ (error estándar ES; $r^2=0.735$ ) .	135
Figura 33. Daño severo en adultos de <i>C. edwardsii</i> concentración-dependiente Peróxido. ....	136
Figura 34. Mortalidad de adultos de <i>C. edwardsii</i> concentración-dependiente Azametifos. ....	137
Figura 35. Mortalidad de adultos de <i>C. edwardsii</i> concentración-dependiente Cipermetrina. Ajuste sigmoideo concentración-dependiente $CL_{50} \pm ES$ (error estándar ES; $r^2=0.869$ ) ..	138
Figura 36. Mortalidad de adultos de <i>C. edwardsii</i> concentración-dependiente Deltametrina. Ajuste sigmoideo concentración-dependiente $CL_{50} \pm ES$ ( $r^2=0.854$ ).....	138
Figura 37. Daño severo en adultos de <i>C. edwardsii</i> concentración-dependiente Peróxido. ....	139
Figura 38. Consumo de Oxígeno ( $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ ) de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de azametifos y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	144
Figura 39. Consumo de Oxígeno ( $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ ) de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de cipermetrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	145



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 40. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de deltametrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	146
Figura 41. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de peróxido y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	147
Figura 42. Actividad de CAT en músculo de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Cipermetrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	148
Figura 43. Actividad de CAT en músculo de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Deltametrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	149
Figura 44. Actividad de CAT en músculo de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Azametifos y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	150
Figura 45. Actividad de CAT en músculo de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrógeno y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).....	151
Figura 46. Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Cipermetrina y seguimiento por 96 h (media + ds).....	152
Figura 47. Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Deltametrina y seguimiento por 96 h (media + ds).....	153
Figura 48. Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Azametifos y seguimiento por 96 h (media + ds).....	153



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 49. Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Peróxido de hidrógeno y seguimiento por 96 h (media + ds). .....	154
Figura 50. Actividad de ACHE en musculo de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Azametifos y seguimiento por 96 h (media + ds). .....	155
Figura 51. Consumo de Oxigeno peso-especifico de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Cipermetrina. ....	156
Figura 52. Consumo de Oxigeno peso-especifico de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Deltametrina. ....	157
Figura 53. Consumo de Oxigeno peso-especifico de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Azametifos. ....	157
Figura 54. Consumo de Oxigeno peso-especifico de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Peróxido de hidrógeno. ....	158
Figura 55. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Cipermetrina. ....	159
Figura 56. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Deltametrina. ....	160
Figura 57. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Azametifos. ....	161
Figura 58. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Peróxido de hidrógeno. ....	162
Figura 59. Actividad de ACHE en musculo de adultos de <i>C. edwardsii</i> luego de exposición crónica a Azametifos. ....	162
Figura 60. Zoea I de <i>C. edwardsii</i> expuestas a distintas concentraciones (ppb) de cipermetrina. A) Larvas muertas más moribundas (%) a 24 horas post-exposición, Mortalidad acumulada B) 48 horas post-exposición y C) 96 horas post-exposición. La flecha la concentración recomendada por el fabricante .....	164



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 61: Tiempo de desarrollo (barras azules) de la Zoea I de <i>C. edwardsii</i> bajo distintas concentraciones de Cipermetrina y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos) .....	165
Figura 62. Zoea I de <i>C. edwardsii</i> expuestas a distintas concentraciones (ppb) de deltametrina A) Larvas muertas más moribundas (%) a 24 horas post-exposición, Mortalidad acumulada B) 24 horas post-exposición y C) 48 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo indica la $CL_{50} \pm es$ . .....	167
Figura 63. Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> bajo distintas concentraciones de deltametrina y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos) .....	168
Figura 64 Zoea I de <i>C. edwardsii</i> expuestas a distintas concentraciones (ppb) de azametifos A) Larvas muertas más moribundas (%) a 24 horas post-exposición, Mortalidad acumulada B) 24 horas post-exposición y C) 48 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo indica la $CL_{50} \pm es$ . .....	170
Figura 65: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> bajo distintas concentraciones de azametifos y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos) .....	171
Figura 66. Mortalidad acumulada (%) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> expuestas por 20 minutos a distintas concentraciones (ppm) de Peróxido de Hidrógeno A) 24 horas post-exposición, B) 48 horas post-exposición. C) 72 horas post-exposición D) 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la $CL_{50} \pm es$ . .....	173
Figura 67: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> bajo distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos) .....	174



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 68. Mortalidad acumulada (%) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> expuestas a 4 aplicaciones de azametifos a distintas concentraciones. ....	175
Figura 69: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> bajo exposición crónica (7 días) a distintas concentraciones de azametifos y supervivencia hasta mudar a Zoea II (cuadrados rojos) .....	176
Figura 70. Mortalidad acumulada (%) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> expuestas a 4 aplicaciones de Peróxido de Hidrógeno a distintas concentraciones.....	177
Figura 71. Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de <i>C. edwardsii</i> bajo exposición crónica (7 días) a distintas concentraciones de Peróxido de Hidrógeno y supervivencia hasta mudar a Zoea II (cuadrados rojos) .....	178
Figura 72. Moribundas más muertas (%) de Zoea I de <i>L. santolla</i> expuestas a distintas concentraciones (ppb) de cipermetrina A) 72 horas post-exposición, B) 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la $CL_{50\pm es}$ .....	180
Figura 73: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de <i>L. santolla</i> bajo distintas concentraciones de cipermetrina (ppb) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos).....	181
Figura 74. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de <i>L. santolla</i> sometidas a distintas concentraciones de cipermetrina en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición). ....	182
Figura 75. Moribundas más muertas (%) de Zoea I de <i>L. santolla</i> expuestas a distintas concentraciones (ppb) de deltametrina a las 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la $CL_{50\pm es}$ .....	183
Figura 76: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de <i>L. santolla</i> bajo distintas concentraciones de deltametrina (ppb) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos).....	184



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

- Figura 77. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de *L. santolla* sometidas a distintas concentraciones de deltametrina en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición). .....185
- Figura 78. Moribundas más muertas (%) de Zoea I de *L. santolla* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de azametifos A) a las 24 horas post-exposición y B) a las 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la  $CL_{50} \pm es$ .....187
- Figura 79. Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *L. santolla* bajo distintas concentraciones de azametifos (ppb) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos).....188
- Figura 80. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de *L. santolla* sometidas a distintas concentraciones de Azametifos en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición).....189
- Figura 81. Moribundas más muertas (%) de Zoea I de *L. santolla* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de Peróxido de Hidrogeno a las 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante.....190
- Figura 82: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *L. santolla* bajo distintas concentraciones de Peróxido de Hidrógeno (ppm) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos).....191
- Figura 83. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de *L. santolla* sometidas a distintas concentraciones de Peróxido de hidrógeno en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición).....192
- Figura 84. A) Batea control con 10 animales con agua de mal filtrada y aireación. B) Batea con el tratamiento luego de 48 h de exposición con  $H_2O_2$  a 1500 ppm (la recomendación del fabricante). .....193
- Figura 85. A) un ejemplar de *Mytilus chilensis* de la batea control (Sin Peróxido de hidrógeno). B) un ejemplar de *Mytilus chilensis* de la batea expuesta por 48 h a una concentración de 1500 ppm de Peróxido de Hidrogeno. br = Branquias; gn = gónadas. .194



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

- Figura 86. Resultados de tasa de aclaramiento para choritos (*Mytilus chilensis*) expuesto a las siete concentraciones de peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (marca Europharma) durante 48 horas previa su medición.....195
- Figura 87. Resultados del crecimiento potencial (energía absorbida – [energía gastada por excreción + energía gastada por consumo de oxígeno]) del chorito *Mytilus chilensis* (pesando entre 900-1800 g) expuestos a las diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrógeno por 48 horas previa su medición. Las barras grises corresponden a los tratamientos y la barra negra representa al control. ....196
- Figura 88. Gráfico de interacción de las principales variables fisiológicas estimadas para *Mytilus chilensis* expuestos a 7 concentraciones de azametifos. ....198
- Figura 89. Resultados de tasa de aclaramiento para choritos (*Mytilus chilensis*) expuesto a las siete concentraciones de Azametifos (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS) durante 48 horas previa su medición. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas del test a posteriori de Tukey. ....199
- Figura 90. Resultados del potencial de crecimiento (= energía absorbida – [energía gastada por excreción + energía gastada por consumo de oxígeno]) del chorito *Mytilus chilensis* (pesando entre 900-1800 gr) expuestos a las diferentes concentraciones de azametifos (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS) por 48 horas previa su medición. Las barras grises corresponden a los tratamientos y la barra negra representa al control. ....200
- Figura 91. Regresión lineal entre la tasa de aclaramiento (L/h) y el peso seco de los mejillones (mg). En el grafico se representa la ecuación de regresión y la correlación de Pearson para cada pendiente (P<0.05). ....201
- Figura. 92. Regresión lineal entre crecimiento potencial (J/h) y el peso seco de los mejillones (mg). En el grafico se representa la ecuación de regresión y la correlación de Pearson para cada pendiente (P< 0.05). ....202
- Figura. 93. Número de espermatozoides con movimiento luego de la exposición por 30 minutos a las siete concentraciones de Peróxido de Hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Nota =1500 ppm es la concentración recomendada por el fabricante para utilizar ante caligidosis. Barras grises



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

representan los tratamientos y barra negra representan las unidades experimentales control (sin Peróxido de Hidrógeno).....	203
Figura 94. Resultados de los experimentos de inhibición de la fecundación de <i>Mytilus chilensis</i> en presencia de siete concentraciones del compuesto Peróxido de hidrógeno [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] luego de dos horas post-fertilización. Barras negras representa ovocitos en estado mórula (fecundación) y barras grises representan ovocitos sin división celular (inhibición de la fecundación). .....	204
Figura. 95. Número de espermatozoides con movimiento luego de la exposición por 30 minutos a las siete concentraciones del compuesto Azametifos [C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS]. Barras grises representan los tratamientos y barra negra representan las unidades experimentales control (sin Azametifos). .....	205
Figura 96. Resultados de los experimentos de inhibición de la fecundación de <i>Mytilus chilensis</i> en presencia de siete concentraciones del compuesto Azametifos [C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS] luego de dos horas post fertilización. Barras negras representa ovocitos en estado mórula (fecundación) y barras grises representan ovocitos sin división celular (inhibición de la fecundación). .....	206
Figura 97. Resultados del porcentaje de sobrevivencia de las larvas competentes de <i>Mytilus chilensis</i> (ultimo estado de la larva de <i>Mytilus</i> antes de la fijación en los colectores) luego de exponerla a una concentración de las siete concentraciones experimentales de Peróxido de Hidrógeno [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ].....	208
Figura 98. Resultados del porcentaje de sobrevivencia de las larvas competentes de <i>Mytilus chilensis</i> (ultimo estado de la larva de <i>Mytilus</i> antes de la fijación en los colectores) luego de exponerlas a una concentración de Azametifos [C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS] usando las siete concentraciones experimentales. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas del test a posteriori de Tukey.....	209
Figura 99. Resultados del experimento de fijación de larvas de <i>Mytilus chilensis</i> . Número de larvas asentadas a las 96 h, previa a su exposición a 7 concentraciones experimentales del compuesto Peróxido de Hidrógeno [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]. .....	210



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 100. Resultados del experimento de fijación de larvas de <i>Mytilus chilensis</i> . Número de larvas asentadas a las 96 h, previa a su exposición de una concentración de cada una de las 7 concentraciones experimentales del compuesto azametifos [C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS].	211
Figura 101. Frecuencia de los estados de maduración gonadal de <i>Mytilus chilensis</i> entre junio de 2015 a noviembre de 2015 en la localidad de Caleta Amargos -Valdivia.	213
Figura 102. Volumen de la fracción gamética (VFG) para los ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y maduros (media + EE) en las hembras de <i>Mytilus chilensis</i> de la localidad de Caleta Amargos -Valdivia, (área libre de Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), entre junio de 2015 a noviembre de 2015.	214
Figura 103. Volumen de la fracción gamética para el tejido interfolicular y otros tejidos (media + EE) en las hembras de <i>Mytilus chilensis</i> de la localidad de Caleta Amargos (área libre de Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), Valdivia, entre junio de 2015 a noviembre de 2015.	215
Figura 104. Frecuencia de los estados de maduración gonadal de <i>Mytilus chilensis</i> entre junio de 2015 a noviembre de 2015 en la localidad de Bahía Yal - Chiloé.	216
Figura 105. Volumen de la fracción gamética (VFG) para los ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y maduros (media + EE) en las hembras de <i>Mytilus chilensis</i> de la localidad de Bahía Yal - Chiloé (área expuesta a Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), entre junio de 2015 a noviembre de 2015.	217
Figura 106. Volumen de la fracción gamética para el tejido interfolicular y otros tejidos (media + EE) en las hembras de <i>Mytilus chilensis</i> de la localidad de Bahía Yal- Chiloé (área expuesta a Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), entre junio de 2015 a noviembre de 2015.	218
Figura 107. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de <i>Mytilus chilensis</i> expuestos al compuesto Peróxido de Hidrógeno (concentraciones experimentales → 50, 100, 300 y 750 ppm). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a peróxido de hidrogeno); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a peróxido de hidrogeno.	221



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 108. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de <i>Mytilus chilensis</i> expuestos a Peróxido de Hidrógeno (concentraciones experimentales → 1500, 2000 y 3000 ppm). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a Peróxido de Hidrógeno); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a Peróxido de Hidrógeno. ....	222
Figura 109. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de <i>Mytilus chilensis</i> expuestos al compuesto Azametifos (concentraciones experimentales → 1, 3, 10 y 30 ppb). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a azametifos); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a Azametifos. ....	223
Figura 110. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de <i>Mytilus chilensis</i> expuestos al compuesto Azametifos (concentraciones experimentales → 100, 300 y 500 ppb). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a azametifos); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a Azametifos. ....	224
Figura 111. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 1 (3 metros de profundidad). ....	229
Figura 112. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 2 (5.5 metros de profundidad). ....	229
Figura 113. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 3 (8 metros de profundidad). ....	230
Figura 114. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 6 (15.5 metros de profundidad). ....	230
Figura 115. Diagrama polar de velocidad (nudos) y dirección (8 m profundidad).....	232
Figura 116. Diagrama polar velocidad (nudos) y dirección (16 m profundidad). ....	232
Figura 117. Esquema de comportamiento de dirección de corrientes en mareas llenante y vaciante en el Centro B. ....	233



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Figura 118. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 1 (3 metros de profundidad). .....	236
Figura 119. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 2 (6 metros de profundidad). .....	236
Figura 120. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 3 (9 metros de profundidad). .....	237
Figura 121. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 4 (15 metros de profundidad). .....	237
Figura 122. Temperatura (°C) y Oxígeno disuelto (mg*L-1) a 5m de profundidad en los centros de cultivo B y C para el día del muestreo Azametifos.....	239
Figura 123. Temperatura (°C) y Oxígeno disuelto (mg*L-1) a 5m de profundidad en los centros de cultivo A y B para el día del muestreo Peróxido. ....	240
Figura 124. Centro B. Concentración azametifos en la columna de agua durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios +ds .....	242
Figura 125. Centro C. Concentración azametifos en la columna de agua durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios + desviación estándar.....	244
Figura 126 Disminución de la concentración del compuesto peróxido de hidrógeno en el tiempo, realizado con agua del mismo centro muestreado .....	246
Figura 127. Centro A. Concentración de peróxido de hidrógeno durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios +SD. ....	247
Figura 128. Centro B. Concentración de peróxido de hidrógeno durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios + ds. ....	248



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 3 OBJETIVOS GENERALES

Determinar el impacto de los productos utilizados en el control del ectoparásito *Caligus rogercresseyi*, sobre los recursos chorito y jaiba marmola

### 4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1 Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos
- 4.2 Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola (*Cancer edwardsii*), bajo condiciones controladas
- 4.3 Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito (*Mytilus chilensis*) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas
- 4.4 Determinar la concentración que alcanza el azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas
- 4.5 Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 5 ANTECEDENTES

El desarrollo de la industria salmonera en los distintos países productores ha estado acompañado de numerosa controversia (Bocking 2012), siendo actualmente una de las principales de origen sanitario. Las altas densidades de cultivo y probablemente la sobrepasada capacidad de carga ha provocado el aumento de plagas parasitarias que implica grandes pérdidas a la industria del salmón (Broxshall y Bravo, 2000). Dentro de las plagas parasitarias se encuentra principalmente la caligidosis, la cual ha sido una de las más importantes para la industria salmonera chilena desde 1982 (Reyes y Bravo, 1983) y desde entonces el piojo de mar, principalmente *Caligus rogercresseyi*, ha sido controlado con distintos agentes antiparasitarios. En 2007 el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura incorpora a la caligidosis como una enfermedad de alto riesgo de la Lista 2, ya que se considera una enfermedad de importancia y puede ser objeto de programas de vigilancia y control. Posteriormente, a fines 2012 se implementa una nueva estrategia en la vigilancia y el control de la caligidosis que se regula a través del Programa Sanitario específico de Caligidosis.

Dentro de los primeros productos utilizados en el control del piojo de mar se encuentran metrifonato, organofosfatos y diclorvos, posteriormente la ivermectina y benzoato de emamectina. Actualmente, los antiparasitarios más usados son: Emamectina, deltametrina y cipermetrinas piretroides que afectan el sistema nervioso central (Sevatdal et al. 2005), estos dos últimos aplicados en baños en concentraciones recomendadas por los fabricantes de 2-3 ppb por 40 min. y 15 ppb por 30 min, respectivamente. Peróxido de hidrógeno, que también es aplicado en baños, por 20 min en concentración de 750-1500 ppb, actúa causando parálisis mecánica (Bravo et al 2010). El diflubenzuron y teflubenzuron, inhibidores de la síntesis de quitina (Clarke and Jewess, 1990) y por último organofosforados, azametifos aplicados en baños en concentración de 100ppb por 30 min, un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (Roth et al 1993).

Los piretroides (cipermetrina, deltametrina) en general tienen alta degradación, baja toxicidad en mamíferos y alta toxicidad en crustáceos, y tienden a ser absorbidos en el



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

material particulado. Los piretroides actúan interfiriendo con el funcionamiento de la membrana nerviosa, principalmente por su interferencia en los canales de Na (Miller and Adams 1992), lo que resulta en la despolarización de la membrana. Específicamente se ha encontrado efecto de la cipermetrina en larvas de langostas, considerado en general este estadio de desarrollo uno de los más sensibles en del ciclo de vida de los organismos (Burrige et al. 2000 a, b) y en otros crustáceos en sus etapas adultas (Burrige et al. 2014). Pahl y Opitz, 1999 describen que las larvas de moluscos y erizo presentan mayor tolerancia a este producto. Estudios en Chile como los realizados en el proyecto FIP “Determinación del posible impacto de la cipermetrina y deltametrina en el medio marino y su efecto en *Mytilus chilensis*”, no detectaron efecto en las larvas de choritos. En general se considera que los piretroides son más tóxicos a insectos no objetivo y crustáceos que a grupos filogenéticamente menos emparentados.

Los mecanismos de acción sugerido por el Peróxido de hidrógeno son parálisis, peroxidación por radicales de hidroxilos de lípidos y membranas de organelos celulares e inactivación de enzimas y replicación de DNA. Evidencia clara de la parálisis ocasionada por este producto es cuando se forman burbujas en el intestino y hemolinfa lo que produce el desprendimiento de los piojos de mar, y permanecen flotando en el agua (Bruno y Raynard 1994). Este compuesto es considerado ambientalmente más amistoso, debido que se descompone en oxígeno y agua (Haya et al. 2005). Escasa información es disponible sobre la toxicidad del peróxido de hidrogeno en distintos organismos marinos, Burrige et al. 2014 indica la DL50 en organismos como langostas (*H. americanus*, adulto y larvas,) camarón (*Crangon septemspinosa*) en general son cercanos a la concentración aplicadas comercialmente o un poco más elevadas (10%), indicando que el riesgo por este producto es bajo.

Azametifos es un pesticida organofosfato que actúa por inhibición de la actividad enzimática (acetilcolinesterasa) en la sinapsis neuronal. Este producto es soluble en agua y tiene bajo log Kow, por lo que se sugiere que podría permanecer en su fase acuosa en el ambiente, el



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

azametifos se descompone por hidrólisis en el medio natural con una vida media de 8.9 días (Burridge et al. 2014), y estudios de los anteriores autores sugieren que la formulación utilizada en su estudio permanece en solución por 24 h aproximadamente con poca degradación o pérdida bajo condiciones de laboratorio. Efecto de azametifos en distintos organismos no objetivos entre ellos *Homarus americanus*, *H. gammarus*, *Crangon septemspinosa* y *Mysid* sp. no han mostrado efectos claros, pero estos estudios se han concentrado en la evaluación de efectos agudos y pocos estudios se han enfocado en evaluar los efectos crónicos debido a las limitaciones en el tiempo de seguimiento de las respuestas.

Tomando en conjunto las siguientes consideraciones sobre los productos utilizados contra el *Caligus* que: a) han sido diseñados para el control de insectos en la agricultura, b) otros, son químicos no específicos para *Caligus*, y c) la liberación de éstos en el ambiente acuático (baños) se ha postulado que no solo se podría estar afectando al piojo de mar sino a otros organismos del ambiente (Cunningham 1996, Waddy et al, 2002, Willis and Ling 2003, Nash, 2003; Burridge et al 2005, Haya et al. 2005, Dorts et al. 2009).

Considerando los antecedentes junto con las denuncias por parte de los pescadores artesanales respecto al “efecto que tanto los piretroides como los organofosforados estarían causando en los crustáceos de la XI Región”, mencionadas en las bases de la presente propuesta, con los posibles efectos en otras especies no objetivo como el chorito y la falta de estudios en Chile sobre los efectos tanto agudos como crónicos sobre distintos organismos de los productos utilizados contra la caligidosis, es importante realizar investigaciones que ayuden a la toma de decisiones de las autoridades basadas en información técnica de respaldo sobre estos aspectos plasmados en la presente propuesta técnica.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 6 METODOLOGÍA DE TRABAJO POR OBJETIVO

6.1 Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos

### 6.1.1 Búsqueda y selección de artículos relevantes

Se realizó una extensa y comprensiva revisión de la literatura existente sobre los efectos de organofosforados, en particular azametifos; y peróxido de hidrógeno, sobre organismos acuáticos, principalmente marinos. Adicionalmente, se realizó la misma búsqueda para deltametrina y cipermetrina. Los principales buscadores utilizados fueron Scopus y Science Direct. Los resultados obtenidos por ambos buscadores fueron revisados y comparados (~80 % de similitud), de manera de confeccionar una base de datos que incluya todos los trabajos de interés para el proyecto. Esto se realizó de manera independiente y por consenso entre tres investigadores. Ninguna búsqueda fue limitada a año de publicación. Dependiendo del compuesto se utilizaron diferentes combinaciones de palabras claves, de manera de encontrar la literatura relevante, pero a la vez no tan rígida para evitar la exclusión de publicaciones de interés. Este balance fue considerado como aceptable cuando las publicaciones de interés representaron entre un 5 y 11.5 % del total de publicaciones arrojadas por la búsqueda (Tabla I). Cada uno de estos trabajos arrojados en las búsquedas fue clasificado como relevante o no, en base a su título y resumen (Se adjunta información de los artículos en Anexo I, Tabla I). Esto también fue realizado por al menos 2 investigadores en forma independiente y los trabajos fueron seleccionados por consenso.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 6.1.2 Validación de la búsqueda

Con el fin de evaluar la precisión y alcance de las búsquedas, 9 trabajos de reconocidos expertos fueron seleccionados de la base de datos (BurrIDGE, L.E., Ernst, W., y Treasurer, J.W.), con el fin de evaluar el número de artículos relevantes citados y que no fueron arrojados en nuestras búsquedas. Este protocolo arrojó la omisión de 7 artículos no encontrados en las búsquedas. De estos 7 artículos, 4 fueron recurrentes en las referencias de los autores seleccionados como expertos. En total, 6 artículos fueron agregados a la base de datos.

**Tabla I. Resumen general del proceso de búsqueda para cada compuesto, organismo, palabras clave utilizadas, y los números de documentos encontrados y seleccionados.**

Compuesto	Organismo	Palabras clave	Area (restringido a)	N resultados	N publicaciones relevantes	% publicaciones relevantes
Azametifos	Crustaceos	Azametifos + crustaceos	Ninguna	334	31	9.3
	Mejillones	Azametifos + mejillones				
	Moluscos	Azametifos + moluscos				
	Equinodermos	Azametifos + equinodermos				
Peroxido de hidrogeno	Crustaceos	Hydrogen peroxide + crustaceos	Phamacology, Toxicology, Pharmaceutics, Agriculture, Biology, Environment, veterinary	391	45	11.5
	Mejillones	Hydrogen peroxide + mejillones+ toxicity				
	Moluscos	Hydrogen peroxide + moluscos				
	Equinodermos	Hydrogen peroxide + equinodermos				
Deltametrina	Crustaceos	Deltametrin + crustaceos	Phamacology, Toxicology, Pharmaceutics, Agriculture, Biology, Environment, veterinary	389	26	6.7
	Mejillones	Deltametrin + mejillones+ toxicity				
	Moluscos	Deltametrin + moluscos				
	Equinodermos	Deltametrin + equinodermos				
Cipermetrina	Crustaceos	Cipermetrin + crustaceos	Phamacology, Toxicology, Pharmaceutics, Agriculture, Biology, Environment, veterinary	635	32	5.0
	Mejillones	Cipermetrin + mejillones+ toxicity				
	Moluscos	Cipermetrin + moluscos				
	Equinodermos	Cipermetrin + equinodermos				
				<b>Promedio</b>		<b>8.1</b>
				<b>SD</b>		<b>2.9</b>



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

6.2 Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola (*Cancer edwardsii*), bajo condiciones controladas

Se trabajó con adultos provenientes de la zona de Carelmapu- Maullín y de Los Molinos, ambas zonas sin historial de uso de los compuestos de interés del proyecto. Los animales fueron aclimatizados por una semana a las condiciones de laboratorio previo a la realización de los experimentos.

## 6.2.1 Experimentos en adultos de jaiba marmola

6.2.1.1 Experimento para evaluar toxicidad aguda sobre mortalidad y reproducción (viabilidad espermática, histología de gónada)

Los efectos sobre la viabilidad espermática y el tejido ovárico de los cuatro diferentes productos utilizados por las empresas salmoneras para el control del *Caligus* fueron estimados a través de experimentos manipulativos, donde se expusieron hembras no ovígeras a los productos por 24 horas (efecto agudo). Para tal efecto, se utilizaron 7 hembras adultas (> 80 cm de ancho del cefalotórax) en cada tratamiento (7 tratamientos por producto, según concentraciones establecidas en Tabla II) mas siete individuos en el control. Este último, consistió en mantener los individuos bajo las mismas condiciones experimentales de temperatura (13°C), salinidad (32), fotoperiodo (24 h luz) y volumen de agua (100 L) que en los tratamientos, pero solo con agua de mar filtrada 5  $\mu$ m y esterilizada por UV.

Para todos los casos, luego de terminado el período de experimentación, las hembras fueron mantenidas 24 horas en recuperación en las mismas condiciones que el control antes de ser medidas y disectadas. Los compuestos utilizados corresponden a productos



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

comerciales utilizados por la industria salmonera: Azametifos (CalFree®, Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV SA); Cipermetrina (Betamax®, Novartis Chile SA); Deltametrina (AlphaMax®, Pharmaq AS Chile Ltda.); Peróxido de hidrógeno (Europharma Chile SA) (Nombres comerciales, presentaciones, fabricante y recomendaciones de uso en ANEXOS I)

Según los resultados obtenidos en experimentos preliminares y la literatura consultada, se pudo establecer que los compuestos se degradan en el tiempo, por lo que la concentración variará durante el tiempo de aplicación. En reunión del equipo de trabajo se analizaron estos resultados y se decidió que las concentraciones de Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina serían restituidas cada 12 horas mientras que las de Peróxido serían restituidas cada 8 horas. De esta forma se estaría cautelando la mantención de la concentración nominal inicial con una variación menor al 15%. La metodología de exposición a los compuestos se modificó entonces colocando los 7 animales de cada compuesto comercial y concentración (tratamiento) en un acuario de vidrio de 250 L con 100 L de agua de mar filtrada a 5  $\mu\text{m}$  y esterilizada por luz UV, a 13.5°C, 32 de salinidad (que será identificada como “agua de mar”, salvo condiciones especiales debidamente indicadas). Cada acuario fue provisto de burbujeo (Anexo I, Fig. 1). Para cada compuesto, 10-15 minutos antes de su aplicación, se preparó una solución de trabajo en agua de mar filtrada 1  $\mu\text{m}$  y esterilizada por UV. De esta solución de trabajo se adicionó con micropipeta el volumen requerido para alcanzar la concentración necesaria en el acuario con los 100 L de agua de mar. Se dejó que los compuestos difundieran en cada acuario por 10 min y luego los animales fueron introducidos en cada acuario. Transcurrido el tiempo identificado para la restitución (8 o 12 h según corresponda), el agua del acuario fue bombeada a un estanque de almacenamiento externo y reemplazada por 100 L de agua de mar. Se realizaron 3 recambios de agua de mar similares (“lavados” de acuario y animales) para luego restituir los 100 L de agua de mar y adicionar el mismo volumen de solución de trabajo requerido para restituir la concentración inicial (Anexo I, Fig. 2). Finalizado el tiempo de exposición al compuesto, se repitió el proceso de lavado tres veces y los animales se mantuvieron en 100



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

L de agua de mar por 24 horas adicionales sin el compuesto. A las 24 horas post-tratamiento, los animales fueron evaluados y la mortalidad registrada. Con esta información se determinó la  $CL_{50}$  por medio de un ajuste sigmoideo dosis-respuesta para cada compuesto. En el caso del Peróxido, no se registró la mortalidad propiamente tal, sino el daño severo considerado como tal el sufrido por los individuos al flotar en la superficie del acuario (Anexo I, Fig. 3). Luego del tiempo de observación, los animales fueron disectados y se extrajo la gónada y los receptáculos seminales.

Esta mortalidad corresponde al efecto de la concentración del compuesto respectivo sobre 7 animales dispuestos en 100 L de agua. Se realizó un segundo registro de mortalidad sobre 36 individuos por tratamiento asociado a los experimentos  $EC_{50}$  (ver mas abajo).

## **Viabilidad espermática**

La viabilidad espermática se determinó a través de una técnica de fluorescencia utilizando LIVE / DEAD® espermatozoos Viabilidad Kit, adaptado para espermios almacenados en los receptáculos seminales de cangrejos (Wolcott et al. 2005). Este producto posee tinciones fluorescentes duales (SYBR-14 agente y yoduro de propidio), el SYBR-14 tiñe los núcleos de las células de espermios vivos de color verde brillante verde a 480 nm de excitación y de emisión de 520 nm, y el yoduro de propidio tiñe células espermáticas muertas rojo fluorescente a 530 nm de excitación y 615 nm de emisión. Estas células muertas han perdido la integridad de la membrana.

## **Evaluación de daño ovárico**

Una sección del ovario maduro de las hembras experimentales, fueron lavadas con alcoholes ascendentes (50°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°), posteriormente deshidratadas con tres repeticiones de butanol, para finalmente ser incluidas en parafina histológica (56° de ebullición). Después de 48 horas fueron talladas, cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina y Tricomico de Mason para la posterior observación microscópica. Una vez obtenidos los cortes de todos los tratamientos y el control, éstos fueron analizados comparativamente



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

contra el control, en cuanto a su 1) asincronía del desarrollo, 2) malformaciones celulares y 3) alteraciones del tamaño de los ovocitos

## 6.2.1.2 Experimentos para toxicidad aguda sobre $EC_{50}$ en adultos de jaiba

Para la evaluación de la toxicidad aguda sobre  $EC_{50}$  se utilizaron machos y hembras no ovígeras provenientes de las mismas localidades descritas anteriormente.

El procedimiento fue similar al descrito para el experimento anterior, pero se trataron 4 concentraciones por semana de un compuesto (4 concentraciones \* (4 tiempos de evaluación \* 9 réplicas = 36 individuos por concentración) = 144 individuos) y a la semana siguiente se completó el experimento, cautelando igual número de réplicas de los tratamientos controles estuviesen en ambas semanas.

Al igual que en el punto anterior, las exposiciones se efectuaron en acuarios de vidrio con 100 L de agua de mar filtrada, con burbujeo, a similar temperatura ( $13^{\circ}C$ ), salinidad (32) y fotoperiodo (24 h luz). Las concentraciones de Azametifos, Cipermetrina y Deltametrina fueron restituidas cada 12 horas mientras que las de Peróxido fueron restituidas cada 8 horas.

Finalizado el tiempo de exposición de 24 horas (generalmente a las diez de la mañana), se realizaron tres recambios de agua de mar ("lavados") y los animales ingresaron a su acuario de mantención, sin compuestos, en el sistema especialmente construido para estos efectos. El sistema de mantención constó de 144 acuarios transparentes de polietileno con suministro de agua de mar individual a un flujo superior a 300 mL/min en cada acuario (Anexo I, Fig. 4). En estos acuarios los animales pueden ser observados regularmente y se evita el contacto entre ellos. En cada nivel se ubicaron los animales a ser evaluados a las 24 h (nivel superior), 48 h (segundo nivel), 72 h (tercer nivel) y 96 h (nivel inferior). En cada nivel de cada uno de los 3 racks se ubicaron 3 réplicas de las cuatro concentraciones experimentales correspondientes (Anexo I, Fig. 4).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Asociados a estos experimentos, se realizó una segunda cuantificación de mortalidad para obtener una  $CL_{50}$  de cada compuesto, esta vez con un “n” mayor por tratamiento ( $n=36$ ). De esta forma, esta mortalidad corresponde al efecto de la concentración del compuesto respectivo sobre 36 animales dispuestos en 100 L de agua.

## **Respuesta conductual: reincorporación**

Al momento de introducir los animales en la cámara respirométrica (ver Respuestas Fisiológicas y bioquímica) los animales fueron manipulados colocándolos en forma invertida, con la zona dorsal apoyada contra el fondo de la cámara respirométrica. Se observó durante 30 segundos si los animales fueron capaces de reincorporarse y adoptar una posición “normal”, apoyados sobre sus patas. Al sumar las evaluaciones de reincorporación se obtuvieron datos para las 6, 24, 30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post-tratamiento. La respuesta se expresó como porcentaje de animales que se reincorporaron.

## **Respuestas Fisiológicas y bioquímica**

La tasa metabólica de cada animal se cuantificó por medio de respirometría cerrada siguiendo una metodología estandarizada en el LECOFIC (ver Paschke et al, 2010). La tarde del día anterior a la evaluación correspondiente (“tiempos”, i.e. 24, 48, 72 y 96 h), cada animal fue introducido a una cámara respirométrica de 24 L y mantenido con flujo abierto de agua de mar por toda la noche con el fin de reducir el estrés por manipulación para la cuantificación de la tasa metabólica a la mañana siguiente. Brevemente, el consumo de oxígeno se obtuvo de la diferencia entre la concentración de oxígeno inicial de la cámara respirométrica y la final, luego de aproximadamente 1 hora de incubación. Tres cámaras respirométricas se usaron como control, sin animales. La concentración de oxígeno disuelto se obtuvo por medio de un sensor óptico calibrado el día de la medición (agua saturada= 100% y solución de sulfito de sodio 5% correspondiente a 0% de oxígeno disuelto), conectado a un sistema Microx TX3 (PreSens, Alemania) que expresa la concentración en  $mg \cdot L^{-1}$ .



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Luego de la medición, la cámara respirométrica fue abierta y la capacidad de reincorporación de los animales fue evaluada durante 30 segundos

Finalizadas las observaciones conductuales, a cada animal se le midió el ancho del caparazón, el peso vivo (para poder expresar la tasa metabólica en  $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ), fueron sacrificados, previo aletargamiento inducido por temperatura a  $4^\circ\text{C}$ , y se obtuvieron muestras de músculo y hepatopáncreas; todas las muestras fueron congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  para su posterior análisis bioquímico.

El análisis bioquímico consistió en cuantificar la actividad de las enzimas Catalasa CAT y Acetilcolinesterasa ACHE. Ambas enzimas han sido ampliamente utilizadas como biomarcadores para evaluar el efecto de contaminantes. La actividad de CAT fue evaluada en músculo y hepatopáncreas de jaibas adultas expuestas a los 4 compuestos analizados debido a que las células de ambos órganos exhiben capacidades antioxidantes enzimáticas altas. La CAT es una de las enzimas que juega un rol en el control de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por su sigla en inglés) cuya generación se intensifica producto de los contaminantes. Catalasa (CAT) es una enzima que facilita la eliminación de peróxido de hidrógeno, que se metaboliza en oxígeno molecular y agua, y por lo tanto es un componente importante de las defensas anti-estrés oxidativo. En los últimos años se ha utilizado como biomarcador.

La actividad de ACHE fue evaluada en músculo de jaiba expuestas a Azametifos, dado que está descrito el efecto de organofosforados inhibiendo la actividad de ACHE, enzima involucrada en metabolizar el neurotransmisor acetilcolina en el espacio interneuronal de una sinapsis. La inhibición de su actividad altera la transmisión del impulso nervioso.

Las muestras congeladas fueron homogenizadas en buffer fosfato en hielo por medio de un sonicador Branson en pulsos de 4 segundos y 4 segundos de pausa. El homogenizado fue subdividido para la estimación de ambas enzimas y de proteína total para expresar la actividad enzimática por mg de proteína. Las submuestras fueron centrifugadas (U32, Boeco) a  $10.000 \cdot \text{G}$  por 10 min a  $2^\circ\text{C}$  y el sobrenadante utilizado para el análisis.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

La actividad de CAT se cuantificó siguiendo el método de Aebi adaptado para microplacas. A 10 uL de sobrenadante (en duplicado) se le adicionaron 180 uL de buffer fosfato pH 7.02. La reacción se inició con la adición de 130uL de solución de trabajo del sustrato  $H_2O_2$  (150uL peróxido Merck al 30% diluido en 25mL de buffer fosfato) con pipeta multicanal. La disminución de  $H_2O_2$  a 25°C fue leída cada 20 segundos por 10 min a 240nm en un espectrofotómetro PowerWave HT (BioTek, EEUU). La actividad se expresó en  $umol \cdot min^{-1} \cdot mgProt^{-1}$  luego de descontar la lectura del blanco (en duplicado) para cada muestra (Blanco consistió en 10uL muestra y 310uL buffer fosfato).

La actividad de ACHE se cuantificó siguiendo el método de Ellman adaptado para microplacas. A 10 uL de sobrenadante (en duplicado) se le adicionó 240 uL de buffer fosfato pH 8.0 y 10uL de DTNB (ácido ditiobisnitrobenzoico 0.01M en buffer fosfato pH7.0). Se incubó la microplaca con muestras y blancos por 10 min a 25°C en un incubador/agitador Thermoxier (Eppendorf, Alemania). La reacción se inició con la adición de 20 uL de sustrato (ioduro de acetiltiocolina 0.075M en agua ultra pura) con pipeta multicanal. La liberación del compuesto de color a 25°C fue leída cada 20 segundos a 412nm por 10 min en un espectrofotómetro PowerWave HT (BioTek, EEUU). La actividad se expresó en  $umol \cdot min^{-1} \cdot mgProt^{-1}$  luego de descontar la lectura del blanco (en duplicado) para cada muestra (Blanco consistió en 10uL muestra, 260uL buffer fosfato y 10uL DTNB).

Las proteínas de cada sobrenadante se cuantificaron espectrofotométricamente por medio del método de Lowry utilizando un kit comercial (DCProtein Assay, Bio Rad, EEUU) con albumina de suero bovina como standard.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 6.2.1.3 Experimento para evaluar toxicidad crónica sobre mortalidad y reproducción (histología de gónada) y EC<sub>50</sub> en adultos de jaiba

Para la evaluación de la toxicidad crónica sobre EC<sub>50</sub> y la gónada se utilizaron hembras no ovígeras provenientes de las mismas localidades descritas anteriormente.

El procedimiento fue similar al descrito para el experimento agudo salvo que se utilizaron 3 concentraciones correspondientes a porcentajes de la CL<sub>50</sub> estimada en el experimento agudo: 100%, 50%, 25% de CL<sub>50</sub> y un control solo con agua de mar filtrada, pero manipulado de la misma forma que los demás tratamientos. ((4 compuestos \* 3 concentraciones) + 1 control = 13 tratamientos \* 11 réplicas = 143 individuos).

Al igual que en el punto anterior, las exposiciones se efectuaron en acuarios de vidrio, pero esta vez con 50 L de agua de mar filtrada (dado que solo se expondrían 11 animales por acuario cada vez), con burbujeo, a similar temperatura (13°C), salinidad (32) y fotoperiodo (24 h luz). Finalizado el tiempo de exposición de 6 horas (generalmente a las 17 horas), se realizaron tres recambios de agua de mar ("lavados") y los animales individualizados (numerados) ingresaron a su acuario de mantención en el sistema descrito anteriormente. Con el fin de que los compuestos a evaluar no fueran incorporados al alimento y que por esta vía se incremente la dosis incorporada en las jaibas, los animales fueron alimentados diariamente *ad libitum* con *Mytilus chilensis* abiertos luego de ingresar a sus acuarios en el sistema de mantención.

Dado que 6 horas de exposición es menor al tiempo establecido para restituir las concentraciones, solo se adicionó el compuesto al inicio de cada exposición diariamente.

#### Evaluación de daño ovárico

El efecto crónico de los compuestos sobre el ovario fue evaluado utilizando la misma metodología descrita para los experimentos agudos.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## **Respuestas Fisiológicas y bioquímica**

Terminado el experimento, se cuantificó la tasa metabólica y se tomaron muestras para actividad de CAT y ACHE de la misma forma como se describió para los experimentos agudos.

### **6.2.2 Experimentos en larvas de jaiba marmola y centolla**

#### **6.2.2.1 Exposición aguda a cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en larvas de *C. edwardsii* y *L. santolla***

Hembras ovígeras de *C. edwardsii* y *L. santolla* fueron mantenidas en acuarios con agua de mar circulante hasta la eclosión de las larvas. Las Zoeas I recién eclosionadas fueron colectadas y solo las larvas que nadaban activamente fueron seleccionadas para ser sometidas a los siguientes los fármacos utilizados en la industria salmonera para el control de la caligidosis: cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno.

#### **Jaiba marmola *C. edwardsii***

Zoeas I de *C. edwardsii* fueron sometidas a 7 concentraciones de los correspondientes fármacos por el periodo indicado en la tabla II. Paralelamente, al grupo de larvas que se le aplicaron los fármacos, un grupo de las larvas fueron utilizadas como control, en este caso se realizó la misma manipulación de las larvas, pero solo con agua de mar. Para evaluar el efecto de los fármacos antes mencionados se utilizaron por fármaco por concentración 350 larvas divididas en 7 réplicas con 50 larvas por cada una ellas y un control para cada fármaco con 7 réplicas con 50 Zoeas I por réplica, que considera solo agua de mar. Una vez seleccionadas y contadas las larvas, fueron sometidas a las distintas concentraciones de los fármacos y tiempos de exposición según la Tabla II. Posteriormente al periodo de aplicación correspondiente, las larvas fueron trasladadas a recipientes con agua de mar filtrada. Este procedimiento se realizó 3 veces y cada uno de los lavados fue por un minuto en agua de mar. Después las larvas fueron separadas en las 7 réplicas correspondientes a



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

la concentración y mantenidas en recipientes de 800 mL sin aireación en agua de mar filtrada 0,45µm. Antes de ser colocadas las larvas en los recipientes para su seguimiento e inmediatamente después de la aplicación de los fármacos y lavado, las larvas fueron observadas clasificándolas en 4 grupos: a) muertas, b) moribundas A, aquellas que estaban en el fondo del recipiente con débiles movimientos de los apéndices solo observable utilizando un microscopio estereoscópico c) moribundas B: aquellas que estaban en el fondo, sin capacidad de natación, pero con movimientos activos de los apéndices observable sin necesidad de microscopio estereoscópico, d) vivas, las que correspondían a las larvas que nadaban activamente.

Las condiciones de mantención de las larvas fueron 15°C, 32 PSU y fotoperiodo 12:12 luz: oscuridad. Diariamente, se realizó cambio de agua y alimentación (nauplii de Artemia), las larvas fueron contadas y clasificadas como vivas, moribundas o muertas y se controló también la presencia de exuvias. Los experimentos se monitorearon hasta que todas las larvas murieron o mudaron a Zoea II.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla II. Concentraciones y tiempos de exposición a utilizar en los respectivos tratamientos. CRF: concentración recomendada por el fabricante.**

Compuesto	Tratamientos							
	Control (agua mar)	1	2	3	4	5 CRF	6	7
Cipermetrina (ppb); 30 min exposición	0	0.15	0.5	1.5	5	15	30	60
Deltametrina (ppb); 40 min exposición	0	0.1	0.25	0.5	1	2	4	8
Azametifos (ppb); 30 min exposición	0	1	3	10	30	100	300	500
Peróxido de hidrógeno (ppm); 20 min exposición	0	50	100	300	750	1500	2000	3000

### **Centolla *Lithodes santolla***

Adicionalmente se realizaron experimentos con larvas de *Lithodes santolla* para evaluar el efecto de la exposición a los fármacos sobre la supervivencia y tiempo de desarrollo. Se incluyó esta especie en los estudios debido que la centolla austral es un recurso de gran importancia comercial para la zona sur-austral del país. Está sometida a una fuerte presión pesquera y es capturada en el mar interior de Chiloé y Seno de Reloncaví, área coincidente con el desarrollo de la salmonicultura. Además, las larvas de *L. santolla* presentan una característica interesante como especie modelo para ecotoxicología puesto que el desarrollo larval es completamente lecitotrófico, por lo cual no requiere alimentación exógena.

Zoea I: larvas de *L. santolla* recién eclosionadas y nadando activamente fueron seleccionadas para ser sometidas cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

hidrógeno a las concentraciones y tiempos indicados en la tabla II. Por concentración (7) de cada uno de los fármacos se utilizaron 210 larvas divididas en 7 réplicas. Adicionalmente un grupo control consistió de 210 larvas que fueron divididas en 7 réplicas (30 larvas por réplicas), este grupo fue sometido a las mismas condiciones de manipulación realizadas a las que fueron expuestas a las distintas concentraciones de los fármacos. Una vez realizada la exposición a los fármacos a las concentraciones y periodos correspondientes, las larvas fueron lavadas tres veces (1 minuto) con agua de mar para posteriormente ser clasificadas en vivas, moribundas A, B (ver detalles arriba) y muertas. Las larvas fueron mantenidas en recipiente de 800 mL con agua de mar filtrada a  $0,45\mu\text{m}$ . Las condiciones de cultivo fueron  $12^{\circ}\text{C}$ , 32 PSU y 12:12 horas luz oscuridad. Diariamente se realizó cambio de agua y se controló la mortalidad y la presencia de exuvias. Las larvas no fueron alimentadas debido a que son lecitotróficas. El experimento se controló hasta que la última larva mudara a Zoea II o muriera.

Megalopa: Megalopas de 10 días de edad fueron utilizadas en los experimentos. Estas megalopas provienen del cultivo larval desde Zoea I a Megalopa bajo condiciones estándar de laboratorio. Debido a la baja disponibilidad de megalopas los experimentos realizados con: a) cipermetrina incluyeron el control y las concentraciones de 1, 5, 15, 30 y 60 ppb con 3 réplicas por concentración y 22 larvas por réplica, b) deltametrina consideraron el control y las concentraciones 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 8 ppb con 5 réplicas por tratamiento y 25 larvas por réplica, c) azametifos consistieron del control y los tratamientos 3, 30, 100, 500 ppb con 4 réplicas por tratamiento y con 23 larvas por réplica y d) peróxido de hidrógeno incluyeron el control y las concentraciones 0, 100, 750, 1500 y 3000 ppm con 4 réplicas por concentración con 23 larvas por réplica.

Una vez expuestas las megalopas a las concentraciones anteriormente mencionadas y periodo indicado en la tabla II para los respectivos fármacos, las larvas fueron lavadas con agua de mar (3 veces) y clasificadas como muertas, moribundas A, B y vivas (ver detalles arriba). Se mantuvieron las megalopas en frascos de 800mL a  $12^{\circ}\text{C}$ , 32PSU y 12:12 horas luz oscuridad. Se realizó cambio de agua, control de mortalidad y de presencia de exuvias



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

diario. Las larvas no fueron alimentadas debido que todo el desarrollo larval es lecitotrófico. El experimento finalizó cuando la última Megalopa murió o mudo a primer juvenil.

## 6.2.2.2 Exposición crónica en larvas de *C. edwardsii*

La exposición crónica de las larvas se realizó solamente con azametifos y peróxido de hidrógeno debido que el 100% de las larvas expuestas a los piretroides utilizados, cipermetrina y deltametrina después de 24 horas postexposición a las concentraciones más bajas utilizadas 0.15 y 0.1 ppb, respectivamente se encontraban muertas o moribundas. Para cada compuesto aplicado se utilizaron 1750 larvas las cuales fueron divididas en 4 concentraciones (Tabla III) y un grupo control solo con agua de mar (350 larvas por tratamiento), cada condición consistió de 7 réplicas con 50 Zoea I cada una.

**Tabla III. Concentraciones de azametifos y peróxido de hidrógeno, y tiempos de exposición para los experimentos crónicos de las larvas de *C. edwardsii*.**

Compuesto	Tratamientos				
	Control (agua de mar)	1	2	3	4
Azametifos (ppb-30 min. exposición)	0	0.063	0.125	0.25	0.5
Peróxido de Hidrógeno (ppm-20 min. exposición)	0	188	375	750	1500



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Las larvas fueron seleccionadas y clasificadas de igual manera que para la exposición aguda. Las condiciones de mantención cambio de agua y alimentación se realizaron como se describió anteriormente para la exposición aguda. Las larvas fueron expuestas diariamente a la concentración correspondiente por el tiempo indicado en la tabla III por 7 días. Se consideró este periodo de exposición (7 días) con el objetivo de solo someter a las Zoea I a la exposición crónica y no tener tratamientos con exposiciones de estadios larvales mezclados. Cada réplica fue expuesta por separado con el objetivo de poder realizar su seguimiento por el periodo que duro el experimento.

## Análisis estadístico

Se evaluó el efecto de cada compuesto utilizado sobre el tiempo de desarrollo y mortalidad de las larvas *C. edwardsii* y *L. santolla*, utilizando análisis de varianza considerando para el tiempo de desarrollo una distribución gamma y para la mortalidad una distribución binomial en los casos que se detectaron diferencias significativas se realizaron pruebas a posteriori (Tukey). Además, se calculó la concentración letal 50 a las 24, 48, 72 y 96 horas en los casos que fue posible, ajustando una distribución binomial (logit). Lo análisis fueron realizados con R versión 3.2.4.

## **6.3 Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito (*Mytilus chilensis*) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas**

### **Recolección de los animales adultos**

Ejemplares adultos de *Mytilus* spp de ambos sexos fueron recolectados al azar desde el submareal de Caleta Amargo (Cercano a Corral, Valdivia - 39°52'30.46" S; 73°25'30.36" O). Esta localidad cumple con el requisito de la propuesta ya que es una zona de extracción de recurso *Mytilus* sin la presencia de centros de cultivo de salmónidos. Estos animales fueron mantenidos vivos a baja temperatura dentro de un *cooler* de aislapol y trasladados al



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

laboratorio del Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas (ICML) de la Universidad Austral de Chile.

## **Identificación taxonómica de los ejemplares utilizados en la presente investigación:**

Debido a las recientes publicaciones que describen la presencia de otras especies del género *Mytilus* en la costa de Chile (Toro, 1998, Toro et al., 2005; Oyarzún et al., 2016; Astorga et al., 2015; Larraín et al., 2015), además de la especie nativa *Mytilus chilensis*, se realizó la determinación taxonómica de los ejemplares con los cuales se trabajó en la presente investigación. De esta forma se asegura que los datos y resultados analizados solo corresponden a la especie *Mytilus chilensis*, que es la especie que se cultiva en Chile.

Una vez finalizado todos los experimentos, los choritos fueron sacrificados y de cada ejemplar se extrajo un trozo de tejido del manto, el cual inmediatamente se preservó en etanol absoluto al 99% (con un cambio de etanol luego de 48 h) y manteniéndose a 4°C hasta el proceso de extracción de ADN.

## **Metodología:**

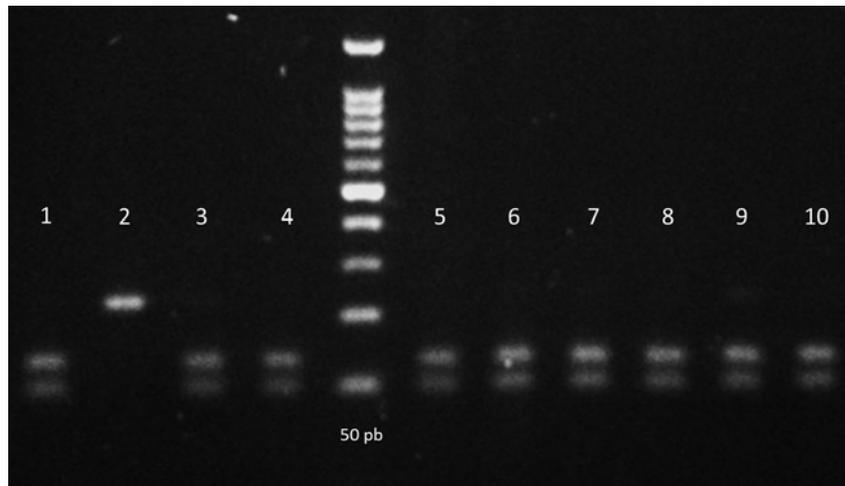
- a. **Extracción de ADN:** De cada muestra de manto se disectó un trozo de aproximadamente 100 mg (~5 mm<sup>2</sup>). Para la extracción de ADN se ha utilizado el kit Genomic DNA Mini Kit (Tissue) de marca *Geneaid*. Con el que se obtiene un ADN libre de impurezas.
- b. **Marcadores moleculares utilizados:** Se utilizaron dos métodos: **1) Me15/16** (Inoue et al. 1995) - Los fragmentos amplificados del gen de la proteína adhesiva del pie, son especie-específico para identificar las especies *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* e híbridos (Inoue et al. 1995). Estas especies morfológicamente son iguales (especies crípticas) y en la costa chilena co-habitan (Toro et al. 2005; Toro and Oyarzún 2014). Los primers utilizados fueron Me15 5'-CCA GTA TAC AAA CCT GTG AAGA - 3' y Me16 5'- TGT TGT CTT AAT AGG TTT GTA AGA - 3'. Las condiciones para la PCR (reacción de cadena de polimerasa) fueron: 94°C, 4 min;



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

(94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 90 s) x 40; 72°C, 4 min; 4°C. La concentración (MgCl<sub>2</sub>) = 1.75 mM. Aunque este marcador no discrimina patrones de bandas entre individuos de las especies *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, es muy efectivo para determinar entre las especies *M. edulis* o *M. trossulus* e híbridos. 2) **COIXba RFLP-PCR** (Fernández-Tajes et al. 2011) – Este ensayo RFLP fue diseñado exclusivamente para la confirmación de *M. chilensis*. Principalmente diferencia entre las especies *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*. Se utilizaron los primers COIXbaF 5'-CCG CCA TTG TCT GTA TAC CC-3' y COIXbaR 5'-TAA TGC CCC CTC CTA AAA CC-3'. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C, 5 min; (94°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 60 s) x 35; 72°C, 5 min; 4°C. Al amplicon de 233 pares de bases se le aplica la enzima de restricción *Xba*I (Invitrogen®) por 12 horas a 37°C. *Mytilus chilensis* muestra un patrón RFLP de 99 y 134 pb y en cambio el amplicón de *Mytilus galloprovincialis* (Mejillón del Mediterráneo) no corta con esta enzima (Fig. 1).



1Figura 1. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con sybr safe que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la digestión con: *Xba*I (primer COIXba). *M.chilensis* de la localidad de Caleta Amargo, Chile (líneas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), *M. galloprovincialis* (línea 2) proveniente de Tumbes, Concepción.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## **Calibración de la degradación de Peróxido de Hidrogeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] para la realización de los experimentos fisiológicos**

El peróxido de hidrogeno es un líquido altamente polar, inestable y se descompone lentamente en oxígeno y agua. Su velocidad de descomposición puede aumentar en presencia de catalizadores. Es por ello que previo a los experimentos fisiológicos, fue necesario determinar la degradación de peróxido de hidrogeno a distintas concentraciones, ya que las exposiciones en los experimentos fisiológicos fueron durante 48 h a las distintas concentraciones propuestas. Los ensayos para la calibración se llevaron a cabo utilizando el mismo producto utilizado por las salmoneras en Chile (Peróxido de hidrogeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] - Europharma), tomando en consideración dos de las concentraciones propuestas en el proyecto: 50 ppm y 1500 ppm.

La concentración de 1500 ppm es la recomendada por el fabricante para su uso en la salmonicultura en el control de la caligidosis. El experimento se realizó en acuarios de plástico vitrificado, cada uno de ellos con 7 litros de agua de mar filtrada por un tiempo de 7 horas. Para ambas concentraciones (50 ppm y 1500 ppm) se utilizó un control sin animales. La concentración de 1500 ppm fue estable en el tiempo, es por ello que, en base a estos resultados los animales expuestos a esta concentración tuvieron un recambio completo de agua a las 7 horas, ya que durante este período de tiempo la concentración de peróxido de hidrogeno disminuyó en un 15% (Fig. 2).

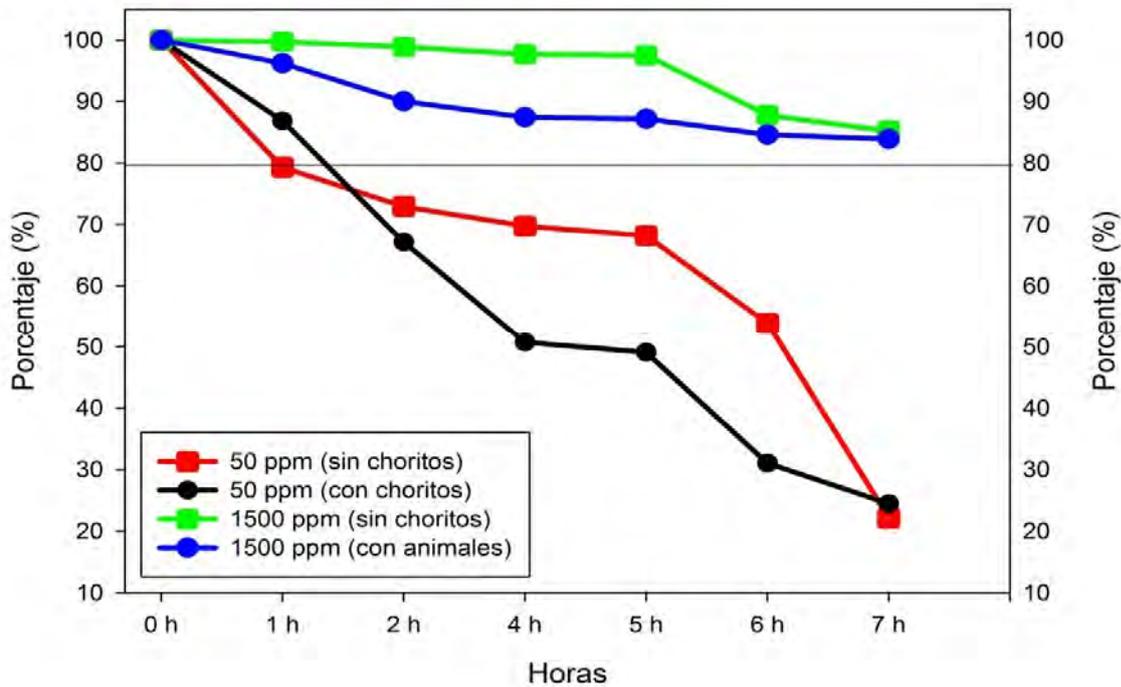
La concentración de 50 ppm fue más inestable en los acuarios, disminuyó su concentración en un 20% transcurrida una hora de exposición, mientras que en las siguientes tres horas la disminución fue menos drástica (10%), finalizando al término de la exposición de 7 horas con una pérdida cercana al 80%. Esta misma concentración (50 ppm) incluyendo animales, evidenció una degradación de peróxido de hidrogeno abrupta en las primeras 4 horas, disminuyendo un 50% con respecto a la concentración inicial (Fig. 2). Es por ello, que para los experimentos fisiológicos a concentraciones bajas se utilizó una bomba peristáltica con el propósito que inyectara a las unidades experimentales (envases de 7 litros) el volumen



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

necesario de peróxido de hidrogeno para que de esta forma la degradación se mantuviera bajo un 16%.



2Figura 2. Resultados de la degradación de Peróxido de Hidrogeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] – marca “Europharma” en unidades experimentales de 7 litros de agua de mar filtrada para las concentraciones de 50 ppm (mínima) y 1500 ppm (1500 ppm es la concentración recomendada por el fabricante para su uso en contra de la caligidosis en salmonicultura), durante 7 horas. Los envases tuvieron 10 ejemplares (*Mytilus chilensis*) de aproximadamente 5 cm de largo (línea negra y azul).

En base a estos resultados se determinó el tiempo de recambio de las unidades experimentales para que las concentraciones del peróxido de hidrogeno no disminuyeran mas de un 16%.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 6.3.1 Metodología para experimentos fisiológicos

### Organismos experimentales

Los parámetros fisiológicos se determinaron en ejemplares adultos de *Mytilus chilensis* provenientes de Caleta Amargo (Cercano a Corral, Valdivia - 39°52'30.46" S; 73°25'30.36" O) que tuvieron un tamaño máximo de longitud valvar de 56-81 mm. Estos animales de esta localidad no estuvieron sometidos a la exposición de los compuestos peróxido de hidrogeno ni a azametifos previamente. Los animales fueron extraídos vivos del submareal (buceo) y trasladados a baja temperatura al laboratorio húmedo del Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas (ICML) de la Universidad Austral de Chile (UACH), Valdivia. Una vez finalizado las estimaciones fisiológicas, a cada animal se le extrajo un pequeño trozo del tejido del manto para extraer ADN y realizar un análisis de identificación molecular y corroborar que se experimentó con choritos de la especie *Mytilus chilensis* (para mayor detalle ver la metodología de identificación molecular del complejo *Mytilus edulis* – Fig. 1).

### Aclimatación

Antes de exponer los ejemplares de *M. chilensis* a los compuestos, los animales fueron aclimatados durante 48 horas procediendo previamente a la remoción cuidadosa de los epibiontes. Se les entregó alimento en tres dosis diarias de *Isochrysis galbana* a una concentración de  $30 \times 10^6$  de cél/L para establecer condiciones normales de alimentación y evitar una ingesta anormal durante los experimentos.

### Exposición a Peróxido de Hidrogeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]

Una vez transcurrido el periodo de aclimatación de 48 horas, se expusieron 10 ejemplares de chorito (*Mytilus chilensis*) por batea (4 bateas = 3 réplicas y 1 control). Cada batea contuvo 7 litros de agua de mar filtrada y se mantuvo la concentración del compuesto durante un periodo de 48 horas, realizando un cambio de agua cada (i) 30 minutos para la



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

concentración de 50 ppm, (ii) 90 minutos para la concentración de 100 ppm, (iii) 150 minutos para 300 ppm, (iv) 240 minutos para 750 ppm, (v) 360 minutos para la concentración de 1500 ppm, y finalmente recambios cada (vi) 12 horas para las concentraciones de 2000 y 3000 ppm (Fig. 3). Durante la exposición al producto los animales se mantuvieron sin alimentación y con aireación constante. Este patrón de recambio se estableció para trabajar con un máximo de 16% de degradación del compuesto (Fig. 2).



**3Figura 3. A) Adición de Peróxido de Hidrogeno en las bateas experimentales durante los tratamientos. B) Diseño experimental con 3 réplicas para cada concentración (50, 100, 300, 750, 1500, 2000, 3000 ppm) más una batea control [sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Cada batea contuvo 10 animales en un volumen de 7 litros de agua de mar filtrada. Para la exposición con el compuesto azametifos se utilizó el mismo diseño (concentraciones utilizadas = 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb).**



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## **Exposición de Azametifos [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS]**

Azametifos es un organofosforado que se utiliza como plaguicida, su característica soluble hace que este compuesto sea más estable en el agua de mar que el compuesto peróxido de hidrogeno (Fig. 2), es decir, su degradación es mucho menor. Para los experimentos se utilizó la marca CalFree® 50% acorde a las especificaciones del fabricante. Esta es la marca de azametifos que se utiliza en la salmonicultura nacional para el control de la caligidosis (AQUA 2015).

Al igual que para peróxido de hidrogeno, se llevaron a cabo análisis preliminares para estimar su degradación en las distintas concentraciones y así obtener los tiempos de recambio para mantener la concentración del compuesto durante los experimentos. Para este propósito, se realizaron experimentos en bateas de 7 litros con 10 animales y con aireación. En la realización del ensayo se tomaron muestras de un litro (del agua de mar con azametifos) al comienzo y al final de los experimentos (la duración del experimento fue de 12 h). Mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography* – HPLC), se estimó la concentración de este compuesto y así su degradación. Las muestras fueron analizadas por una empresa que realiza este tipo de análisis químico (SGS) ubicada en Puerto Montt. Los resultados indicaron que a la concentración de 100 ppb la tasa de degradación luego de 12 horas fue de un 22%. Por tanto, se optó por realizar recambios del agua de mar de cada batea en exposición cada 12 horas para cada una de las concentraciones. Durante la exposición los animales se mantuvieron sin comida y con aireación constante. Este margen de recambio se estableció para trabajar con un máximo de 22% de degradación del compuesto.

## **Estimación de las tasas fisiológicas**

Aunque el compromiso de la propuesta solo contemplaba la estimación de la tasa de aclaramiento y consumo de oxígeno, se profundizó en los análisis y se determinaron todos los parámetros fisiológicos necesarios con el objetivo de poder calcular el crecimiento potencial (*Scope for Growth*), que es el índice energético que representa la adquisición de energía que puede ser utilizado tanto para reproducción como para producir tejido somático



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

(crecimiento). Por tanto, el Crecimiento Potencial es el parámetro fisiológico más importante que se puede estimar en trabajos ecotoxicológicos de mejillones (Widdows et al. 2002; Mubiana and Blust 2007).

Las siguientes fueron las variables fisiológicas que se determinaron:

## **(a) Tasa de aclaramiento en adultos de *Mytilus chilensis***

La tasa de aclaramiento se define como el volumen de agua liberado de partículas por unidad de tiempo (Widdows 1985). Para ello se utilizó un sistema estático, aplicando la metodología de Bayne et al. (1983), utilizando acuarios experimentales de 800 ml. La disminución de las partículas en cada acuario experimental se determinó individualmente en cada unidad, la cual contuvo agua de mar filtrada a 0.45 µm, una salinidad de 30 psu y 13°C de temperatura (Fig. 4). Las mediciones de la tasa de aclaramiento se realizaron a intervalos de 20 minutos durante 2 horas, reemplazando el alimento consumido en cada medición. Además, se mantuvo un acuario control (experimental) sin animales, para corregir el error producido por sedimentación o por división celular de la microalga. Se utilizó una concentración 30 x 10<sup>6</sup> cél/L de alimento *Isochrysis galbana* (cultivo larval - Fig. 5). La homogenización del medio experimental se realizó a través de difusores de aire. Para el cálculo de tasa de aclaramiento se utilizó un contador de partículas marca Beckman modelo Z2 equipado con un tubo de recuento de 100 µm de apertura.

La tasa de aclaramiento para cada animal de *M. chilensis* fue calculada utilizando la fórmula descrita por Coughlan (1969):

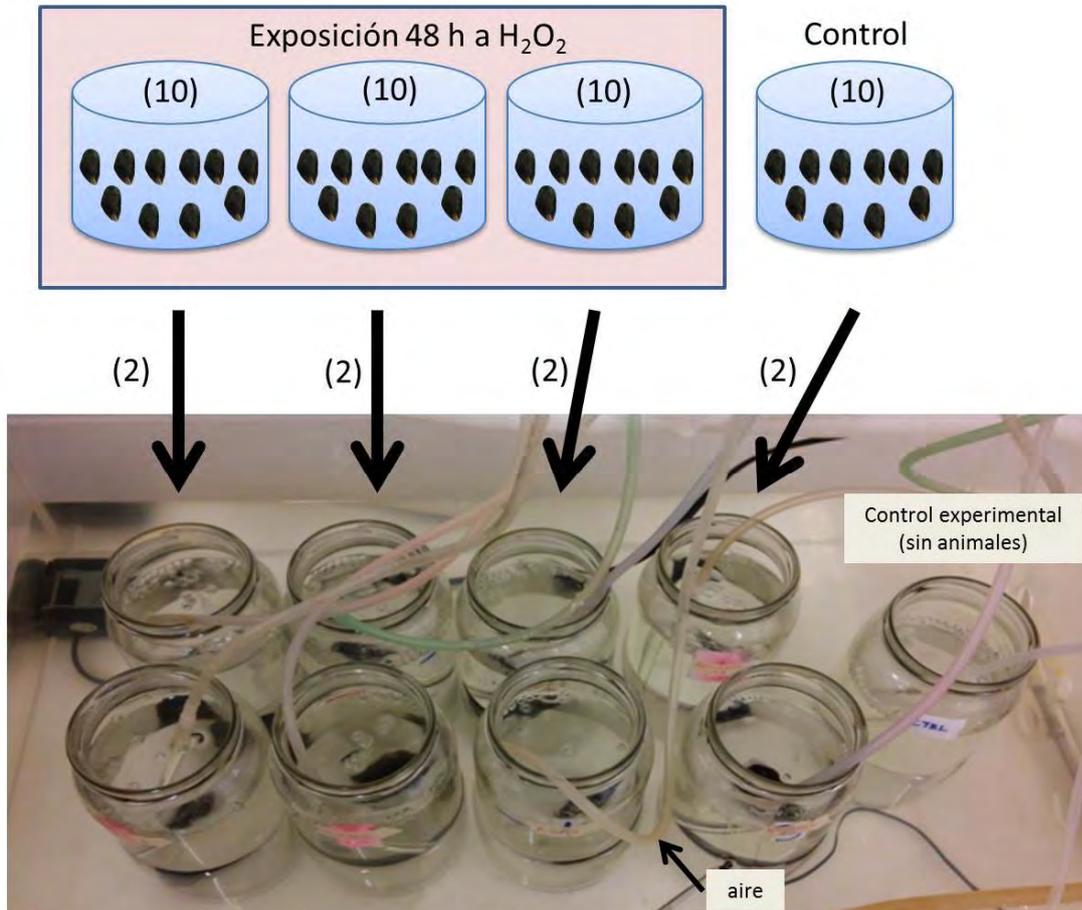
$$TA = V(\log_e C_1 - \log_e C_2) / t \quad (1)$$

Donde TA = tasa de aclaramiento. V = volumen. C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> = concentración de partículas al comienzo y al final del intervalo de tiempo t.



Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



4Figura 4. Diseño experimental para las determinaciones de las tasas de aclaramiento. Este diseño se utilizó para los experimentos con Peróxido de hidrogeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] y Azametifos [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>CIN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS]. La exposición a los compuestos se llevó a cabo en bateas que contuvieron un volumen de siete litros de agua de mar. Las estimaciones de la tasa de aclaramiento se realizaron en envases de vidrio que contuvieron 800 ml de agua de mar filtrada y con aireación.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



**5Figura 5. Cultivo de microalgas (*Isochrysis galbana* –T-iso) utilizada para la aclimatación y para las estimaciones de parámetros fisiológicos (i.e., tasa de aclaramiento, tasa de ingestión, eficiencia de absorción).**

## **(b) Tasa de Ingestión (TI)**

Se tomaron muestras de la dieta utilizada (*I. galbana* – Fig. 5) para determinar su contenido orgánico e inorgánico. Estas muestras fueron filtradas y concentradas en filtros de fibra de vidrio GF/C de 47 mm diámetro y 0,75  $\mu\text{m}$  de poros, previamente lavados, quemados y pesados. Luego de filtrar una cantidad de 30 ml (conc.  $30 \times 10^6$  cél/l), se lavó con una solución isotónica de formiato de amonio (3%) para remover las sales y previniendo a su vez la lisis celular. Para determinar el peso seco total, los filtros se secaron a 80°C por 24 h, pesándose en una balanza analítica. Posteriormente se quemaron por 3 h a 450°C para por diferencia, estimar el peso orgánico. La tasa de ingestión orgánica representa la cantidad de materia orgánica consumida por unidad de tiempo ( $\text{mg h}^{-1}$ ). Este parámetro fue calculado como el



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

producto entre la tasa de aclaramiento ( $l\ h^{-1}$ ) y la concentración del material particulado en suspensión ( $mg\ l^{-1}$ ).

### (c) Eficiencia de absorción y tasa de absorción

La eficiencia de absorción se determinó utilizando el método de Conover (1966), que se basa en la estimación del contenido orgánico e inorgánico en el alimento y en las fecas. Al momento de finalizar las mediciones de tasa de aclaramiento se procedió a recolectar las fecas producidas en cada uno de los acuarios con la ayuda de una pipeta Pasteur. Las fecas recolectadas fueron filtradas a través de un filtro Whatman GF/C (2.5 cm de diámetro) previamente tratado y pesado. Inmediatamente los filtros se lavaron con una solución isotónica de formiato de amonio (3%) para eliminar las sales. Para estimar el peso seco total, los filtros se secaron por 24 h a  $80^{\circ}C$  y se pesaron en una balanza analítica, posteriormente fueron quemados en una mufla a  $450^{\circ}C$  por 3 h y pesados nuevamente, con el fin de estimar la fracción orgánica e inorgánica de las fecas. De acuerdo a estos datos y a los obtenidos en la dieta suministrada (*Isochrysis galbana*), se calculó la eficiencia de absorción. La tasa de absorción ( $mg/h$ ) se determinó como el producto entre la tasa de ingestión orgánica y la eficiencia de absorción. Finalmente, la tasa de absorción fue convertida a su equivalente energético ( $J\ h^{-1}$ ) considerando que 1 mg de material orgánico de la dieta = 18.75 J (Whyte, 1987).

### (d) Consumo de Oxígeno

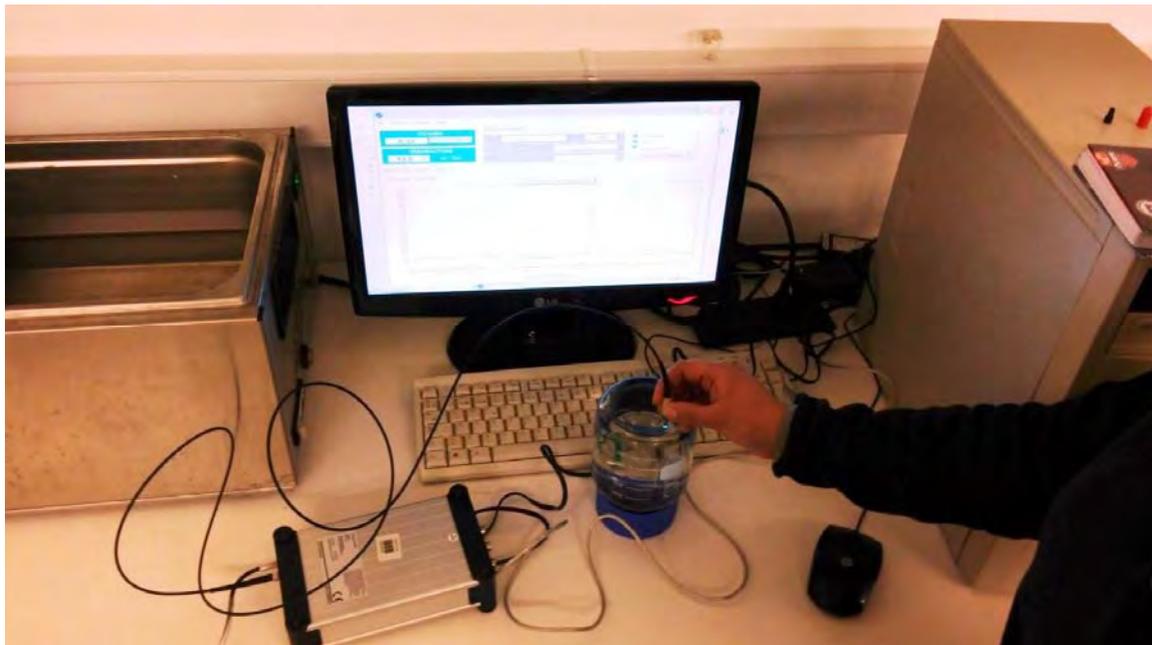
Una vez finalizado las mediciones de la tasa de aclaramiento, los animales fueron introducidos en frascos de vidrios volumétricos (Fig. 6), los que contuvieron un sensor de fibra óptica para medir el consumo de oxígeno. Los ejemplares fueron dispuestos en dichos frascos con agua de mar filtrada (810 ml) y tapados herméticamente, sin dejar burbujas en el interior que pudiesen alterar la medición. Adicionalmente, se utilizó un frasco con agua de mar sin animales como control. Estos fueron sumergidos en un baño termorregulado



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

manteniendo una temperatura constante de 13°C. Se realizaron 2 mediciones, la primera de ellas inmediatamente después de adicionar al animal y la segunda medición después de transcurrida una hora. La estimación de oxígeno se realizó mediante la lectura de un sensor óptico que se acopla en el fondo de cada frasco que dispone de un spot el cual emite una señal que se visualiza en el computador mediante el software Fibox 3 (Fig. 6). Los valores de  $VO_2$  ( $ml\ O_2\ h^{-1}$ ) consumidos por los animales fueron transformados a sus equivalentes energéticos considerando que  $1\ ml\ O_2 = 19,9\ J$  (Elliott and Davison, 1975).



**6Figura 6. Fotografía que muestra la medición del consumo de oxígeno mediante un sensor de fibra óptica con compensación de temperatura (Fibox3).**



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### (e) Tasa de Excreción

Se utilizó la misma incubación del consumo de oxígeno. Se tomaron muestras de cada frasco (5 ml) y se analizaron para la prueba de amonio-nitrógeno según Solórzano (1969), a través de la construcción de una curva de calibración. Los valores  $\text{NH}_4\text{-N}$  fueron expresados en  $\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$  y transformados a Joules usando el factor de conversión  $1 \mu\text{g NH}_4\text{-N} = 0,0249 \text{ J}$  (Elliott and Davison, 1975).

### (f) Crecimiento Potencial (Scope for Growth)

El crecimiento potencial es un índice fisiológico que representa la integración de todas las mediciones relacionadas con ganancias y pérdidas de energía. Se calcula como la diferencia entre la energía absorbida y la pérdida (tanto en respiración como en excreción), después de convertir todas las tasas fisiológicas a sus equivalentes calóricos ( $\text{J h}^{-1}$ ). Para cuantificar el crecimiento potencial se utilizó la fórmula de Widdows (1985):

$$CP = A - (R + E) \quad (2)$$

Donde  $CP$  = Crecimiento potencial ( $\text{J h}^{-1}$ ),  $A$  = energía absorbida por alimentación,  $R$  = Consumo de energía por oxígeno,  $E$  = consumo de energía por excreción.

### Análisis de datos

En primer lugar, se realizó una exploración de los datos para identificar las correlaciones entre las tasas fisiológicas.

La tasa de aclaramiento y el crecimiento potencial fue comparado entre los distintos tratamientos (i.e. concentraciones de exposición a azametifos) mediante un ANCOVA, usando como covariable el peso seco de los animales (tamaño). Se realizaron análisis independientes para tasa de aclaramiento y para crecimiento potencial. El postulado de linealidad de la variable dependiente con la covariable fue evaluado mediante un análisis de regresión ( $P < 0.05$ ). De igual forma se evaluó el supuesto de independencia entre la covariable y los tratamientos realizando un análisis de varianza ( $P > 0.05$ ). Para poner a prueba las presunciones de normalidad de los datos se aplicó la prueba de Kolmogorov-



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Smirnov corregido por Lilliefors y para las presunciones de homogeneidad de varianza se aplicó la prueba de Levene ( $P > 0.05$ ). Todos los análisis fueron realizados utilizando los software Minitab® v16.2.2 y R Project v.2.15.3 (R Foundation for Statistical Computing).

## 6.3.2 Experimentos de fecundación

Para estudiar el potencial efecto sobre la reproducción que tendrían estos compuestos, específicamente en el proceso de fecundación de estos mitílidos, se utilizaron ejemplares (choritos) recolectados de Caleta Amargo (Corral-Valdivia). A cada individuo adulto se le eliminó cuidadosamente la epifauna (i.e. algas, cirripedios, etc.) y luego se aclimataron durante 15 días con altas concentraciones de alimento, para aumentar la probabilidad de desove. Luego los mejillones fueron introducidos en bateas de fibra de vidrio con agua de mar filtrada y esterilizada (UV) y mediante incremento de temperatura se indujo el desove. Una vez que se obtuvo el fluido gamético, se realizó la fecundación en envases de vidrio de 250 ml. Se determinó la concentración de los espermatozoides y de los ovocitos. La relación entre espermatozoides y ovocitos utilizada para la fecundación fue de 100:1 en todas las unidades experimentales (Toro et al. 2010; Toro et al. 2012). Una vez añadido los espermatozoides y ovocitos se añadieron los compuestos a las concentraciones experimentales. Se utilizaron dos replicas por cada una de las concentraciones y sus controles. Los gametos se mantuvieron incubando por dos horas, luego de ese período en los envases control se observó células en división, tal como lo registra la literatura (Ruiz et al. 2008; Toro et al. 2012). Luego del período de incubación se realizaron conteos (tres por unidad experimental) utilizando la cámara de recuento Petroff-Hausser. Una vez finalizado los experimentos, a cada reproductor se le extrajo un pequeño trozo del tejido del manto para extraer ADN y realizar un análisis de identificación molecular y corroborar que se experimentó con choritos de la especie *Mytilus chilensis* (para mayor detalle ver la metodología de identificación molecular del complejo *Mytilus edulis* – Fig. 1).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## (a) Experimento sobre los gametos de *Mytilus chilensis*

Para evaluar indirectamente efectos sobre la fecundación se realizó la exposición de espermatozoides de *Mytilus chilensis* durante 30 minutos a las distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y azametifos ( $C_9H_{10}ClN_2O_5PS$ ) propuestas en el proyecto. Lo anterior, con la finalidad de observar anomalías en los gametos que puedan impedir la fecundación. Se consideró la movilidad de los espermatozoides como un factor determinante, ya que estas especies tienen fecundación externa y la movilidad espermática es vital para que se produzca la fertilización. El experimento se llevó a cabo en tubos esterilizados que contuvieron 42 ml de agua de mar y 8 ml de fluido espermático. Se realizaron dos replicas por cada concentración y control. Transcurrido el tiempo de exposición a los compuestos (30 minutos) los gametos fueron contabilizados utilizando una cámara de recuento Petroff-Hausser.

### 6.3.3 Efecto del Peróxido de Hidrogeno y Azametifos sobre larvas pediveligeras de *Mytilus chilensis*

#### Metodología para Experimentos Larvales

Para llevar a cabo este objetivo la primera actividad fue producir la fecundación *in vitro* entre reproductores de *Mytilus chilensis*, lo cual se llevó a cabo mediante desoves inducidos por shock térmico (aumento de temperatura) en reproductores maduros. Luego siguiendo las especificaciones de Toro et al. (2012), se realizó el cultivo larval de estos bivalvos en estanques de 2500 L a una temperatura de  $14 \pm 1$  °C durante 28 días, con recambio de agua cada 72 h y con dosis diarias de alimento (*T-iso*). Cuando las larvas alcanzaron un tamaño promedio de aproximadamente de 220  $\mu m$  (Larva pedivelígera = tamaño previo a la fijación) se realizó la exposición de las larvas a los compuestos en evaluación (Peróxido de Hidrógeno y Azametifos). El diseño experimental consideró las siete concentraciones de Peróxido de Hidrógeno [50, 100, 300, 750, 1500, 2000 y 3000 ppm] y las siete concentraciones de Azametifos [1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb], establecidas en el proyecto

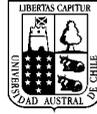


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

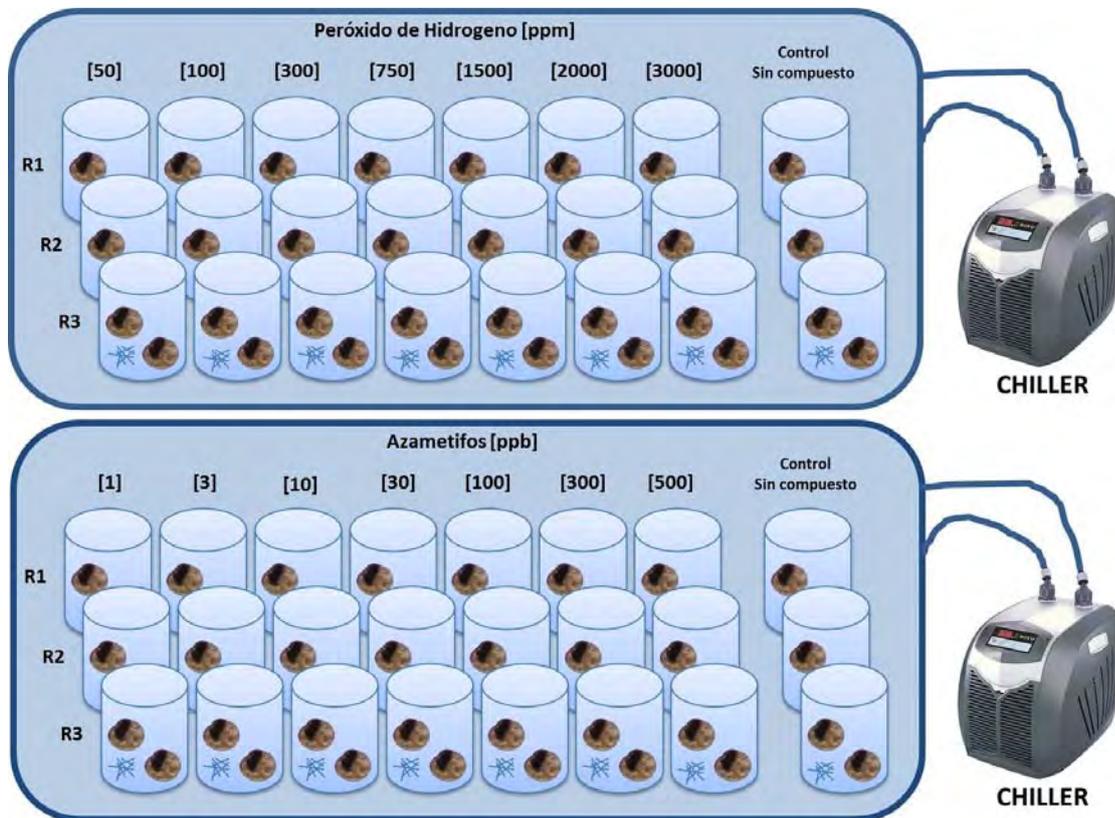
con sus respectivas réplicas (3) y las unidades control (sin compuestos) (Fig. 7). La temperatura se controló mediante un sistema que contempló una unidad de chiller. A cada unidad experimental (conteniendo 2.5 L de agua de mar) se le agregó 167 ml de cultivo larval para alcanzar una concentración de 2 larvas/ml durante la exposición. Las larvas utilizadas para este experimento son larvas competentes, con escasa capacidad natatoria, pero con una alta actividad del pie y de los septos branquiales. Esta es la última etapa larval previo a la fijación al sustrato (denominado en la mitilicultura como la etapa de captación de semillas). La actividad larval se puede observar fácilmente con la lupa estereoscópica a través de su valva traslúcida. Finalmente en el fondo de cada envase se colocó 10 cm de malla netlon (NETLON®) con el fin de aumentar el área de sustrato disponible para el experimento (Fig. 7).

Una vez montado el experimento, es decir cuando cada unidad experimental contuvo las larvas en la concentración requerida, se añadieron los compuestos de acuerdo a las concentraciones experimentales. Solo se adicionaron los compuestos Peróxido de Hidrógeno y Azametifos en una sola ocasión. Luego de 48 h se analizó la sobrevivencia larval en cada unidad experimental y al finalizar el experimento se estimó el número de larvas asentadas



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



7Figura 7. Diagrama del experimento para determinar el efecto sobre larvas competentes de *Mytilus* al ser expuestas a los compuestos Peróxido de Hidrógeno y Azametifos. Las unidades experimentales se mantuvieron en bateas con agua circulante a través de un Chiller para mantener una temperatura de  $14 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cada unidad experimental tuvo 2.5 L de agua de mar (filtrada y esterilizada con luz UV) a una salinidad de 30 psu, aeración constante y un trozo de 10 cm de malla netlon.

### 6.3.4 Efecto de peróxido de hidrógeno y azametifos los patrones reproductivos de *Mytilus chilensis*.

Hay antecedentes bibliográficos que indican que los azametifos inhiben la acción de la enzima acetilcolinesterasa y esta enzima tiene una actividad importante en las branquias de



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

mitílidos, pero además tiene un rol determinante en la reproducción de moluscos (Moes et al. 2014). Es por ello, que se llevaron a cabo dos investigaciones para analizar este potencial efecto:

## **(a) Relación macho/hembras**

Se cuantificó la proporción entre machos y hembras en muestras de ejemplares provenientes de dos localidades de estudio. Para ello se obtuvieron al azar muestras de ejemplares de *Mytilus* desde el submareal de una población localizada en una zona expuesta a los baños anti-caligidosis mediante el uso de Azametifos y Peróxido de Hidrógeno (Bahía Yal; 42°38'S; 73°39'O) y una población en una localidad libre de exposiciones a éstos compuestos químicos (Caleta Amargos; 39°52'30.46" S; 73°25'30.36" O). El sexo de cada animal se determinó en el laboratorio mediante frotis gonadal y observación microscópica de las células germinales con lo cual se calculó la proporción entre machos y hembras. Después se aplicó la prueba de Chi-cuadrado para determinar la bondad de ajuste de las proporciones sexuales con la relación esperada 1:1 tal como lo señala la literatura (Toro et al. 2002; Oyarzún et al. 2011).

## **(b) Estadios gametogénicos y Volumen de Fracción Gamética (VFG)**

Se estimaron los estadios gametogénicos a partir de cortes histológicos. Para ello, se muestreo mensualmente ejemplares durante el periodo más activo en términos reproductivos para *Mytilus chilensis* (junio a noviembre) (Oyarzún et al. 2011). A cada ejemplar se le extrajo un trozo de la región media de la gónada el que fue fijado en solución Bouin. Luego las muestras se deshidrataron usando una serie ascendente de alcoholes. El tejido fue aclarado en butanol e incluido en parafina histológica para finalmente ser cortadas en secciones de 7 µm de espesor, transversales al eje del lóbulo de la gónada. Las secciones tratadas fueron teñidas con hematoxilina-eosina (Humason 1962).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

La descripción de los ciclos gametogénicos representa la división de la gametogénesis de *Mytilus chilensis* en diferentes estadios. La metodología se basa en las observaciones microscópicas de los cortes histológicos, utilizando los criterios y categorías descritas por Oyarzún et al. (2011).

Además, se determinó el Volumen de la Fracción Gamética (VFG) mediante la técnica de estereometría (Weibel 1969) que utiliza un retículo de 42 puntos (Oyarzún et al. 2010, 2011). Para ello, mediante fotografía digital se capturo la secuencia completa de la gónada femenina y se contó el número de ovocitos presentes en cada uno de los diferentes estados de desarrollo además de los tejidos anexos. Para identificar los estados ovocitarios (previtelogénicos, vitelogénicos y maduros) y tejidos gonádicos se siguieron los criterios de Oyarzún et al. (2010).

## 6.3.5 Ensayo crónico en adultos

Ejemplares adultos de *Mytilus chilensis* fueron recolectados aleatoriamente desde el submareal de Caleta Amargos (Cercano a Corral, Valdivia - 39°52'30.46" S; 73°25'30.36" O). Esta localidad cumple con el requisito de la propuesta ya que es una zona de extracción del recurso, pero con ausencia de centros de cultivo de salmonídeos. Luego de recolectar los ejemplares de choritos se trasladaron vivos a baja temperatura dentro de un cooler de aislapol para evitar posibles emisiones gaméticas por cambios de temperatura. Estos animales se aclimataron durante 48 h, con agua de mar filtrada y alimentación (*Isochrysis galbana*) *ad libitum*. Se dispusieron 5 animales por unidad experimental (envases de vidrio de 3 L) que contuvieron agua de mar filtrada (2.5 L) y aeración constante, los que se mantuvieron durante todo el experimento. Cada concentración (tratamiento) tuvo 3 unidades experimentales (replicas) al igual que el control. Los frascos experimentales se dispusieron en un baño termostático para mantener una temperatura constante ( $13 \pm 2^\circ\text{C}$ ). El diseño experimental fue similar al diagrama de la figura 7. Se realizaron exposiciones cada 48 h en



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

cada unidad experimental (Peróxido de Hidrógeno = 50, 100, 300, 750, 1500, 2000 y 3000 ppm y azametifos = 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb) excepto en las unidades control que estuvieron libres de estos compuestos. Luego de 48 horas post-intoxicación a cada unidad experimental se le realizó cambio de agua, para evitar la impregnación de los compuestos en los recipientes y su posible acumulación dentro del transcurso del experimento que pudiese afectar los resultados. Además, con ello, se eliminaron los compuestos nitrogenados producto de la excreción por los animales. Los choritos fueron alimentados con *T-iso* a una concentración de  $30 \times 10^6$  cél/L (Fig. 5). El experimento tuvo una duración de 31 días, y se evaluó la mortalidad en cada ensayo cada 24 h. Finalmente se calculó la concentración letal (CL).

- 7 Determinar la concentración que alcanza azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas**
  
- 8 Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas**

Dada la similitud de metodologías, ambos objetivos serán desarrollados en conjunto.

- 8.1 Estimación de concentraciones dentro y fuera de la jaula durante y posterior a un baño con lona cerrada de azametifos y peróxido de hidrógeno.
- 8.1.1 Mediciones de concentración dentro de la jaula.

El diseño contempló la evaluación de 4 puntos de muestreos equidistantes dentro de la lona de baño que envuelve la jaula (Fig. 8), con el supuesto de cobertura espacial y que los cuatro puntos deberían alcanzar concentraciones similares. En cada punto fue instalada una estructura, cada una de ellas contenía 12 botellas de vidrio Schott (Fig. 9), que permitía el accionamiento de llenado desde la superficie por medio de mensajeros de monofilamentos



# Universidad Austral de Chile

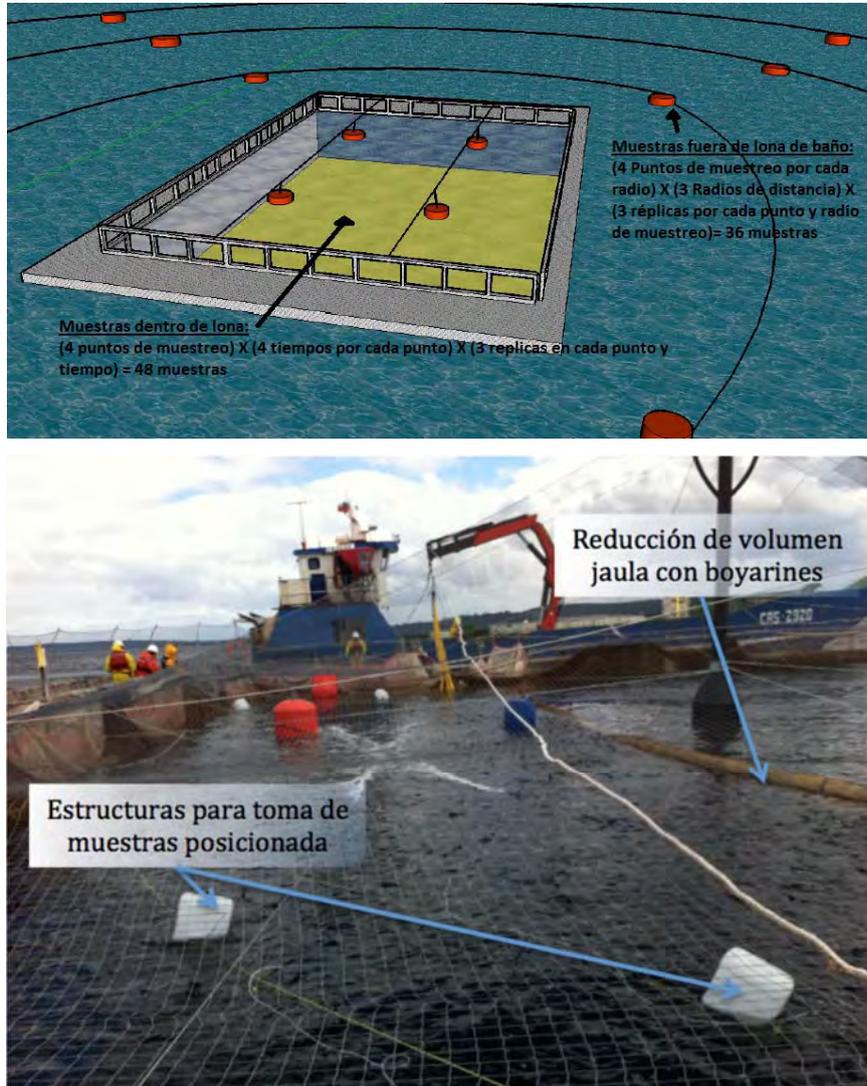
Instituto de Acuicultura

accionados manualmente desde el pasillo del centro de cultivo. En cada punto se tomaron muestras por triplicado y en cada uno de los 4 tiempos: antes del baño con el quimioterapéutico (Tiempo 0), al término de la aplicación del compuesto (Tiempo 1), antes de la liberación de la lona (Tiempo 2) y posterior a 10 minutos de la liberación de la lona (Tiempo 3). Las muestras en los puntos definidos fueron tomadas a una profundidad de 2.5 m, debido a que es a esta profundidad donde se encuentra la mayor densidad de peces durante el procedimiento de baño y representa el punto medio para el modelo de dispersión del compuesto (SEPA, 2008).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

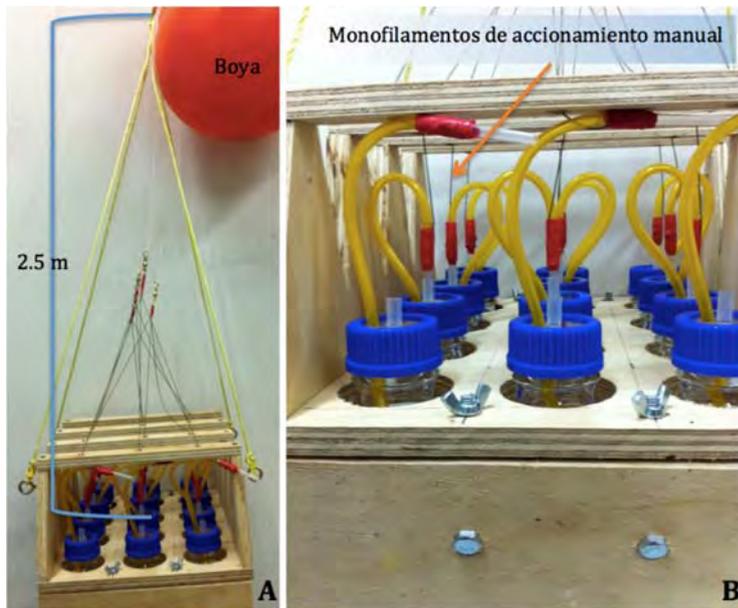


8Figura 8. Esquema de los puntos de muestreo dentro y fuera (radios de impacto) de las jaulas de cultivo, representados por las boyas naranjas y B) Jaula en proceso de baño con quimioterapéutico, se muestra la lona reducida para el baño y las estructuras de toma de muestra posesionadas.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



**9** Figura 9 . A, estructura de soporte de 12 botellas Schott de muestreo con sistema de flotación. B, accionamiento manual de llenado por mensajeros de monofilamento.

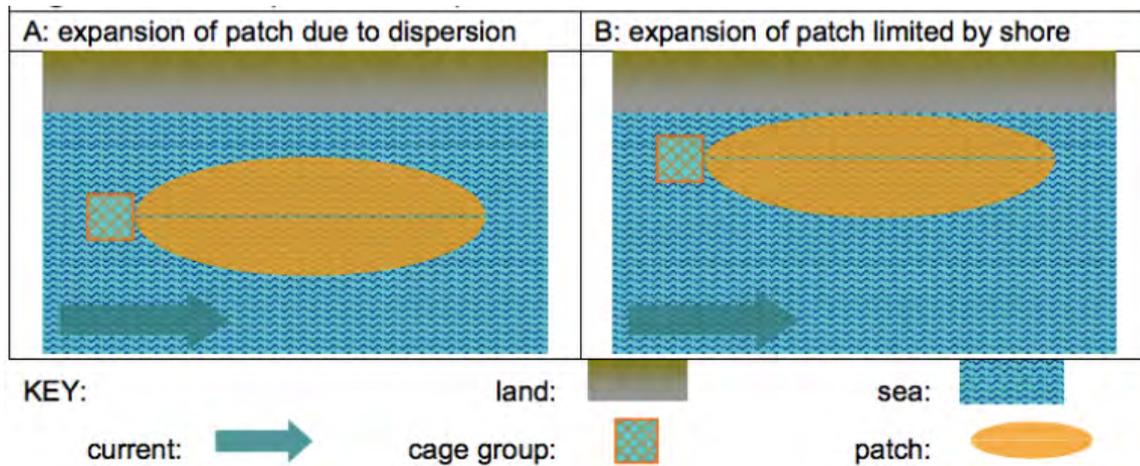
## 8.1.2 Mediciones fuera de la jaula, posterior a liberación de la lona

Paralelamente a la liberación de la lona de la jaula, se comenzó a tomar muestras fuera de esta estructura siguiendo la “pluma de dispersión del compuesto”. Para esto se consideró el modelo de Scottish Environmental Protection Agency (SEPA, 2008). Este es un modelo de evaluación de corto plazo. SEPA ha desarrollado un modelo simple, los resultados se rigen principalmente por la velocidad de la corriente media en el sitio y la distancia del emplazamiento de la “pluma de dispersión” de la orilla. El modelo se aplica la hipótesis de que la masa de agua con el compuesto químico se transporta longitudinalmente a la velocidad de corriente media, mientras la difusión lateralmente a una velocidad determinada por un coeficiente de dispersión (Fig. 10).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



**10 Figura 10. Modelo SEPA (2008), la elipse naranja representa la “pluma de dispersión” y la línea central de la elipse corresponde a la zona de muestreo de la masa de agua con el quimioterapéutico.**

Hay varios supuestos de simplificación en este enfoque de modelo que deben ser señalados:

- El modelo supone que el compuesto es transportado por una velocidad de corriente media unidireccional. Esta es una simplificación gruesa en muchos lugares. El modelo no es válido para los períodos largos, que se extienden más allá de una sola dirección de flujo o reflujos, es decir, sólo debe ser utilizado por un período de no más de 6 horas.
- El modelo incluye la dispersión en la dirección lateral; dispersión se supone que es despreciable en relación con la advección en la dirección longitudinal.
- dispersión lateral supone que es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo transcurrido desde la descarga.
- Cálculo de la concentración media dentro de la masa de agua con el compuesto químico asume concentración homogénea, mientras que la derivación en ancho de la pluma asume que las concentraciones reales se distribuyen normalmente. Con el tiempo cada vez mayor, el modelo se hace menos válido.
- El modelo supone la mezcla a una profundidad de hasta o menor de 10 m, o la mitad de la profundidad media de la masa de agua con el químico, para considerar los efectos de la turbulencia de corriente vertical y lateral.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

La dirección y velocidad de corriente fue verificada con 3 derivadores con posicionamiento satelital, profundizado a 2.5 m y con boya de señal GPS (Data Logger X-Route Modelo: XR-6100). Los derivadores fueron liberados desde la embarcación o pasillo inmediatamente después de liberada la lona y una vez que el derivador central del baño llegó al borde de la jaula. Estos derivadores se colocaron uno en cada esquina exterior de la jaula y uno en el centro del borde exterior de la jaula (en el borde exterior hacia donde se dirigía la corriente) (Fig. 11). Las muestras de agua de la pluma de dispersión fueron tomadas a 2.5 m de profundidad siguiendo al derivador central. Las muestras fueron tomadas entre los 1 y 60 minutos desde la liberación de la lona y tomando muestras en triplicado en línea imaginaria del punto medio de los derivadores (SEPA, 2008).



**11Figura 11. Liberación de los derivadores con GPS al agua post baño con quimioterapéutico, para seguimiento de la pluma de dispersión.**

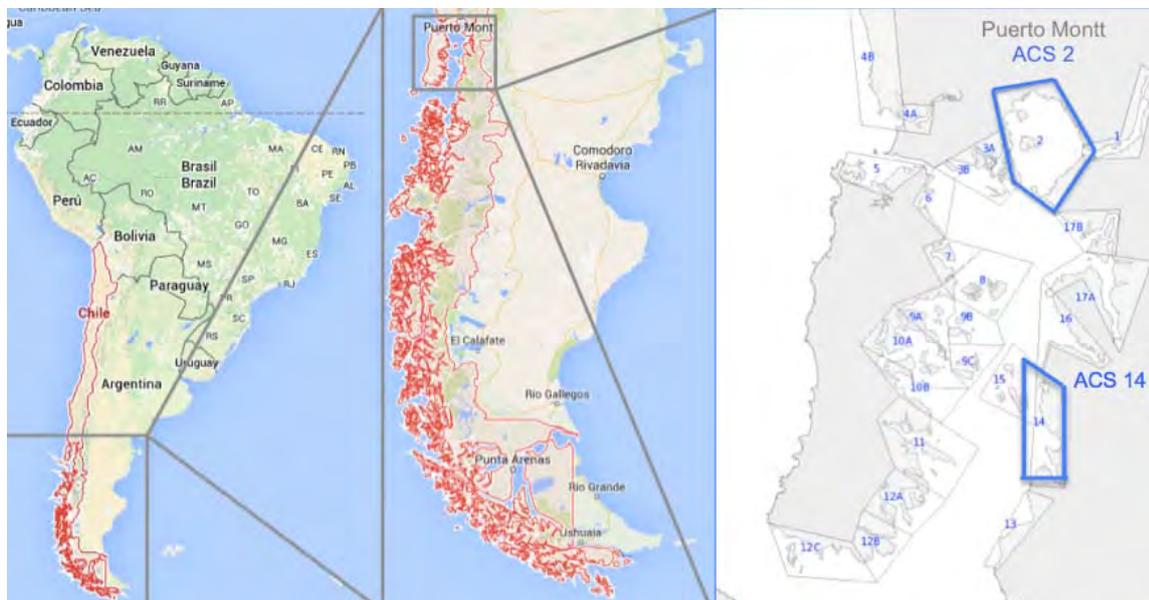


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 8.1.3 Los sitios de estudio y particularidades de los centros

Los sitios considerados para la realización de los muestreos de quimioterapéuticos durante y posterior al baño, correspondieron a centros de cultivo de salmones (*S. salar*) ubicados en la ACS 2 y 14 (Agrupación de Concesiones Salmoneras) (Fig. 12). Tres centros fueron visitados durante la realización de baños de quimioterapéuticos de rutina con lona cerrada. En uno de ellos (Centro A) fue posible realizar el muestreo durante y posterior a un baño con peróxido de hidrógeno (Centro A Peróxido) (17-11-2015). En el segundo centro evaluado (Centro B), se realizó una evaluación de azametifos (Centro B aza) (12-04-2016) y en una segunda ocasión, una de peróxido de hidrógeno (Centro B Peróxido) (27-4-2016). El tercer centro ubicado en la ACS 14 fue muestreado durante un baño de azametifos (Centro C aza) (23-11-2016).



12Figura 12. Representación geográfica de la ACS 2 y 14.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## **Centro A**

El primer centro y baño evaluado (Centro A Peróxido) evaluado corresponde a la zona de Isla Huar, ubicada en la ACS 2, Región de los Lagos, Chile. Su construcción es con jaulas de 30 X 30.

## **Correntometría Centro A**

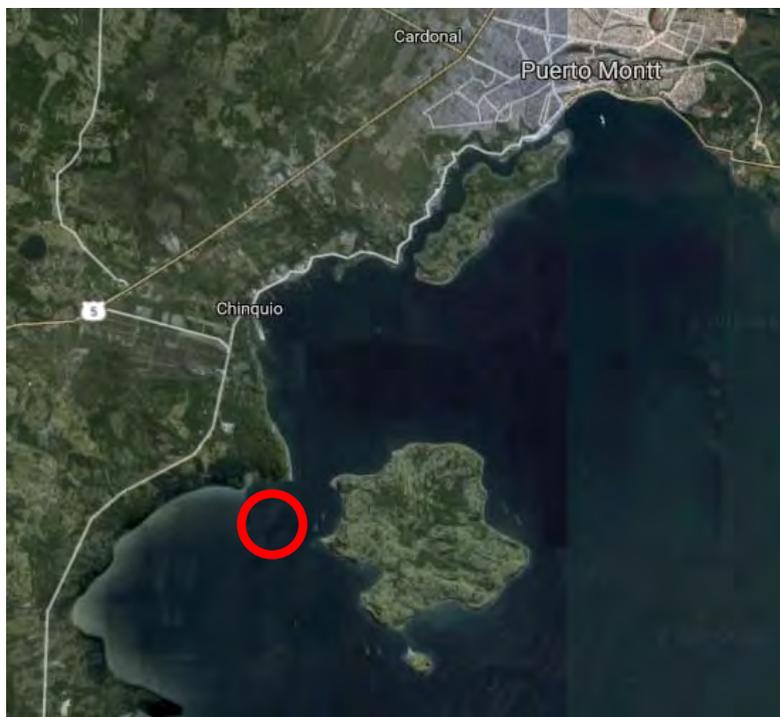
Para la obtención de la información, se realizó una correntometría euleriana por 30 días continuos. Éste método de registro de corrientes que se caracteriza porque el instrumento de medición conserva una posición estática con respecto a una masa de fluido que pasa a través, el resultado se representa por un vector de corriente en uno o varios estratos. Para lo cual se utilizó un Correntómetro Perfilador Acústico Doppler (ADCP) de 1 Mhz, marca Nortek, el cual registra continuamente velocidad y dirección de la corriente en toda la columna de agua (Fig. 13). El Correntómetro fue programado para medir una columna de agua de 25 m (9 capas de 2.5 metros c/u), en la línea de la más baja marea, el que fue instalado en las coordenadas Lat. 41° 40.356` S: Long. 72° 59.588` W (Fig. 14). Los datos que se analizaron son series de tiempo en velocidad y dirección de la corriente a intervalos de 10 minutos.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



13 Figura 13. Correntómetro Perfilador Acústico Doppler



14 Figura 14. Indicación geográfica del lugar de instalación de equipo correntómetro, Centro A.

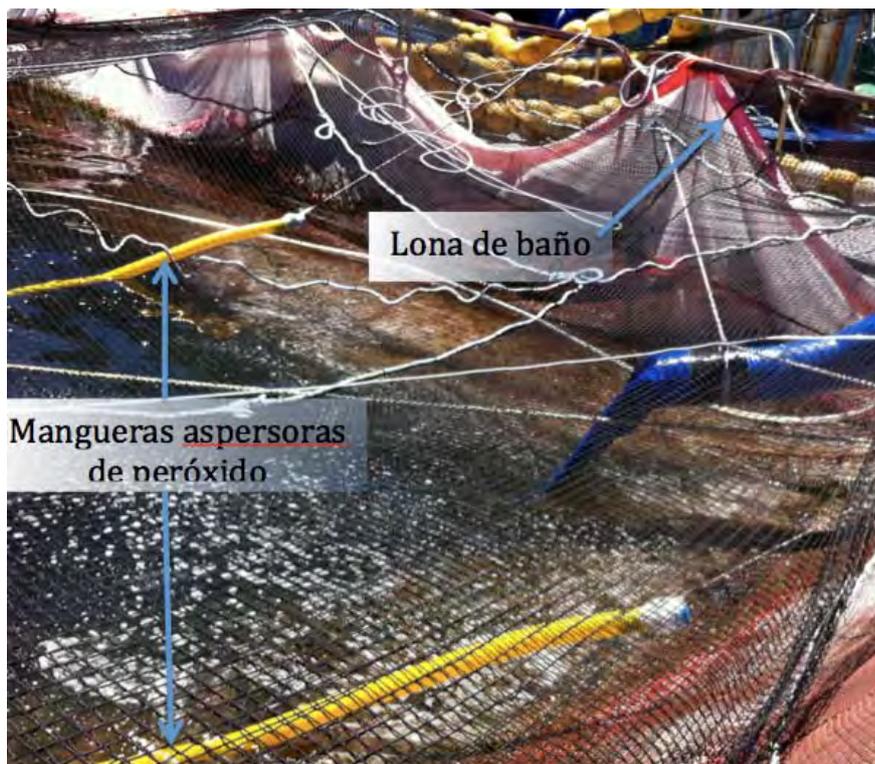


## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### Operación de baño Centro A y obtención de muestras

La lona y malla para la realización del baño fue levantada quedando a 5 metros de profundidad. Debido a que los peces eran pequeños, los tratamientos se realizaron en un tercio de la jaula reduciendo con boyarines (como en Fig. 8). El peróxido de hidrógeno fue asperjado por medio de una motobomba y tuberías perforadas a lo largo del tratamiento de baño, procurando conseguir una concentración de 750 ppm (Fig. 15).



15Figura 15. Se muestra sistema de distribución de peróxido de hidrógeno (Manguera amarilla perforada) y lona instalada.

La condición de la corriente del día de muestreo, no permitió que los derivadores naveguen correctamente. La orientación de la corriente de agua fue a través de las jaulas contiguas,



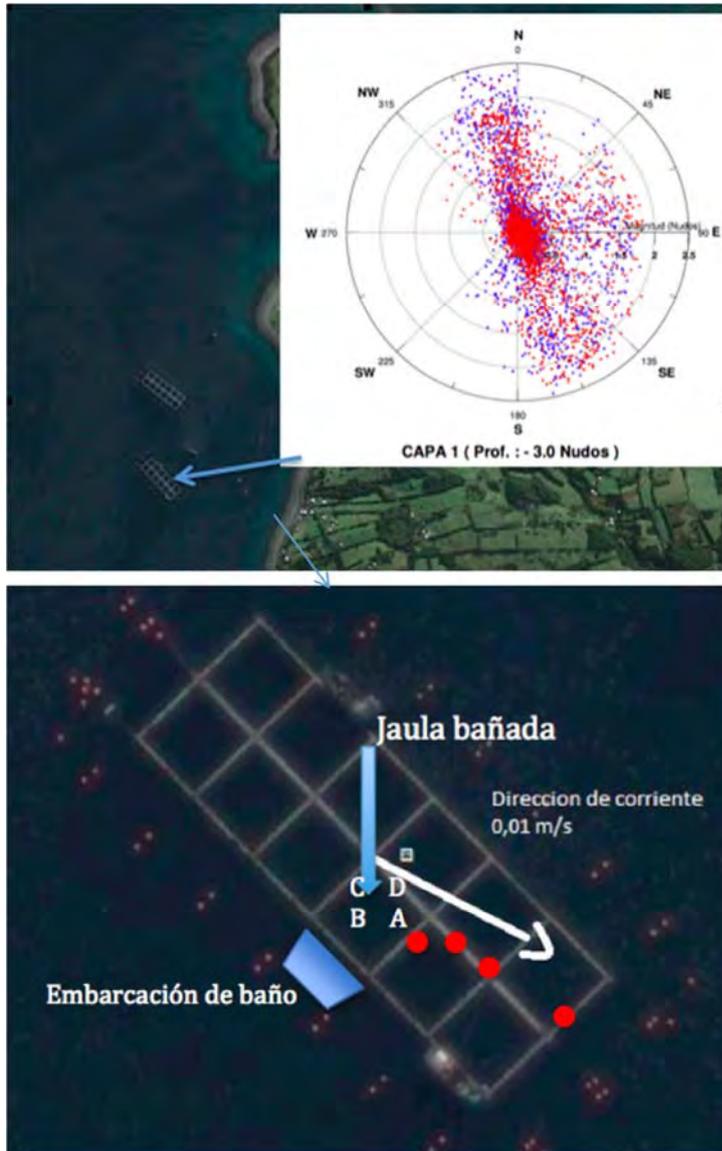
## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

por lo que fue necesario tomar muestras desde los pasillos (Fig. 16). Los derivadores de los extremos de la jaula fueron utilizados como guía, sin embargo, el derivador central no navegó correctamente al enredarse en los cabos del centro. Las muestras fueron tomadas en 4 puntos conforme a las distancias que permitían los pasillos del módulo. Las muestras fueron tomadas a los 4, 8, 16 y 30 minutos desde la liberación de la lona y tomando muestras en triplicado en línea imaginaria del punto medio de los derivadores (SEPA, 2008).



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



16Figura 16. Dirección y velocidad de corriente respecto al centro en el momento de la toma de muestras. Letras A, B, C y D representan las posiciones de las estructuras soportante de botellas de muestreo. Puntos rojos representan la toma de muestras fuera de la jaula.



# Universidad Austral de Chile

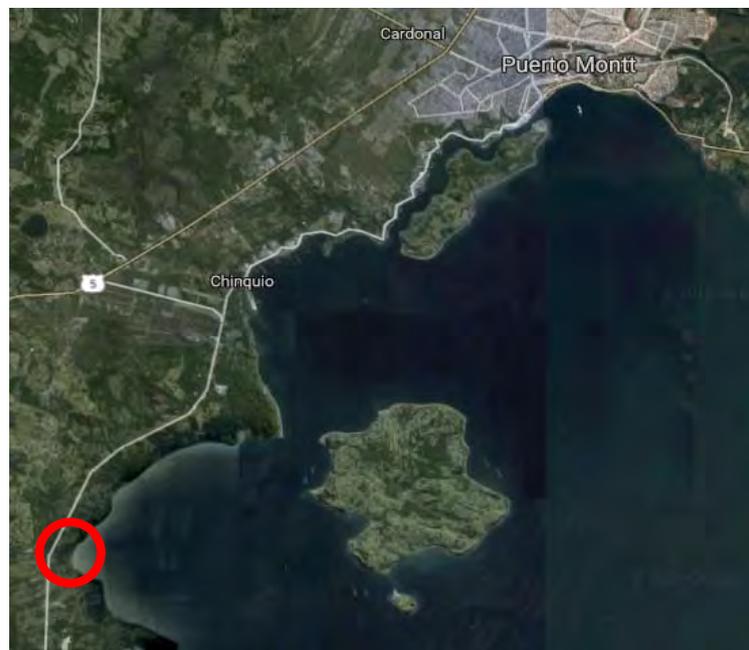
Instituto de Acuicultura

## Centro B

El segundo centro y baño evaluado (Centro B aza) corresponde a la bahía Huenquillahue (Fig. 17), ubicada en la ACS 2, Región de los Lagos, Chile.

## Correntometría Centro B

Los correntómetros utilizados fueron FSI, Falmouth Scientific INC, modelo 2DACM (Fig. 18), éstos fueron colocados a 8 y 16 m con respecto a la superficie, programados para medir datos en tiempo real de velocidades y orientación de las corrientes con respecto al Norte magnético. Los correntómetros se instalaron, en la cabecera sur del módulo de jaulas metálicas de 7 x 7 metros y estuvieron operando por 15 días continuos. Los correntómetros fueron instalados con un peso a péndulo y amarrados a la jaula (Fig. 19), de tal forma que trabajen siempre verticales.



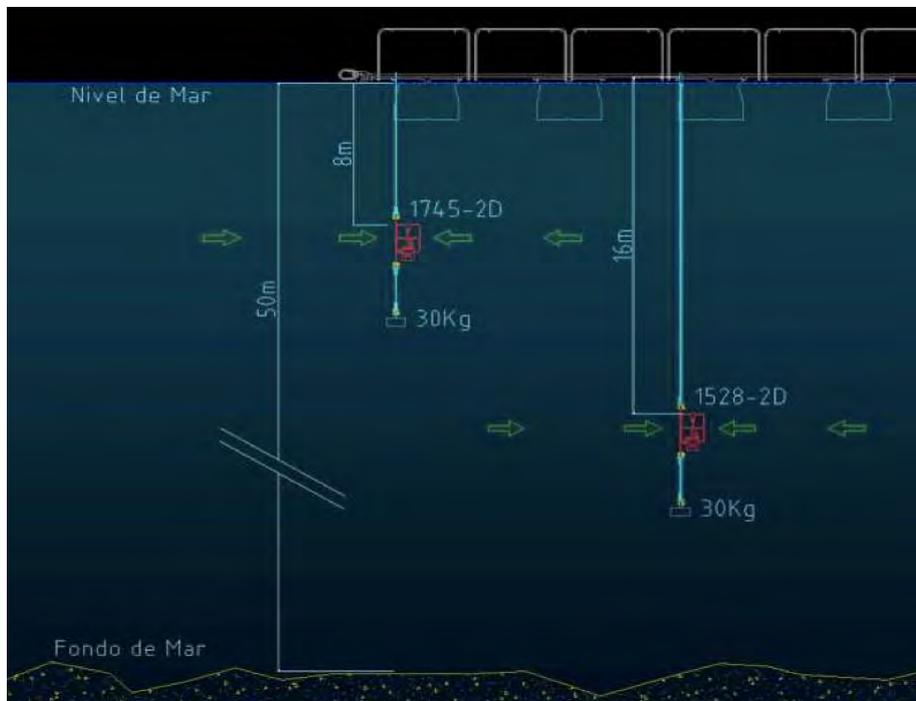
17 Figura 17. Indicación geográfica del lugar de instalación de equipo correntómetro, Centro B.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



18 Figura 18. Correntómetro euleriano de punto fijo.



19 Figura 19. Instalación de correntómetros en módulo del Centro B.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

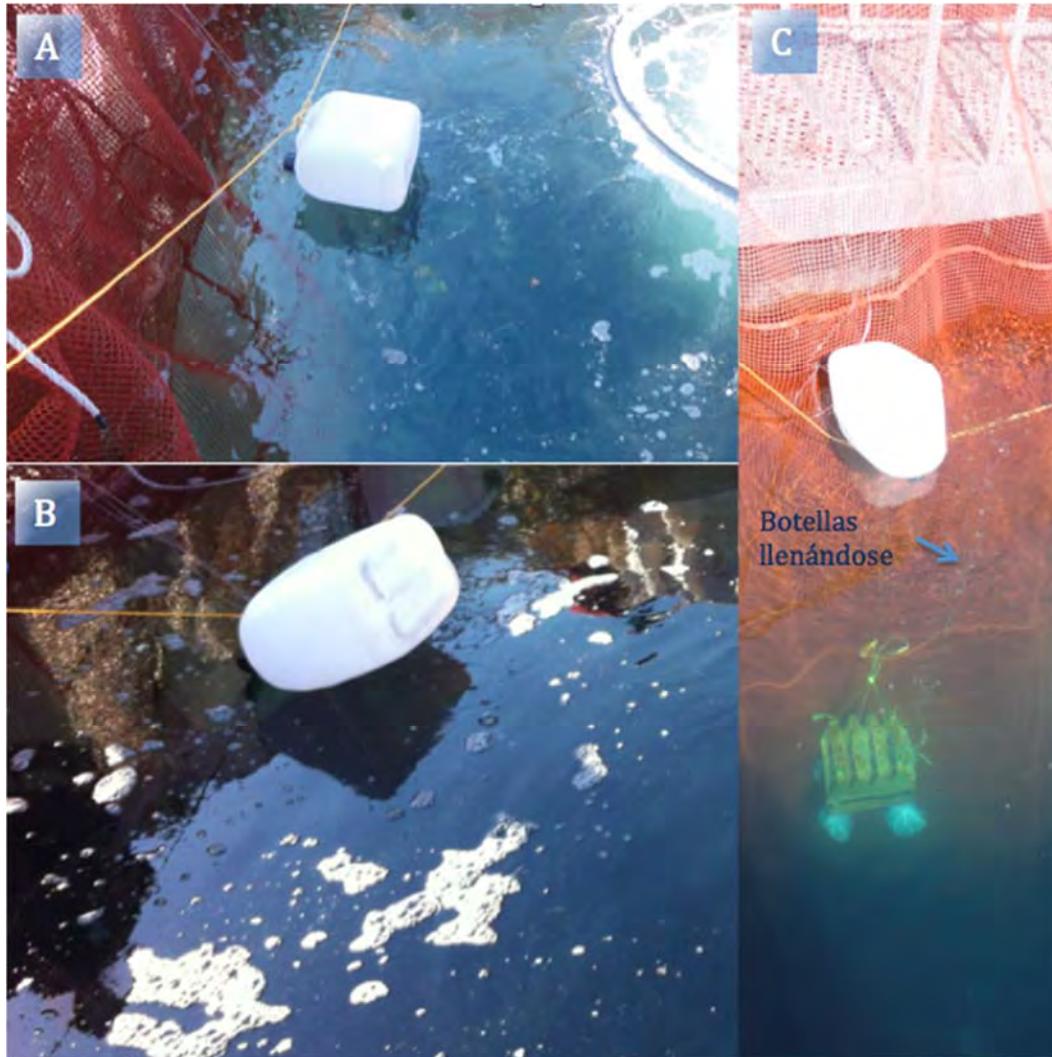
## **Operación de baño Centro B y obtención de muestras**

La realización y toma de muestras de los baños con azametifos consideró la misma metodología que para peróxido de hidrógeno. Para la realización de este baño se consideró la concentración recomendada por el fabricante, es decir, 100 ppb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). El compuesto fue aplicado por una bomba dosificadora y un anillo de aspersion (Fig. 20). Las tomas de muestras de agua fueron realizadas dentro de la jaula antes de la aplicación del producto, al finalizar la aplicación y posterior a la liberación de la lona. La concentración de azametifos fuera de la lona, fue monitoreada tomando muestras de agua contiguas al derivador central (Fig. 21). Este mismo centro fue evaluado en una en una segunda ocasión, donde se realizó un baño con peróxido de hidrógeno (Centro B Peróxido), se mantuvo la metodología, las condiciones de corriente fueron favorables para el seguimiento fuera de las jaulas, pero diferentes al baño con azametifos. La liberación y seguimiento de los derivadores para la toma de muestras se muestra en la figura 21 y 22.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



20 Figura 20. Secuencia de muestreo de agua durante aplicación de compuestos caligicidas A, finalización de la aplicación (Tiempo 1). B, antes de la liberación de la lona (Tiempo 2). C, posterior a 10 minutos de la liberación de la lona (Tiempo 3).



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura

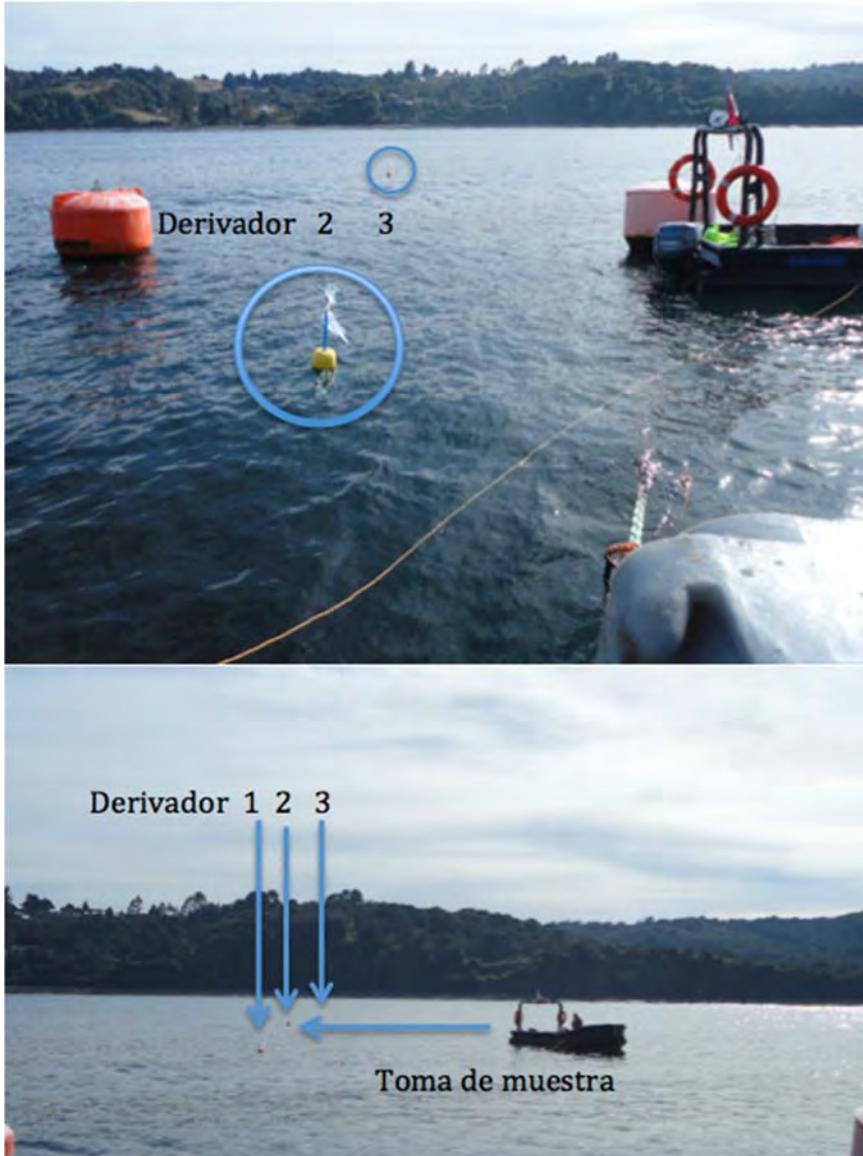


B

21 Figura 21. A, seguimiento de los derivadores (visto desde el módulo) para obtención muestras de agua de la pluma de dispersión de los quimioterapéuticos. B, se muestran 2 de los tres derivadores vistos desde la lancha.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



22 Figura 22. Seguimiento con toma de muestra en la línea de derivadores, post baño con peróxido de hidrógeno.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## Centro C

El tercer centro (Centro C) está ubicado al sur-oeste de Chaitén (Fig. 23), en la ACS 14, Región de los Lagos, Chile. Su construcción se basa en jaulas flotantes de 30 x 30 m.



23 Figura 23. Ubicación geográfica del lugar de muestreo durante baño de azametifos, Centro C (Círculo rojo)



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## Correntometría Centro C

Para este centro se utilizó un correntómetro del tipo ADCP (Acoustic Doppler Current Profiler), marca Nortek modelo Aquadop Profiler de 0,4 MHz de frecuencia. El ADCP se programó para registrar la intensidad y dirección de la corriente cada 10 minutos, dividiendo la columna de agua en 6 capas de 3m de espesor cada una.

## Operación de baño Centro C y obtención de muestras

La metodología para la toma de muestras de para baños con azametifos de este centro fue similar a la descrita anteriormente.

Para la realización de este baño se consideró la concentración recomendada por el fabricante, es decir, 100 ppb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). El compuesto fue aplicado por una bomba dosificadora y una manguera de aspersion (Fig. 24) una vez que la lona estaba en su posición. Las tomas de muestras de agua fueron realizadas dentro de la jaula antes de la aplicación del producto, durante (10 min posterior a finalización de aplicación del compuesto), al finalizar la aplicación (35 min) y posterior a la liberación de la lona (10 min posterior al término de baño) por medio de las 4 estructuras para toma de muestra, las mismas consideradas en los terrenos anteriores (Fig. 25). Las condiciones de corriente y marea llenante fueron favorables para el seguimiento fuera de las jaulas con excepción de la muestra de 4 metros que fue tomada en el pasillo exterior del módulo. La concentración de azametifos fuera de la lona, fue monitoreada tomando muestras de agua contiguas al derivador central (Fig. 26). El seguimiento de los derivadores y los puntos de toma de muestras en la figura 27.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



24 Figura 24. Previo al inicio de baño. Flecha azul indica manguera de aspersion del compuesto azametifos y flecha roja muestra lona de baño en posicionada.



25 Figura 25. Posicionamiento de estructuras de muestreo durante baño con azametifos en Centro C.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



26 Figura 26. Seguimiento de derivadores con toma de muestra en la línea imaginaria central de derivadores, post baño con azametifos en Centro C.



Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



27 Figura 27. Trayectoria de los derivadores y los puntos referenciales de toma de muestras en Centro C.

### Manejo de muestras □

Las botellas utilizadas para la toma de muestra fueron tipo Schott de 500 ml aproximadamente. Una vez que las botellas fueron llenadas en el tiempo y profundidad requerida, fueron retiradas desde la columna de agua y colocadas en una caja de polietileno expandido con hielo (Burrige et al., 2014). Las botellas fueron mantenidas en oscuridad, debido a antecedentes de la foto degradación de quimioterapéuticos, y en frío aplicando hielo en escamas (entre 4 y 8 °C, para evitar aceleración de reacciones) hasta el análisis en



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

laboratorio inmediatamente después de la toma en terreno. Las muestras para peróxido fueron analizadas en su concentración en laboratorio de Ecofisiología de Crustáceos de la Universidad Austral de Chile, Puerto Montt (UACH). Las muestras de concentración de azametifos fueron analizadas en el laboratorio SGS, Puerto Varas.

Las muestras tomadas en terreno fueron trasladadas junto con botellas de concentración conocida para cada compuesto. Estas concentraciones conocidas permitieron recalcular las concentraciones de las muestras incógnitas por medio de un factor de corrección para la pérdida de concentración en el tiempo.

#### 8.1.4 Temperatura y oxígeno disuelto durante el muestreo.

Los valores de temperatura y oxígeno disuelto se obtuvieron desde registradores continuos (termocupla digital y sensor de oxígeno óptico, Innovex™) ubicados en los respectivos centros. Los valores reportados corresponden a la profundidad de 5 m para el día de muestreo de cada compuesto en el centro respectivo.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 9 RESULTADOS POR OBJETIVO

- 9.1 Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos

La caligidosis o enfermedad causada por piojos de mar, se ha vuelto un gran problema para la industria salmonera tanto en el hemisferio norte como en el hemisferio sur. En Chile el agente causal de la caligidosis es *Caligus rogercresseyi*, un crustáceo copépodo ectoparásito, que genera pérdidas cercanas a 0.19 € Kg<sup>-1</sup> de salmón producido (Costello, 2009). Los tratamientos antiparasitarios por baños con quimioterapéuticos se han convertido en la principal forma de combatir la caligidosis seguido de los tratamientos incluidos en el alimento (Bravo et al., 2015). Los dos primeros quimioterapéuticos usados entre 1981 y 1985 para controlar el piojo de mar en Chile se aplicaron mediante baño, como el metrifonato (Neguvon TM) el que fue sustituido por diclorvos (Nuvan TM) entre 1985 y 2000. La ivermectina fue administrada en el alimento desde finales de los 80 hasta el 2003. Entre los años 2000-2007, el benzoato de emamectina fue el único quimioterapéutico autorizado por la autoridad oficial “Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura” (SERNAPESCA) para el tratamiento de la caligidosis (Bravo et al., 2014). Luego de la detección de pérdida de sensibilidad de *C. rogercresseyi* hacia el benzoato de emamectina, comienza el uso de peróxido de hidrógeno (2007) y se introducen los piretroides deltametrina (2007) y cipermetrina (2009) (Bravo et al., 2010, 2014). Posteriormente en el 2010, diflubenzurón, un inhibidor de la síntesis de quitina aplicado en el alimento, fue puesto en el mercado. Debido a la pérdida de sensibilidad de los piretroides en algunas localidades (Marin et al., 2015) y la limitada oferta de quimioterapéuticos, los organofosforados azametifos fueron autorizados en el 2013 para su uso en baños con lona cerrada (Helgesen et al., 2014). Desde entonces, el uso de azametifos se ha vuelto el principal tratamiento para la caligidosis y el peróxido de hidrogeno ha comenzado a utilizarse con mayor frecuencia en empresas que buscan certificaciones ASC (Aquaculture Stewardship Council). Para estos dos últimos



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

quimioterapéuticos no hay evidencia de pérdida de sensibilidad publicada en *C. rogercresseyi*. Sin embargo, para el piojo de mar que causa las mayores pérdidas económicas en Noruega (*Lepeophtheirus salmonis*), la pérdida de efectividad de estos compuestos ya ha sido declarada (Aaen et al., 2015).

A pesar de las estrategias del servicio SERNAPESCA, plasmadas en el “Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis” y en colaboración con privados del sector (INTESAL, AQUABENCH), ha sido muy difícil controlar esta plaga. El cambio de lona perimetral por lona cerrada para el tratamiento de baño, la definición del número de parásitos umbrales para tratamiento y centros de alta diseminación (CAD), la coordinación de Agrupación de Concesiones Salmoneras (ACS) en el uso y rotación de quimioterapéuticos y la inclusión de tratamientos no farmacológicos, entre otras, son medidas aún insuficientes para disminuir el uso de tratamientos contra *C. rogercresseyi*. Lo anterior se evidencia en el aumento de los volúmenes de quimioterapéuticos utilizado (Bravo et al., 2014).

Dos alternativas de tratamientos por baños son realizadas en la industria salmonicultora para los quimioterapéuticos azametifos, peróxido de hidrogeno, deltametrina y cipermetrina. Una de las alternativas menos recurrentes son los baños en wellboat, donde los peces son introducidos a las bodegas y tratados con los quimioterapéuticos según las indicaciones del fabricante. Y la alternativa mas utilizada son los baños con lona cerrada de volumen relativamente conocido, volumen que depende de las dimensiones de la jaula y tamaño de los peces. Una vez que la lona está instalada, envolviendo la malla y los peces, se aplica el quimioterapéutico por medio de bombas y aspersores que distribuyen el compuesto hasta alcanzar la concentración recomendada por el fabricante del quimioterapéutico. El baño considera un tiempo mínimo de residencia de los peces en el quimioterapéutico para asegurar la efectividad del tratamiento. Ya sea en wellboats o lona cerrada, después de realizado el baño, el compuesto es liberado al medio, lo que genera una dispersión y dilución relativa a la batimetría, dinámica de corrientes, condiciones ambientales, características químicas del agua y del tipo de compuesto entre otros factores. Así es factible la



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

permanencia de una concentración residual en el entorno de los centros tratados, lo que podría afectar en algún grado a especies no objetivo (Burrige et al., 2014; Ernst et al., 2014).

El aumento en el uso de pesticidas en los recursos hídricos ha despertado preocupación, desde el comienzo de los años 70, sobre los posibles efectos de estos productos en las especies no objetivo (Flannagan, 1973). Desde entonces, varios estudios han evidenciado mortalidades directas por estos químicos y efectos sub letales como aumento del riesgo de depredación y reducción de la capacidad de reproducción en especies de importancia comercial y ecológica que habitan en las cercanías de las zonas productivas en que son utilizados estos químicos (Burrige et al., 2005, 2010, 2014).

La presente revisión tiene como objetivo realizar una búsqueda y análisis crítico de la información disponible de los efectos de los principales quimioterapéuticos utilizados para el control de la caligidosis, sobre distintas especies no objetivos. Los quimioterapéuticos considerados corresponden a azametifos, peróxido de hidrógeno, deltametrina y cipermetrina.

## 9.1.1 Azametifos (organofosforado)

Los organofosforados son neurotóxicos que inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), la enzima responsable de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina, liberada durante la transmisión de un impulso nervioso (Baillie, 1985; Intorre et al., 2004). En el pasado, cuatro compuestos organofosforados se han utilizado en el tratamiento de las infestaciones de piojos de mar: malatión, triclorfón, diclorvos (DDVP) y azametifos. Por varios años, DDVP era el tratamiento de preferencia contra las infestaciones de piojos de mar. Sin embargo, el uso frecuente llevó a la resistencia o pérdida de sensibilidad en algunas zonas (Tully and McFadden, 2000). Lo anterior, junto con un bajo índice terapéutico



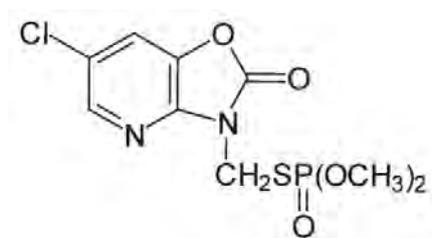
# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

de seguridad (dosis tóxica al salmón / dosis utilizada para tratar los piojos de mar), provocó que el producto sea discontinuado.

Azametifos como principio activo fue utilizado varios años con el nombre comercial de Salmosan®, pero actualmente en Chile es comercializado bajo tres nombres: Byelice® por Bayer (antes llamado Salmosan®), Calfree® por FAV- Recalcine y por último Azasure® por Centrovét.

Azametifos (S-6-chloro-2,3-dihidro-2-oxo-1,3-oxazolo[4,5-*b*]piridin-3-ylmethyl 0,0-dimethyl phosphorothioate) (Fig. 28) es un pesticida moderadamente soluble en agua, con una vida media estimada de 10,8 días a 20 °C y pH 7 (Worthing y Walker, 1987).



**28 Figura 28. Estructura de azametifos (Pfenning et al., 1999; Rawn et al., 2009)**

Su actual aplicación es llevada a cabo por inmersión comúnmente llamado “baño”, realizado por medio de una lona cerrada de tamaño conocido que es instalada bajo la jaula de peces donde el producto es aplicado a una concentración recomendada de 100 ppb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por 0.5 a 1 h de exposición (Burrige et al., 2010). Esta forma de aplicación de los baños de azametifos en los centros de cultivo de salmones junto a la persistencia del compuesto en el agua, podría provocar algún efecto nocivo letal o sub letal para las especies que comparten la columna de agua en los sectores aledaños a esta actividad económica.

### 3.1.1 Letalidad

La mayoría de los estudios que han evaluado los efectos letales o sub letales de azametifos sobre organismos acuáticos, lo hacen de distintas maneras por lo que no siempre se puede



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

extraer una  $LC_{50}$  (concentración letal en que muere el 50 % de los animales, expresada en concentración del principio activo). En algunos casos es utilizada una o varias concentraciones y tiempos de exposición donde se obtiene una respuesta de sensibilidad o supervivencia.

Los efectos de azametifos en las especies acuáticas dependen, además del tipo de especie, de varios factores como la concentración del fármaco en el agua, tiempo de exposición, frecuencia de la exposición, edad o estadio del desarrollo del organismo y factores ambientales como la temperatura.

En experimentos de laboratorio, exposiciones de 48 horas a un gradiente de concentraciones en *Homarus americanus* encontraron que el 50 % de las larvas mueren entre 1 y  $3.6 \mu\text{g L}^{-1}$  (ppb), mientras que el 50 % de los adultos muere con  $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$  (Burrige et al., 1999). Por otro lado, en exposiciones a diferentes tiempos como: 0.5, 1, 6 y 12 horas, Pahl and Opitz (1999) encontraron que la  $LC_{50}$  de las larvas de *H. americanus* fue de 27, 26.5, 5.4, 1.33 ppb, indicando que la especie responde de manera diferente dependiendo del tiempo de exposición al compuesto, disminuyendo el valor  $LC_{50}$  a medida que aumenta el tiempo de exposición. Los mismos investigadores encontraron que en las larvas de *H. americanus*, el valor de  $LC_{50}$  disminuye a temperatura más alta cuando la exposición es de una hora o más. Pasando de 26.5 a 20.7 cuando la temperatura de evaluación cambia de 10 a 12 °C, respectivamente. Lo que implica una sensibilidad mayor a temperatura más alta de bioensayo. Adicionalmente, en *H. americanus*, Burrige et al. (2000a) evaluaron exposiciones agudas repetidas en el tiempo, simulando baños de un centro. Las larvas y adultos fueron sometidas a baños de 30 minutos a 23.8 ppb. Si bien encontraron que baños repetidos no provocaron efectos en las larvas bajo 23.8 ppb, sobre esta concentración un 25 % de las larvas murieron luego de 22 horas. En los adultos se observó una mortalidad acumulada de 40 % en el tercer baño y hasta un 80 % al noveno baño.

En juveniles de *H. americanus*, Abgrall et al. (2000) encontraron que sometiendo por 1 y 24 h a concentraciones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , los juveniles sobrevivían, sin embargo, a concentraciones de 500 y  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  la supervivencia fue del 50 y 33 %, respectivamente.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

En hembras adultas de *H. americanus* sometidas por 48 h a un gradiente de concentraciones, se observó que la  $LC_{50}$  fue de 0.6 ppb en época estival y de 3.2 ppb en los meses fríos (Burrige et al., 2005). Cuando estas hembras fueron sometidas a una exposición crónica de 61 ng L<sup>-1</sup> de azametifos por 10 días, la mortalidad fue de 33 % a diferencia de 2.6 % encontrada en los controles (0 ng L<sup>-1</sup>) (Coulliard and Burrige, 2015). Ernst et al. (2014) demostraron que inmediatamente después de un baño con lona cerrada de azametifos a 100 ppb de concentración, este compuesto se diluía a niveles indetectables a una distancia de 1000 m del baño una vez que la lona fue retirada. La concentración del fármaco a 100 m de distancia (5 ppb aproximadamente) fue capaz de afectar cerca de un 40 % de *Eohaustorius estuarius* (anfípodo) luego de 48 h de exposición, mientras que a 1 h de exposición no se observaron efectos. El mismo estudio determinó que a 100 m de la descarga de un wellboat con 100 ppb de azametifos, la concentración encontrada fue casi indetectable y ya no afectaba a esta especie con incubaciones de 1 o 48 h (Ernst et al., 2014). Adicionalmente, en este estudio se determinó, en dos especies de crustáceos que habitan en el entorno de las jaulas de cultivo, la sensibilidad al azametifos observándose una respuesta diferencial según la especie. *Mysis stenolepsis* registró una  $LC_{50}$  promedio de 10.6 ppb, más sensible al azametifos que *Crangon septemspinosa* cuya  $LC_{50}$  fue de 19.2 ppb con 24 h de exposición (Tabla IV). En 1 h de exposición al agua colectada de la periferia de la jaula inmediatamente después de liberada la lona, la mortalidad en *M. stenolepsis* fue menor a un 50 % y no se registró mortalidad de *C. septemspinosa* (Tabla V) (Ernst et al., 2014).

Valores comparativos de letalidad ( $LC_{50}$ ) para diferentes especies expuestas al azametifos se muestran en la tabla IV y niveles de afectados (moribundos + muertos, expresados en porcentaje) expuestos a concentraciones puntuales de azametifos se muestran en la tabla V.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla IV Resumen de las concentraciones de azametifos necesarias para matar al 50 % de la población, en diferentes especies marinas. (s) determinaciones realizadas con sedimento ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ), ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición**

Especie	Grupo	ED	LC <sub>50</sub> ppb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Te (°C)	Tpo (h)	Referencia
<i>Mysis stenolepsis</i>	Crustáceo/ Misidáceo	Adulto	10,6	13-15	24	Ernst et al., 2014
<i>Crangon septemspinosa</i>	Crustáceo/ Camarón	Adulto	19,2	13-15	24	Ernst et al., 2014
<i>Corophium volutator</i> (s)	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	182	14-16	240	Mayor et al., 2008
<i>H. americanus</i>	Crustáceo/ Langosta	Adulto	0,6	11-14	48	Burrige et al., 2005
<i>H. americanus</i>		Adulto	3-3,2	2-6	48	Burrige et al., 2005
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Equinodermo / Erizo	Adulto	>1000	14-16	96	Ernst et al., 2001
<i>Polydora cornuta</i>	Anélido/ Poliqueto	Juvenil	2310	14-16	96	Ernst et al., 2001
<i>Artemia salina</i>	Crustáceo/ Anostraco	Adulto	>10.000	14-16	24	Ernst et al., 2001
<i>Brachionus plicatilis</i>	Rotífero	Adulto	>10.000	14-16	24	Ernst et al., 2001
<i>Gammarus</i> spp	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	< 5	14-16	96	Ernst et al., 2001



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla V Resumen de las concentraciones de azametifos necesarias afectar (en %) a diferentes especies marinas. (s) determinaciones realizadas con sedimento ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ), Conc: concentración; ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición**

Especie	Grupo	ED	Conc ppb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	%	Te ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tpo (h)	Referencia
<i>Eohaustorius estuarius</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	100	100	14-16	1	Ernst et al., 2014
<i>Mysis stenolepsis</i>	Crustáceo/ Misidaceo	Adulto	100	<50	13-15	1	Ernst et al., 2014
<i>Crangon septemspinosa</i>	Crustáceo/ Camarón	Adulto	100	0	13-15	1	Ernst et al., 2014
<i>H. americanus</i> (primavera)	Crustáceo/ Langosta	Adulto	10	43- 100	13	1x4 veces	Burridge et al., 2008
<i>H. americanus</i> (verano)		Adulto	10	13	13	1x4 veces	Burridge et al., 2008
<i>Corophium volutator</i> (s)	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	100	35	14-16	240	Mayor et al., 2008
<i>Pseudodactylo gyrosis</i> spp	Platelminto	Adulto	100	95,5	18-20	1-2	Pretti et al., 2002
<i>Brachionus plicatilis</i>	Rotífero	Adulto	>10.000	100	14-16	24	Ernst et al., 2001
<i>Gammarus</i> spp	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	< 5	100	14-16	96	Ernst et al., 2001

### 3.1.2. Respuestas conductuales

Abgrall et al. (2000) observaron que en *H. americanus*, exposiciones de 10 minutos a azametifos, reduce la capacidad locomotora a medida que aumenta la concentración del compuesto. Esto causó un retardo en la búsqueda de refugio cuando los animales fueron sometidos a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , comparado con los controles. Este retraso fue aún más evidente en concentraciones de 500 y  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Esta condición podría ser desfavorable para la alimentación o frente a un depredador.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 3.1.3 Respuesta fisiológica, celular y bioquímica

Estudios realizados en el bivalvo *Mytilus edulis*, han evidenciado que la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) puede ser modificada por adición de azametifos, pudiendo causar efectos sub letales como disminución de la capacidad fagocítica y mantención de la viabilidad celular para transporte de moléculas. Incluso se han alcanzando niveles de actividad de AChE inviabilizantes para la vida a largo plazo. La actividad de la AChE en *M. edulis* mostró una significativa inhibición (80 %) a 1 hora de exposición con 974  $\mu\text{g L}^{-1}$  de azametifos (Brown et al., 2004). Los valores de concentración de  $\text{IC}_{50}$  (Concentración inhibitoria del 50% de la actividad) para enzimas de branquias y hemolinfa calculados después de la exposición *in vitro* fueron de similar orden de magnitud, 0.74  $\text{mg L}^{-1}$  más bajo que la  $\text{IC}_{50}$  de hemolinfa (1.3  $\text{mg L}^{-1}$ ). Sin embargo, después de la exposición *in vivo* de 1 y 24 h a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  del mismo quimioterapéutico, la enzima de la branquia experimentó un nivel del 30 y 59 % de inhibición, respectivamente, en comparación con 80 % de inhibición en la hemolinfa a las 24 h (Canty et al., 2007). La inhibición de la actividad enzimática observada en preparaciones de tejido respecto a la exposición *in vivo* genera la necesidad de conocimiento de la sensibilidad de los mitílidos en términos de captación del compuesto, biotransformación y patrones de desintoxicación.

Los investigadores (Canty et al., 2007) indicaron que en *M. edulis* en el nivel de citotoxicidad, la retención de rojo neutro sigue en aumento luego de la exposición a azametifos por 1 y 24 h, es decir, las células se mantienen viables (tanto *in vivo* como *in vitro*). Por otro lado, la función inmune (actividad fagocítica) disminuyó en un 9 % respecto al control en animales expuestos por 24 h a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de este compuesto. Sin embargo, no se observaron diferencias en la tasa de ingestión con respecto al control (Canty et al., 2007).

En la especie *Arenicola marina*, un anélido marino, la exposición *in vitro* a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de azametifos por 0.5 h da lugar a una mayor inhibición de la actividad de la esterasa PChE (propionilcolinesterasa) en relación a AChE (inhibición del 80 %). Mientras que *in vivo*



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

después de 10 días de exposición a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , PChE fue inhibida en un 32 %. Tal discrepancia en la sensibilidad de esta esterasa entre experimentos *in vitro* e *in vivo* puede ser un reflejo de los procesos de absorción, biotransformación y desintoxicación de *A. marina*.

En *H. americanus* el efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones ( $61 \text{ ng L}^{-1}$ ) de azametifos de forma continua durante 10 días fue evaluada y se determinó que los niveles de proteínas totales séricas, hemocianina y lactato no se vieron afectados. Por otro lado, el daño oxidativo medido como carbonilación de proteínas en branquias y suero, aumentó. Inclusive, se observó una disrupción en la energía asignada a diferentes procesos. Por ejemplo, se observaron índices hepatosomáticos aumentados y gonadosomáticos disminuidos en relación a los controles, explicados por un aumento del nivel de lípidos en hepatopáncreas y una disminución en el contenido de agua. En este trabajo se evaluó además neurotoxicidad, encontrando niveles de colinesterasa disminuidos en el músculo (Coulliard and Burrige, 2015).

### 3.1.4 Efecto en la reproducción

En langosta *H. americanus*, las hembras pre-ovígeras aclimatadas a  $13 \text{ }^{\circ}\text{C}$  se sometieron a exposiciones quincenales de 1 h a concentraciones de azametifos desde  $1.25$  a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . En marzo y abril (primavera), cuatro exposiciones a  $1.25$ ,  $2.5$  o  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  no tuvieron efecto significativo sobre la supervivencia y el desove, mientras que tres o cuatro exposiciones a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  causaron alta mortalidad (43 a 100 % dependiendo del grupo extraído) y una disminución en la capacidad de desove de las hembras (34 % menos que el control). En diciembre y enero (invierno), cuatro exposiciones de 1 h a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de azametifos no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia o el desove. Los resultados demuestran que las reiteradas exposiciones quincenales a azametifos pueden tener un efecto negativo en la supervivencia y el desove de la langosta americana. La respuesta a este compuesto tanto para la supervivencia como para el desove parece estar influida por la concentración y el



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

número de exposiciones, así como por la época del año, siendo esta especie, en los meses fríos menos sensible a azametifos (Burridge et al., 2008).

## 9.1.2 Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El peróxido de hidrógeno, o agua oxigenada, es un compuesto químico altamente polar que generalmente se encuentra en estado líquido. Su principal característica es ser un compuesto altamente oxidante y su elevada reactividad facilita su descomposición en agua (H<sub>2</sub>O) y oxígeno (O<sub>2</sub>) mediante una reacción exérgica (liberando calor, Eq.1)



Dada su gran capacidad oxidativa, el peróxido de hidrógeno es principalmente utilizado como agente desinfectante o de limpieza tanto en labores industriales como domésticas. Productos domésticos para usos medicinales (belleza) y de limpieza contienen concentraciones relativamente bajas, entre un 3 a un 9 %. Sin embargo, en labores industriales como blanqueamiento del papel en celulosas, desinfección de agua riles y combustible, se utiliza en concentraciones muy superiores.

El peróxido de hidrógeno también se forma y se encuentra en condiciones naturales. Pequeñas concentraciones de peróxido de hidrógeno se pueden encontrar en el aire, y también dentro de la mayoría de organismos vivos, claro que a concentraciones muy inferiores. De una u otra manera (fotosíntesis y/o metabolismo aeróbico) la respiración de organismos vivos tiene por objeto generar energía (ATP) para el normal funcionamiento de celular y del organismo en general. La mayor parte del oxígeno respirado es reducido a agua y CO<sub>2</sub> en la mitocondria (célula animal), generando ATP. Sin embargo, producto de la normal ineficiencia mitocondrial, un pequeño porcentaje de este oxígeno respirado (entre un 0.1 a un 4.0 %) escapa la cadena transportadora de electrones como anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Turrens, 2003; Tahara et al., 2009). Dado que este anión es también un agente



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

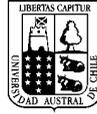
oxidante, una serie de transformaciones ocurren en el organismo con el fin de reducir este anión a un compuesto menos dañino para la célula. Es aquí, en la primera transformación de este anión superóxido, mediante su dismutación mediada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), que el producto final es peróxido de hidrógeno.

Desde hace algunos años y dado su gran capacidad oxidativa, el peróxido de hidrógeno también se utiliza como tratamiento para la caligidosis. Su aplicación es por baños, en los que los distintos estadios de los ectoparásitos que causan pérdidas económicas en la industria del salmón son expuestos directamente a una concentración recomendada entre 1.2 a 1.8 g L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrógeno, sin embargo, la concentración utilizada actualmente en Chile es de 0.75 g L<sup>-1</sup> (750 ppm). El mecanismo de acción se basa en la difusión directa del peróxido de hidrógeno hacia el interior del parásito, en donde además de actuar como agente oxidante (daño celular), la liberación de oxígeno gaseoso genera burbujas que quedan atrapadas dentro de la cutícula del parásito. Esto dificulta la sujeción del parásito al pez de cultivo, lo que determinara el desprendimiento del parásito. Dado que la aplicación de peróxido de hidrógeno por baños se realiza *in situ*, o sea en las balsas de cultivo, otros organismos marinos que se encuentran en la columna de agua pueden ser expuestos al peróxido de hidrógeno. Los efectos de esta exposición en invertebrados marinos, especialmente bivalvos y crustáceos, no son claros ni han sido extensivamente evaluados.

A continuación, se discutirán los efectos de la exposición a peróxido de hidrógeno, descritos en la literatura a la fecha, en bivalvos y crustáceos.

### 3.2.1 Letalidad

La mayoría de los estudios que han evaluado los efectos del peróxido de hidrogeno sobre crustáceos y bivalvos, evalúan de alguna manera supervivencia. Sin embargo, dadas las diferentes metodologías usadas, no siempre se puede extraer una LC<sub>50</sub>. Un resumen de las



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

LC<sub>50</sub> encontradas en la literatura se presenta en la Tabla VI. Estas varían entre valores mayores a 3750 mg L<sup>-1</sup> en adultos de langosta americana (*H. americanus*) para una exposición de 1 h (Burridge et al., 2014), a valores tan bajos como 1.9 mg L<sup>-1</sup> en cladóceros adultos (*Moina sp*) luego de 96 h de exposición (Reichwaldt et al., 2012). Valores similares han sido reportados para otro cladóceros (*Daphnia magna*), donde una concentración de 5 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno fue letal para el ~80 % de la población luego de 48 h de exposición (Bownik y Stępniewska, 2015). Esta gran diferencia en la concentración de peróxido de hidrógeno que es letal para el 50 % de la población, no solo muestra que hay grandes diferencias entre la tolerancia de diferentes especies, sino que también en el gran efecto del tiempo de exposición. Mientras menos es el tiempo de exposición, mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno son necesarias para afectar al 50 % de la población. Así, dada la concentración recomendada de peróxido de hidrógeno 1.2 a 1.8 g L<sup>-1</sup> (1800 mg L<sup>-1</sup>) para el control de Caligus, es evidente que está por sobre los valores LC<sub>50</sub> reportados para crustáceos (Tabla VI). Además, es importante considerar el tiempo de exposición, ya que aún en bajas concentraciones producto de la dilución una vez liberado el peróxido de hidrógeno al ambiente marino, podría ser letal bajo una exposición prolongada.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla VI. Resumen de las concentraciones de peróxido de hidrógeno necesarias para matar al 50% de la población, en diferentes especies de crustáceos de agua dulce y salada. No se encontró esta información para bivalvos. ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición**

Especie	Grupo	ED	LC <sub>50</sub> ppm (mg L <sup>-1</sup> )	Te (°C)	Tpo (h)	Referencia
<i>H. americanus</i>	Crustáceo/ Langosta	Larva, estadio I	1637	8 - 14	1	Burridge et al., 2014
<i>H. americanus</i>		Adulto	> 3750	8 - 14	1	Burridge et al., 2014
<i>C. septemspinosa</i>	Crustáceo/ Camarón	Adulto	3182	8 - 14	1	Burridge et al., 2014
<i>Mysid sp.</i>	Crustáceo / Misidáceo	Adulto	973	8 - 14	1	Burridge et al., 2014
<i>G. lacustris</i>	Crustáceo / Anfípodo	Adulto	231,2	6 - 8	24	Fedoseeva & Stom, 2013
<i>E. vittatus</i>	Crustáceo / Anfípodo	Adulto	238	6 - 8	24	Fedoseeva & Stom, 2013
<i>E. verrucosus</i>	Crustáceo / Anfípodo	Adulto	1152,6	6 - 8	24	Fedoseeva & Stom, 2013
<i>E. cyaneus</i>	Crustáceo / Anfípodo	Adulto	119	6 - 8	24	Fedoseeva & Stom, 2013
<i>G. fasciatus</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	20,4	6 - 8	24	Fedoseeva & Stom, 2013
<i>Moina sp</i>	Crustáceo/ Cladóceros	Adulto	1,9	21	48	Reichwaldt et al., 2012
<i>D. carinata</i>	Cladóceros	Adulto	5,7	21	48	Reichwaldt et al., 2012
<i>C. volutator</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	46	15	96	Smit et al., 2008
<i>A. salina</i>	Crustáceo/ Anostraco	Adulto	168	25	96	Smit et al., 2008

Los efectos del peróxido de hidrógeno también son dependientes del estadio de vida de los organismos. Por ejemplo, en la Tabla VI se puede apreciar que valores mayores a 3750 mg L<sup>-1</sup> son necesarios en adultos de langosta americana (*H. americanus*), pero menos de la



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

mitad de esta concentración es suficiente para matar el 50 % de la población en estadios larvales (Estadio I) de la misma especie (Burrige et al., 2014). Dado que la mayoría de los estadios larvarios de los invertebrados marinos, incluyendo crustáceos y bivalvos, son pelágicos (se desarrollan en la columna de agua) estos son los que tienen mayor probabilidad de ser expuestos al peróxido de hidrogeno durante la aplicación en baños en la salmonicultura. Así, dado que los estadios larvarios son más sensibles que los estadios adultos, los efectos del peróxido de hidrógeno deberían ser evaluados en los estadios larvales.

La talla de los organismos también ha sido sugerida como determinante de la tolerancia al peróxido de hidrógeno. De hecho, comparando las  $LC_{50}$  de cinco especies de copépodos habitantes del Lago Baikal (Rusia), se observó que una relación positiva entre la talla de los copépodos y la concentración de peróxido de hidrógeno necesaria para la  $LC_{50}$  (Fedoseeva and Stom, 2013). Más datos son necesarios para establecer de manera más general el efecto de la talla sobre la tolerancia al peróxido de hidrógeno en crustáceos como en otros organismos.

Otro estudio en *D. magna* encontró que luego de 21 días de exposición a  $1.25 \text{ mg L}^{-1}$ , un 20 % de la población murió y la progenie de los supervivientes fue un 15.5 % más pequeña, eclosionando 10 % más temprano y con solo una eclosión del 40 % de los embriones (Meinertz et al., 2008). Esto no solo está de acuerdo con los valores  $LC_{50}$  reportados para la especie, sino que también muestra que la exposición prolongada (21 días) a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno también pueden tener un efecto poblacional a largo plazo, mediante la progenie de los individuos expuestos. Así, una reducción en el número de individuos de futuras cohortes no solo causa una disminución de la futura población de esta especie, sino que también afectará la cantidad, calidad y disponibilidad de alimento para todas aquellas otras especies que se alimentan de la especie afectada.

El efecto del peróxido de hidrógeno no ha sido extensivamente evaluado en bivalvos, por lo que no es posible dimensionar los alcances que el uso de peróxido de hidrógeno pueda tener sobre las poblaciones de bivalvos, comunes en las cercanías de los centros de cultivo



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

de salmones. Un estudio reporta una mortalidad de ~30 % en adultos de *Perna viridis* luego de 14 días de exposición a ~2 mg L<sup>-1</sup> (Leung et al., 2011). Otro estudio, usando una concentración mucho mayor de 100 mg de peróxido de hidrógeno reporta un 100 % de mortalidad en larva veliger y un 25 % de mortalidad en juveniles de *Dreissena polymorpha* luego de 6 h de exposición, mientras que 0 % de mortalidad en juveniles de *Fusconaia flava* (Waller and Fisher, 1998). Al igual que en crustáceos, estos valores reportados para bivalvos muestran tolerancias específicas para cada especie y etapa en el ciclo de vida.

### 3.2.2 Respuestas conductuales

Pocos estudios han evaluado las respuestas conductuales de organismos expuestos a peróxido de hidrogeno y la literatura disponible al momento no permite una conclusión definitiva. Estudios que han permitido a los animales preferir o evitar flujos con peróxido de hidrógeno, muestran que *G. lacustris*, *G. fasciatus*, and *P. cancellus* son atraídos a bajas concentraciones (5.1 mg L<sup>-1</sup>) de peróxido de hidrogeno, no muestran preferencia por concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno y evitan flujos de agua con concentraciones superiores (Fedoseeva and Stom, 2013). Sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales, *O. flavus* no muestra ni preferencia ni evasión a ninguna de las concentraciones utilizadas (Fedoseeva and Stom, 2013). Por otro lado, adultos, nauplii y copepoditos de distintas especies de copépodos mostraron cambios en su comportamiento alimenticio luego de ser expuestos a 5 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno, inhibiendo por completo su alimentación (Van Geest et al., 2014). En el mismo estudio, concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno causaron la total parálisis luego de 15 minutos de exposición (Van Geest et al., 2014). En *D. magna*, similares concentraciones de 5 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno han sido reportadas de causar una disminución en la velocidad de nado y en la frecuencia cardiaca (Bownik and Stępniewska, 2015). Así, es claro que el peróxido de hidrógeno causa respuestas conductuales en algunos crustáceos y en concentraciones muy inferiores a las utilizadas para tratar la caligidosis.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Potenciales respuestas conductuales en bivalvos a la exposición de peróxido de hidrógeno no se han evaluado.

### 3.2.3 Respuestas fisiológicas, moleculares y alteraciones en el balance Redox

Si bien es cierto varios de los estudios encontrados describen de una u otra manera los procesos fisiológicos afectados luego de la exposición al peróxido de hidrógeno, el proceso más evaluado tiene relación con el balance oxidativo de los organismos. Dado que peróxido de hidrógeno tiene una alta capacidad oxidativa y que el peróxido de hidrógeno es ya un compuesto intermediario en el balance redox de los organismos, es de esperar que el balance redox sea una de los primeros procesos afectados. En *D. magna*, concentraciones de 5 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno han sido reportadas de causar una significativa disminución en la razón GSH/GSSG, lo que fue atribuida a la oxidación de glutatión. Los autores también observaron un incremento en óxido nítrico, sugiriendo un desbalance del equilibrio redox y un mayor estrés oxidativo (Bownik and Stępniewska, 2015). Un incremento en el daño al ADN branquial fue también observado en adultos de *Sinopotamon henanense* luego de 24 h de exposición a 170 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno (Wang et al., 2014) y en *D. magna* luego de exposición a concentraciones tan bajas como 0.17 mg L<sup>-1</sup> (Pelegri et al., 2014). La formación de complejos de hierro (Fe) en cistos de *Artemia salina* expuestos a peróxido de hidrógeno también han sido interpretados como resultado de un incremento en el stress oxidativo (Veeramani and Baskaralingam, 2011).

De acuerdo con estas observaciones, un incremento en la actividad y expresión de enzimas antioxidantes han sido reportadas como respuesta del animal para protegerse del incremento del estrés oxidativo causado por la exposición al peróxido de hidrogeno. Un incremento en el magnesio SOD isoforma (una potente enzima antioxidante) fue reportado en (Veeramani and Baskaralingam, 2011). Un rápido incremento en la expresión de glutatión peroxidasa en el hepatopáncreas, hemocitos y branquias también ha sido reportada luego de 3 h de la inyección, vía hemolinfa, de 0.5 mg kg<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno en adultos *Scylla paramamosain* (Fu et al., 2013). Los autores también reportan recuperación luego de 12 h,



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

sin embargo, hay que considerar que esto es en la expresión de la glutatión peroxidasa, no en otras variables que reporten daños directos en los cangrejos.

En bivalvos, el panorama parece ser menos claro. Se han reportado incrementos en el estrés oxidativo en la glándula digestiva de *Unio tumidos*, luego de exposición a elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $1360 \text{ mg L}^{-1}$ , Labieniec and Gabryelak, 2006), pero no se encontraron indicios de estrés oxidativo en adultos de *Perna viridis* luego de 14 días de exposición a  $\sim 2 \text{ mg L}^{-1}$  peróxido de hidrógeno (Leung et al., 2011). En el mismo estudio, se encontró un incremento en el stress oxidativo luego de exposición a cadmio (Leung et al., 2011). Aun así, la escasa información en bivalvos, parece ser que son menos sensibles que los crustáceos al peróxido de hidrógeno.

### 3.2.4 Cambios morfológicos

A pesar de la gran capacidad oxidativa del peróxido de hidrógeno, efectos a nivel morfológico no han sido extensamente evaluados. Daños celulares a nivel branquial se han reportado en adultos de *Sinopotamon henanense* (Wang et al., 2014). Luego de 24 h de exposición a  $170 \text{ mg L}^{-1}$  peróxido de hidrógeno, se observó un desorden en las células epiteliales y una mayor separación de la membrana basal. También se observó la desaparición de algunos organelos cercanos al núcleo y mitocondrias de mayor tamaño e inflamadas, indicando daños en la membrana mitocondrial. Agregación y deformidad de la cromatina nuclear también fue observada (Wang et al., 2014). Basados en estos daños morfológicos reportados a concentraciones menores que las recomendadas para tratar la caligidosis, hace sentido con los efectos no morfológicos reportados previamente en animales expuestos a concentraciones aun menores.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 9.1.3 Deltametrina

Químicamente conocida como [(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)- 2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzilo y de fórmula  $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ , deltametrina es un piretroide sintético con alta actividad y de amplio espectro insecticida. Dado que es relativamente inocuo para mamíferos y de alta toxicidad para insectos, también se considera como uno de los insecticidas agrícolas de uso más seguro. Sin embargo, es también altamente tóxico para organismos acuáticos, incluyendo peces, por lo que se recomienda extrema precaución en su uso cercano a ambientes acuáticos. Paradójicamente, es también usado por la industria salmonera para el control de la caligidosis.

La deltametrina ha sido usada amplia y efectivamente para el control y prevención de enfermedades transportadas por vectores como garrapatas, y también para el control de plagas en ambientes urbanos como pulgas, arañas, hormigas y chinches. En agricultura, la deltametrina se usa ampliamente en plantaciones frutales y forestales, viñas, cultivos de hortalizas, plantas ornamentales, cereales y flores, con el fin de controlar langostas, saltamontes, pulgones, y otros ortópteros, coleópteros y lepidópteros. La deltametrina puede ser absorbida por contacto o por ingestión, afectando el sistema nervioso en artrópodos. Con un amplio espectro de acción, actúa sobre estadios adultos, juveniles y ninfales.

Con el desarrollo de la salmonicultura y la subsecuente aparición de la caligidosis, la deltametrina ha sido extensamente utilizada en la salmonicultura. Su aplicación recomendada es por baños de 30 a 40 minutos a una concentración de 2.0 o 3.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , según el fabricante (SEPA, 2005). Dado que estos baños se realizan *in situ*, o sea en las balsas de cultivo, otros organismos marinos que se encuentran en la columna de agua pueden ser expuestos a la deltametrina. Los efectos de esta exposición en invertebrados marinos, especialmente bivalvos y crustáceos, no son claros ni han sido extensivamente



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

evaluados. Los efectos de esta exposición en invertebrados marinos, especialmente bivalvos y crustáceos, no son claros ni han sido extensivamente evaluados.

### 3.3.1 Letalidad

La mayoría de los estudios que han evaluado los efectos de la deltametrina sobre crustáceos, de alguna manera han evaluado también supervivencia, por lo que fue posible compilar una extensa tabla de concentración letales  $LC_{50}$  (Tabla VII). Estas varían entre valores mayores a  $9.4 \mu\text{g L}^{-1}$  en neonatos de *D. magna* luego de 24 horas de exposición (Toumi et al., 2013), a valores tan bajos como  $0.0006 \mu\text{g L}^{-1}$  en larvas (Zoea II) de la langosta americana (*H. americanus*) luego de 24 h de exposición (Burrige et al., 2014). Evidentemente esta diferencia, de  $\sim 15.000$  veces en la  $LC_{50}$ , refleja las diferentes sensibilidades de organismos a la deltametrina (Tabla VII). Incluso diferentes cepas de *D. magna* presentan diferencias en la  $LC_{50}$ . Por ejemplo, Toumi et al. (2013), reportaron que neonatos de la cepa 1 son un 6 % más resistentes que los neonatos de la cepa 2. De la tabla VII también es evidente que mientras mayor es el tiempo de exposición, menores concentraciones de deltametrina son necesarias para eliminar al 50 % de la población. Así, dada la concentración recomendada de deltametrina por uno de los fabricantes ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para el control de *C. rogercresseyi* (SEPA, 2005), es evidente que está por sobre los valores  $LC_{50}$  reportados para la mayoría de los crustáceos estudiados a la fecha (Tabla VII). Además, es importante considerar el tiempo de exposición, ya que aún en bajas concentraciones producto de la dilución una vez liberada la deltametrina al ambiente marino, puede ser letal bajo una exposición prolongada. Por ejemplo, concentraciones tan bajas como de  $0.0332 \mu\text{g L}^{-1}$  han sido reportadas suficientes para causar una mortalidad del 50 % de la población de *Gammarus pulex* luego de 96 h de exposición (Adam et al., 2010).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla VII. Resumen de las concentraciones de deltametrina necesarias para matar al 50 % de la población, en diferentes especies de crustáceos de agua dulce y salada, y algunos poliquetos. No se encontró esta información para bivalvos. ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición**

Especie	Grupo	ED	LC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Te (°C)	Tpo (h)	Referencia
<i>D. magna cepa 1</i>	Crustáceo/ Cladóceros	Neonatos	9,4	20	24	Toumi et al., 2013
<i>D. magna cepa 1</i>		Neonatos	0,32	20	48	Toumi et al., 2013
<i>D. magna cepa 2</i>		Neonatos	8,86	20	24	Toumi et al., 2013
<i>D. magna cepa 2</i>		Neonatos	0,63	20	48	Toumi et al., 2013
<i>P. serratus</i>	Crustáceo/ Camarón	Adultos	0,05	18	96	Oliveira et al., 2012
<i>D. magna cepa 3</i>		Neonatos	0,88	20	48	Toumi et al., 2015
<i>G. fossarum</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adultos	0,004	15	48	Adam et al., 2010
<i>G. fossarum</i>		Adultos	0,0332	15	96	Adam et al., 2010
<i>G. pulex</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adultos	0,0057	15	48	Adam et al., 2010
<i>G. pulex</i>		Adultos	0,068	15	96	Adam et al., 2010
<i>E. finmarchicus</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adultos	0,0095	10	24 + 72 recuperación	Van Geest et al., 2014
<i>E. finmarchicus</i>		Adultos	0,07	10	1 + 95 recuperación	Van Geest et al., 2014
<i>H. americanus</i>	Crustáceo/ Langosta	Estadio I	0,0034	8-14	1	Burridge et al., 2014
<i>H. americanus</i>		Estadio I	0,0008	8-14	24	Burridge et al., 2014
<i>H. americanus</i>		Estadio II	0,0006	8-14	24	Burridge et al., 2014
<i>H. americanus</i>		Estadio IV	0,0017	8-14	24	Burridge et al., 2014
<i>H. americanus</i>		Adultos	0,0188	8-14	1	Burridge et al., 2014
<i>H. americanus</i>		Adultos	0,015	8-14	24	Burridge et al., 2014
<i>C. septemspinosa</i>	Crustáceo/ Camarón	Adultos	0,142	8-14	1	Fairchild et al., 2010
<i>C. septemspinosa</i>		Adultos	0,0027	8-14	24	Burridge et al., 2014
<i>Mysid sp.</i>	Crustáceo/ Misidáceo	Adultos	0,0139	8-14	1	Burridge et al., 2014
<i>Mysid sp.</i>		Adultos	0,0014	8-14	24	Burridge et al., 2014
<i>M. lar</i>	Crustáceo/ Camarón	Adultos	0,05	25,5	48	Bajet et al., 2012
<i>M. lar</i>		Adultos	0,26	25,5	24	Bajet et al., 2012
<i>D. magna</i>	Crustáceo/ Cladóceros		3,5		48	Morky & Hoagland, 1990



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

<i>D. magna</i>			0,038		48	Morky & Hoagland, 1990
<i>D. magna</i>			0,05		48	Day, 1991
<i>D. magna</i>			1,01		48	Day, 1991
<i>D. magna</i>			0,85		48	Day, 1991
<i>D. magna</i>			0,64		24	Day, 1991
<i>D. magna</i>			3,42		24	Day, 1991
<i>D. magna</i>			4,65		24	Day, 1991
<i>P. aibuhitensis</i>	Poliqueto	Adultos	0,26	18	100	Chen et al., 2012
<i>C. dubia</i>	Crustáceo/ Cladóceros	neonatos	0,84	24	24	Shen et al., 2012
<i>C. dubia</i>		neonatos	0,06	24	48	Shen et al., 2012
<i>C. dubia</i>		neonatos	0,116	24	192	Shen et al., 2012

Es bien conocido que estadios larvarios o tempranos son más sensibles a contaminantes que estadios adultos, sin embargo, no se observa claramente este patrón en la tabla VII. De manera similar, y basados en el mismo ejemplo, parece ser que no hay un patrón tan claro entre el tamaño del animal y su sensibilidad a la deltametrina (tabla VII). Esto probablemente esté relacionado con el mecanismo de acción de la deltametrina, que, al afectar el sistema nervioso, pequeñas concentraciones son suficientes para afectar a los organismos, independiente de su estadio de desarrollo y/o tamaño. De hecho, de los estudios existentes a la fecha se puede concluir que la deltametrina es altamente tóxica para organismos tanto pelágicos como bentónicos, independientemente de su estadio y tamaño. Los efectos de la deltametrina en bivalvos de importancia económica en Chile no han sido evaluados en detalle, resaltando la premura de su evaluación.

### 3.3.2 Respuestas conductuales

Reducidos estudios han evaluado algunas respuestas conductuales, o relacionadas, a la deltametrina. En el camarón *P. serratus* se demostró que la velocidad de nado disminuye significativamente en concentraciones iguales o superiores a  $0.6 \text{ ng L}^{-1}$  ( $0.0006 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) de deltametrina (Oliveira et al., 2012). Los autores enfatizan la importancia de este efecto, ya



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

que la capacidad de desplazarse determina su capacidad para escapar de depredadores, encontrar alimento y una pareja para reproducirse. Por ende, esta reducción de la velocidad de nado luego de la exposición a deltametrina, tendrá probablemente grandes efectos a nivel poblacional. El otro estudio (Van Geest et al., 2014b), en poliquetos, se encontró que entre el 80 al 100 % de los individuos adultos de *N. virens* no se enterraron en el sedimento contaminado con deltametrina a concentraciones superiores a  $0.32 \mu\text{g g sedimento}^{-1}$ , durante los 7 días que duro el experimento. Los autores también demostraron que en sedimentos contaminados con deltametrina a concentraciones entre 0.11 a  $0.22 \mu\text{g sedimento}^{-1}$ , individuos de *N. virens* se enterraron el primer día, pero entre el 80 al 90 % de ellos emergieron (o parcialmente) durante los tres primeros días de exposición (Van Geest et al., 2014). De manera similar a lo encontrado en *P. serratus*, la inhibición de la capacidad de enterrarse en *N. virens* los expone a depredadores, y por ende compromete la población. Así, aun cuando más investigaciones son necesarias, los escasos estudios sugieren que concentraciones de deltametrina muy inferiores a las utilizadas para el tratamiento de la caligidosis afectan el comportamiento (capacidad de nado) en crustáceos. Por otro lado, concentraciones similares (en el sedimento) a las usadas en el tratamiento de caligidosis inhiben la capacidad de enterrarse en poliquetos. En el chorito de agua dulce *Anodonta cygnea* se ha observado que concentraciones entre 1-5 ppm de deltametrina causan un incremento en el tiempo de apertura del sifón exhalante en cambio concentraciones entre 10- 50 ppm producen la acción contraria y la inhibición de la actividad de filtración (Kontreczky et al. 1997).

### **3.3.3 Respuestas fisiológicas, moleculares y alteraciones en el balance Redox**

Varios de los estudios han evaluado, de una u otra manera, los procesos fisiológicos afectados luego de la exposición a deltametrina. Por ejemplo, en adultos *P. serratus* se ha reportado un incremento en la actividad enzimática de la colinesterasa, encargada de mediar la producción de esteres usados como neurotransmisores, en la musculatura de animales expuestos entre 0.6 a  $2.4 \text{ ng L}^{-1}$  de deltametrina (Oliveira et al., 2012). Así mismo,



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

los autores reportan un incremento en la actividad de esta enzima en la glándula digestiva, luego de la exposición entre 19 a 39 ng L<sup>-1</sup> de deltametrina (Oliveira et al., 2012). Por otro lado, en *P. monodon*, se ha reportado una tendencia a una disminución en la actividad enzimática de colinesterasa en las branquias a concentraciones superiores a 1 ng L<sup>-1</sup> de deltametrina (Tu et al., 2012) y una significativa disminución de la actividad de esta enzima en el musculo luego de 7 días a 100 ng L<sup>-1</sup> deltametrina (Tu et al., 2012).

También se ha reportado un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión transferasa (entre 19 a 39 ng L<sup>-1</sup> deltametrina) y catalasa (a 19 ng L<sup>-1</sup> deltametrina) (Oliveira et al., 2012). Sin embargo, también se reportó un aumento en la oxidación de lípidos, lo que sugiere que la deltametrina produce estrés oxidativo, sobrepasando las defensas antioxidantes en *P. serratus*. En adultos *P. monodon* también se ha reportado un incremento en la oxidación de lípidos luego de 4 días de exposición a 0.1 µg L<sup>-1</sup> deltametrina, efecto que se vuelve a la normalidad luego de 7 días de recuperación (sin deltametrina) (Dorts et al., 2009). Los autores, sin embargo, no encontraron efecto alguno sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (Dorts et al., 2009). Contrariamente, en la misma especie y concentración, se ha reportado una inhibición de las enzimas antioxidantes. Por ejemplo, en adultos *P. monodon*, expuesto a 0.1 µg L<sup>-1</sup> deltametrina se encontró una inhibición de glutatión total, catalasa y glutatión peroxidasa (Tu et al., 2012). Aunque menos claro, los autores también reportan una interacción entre temperatura y salinidad en los efectos de la deltametrina (Tu et al., 2012).

En *Unio elongatulus*, bivalvo de agua dulce, se ha observado un significativo incremento de peroxidación de lípido con el aumento de la concentración de deltametrina y/o al tiempo de exposición y un decrecimiento de la actividad del glutatión y catalasa, no pudiendo actuar a altas concentraciones de deltametrina contra el estrés oxidativo causado por este piretroide (Köprücü et al. 2008).

A nivel molecular varios cambios han sido reportados luego de la exposición a la deltametrina. Toumi et al. (2015) mostraron que luego de 48 h de exposición a 300 ng L<sup>-1</sup>



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

deltametrina, alrededor de 88 proteínas diferentes son sobre expresadas en *D. magna*, y otras 40 son sub-expresadas. También se ha reportado una sobre regulación de enzimas detoxificadoras de la familia CYP. En el poliqueto adulto, *P. aibuhitensis*, la expresión de CYP4 fue sobre regulada luego de 3 h a concentraciones superiores a  $0.013 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina (Chen et al., 2012) y bajas concentraciones se mantuvo elevada incluso por 14 días (Chen et al., 2012).

### 3.3.4 Morfológico

Se han reportado malformaciones en neonatos de *D. magna*, cepa 1, luego de 21 días de exposición a  $80 \text{ ng L}^{-1}$  deltametrina, y luego de 21 días de exposición a  $150 \text{ ng L}^{-1}$  deltametrina en otra cepa de *D. magna*. Los cambios observados incluyen malformaciones en general, sub-desarrollo de anténulas, curvatura en las espinas del caparazón y del abdomen, y cambios en el porcentaje de machos (Toumi et al., 2013). De manera similar y en otro miembro de la misma familia, *C. dubia*, una reducción en el tamaño alcanzado por los adultos ha sido reportada luego de exposición a  $5 \text{ ng L}^{-1}$  deltametrina (Shen et al., 2012).

### 9.1.4 Cipermetrina

La cipermetrina es un piretroide sintético ampliamente utilizado como insecticida para el control de plagas tanto en la agricultura como la acuicultura (Amweng et al., 2005). Este producto fue introducido en el mercado a fines de los 70 y es uno de los piretroides más eficientes en el control de plagas. Los piretroides tienen baja toxicidad para mamíferos (Davies, 1985), pero en general son altamente tóxicos para peces y crustáceos (Anderson, 1989; Coats et al., 1989; Haya, 1989; Mian and Mula, 1992).

Los piretroides actúan sobre la transmisión nerviosa por la interferencia en los canales de sodio (Miller and Adams, 1982) lo que resulta en la despolarización de las neuronas motoras y descarga repetitiva en las terminaciones nerviosas, conduciendo a una eventual parálisis y muerte de los organismos (Crane et al., 2011; Haya et al., 2005).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

La cipermetrina se caracteriza por tener baja solubilidad en el agua y relativamente alto log Kow, 6.6, (Worthing, 1991; Zhou et al., 1995), esta característica fisicoquímica indica que se adhieren al material particulado pudiendo acumularse en el sedimento (Mayor et al., 2008). La fórmula molecular de la cipermetrina es  $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$  ((1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (RS)-ciano-3-Fenoxibencilo (IUPAC)).

Los piretroides principalmente deltametrina y cipermetrina han sido utilizados por la industria salmonera tanto nacional como internacional contra la caligidosis (*C. rogercresseyi*, *L. salmonis* y *Caligus spp*). Estos productos son aplicados a través de baños en las balsas jaulas o en wellboat y una vez transcurrido el periodo de aplicación el producto es liberado y especies no objetivos pueden ser afectadas. Dentro de los productos utilizados con cipermetrina como principio activo por la industria salmonera mundial se encuentra Excis® y Betamax®, este último con registro en el servicio agrícola y ganadero de Chile. Para el caso de los baños realizados con Excis® se recomiendan de 1 hora a una concentración de  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , y para Betamax  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  por 30 minutos. La mayoría de los estudios que han evaluado el efecto de la cipermetrina en organismos marinos no objetivos han sido realizado con Excis®.

### 3.4.1 Letalidad

La mayoría de los estudios que evalúan efectos de la cipermetrina sobre los organismos acuáticos se basan en la evaluación de la supervivencia. Sin embargo, aunque la respuesta final medida es la misma (supervivencia), los estudios difieren en sus metodologías, las cuales en algunos casos no permite extraer la concentración en que muere el 50 % de los organismos ( $LC_{50}$ ) y en otros, debido que los tiempos de exposición al fármaco son distintos, los  $LC_{50}$  no son comparables directamente.

Los efectos de la cipermetrina en los organismos acuáticos dependen la especie, estadio de desarrollo utilizado, pudiendo atribuirse diferencias entre los estadios de desarrollo a mecanismos detoxificantes más avanzados presentes en adultos que en los estadios tempranos del desarrollo y también a diferencias alométricas (relación superficie/volumen, Medina et al., 2002), así como de las condiciones en que se realizan las pruebas de



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

toxicidad como temperatura, pH, contenido de material particulado, entre otros. En el caso particular de la temperatura se ha demostrado que la toxicidad de los piretroides es temperatura dependiente, aumentando la toxicidad a más bajas temperaturas en algunas especies (Coats et al., 1989; Harwood et al., 2009).

La mayoría de los estudios destinados a evaluar la toxicidad de la cipermetrina en organismos acuáticos han sido realizado en especie de agua dulce en su etapa adulta, principalmente anfípodos, cladóceros y copépodos.

La  $LC_{50}$  varía en *Gammarus pulex*, anfípodo de aguadulce entre 116-240 ng L<sup>-1</sup> a las 24 h de exposición (Ashauer et al., 2011; Adam et al., 2009) y se reduce entre 82 - 101 ng L<sup>-1</sup> a las 96 h (Adam et al., 2009) (Tabla VIII). En anfípodos marinos, *Echinogammarus finmarchicus* y *Praunus flexuosus*, la  $LC_{50}$  determinado bajo una exposición de 24 h y 72 h de recuperación es de 77 ng L<sup>-1</sup> (70-83) y 33 ng L<sup>-1</sup> (25-44) y bajo condiciones de una hora de exposición y 95 h de recuperación, el  $LC_{50}$  aumenta a 220 ng L<sup>-1</sup> (130-390) y >140 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente (Van Geest et al. 2014), otros anfípodos presentan  $LC_{50}$  entre 6860 y 65 ng L<sup>-1</sup> (Tabla VIII). Determinaciones realizadas en el anfípodo *Corphium volutator* expuestos a sedimento con cipermetrina por 10 días indican  $LC_{50}$  es de 5 ng L<sup>-1</sup> (4-6) (Mayor et al., 2008) (Tabla VIII).

En adultos del cladócero de agua dulce *Daphnia cuculata* se observa que la concentración letal disminuye con las horas post exposición, patrón observado en general para todos los organismos, mostrando un  $LC_{50}$  de 50 ng L<sup>-1</sup> entre las 24 y 48 h y una reducción en un 40 % de la concentración letal a las 96 y 264 h (Tabla VIII) (Wendt-Rasch et al., 2003). En neonatos de *Ceriodaphnia dubia* y *D. magna* la concentración letal al 50 % a las 48 h es de 230 ng L<sup>-1</sup> (140-390) y 2800 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente (Shen et al., 2012; Feo et al., 2013).

En adultos del copépodo de agua dulce *Eudiaptomus graciloides* la concentración en que muere el 50 % varía desde 270 ng L<sup>-1</sup> (42-886) con 4 h de exposición a 30 ng L<sup>-1</sup> (2-186) a las 96 h de exposición (Wendt- Ransch et al., 2003), en copépodos marinos como *Acartia tonsa* se ha estimado  $LC_{50}$  de similar orden de magnitud que el reportado para la anterior especie (142 ng L<sup>-1</sup>, Barata et al., 2002a), en nauplii de *A. tonsa* el  $LC_{50}$  disminuye



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

considerablemente a  $5 \text{ ng L}^{-1}$  (Medina et al., 2002) siendo este valor uno de los más bajos reportados en la literatura (Tabla VIII).

Bajet et al. (2012) reportan un  $LC_{50}$  para el camarón de agua dulce *Macrobrachium lar* de  $1070 \text{ ng L}^{-1}$  (740-1530) a las 48 h y de  $1330 \text{ ng L}^{-1}$  (920-1890) a las 24 h. Contrastando con las especies marinas de camarones que se tiene conocimiento, las concentraciones en que muere el 50 % son dos órdenes de magnitud más bajas, correspondiendo para el camarón carideo *Palaemonetes pugio* a  $16 \text{ ng L}^{-1}$  a las 96 h (Mugni et al., 2013).

Estudios en otros crustáceos, específicamente la langosta americana *H. americanus*, muestra claramente la gran dependencia de la  $LC_{50}$  a los tiempos de exposición a la cipermetrina, así como la respuesta diferencial de los organismos según su estadio de desarrollo. *H. americanus* adultos, presentan una  $LC_{50}$  de  $40 \text{ ng L}^{-1}$  a las 96 h, aumentando aproximadamente al doble con la reducción de 24 h de exposición (Burrige et al., 1999; McLeese et al., 1980; Burrige et al., 2000 a, b). En general, para los estadios larvales de *H. americanus* se observa un aumento de la sensibilidad a la cipermetrina desde el estadio I al III ( $180$  a  $60 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente, Burrige et al., 2000b) (Tabla VIII).

El grupo de los Anostraca (*A. salina* y *Thamnocephalus platyurus*) junto con los rotíferos (*Brachionus calyciflorus* y *B. plicatilis*) presenta la más alta tolerancia a la cipermetrina, siendo sus  $LC_{50}$  varios ordenes de magnitud superiores a las otras especies evaluadas (Tabla VIII)

Aunque, existe abundantes reportes que determinan  $LC_{50}$  en crustáceos se observa una carencia de estudios en crustáceos braquiuros y anomuros principalmente en sus estadios larvales, así como en general de estadios larvales de invertebrados marinos con ciclo de vida complejo, los cuales se desarrollan en la columna de agua, aumentando la probabilidad de quedar expuestos a los distintos quimioterapéuticos durante su desarrollo planctónico.

Dentro de las especies, distinta a los crustáceos, en las cuales se ha determinado  $LC_{50}$  se encuentra el poliqueto *Polydora cornuta*, para el cual Ernst et al. (2001) encuentran que los juveniles tienen alta tolerancia a la cipermetrina determinando una concentración de  $27800 \text{ ng L}^{-1}$ .



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

En general, los  $LC_{50}$  determinados en las distintas especies (Tabla VIII) son varios ordenes de magnitud inferiores a las concentraciones recomendadas por el fabricante para el control de la caligidosis. Estudios realizados para evaluar la dispersión de la cipermetrina post-aplicación han detectado varias horas después, entre 2 a 5.5 h, a una distancia de 0.9 a 3 km del sitio de aplicación, concentraciones equivalentes a diluciones entre 1000-2000 veces de las concentraciones liberadas (aproximadamente entre 15 a 7.5  $ng L^{-1}$ ) (Ernst et al., 2001, 2014). En los estudios anteriormente mencionados, la concentración más alta medida de cipermetrina fue 187  $ng L^{-1}$  a los 25 minutos post-aplicación a una distancia de 25 metros, en el caso del estudio realizado por Willis et al. (2005) llevado a cabo en la costa oeste de Escocia. La concentración alcanzada a los 25 minutos el primer día de aplicación fue de 218  $ng L^{-1}$ . Hunter and Fraser (1995), indican que la concentración de cipermetrina después de 30 minutos fue de 74  $ng L^{-1}$  y después de 50 minutos 13  $ng L^{-1}$ . Complementariamente, en el estudio realizado por Willis et al. (2005) una aplicación total de 78 g de cipermetrina predice concentraciones de 3000  $ng L^{-1}$  para cortos periodos después de la aplicación, concentraciones mayores a 0.5  $ng L^{-1}$  a las 24 h solo fueron predicha para menos del 2 % del área tratada y los 16  $ng L^{-1}$  a las 3 h post aplicación solo fue excedida en menos de 0.3 % del área, tomando como base cada tratamiento diario. Los estudios de dispersión de la cipermetrina muestran una rápida degradación del compuesto y una pequeña área de impacto, sin embargo es importante evaluar la respuesta de los organismos bajo condiciones de aplicación periódica y no solo los efectos letales sino también los efectos retardados y los efectos sub letales que pueden sufrir los organismos, como la inmovilidad que en el campo pueden aumentar las probabilidades de mortalidad por depredación o por la incapacidad de los organismos pelágicos de permanecer en la columna de agua siendo esto especialmente crítico para los estadios larvales planctónicos de la mayoría de los invertebrados marinos.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla VIII. Resumen de las contracciones de cipermetrina necesarias para matar al 50 % de la población (LC<sub>50</sub>), en diferentes especies de crustáceos de marinos, de agua dulce (\*) y estuarinos (\*\*) y rotíferos de agua marinos y de agua dulce. (s) determinaciones realizadas con sedimento (µg Kg<sup>-1</sup>), LC<sub>50</sub>: promedio (Intervalo de confianza del 95 %). ED: estadio de desarrollo; Te: temperatura; Tpo: tiempo de exposición + recuperación**

Especie	Grupo	ED	LC <sub>50</sub> (ng L <sup>-1</sup> )	Te (°C)	Tpo (h)	Referencia
<i>Echinogammarus finmarchicus</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	220 (130-390)	10	1h+95	Van Geest et al., 2014
<i>Echinogammarus finmarchicus</i>		Adulto	77 (70-83)	10	24h+72	Van Geest et al., 2014
<i>Praunus flexuosus</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	>142	14	1h+95	En VanGeest et al., 2014
<i>Praunus flexuosus</i>		Adulto	33 (25-44)	14	24h+72	En VanGeest et al., 2014
<i>Eohaustorius estuarius</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	1000-3600	15±1	48	Ernst et al., 2001
<i>Amphiporeia virginiana</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	12 (0-20)	15	48h+48	Ernst et al., 2001
<i>Amphiporeia virginiana</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	6860 (4410-9300) 7420 (4240-1060)	15	48	Ernst et al., 2001
<i>Hyalella curvispina</i> *	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	65±3	22	48	Mugni et al., 2013
<i>Hyalella azteca</i> * (s)	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	3,6-23		10 días	Maund et al. 2002
<i>Gammarus spp</i>	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	65±3	22	48	Mugni et al., 2013
<i>Gammarus pulex</i> *	Crustáceo/ Anfípodo		240		24	Ashauer et al., 2011
<i>Gammarus pulex</i> *		Adulto	116-135	15	24	Adam et al., 2009
<i>Gammarus pulex</i> *		Adulto	98-116	15	48	Adam et al., 2009
<i>Gammarus pulex</i> *		Adulto	84-103	15	72	Adam et al., 2009
<i>Gammarus pulex</i> *		Adulto	82-101	15	96	Adam et al., 2009
<i>Corophium volutator</i> (s)	Crustáceo/ Anfípodo	Adulto	5 (4-6)	15±1	10 días	Mayor et al., 2008
<i>Daphnia cucullata</i> *	Crustáceo/ Cladóceros	Adulto	50 (2-)	16.3-19	24	Wendt-Rasch et al. 2003
<i>Daphnia cucullata</i>		Adulto	50 (9-)	16.3-19	48	Wendt-Rasch et al. 2003



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

<i>Daphnia cucullata</i>		Adulto	30 (8-)	16.3-19	96	Wendt-Rasch et al. 2003
<i>Daphnia cucullata</i>		Adulto	30 (20-57)	16.3-19	264	Wendt-Rasch et al. 2003
<i>Daphnia magna</i>			720		48	Ashauer et al. 2011
<i>Daphnia magna</i>		Neonatos	2800	20±0,5	48	Feo et al., 2013
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustáceo/	Neonatos	2500 (1840-3400)	23-25	24	Shen et al., 2012
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Cladóceros					
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustáceo/	Neonatos	230 (140-390)	23-25	48	Shen et al., 2012
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Cladóceros					
Copépodos* (sin identificación)	Crustáceo/	Nauplii	170 (<1-)	16.3-19	4h	Wendt-Rasch et al. 2003
<i>Cyclops spp*</i>	Copépodo					
<i>Cyclops spp*</i>	Crustáceo/	Adult	170 (1-)	16.3-19	4h	Wendt-Rasch et al. 2003
<i>Cyclops spp*</i>	Copépodo					
<i>Cyclops spp*</i>	Crustáceo/	Adult	180 (<1-2563)	16.3-19	24h	Wendt-Rasch et al. 2003
<i>Cyclops spp*</i>	Copépodo					
<i>Diaptomus forbesi*</i>	Crustáceo/		30		48	Saha and Kaviraj, 2008
<i>Diaptomus forbesi*</i>	Copépodo					
<i>Oithona similis*</i>	Crustáceo/		240		48	Willis and Ling, 2004
<i>Oithona similis*</i>	Copépodo					
<i>Temora longicornis</i>	Crustáceo/		740		48	Willis and Ling, 2004
<i>Temora longicornis</i>	Copépodo					
<i>Acartia clause</i>	Crustáceo/		2670		48	Willis and Ling, 2004
<i>Acartia clause</i>	Copépodo					
<i>Acartia tonsa</i>	Crustáceo/	Adulto	142			Barata et al., 2002 a
<i>Acartia tonsa</i>	Copépodo					
<i>Acartia tonsa</i>		Nauplii	5			Medina et al., 2002
<i>Tisbe battagliai</i>	Crustáceo/	Adulto	52			Barata et al. 2002b
<i>Tisbe battagliai</i>	Copépodo					
<i>Macrobrachium lar*</i>	Crustáceo/	Adulto	1330 (920-1890)	25.5±1	24	Bajet et al. 2012
<i>Macrobrachium lar*</i>	Camarón					
<i>Macrobrachium lar*</i>		Adulto	1070 (740-1530)	25.5±1	24	Bajet et al. 2012
<i>Paratya australiensis*</i>	Crustáceo/	Adulto	19 (25-27)	23±1	96	Kumar et al., 2010
<i>Paratya australiensis*</i>	Camarón					
<i>Palaemonetes pugio</i>	Crustáceo/		16		96	En Mugni et al. 2013
<i>Palaemonetes pugio</i>	Camarón					
<i>Homarus americanus</i>	Crustáceo/	Adulto	1800	10±1	30	Burridge et al. 2000a
<i>Homarus americanus</i>	Langosta				min+25,5	
<i>Homarus americanus</i>		Adulto	140	10	24	Burridge et al. 2000b
<i>Homarus americanus</i>		Adulto	81	10±1	48	Burridge et al. 2000a
<i>Homarus americanus</i>		Adulto	40		96	Mc Leese et al., 1980
<i>Homarus americanus</i>						Burridge et al. 1999



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

<i>Homarus americanus</i>		Larva	180	10	48	Burridge et al. 2000b
<i>Homarus americanus</i>		Estadio I	(20-320)			
<i>Homarus americanus</i>		Larva	120	10	48	Burridge et al., 2000b
<i>Homarus americanus</i>		Estadio II	(60-180)			
<i>Homarus americanus</i>		Larva	660-1690	10-12	5 min+12	Pahl and Opitz, 1999
<i>Homarus americanus</i>		Estadio II				
<i>Homarus americanus</i>		Larva	58-365	10-12	12+12	Pahl and Opitz, 1999
<i>Homarus americanus</i>		Estadio II				
<i>Homarus americanus</i>		Larva	60	10	48	Burridge et al., 2000b
<i>Homarus americanus</i>		Estadio III	(30-90)			
<i>Homarus americanus</i>		Larva	120	10	48	Burridge et al., 2000b
<i>Homarus americanus</i>		Estadio IV	(80-170)			
<i>Artenia franciscana</i>	Crustáceo	Larva	4720000	25	24	Sánchez-Fortún & Barahona, 2005
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	/Anostraca	Larva	(390000-573000)			
<i>Brachionus calyciflorus*</i>	Crustáceo	Larva	670000	25	24	Sánchez-Fortún & Barahona, 2005
<i>Bachionus plicatilis(**)</i>	/Anostraca	Larva	(550000-810000)			
<i>Bachionus plicatilis(**)</i>	Rotífero	Larva	80000	25	24	Sánchez-Fortún & Barahona, 2005
<i>Bachionus plicatilis(**)</i>	Rotífero	Larva	(50000-140000)			
<i>Bachionus plicatilis(**)</i>	Rotífero	Larva	300000	25	24	Sánchez-Fortún & Barahona, 2005
<i>Bachionus plicatilis(**)</i>	Rotífero	Larva	(260000-350000)			

### 3.4.2 Respuestas conductuales

Van Geest et al. (2014) indican que copépodos marinos son inmovilizados en concentraciones de cipermetrina (Excis ®) similares a las utilizadas en la industria salmonera, siendo la alimentación de partículas inhibida y la EC<sub>50</sub> (determinada a través de la inhibición de la alimentación) determinado en concentraciones de cipermetrina entre 0.098-0.36 µg L<sup>-1</sup>, basado en una exposición de 1 h y recuperación de 5 h. La inhibición de la alimentación también ha sido observada por Barata et al. (2002a) en copepoditos de 8 días de edad de *A. tonsa* indicando que EC<sub>50</sub> fue de 0.065 (0.041-0.089 µg L<sup>-1</sup>) y para adultos de *Tisbe battagliai* fluctuó entre 0.098-0.32 µg L<sup>-1</sup>. Las concentraciones utilizadas si bien no conducen a la muerte directamente, la inmovilización aumenta las probabilidades de mortalidad al aumentar los riesgos de depredación, así como disminuir la probabilidad de permanecer en la columna de agua. Concentraciones que producen la inmovilización de



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

los organismos estudiados son 13-51 veces más diluidas que las utilizadas en acuicultura ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  Excis® y  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  Betamax) (Van Geest et al., 2014) y según los reportes de Ernst et al. (2001) para Excis® estas concentraciones pueden estar presentes entre 20 min a 1.5 h y en algunos casos extremos hasta las 6 h post-exposición en el área donde se realizó la aplicación de cipermetrina.

### 3.4.3 Respuestas fisiológica, celular y bioquímica

Estudios indican que la cipermetrina puede producir especies reactivas del oxígeno (ROS) y por esto inducir el stress oxidativo. ROS como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superóxido ( $\text{O}_2$ ) y radicales de hidroxilos (OH) son capaces de reaccionar con macromoléculas biológicas y conducir a la carbonilación de proteínas, peroxidación de lípidos y daño del DNA (Bagchi et al., 1995). Los ROS juegan un rol importante en la modulación del sistema inmune y el stress oxidativo es uno de los mecanismos más importantes a través del cual los contaminantes inducen la toxicidad en los organismos marinos.

En el hepatopáncreas de *Procambarus clarkii*, la exposición a la cipermetrina en concentraciones entre  $0.005$  a  $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$  a partir de las 24 h de exposición, produce un incremento en las especies reactivas de oxígeno y presenta los más altos niveles de ROS a las 48 h de exposición a  $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ . En conjunto al aumento de las ROS con la exposición a la cipermetrina, se observa también un aumento en la actividad de la superóxido de dismutasa, enzima que junto a la catalasa están encargadas de descomponer los aniones de superóxido y peróxido de hidrógeno, las cuales juegan un rol crucial en la primera línea de defensa de los organismos contra el exceso de radicales libres. Este aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes no es sostenido y decrece después de 72 h de exposición a la cipermetrina (Wei and Yang, 2015a) teniendo como consecuencia altos niveles de carbonilación de proteínas y peroxidación de lípidos en el hepatopáncreas de *P. clarkii* con el aumento de la concentración de cipermetrina. Adicionalmente, a las consecuencias mencionadas por el aumento de los ROS aumentan los riesgos de inmunodepresión. Efectos sub letales de cipermetrina evaluados en branquias de este



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

mismo camarón, *P. clarkii*, indican similares consecuencias que las observadas en el hepatopáncreas, es decir disminución en la actividad de las enzimas oxidativas aumento en la carbonilación de proteínas y peroxidación de lípidos. Así también, las branquias de los camarones después de ser expuestos a beta-cipermetrina (concentraciones nominales 0.005-0.04  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por 96 h presentan importantes daños, como inflamación en los filamentos branquiales y las células epiteliales de las lamelas aparentemente fusionadas o necróticas. Debido a la alta sensibilidad de las branquias a los contaminantes tóxicos en general y en particular su respuesta a los contaminantes a través de la carbonilación de proteínas, estas estructuras son propuestas como adecuadas para realizar biomonitoreo (Wei and Yang, 2015b).

En *Unio gibbus*, un bivalvo de agua dulce, bajo concentraciones entre 59.7 y 97.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  y exposición por 96 h también presentaron estrés oxidativo, con un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa, catalasa, así como un aumento en la concentración peróxido de hidrógeno, peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas en la branquia (Khazri et al. 2015). Los resultados de este estudio sugieren que la cipermetrina puede ser acumulada por *U. gibbus* probablemente debido a la naturaleza lipofílica y a su rápida remoción desde el agua debido a su característica hidrofóbica.



## Universidad Austral de Chile

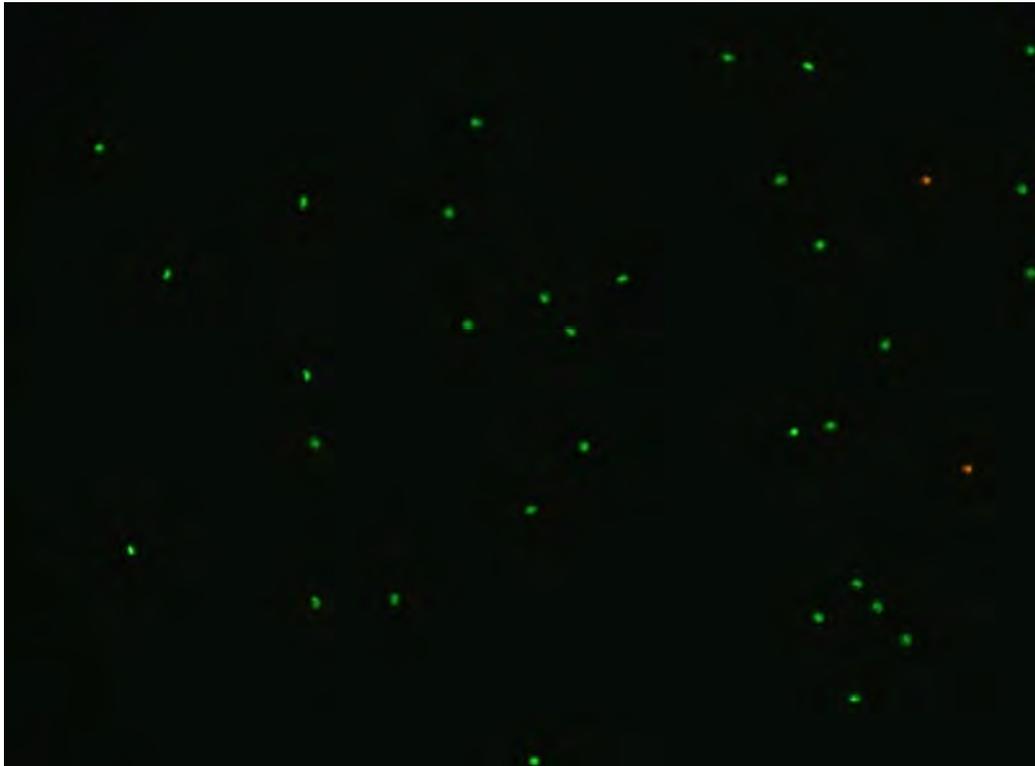
Instituto de Acuicultura

9.2 Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola (*Cancer edwardsii*), bajo condiciones controladas

9.2.1 Experimentos en adultos de jaiba marmola

### 9.2.1.1 Exposición aguda en la viabilidad espermática y en el tejido ovárico

Los porcentajes de viabilidad espermática, medidos con técnicas fluorescentes (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit), no mostraron mayores diferencias entre los tratamientos, incluidos el control (Ver Tabla IX ANOVA). En todos los casos, la viabilidad espermática mostro valores superiores a los 85% (Figuras 29 y 30),

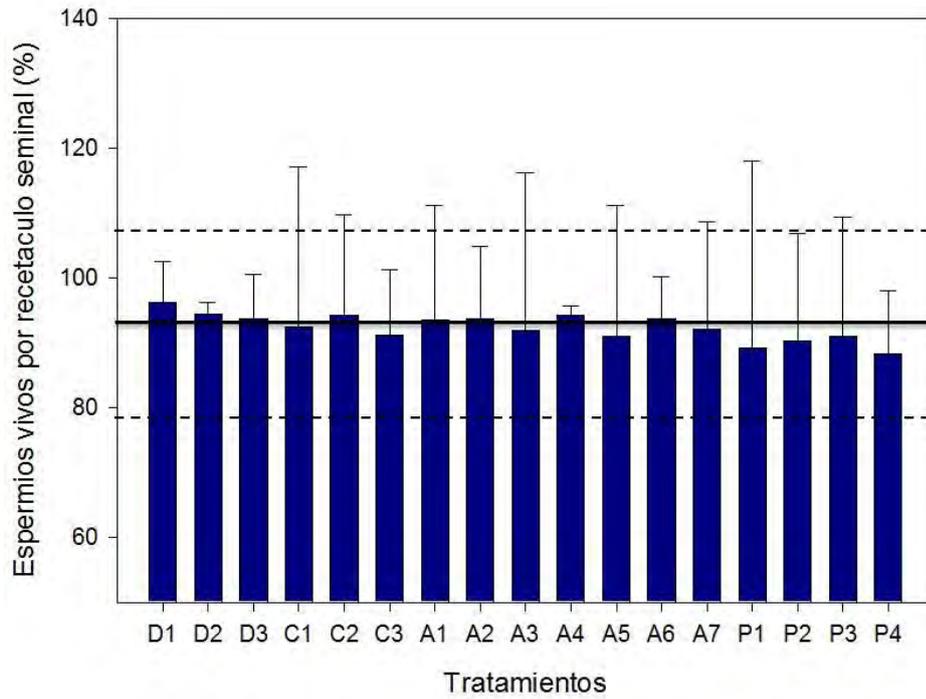


29 Figura 29. Aplicación de la técnica fluorescente para la estimación de viabilidad, espermios verdes = vivos, espermios rojos = muertos.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



30 Figura 30. Media del porcentaje de viabilidad de espermios dentro del receptáculo seminal en hembras expuestas a diferentes niveles de compuestos. Línea continua representa la media del control y las discontinuas su desviación estándar. D1,D2, ... Deltametrina; C1,C2, ... Cipermetrina; A1,A2, ... Azametifos; P1,P2, ... Peróxido.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla IX. Análisis de varianza para comparar los efectos de los diferentes compuestos sobre la viabilidad espermática. Se compara el control y los diferentes niveles (concentraciones) de cada producto.**

Fuentes de variación	Df	MS	F	p
Control y Peróxido	4	11,0	0,63	0,645
Error	30	17,5		
Control y Azametifos	7	11,4	0,82	0,579
Error	48	13,9		
Control Deltametrina	y 3	22,6	2,29	0,110
Error	20	9,9		
Control Cipermetrina	y 3	10,7	0,65	0,594
Error	20	16,6		

Los efectos de los compuestos sobre el tejido ovárico fueron comparados entre los tratamientos y el control. Debido a que se encontraron ovarios en diferentes estadios de desarrollo, no presentes en el control, se usó también como referencia las descripciones hechas por Pardo et. al (2009) en esta misma especie.

Los resultados de cada hembra experimental se presentan en la Tabla X. En general no existieron mayores alteraciones en el tejido ovárico en todas las etapas de desarrollo (Tabla XI), solo se puede detectar lisis celular en los oocitos en algunas de las réplicas, pero estas no difieren mayormente a las del control. La única excepción a esto fue los tratamientos con cipermetrina (1.5 ppb) donde la mayoría de las réplicas presentaron varios oocitos con lisis de la membrana celular. Cabe señalar que esto solo ocurrió en los estadios avanzados de desarrollo (IV y V).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla X. Efectos en el ovario de hembras de *Cancer edwardsii* producto de la exposición de diferentes compuestos en distintas concentraciones por 24 h**

Tratamiento	Concentracion	Replic	Estadio gonad	Oocitos	observaciones
Control	Control	1	V	Normal	
Control	Control	2	V	Normal	
Control	Control	3	V	Normal	
Control	Control	4	V	Normal	
Control	Control	5	V	Normal	
Control	Control	6	V	Normal	
Control	Control	7	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Peroxido de hidrogeno	1	1	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	1	2	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	1	3	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	1	4	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	1	5	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Peroxido de hidrogeno	1	6	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	1	7	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	2	1	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	2	2	III	Normal	
Peroxido de hidrogeno	2	3	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	2	4	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	2	5	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	2	6	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	2	7	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	3	1	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	3	2	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	3	3	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	3	4	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	3	5	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	3	6	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	3	7	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	4	1	III	Normal	
Peroxido de hidrogeno	4	2	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	4	3	muerta		
Peroxido de hidrogeno	4	4	V	Normal	
Peroxido de hidrogeno	4	5	muerta		
Peroxido de hidrogeno	4	6	IV	Normal	
Peroxido de hidrogeno	4	7	muerta		
Peroxido de hidrogeno	5 - 7	1 - 7	muertas		



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Azametifos	1	1	V	Normal	
Azametifos	1	2	V	Normal	
Azametifos	1	3	V	Normal	
Azametifos	1	4	V	Normal	
Azametifos	1	5	V	Normal	
Azametifos	1	6	VI	Normal	Oocitos remanentes
Azametifos	1	7	V	Normal	
Azametifos	2	1	IV	Normal	
Azametifos	2	2	V	Normal	
Azametifos	2	3	V	Normal	
Azametifos	2	4	V	Normal	
Azametifos	2	5	IV	Normal	
Azametifos	2	6	VI	Normal	Oocitos remanentes
Azametifos	2	7	V	Normal	
Azametifos	3	1	V	Normal	
Azametifos	3	2	V	Normal	
Azametifos	3	3	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Azametifos	3	4	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Azametifos	3	5	IV	Normal	
Azametifos	3	6	IV	Normal	
Azametifos	3	7	V	Normal	
Azametifos	4	1	V	Normal	
Azametifos	4	2	IV	Normal	
Azametifos	4	3	V	Normal	
Azametifos	4	4	III	Normal	
Azametifos	4	5	IV	Normal	
Azametifos	4	6	V	Normal	
Azametifos	4	7	IV	Normal	
Azametifos	5	1	V	Normal	
Azametifos	5	2	VI	Normal	Oocitos remanentes
Azametifos	5	3	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Azametifos	5	4	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Azametifos	5	5	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Azametifos	5	6	V	Normal	
Azametifos	5	7	IV	Normal	
Azametifos	6	1	V	Normal	
Azametifos	6	2	IV	Normal	
Azametifos	6	3	V	Normal	
Azametifos	6	4	V	Normal	
Azametifos	6	5	IV	Normal	
Azametifos	6	6	V	Normal	
Azametifos	6	7	IV	Normal	
Azametifos	7	1	VI	Normal	
Azametifos	7	2	IV	Normal	
Azametifos	7	3	V	Normal	
Azametifos	7	4	IV	Normal	
Azametifos	7	5	V	Normal	
Azametifos	7	6	V	Normal	
Azametifos	7	7	IV	Normal	



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tratamiento	Concentracion	Replic	Estadio gonad	Oocitos	observaciones
Cipermetrina	1	1	V	Normal	
Cipermetrina	1	2	IV	Normal	
Cipermetrina	1	3	V	Normal	
Cipermetrina	1	4	IV	Normal	
Cipermetrina	1	5	IV	Normal	
Cipermetrina	1	6	V	Normal	
Cipermetrina	1	7	III	Normal	
Cipermetrina	2	1	V	Normal	
Cipermetrina	2	2	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Cipermetrina	2	3	V	Normal	Post vitelogeneticos, 1% presentan lisis
Cipermetrina	2	4	V	Normal	
Cipermetrina	2	5	III	Normal	
Cipermetrina	2	6	muerta	Normal	
Cipermetrina	2	7	muerta		
Cipermetrina	3	1	V	Normal	
Cipermetrina	3	2	V	Normal	
Cipermetrina	3	3	V	Normal	Post vitelogeneticos, 5% presentan lisis
Cipermetrina	3	4	V	Normal	
Cipermetrina	3	5	III	Normal	
Cipermetrina	3	6	muerta		
Cipermetrina	3	7	muerta		
Cipermetrina	4	1	IV	Normal	
Cipermetrina	4	2	muerta		
Cipermetrina	4	3	muerta		
Cipermetrina	4	4	muerta		
Cipermetrina	4	5	muerta		
Cipermetrina	4	6	muerta		
Cipermetrina	4	7	muerta		
Cipermetrina	5 - 7	1 - 7	muertas		
Deltametrina	1	1	VI		
Deltametrina	1	2	III		
Deltametrina	1	3	IV		
Deltametrina	1	4	VI		
Deltametrina	1	5	V		
Deltametrina	1	6	III		
Deltametrina	1	7	IV		
Deltametrina	2	1	IV		
Deltametrina	2	2	V		
Deltametrina	2	3	V		
Deltametrina	2	4	V		
Deltametrina	2	5	Anormal		
Deltametrina	3	1	VI		
Deltametrina	3	2	III		
Deltametrina	3	3	V		
Deltametrina	3	4	IV		
Deltametrina	3	5	VI		



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla XI. Estados gonadales del ovario de las hembras en los experimentos de exposición aguda**

Tratamiento agudo	Concentración	N°	Estado ovárico						Anormal
			I	II	III	IV	V	VI	
<b>Control</b>	Agua de Mar	7	0	0	0	0	7	0	
<b>Peróxido de Oxígeno</b>	1	7	0	0	0	4	3	0	
	2	7	0	0	1	2	4	0	
	3	7	0	0	0	1	6	0	
	4	4	0	0	1	1	2	0	
	4 - 7		Muertas en el experimento						
<b>Azametifos</b>	1	7	0	0	0	0	6	1	
	2	7	0	0	0	2	4	1	
	3	8	0	0	0	3	5	0	
	4	7	0	0	1	3	3	0	
	5	7	0	0	0	1	5	1	
	6	7	0	0	0	3	4	0	
	7	7	0	0	0	3	3	1	
<b>Cipermetrina</b>	1	7	0	0	1	3	3	0	
	2	5	0	0	1	0	4	0	
	3	5	0	0	1	0	4	0	
	4	1	0	0	0	1	0	0	
	5 - 7		Muertas en el experimento						
<b>Deltametrina</b>	1	7	0	0	2	2	1	2	
	2	5	0	0	0	1	3	0	1
	3	5	0	0	1	1	1	2	
	4 - 7		Muertas en experimento						

## 9.2.1.2 Exposición crónica en el tejido ovárico

Los efectos de los compuestos sobre el tejido ovárico fueron comparados entre los tratamientos y el control. Al igual que para la exposición aguda, se encontraron ovarios en diferentes estadios de desarrollo, por lo que se usó también como referencia las descripciones hechas por Pardo et. al (2009) en esta misma especie.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Los resultados de cada hembra experimental se presentan en la Tabla XII. En general no existieron mayores alteraciones en el tejido ovárico en todas las etapas de desarrollo (Tabla XIII), solo se puede detectar lisis celular en los oocitos en algunas de las réplicas, pero estas no difieren mayormente a las del control.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla XII. Efectos en el ovario de hembras de *Cancer edwardsii* producto de la exposición crónica de diferentes compuestos en distintas concentraciones**

Tratamiento	Concentracion	Replic	Estadio gonad	Oocitos
Control	Control	1	VI	Normal
Control	Control	2	III	Normal
Control	Control	3	V	Normal
Control	Control	4	IV	Normal
Control	Control	5	VI	Normal
Peroxido de hidrogeno	1	1	V	Normal
Peroxido de hidrogeno	1	2	IV	Normal
Peroxido de hidrogeno	1	3	V	Normal
Peroxido de hidrogeno	1	4	V	Normal
Peroxido de hidrogeno	1	5	V	Normal
Peroxido de hidrogeno	1	6	III	Normal
Peroxido de hidrogeno	1	7	III	Normal
Peroxido de hidrogeno	2	1	III	Normal
Peroxido de hidrogeno	2	2	IV	Normal
Peroxido de hidrogeno	2	3	IV	Normal
Peroxido de hidrogeno	2	4	V	Normal
Peroxido de hidrogeno	2	5	IV	Normal
Peroxido de hidrogeno	2	6	V	Normal
Peroxido de hidrogeno	2	7	muerta	
Peroxido de hidrogeno	3	1	IV	Normal
Peroxido de hidrogeno	3	2	V	Normal
Peroxido de hidrogeno	3	3	IV	Normal
Peroxido de hidrogeno	3	4	IV	Normal
Peroxido de hidrogeno	3	5	III	Normal
Peroxido de hidrogeno	3	6	III	Normal
Peroxido de hidrogeno	3	7	muerta	
Peroxido de hidrogeno	4	1	muerta	
Peroxido de hidrogeno	4	2	muerta	
Peroxido de hidrogeno	4	3	muerta	
Peroxido de hidrogeno	4	4	muerta	
Peroxido de hidrogeno	4	5	muerta	
Peroxido de hidrogeno	4	6	muerta	
Peroxido de hidrogeno	4	7	muerta	
Peroxido de hidrogeno	5 - 7	1 - 7	muertas	



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tratamiento	Concentracion	Replic	Estadio gonad	Oocitos
Azametifos	1	1		Anormal
Azametifos	1	2	V	Normal
Azametifos	1	3	IV	Normal
Azametifos	1	4	V	Normal
Azametifos	1	5	V	Normal
Azametifos	1	6	IV	Normal
Azametifos	1	7	V	Normal
Azametifos	1	8	IV	Normal
Azametifos	2	1	IV	Normal
Azametifos	2	2	V	Normal
Azametifos	2	3	V	Normal
Azametifos	2	4	V	Normal
Azametifos	2	5	muerta	
Azametifos	2	6	muerta	
Azametifos	2	7	muerta	
Azametifos	3	1		Anormal
Azametifos	3	2	muerta	
Azametifos	3	3	V	Normal
Azametifos	3	4	V	Normal
Azametifos	3	5	V	Normal
Azametifos	3	6	muerta	
Azametifos	3	7	muerta	
Azametifos	4 -7	1 -7	muertas	



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tratamiento	Concentracion	Replic	Estadio gonad	Oocitos
Cipermetrina	1	1	III	Normal
Cipermetrina	1	2	V	Anormal
Cipermetrina	1	3	V	Normal
Cipermetrina	1	4	IV	Normal
Cipermetrina	1	5	V	Normal
Cipermetrina	1	6	III	Normal
Cipermetrina	1	7	V	Anormal
Cipermetrina	2	1	II	Normal
Cipermetrina	2	2	V	Normal
Cipermetrina	2	3	V	Normal
Cipermetrina	2	4	IV	Normal
Cipermetrina	2	5	III	Normal
Cipermetrina	2	6	muerta	
Cipermetrina	2	7	muerta	
Cipermetrina	3	1	IV	Normal
Cipermetrina	3	2	IV	Normal
Cipermetrina	3	3		Anormal
Cipermetrina	3	4	IV	Normal
Cipermetrina	3	5	muerta	
Cipermetrina	3	6	muerta	
Cipermetrina	3	7	muerta	
Cipermetrina	4 - 7	1 - 7	muertas	



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tratamiento	Concentracion	Replic	Estadio gonad	Oocitos
Deltametrina	1	1	V	Normal
Deltametrina	1	2	V	Normal
Deltametrina	1	3	II	Normal
Deltametrina	1	4	IV	Normal
Deltametrina	1	5	V	Normal
Deltametrina	1	6	II	Normal
Deltametrina	1	7	muerta	
Deltametrina	2	1	II	Normal
Deltametrina	2	2	III	Normal
Deltametrina	2	3	II	Normal
Deltametrina	2	4	V	Normal
Deltametrina	2	5	muerta	
Deltametrina	3	1	muerta	
Deltametrina	3	2	muerta	
Deltametrina	3	3	IV	Normal
Deltametrina	3	4	muerta	
Deltametrina	3	5	muerta	



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tabla XIII. Estados gonadales del ovario de las hembras en los experimentos de exposición crónica

Tratamiento crónico	Concentración	Nº	Estado ovárico						Anormal
			I	II	III	IV	V	VI	
<b>Control</b>	Agua de Mar	5	0	0	0	0	5	0	0
<b>Peróxido de Oxígeno</b>	1	7	0	0	1	1	5	0	0
	2	6	0	0	1	4	3	0	0
	3	6	0	0	0	2	4	0	0
	4 - 7	muertas en el experimento							
<b>Azametifos</b>	1	8	0	0	0	2	5	0	1
	2	6	0	0	1	4	1	0	0
	3	5	0	0	0	0	4	0	1
	4 - 7	muertas en el experimento							
<b>Cipermetrina</b>	1	7	0	0	1	2	3	0	1
	2	5	0	1	2	0	2	0	0
	3	4	0	0	0	3	0	0	1
	4 - 7	muertas en experimento							
<b>Deltametrina</b>	1	6	0	0	2	0	4	0	0
	2	4	0	0	2	0	1	0	1
	3	1	0	0	0	0	1	0	0
	4 - 7	muertas en experimento							

### 9.2.1.3 Exposición aguda sobre la mortalidad de adultos de *C. edwardsii*

Del mismo experimento para viabilidad espermática y daño ovárico, se obtuvo información sobre la mortalidad causada por exposición aguda por 24 h a las diferentes concentraciones



# Universidad Austral de Chile

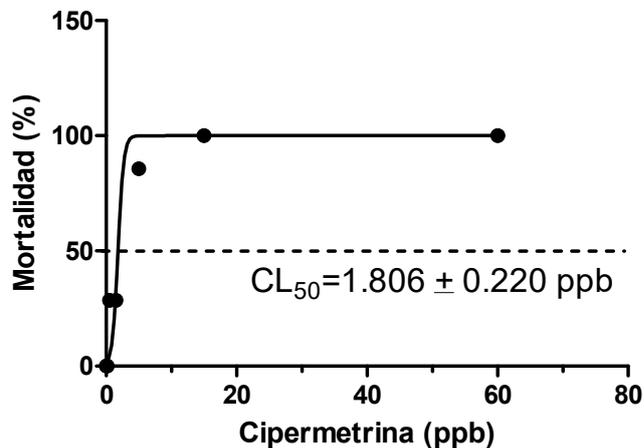
Instituto de Acuicultura

de los 4 compuestos estudiados, considerando una densidad de 7 individuos en 100 L de agua de mar filtrada.

Para Azametifos no se observó mortalidad de los animales expuestos por 24 h en cualquiera de los 8 tratamientos (7 concentraciones y el control sin azametifos).

Para Cipermetrina se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $1.806 \pm 0.22$  ppb, casi un orden de magnitud inferior a la Concentración recomendada por el fabricante de 15 ppb (Fig. 31).

## Cipermetrina por 24h. Mortalidad jaiba adulto

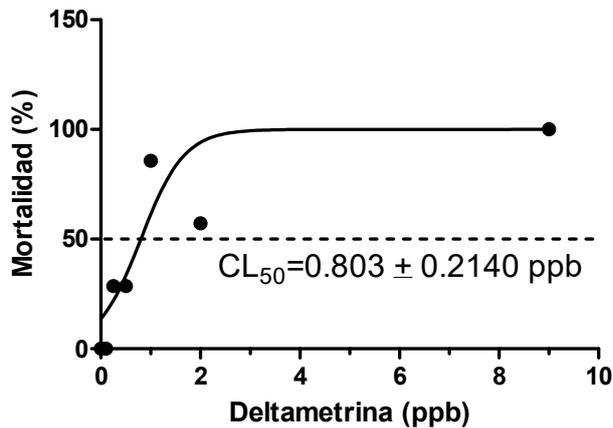


31 Figura 31. Mortalidad de adultos de *C. edwardsii* concentración-dependiente Cipermetrina. (Ajuste sigmoideo concentración-dependiente  $CL_{50} \pm ES$  (error estándar ES;  $r^2=0.934$ ))

Deltametrina presentó una  $CL_{50}$  de  $0.803 \pm 0.21$  ppb, inferior a la Concentración recomendada por el fabricante de 2 ppb (Fig. 32).



**Deltametrina por 24h. Mortalidad adulto jaiba**

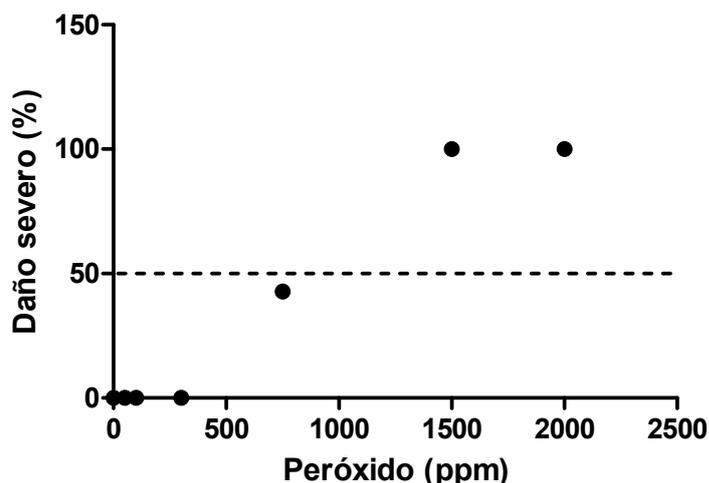


32 Figura 32. Mortalidad de adultos de *C. edwardsii* concentración-dependiente Deltametrina. (Ajuste sigmoideo concentración-dependiente  $CL_{50} \pm ES$  (error estándar ES;  $r^2=0.735$ ))

La exposición a Peróxido por 24h no provocó mortalidad, pero si un daño severo, provocando que los animales flotaran. Para este análisis no se estimó entonces la  $CL_{50}$ , sino que se intentó estimar la  $EC_{50}$ , (concentración que provoca un efecto en el 50% de los individuos), sin embargo, no hubo convergencia en el análisis para ajustar una curva sigmoideo concentración-dependiente por lo que no fue posible obtener el valor para peróxido (Fig. 33). En la figura 33 se puede observar que el 50% de los individuos se dañaron severamente a concentraciones de peróxido inferiores a 1000 ppm, i.e. bajo la concentración recomendada por el fabricante de 1500 ppm.



### Peróxido por 24h. Daño severo adulto jaiba



33 Figura 33. Daño severo en adultos de *C. edwardsii* concentración-dependiente Peróxido.

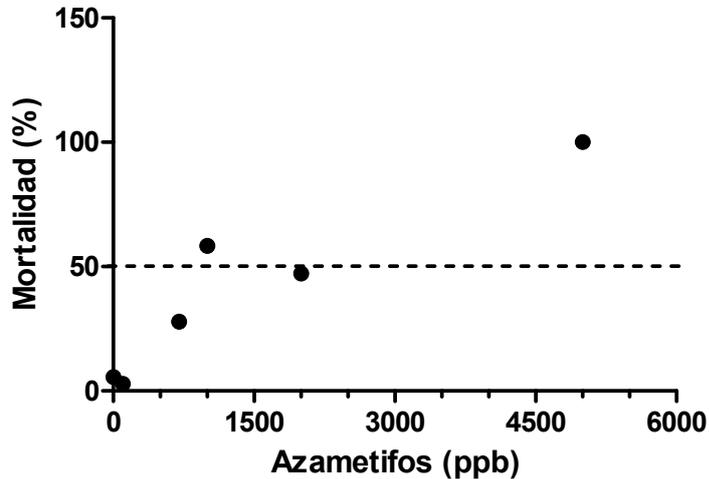
Cuando se analizó la información sobre la mortalidad causada por exposición aguda por 24 h a las diferentes concentraciones de los 4 compuestos estudiados, considerando una densidad de 36 individuos en 100 L de agua de mar filtrada, se observó una tendencia a incrementar la  $CL_{50}$  en comparación a la observada con 7 individuos en 100 L. Los valores aquí reportados corresponden a la mortalidad total observada, luego de 96h de observación post-exposición.

Para Azametifos no hubo convergencia en el análisis para ajustar una curva sigmoideo concentración-dependiente por lo que no fue posible obtener el valor  $CL_{50}$  con su estimación de error (Fig. 34). Sin embargo, el 50% de los individuos murieron a concentraciones cercanas a los 2000 ppb, muy por encima de la CRF de 100 ppb. Para este compuesto, la mortalidad se observó casi exclusivamente durante las 24h de exposición al compuesto (de los 87 animales cuantificados, solo 2 murieron durante el tiempo post-exposición).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



34 Figura 34. Mortalidad de adultos de *C. edwardsii* concentración-dependiente Azametifos.

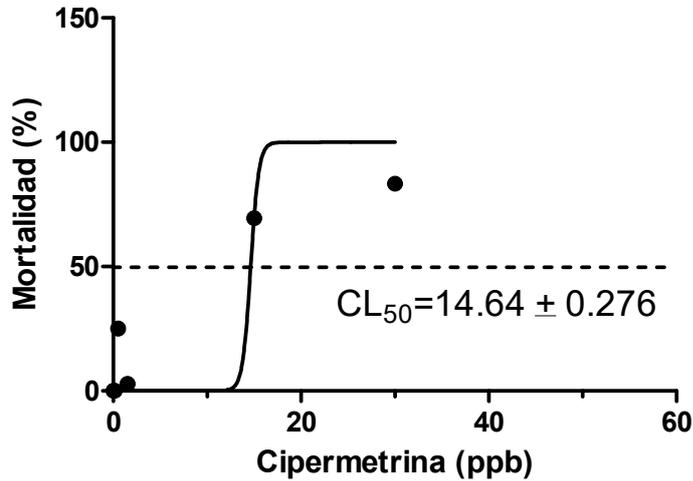
Para Cipermetrina se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $14.64 \pm 0.27$  ppb, levemente inferior a la Concentración recomendada por el fabricante de 15 ppb (Fig. 35). De forma similar que para azametifos, mas del 67% de la mortalidad se registró durante las 24h de aplicación del compuesto.

Deltametrina presentó una  $CL_{50}$  de  $3.255 \pm 0.21$  ppb, superior a la Concentración recomendada por el fabricante de 2 ppb (Fig. 36). De la mortalidad registrada, el 68% se produjo durante la aplicación del tratamiento, 17% a las 24h post-exposición y un 13% a las 48 h de haber expuesto los animales al compuesto.

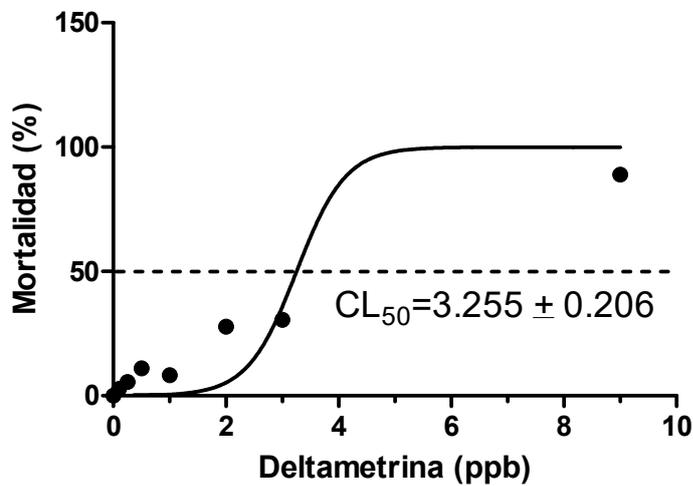


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



35 Figura 35. Mortalidad de adultos de *C. edwardsii* concentración-dependiente Cypermethrina. Ajuste sigmoideo concentración-dependiente  $CL_{50} \pm ES$  (error estándar ES;  $r^2=0.869$ )



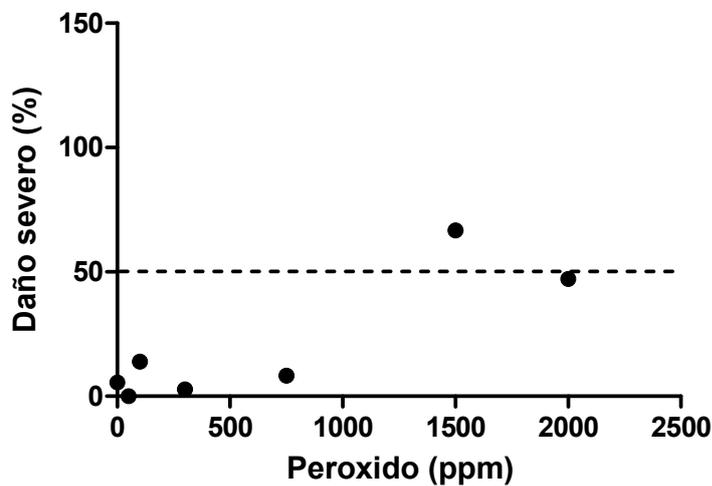
36 Figura 36. Mortalidad de adultos de *C. edwardsii* concentración-dependiente Deltametrina. Ajuste sigmoideo concentración-dependiente  $CL_{50} \pm ES$  ( $r^2=0.854$ )



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

La exposición a Peróxido por 24h no provocó mortalidad, pero si un daño severo, provocando que los animales flotaran. Para este análisis no se estimó entonces la  $CL_{50}$ , sino que se intentó estimar la  $EC_{50}$ , sin embargo, no hubo convergencia en el análisis para ajustar una curva sigmoideo concentración-dependiente por lo que no fue posible obtener el valor  $EC_{50}$  con un error estadístico para peróxido (Fig. 37). Al observar el grafico es posible identificar un punto en torno a los 1500 ppm donde el 50% de los animales se vio afectado.



37 Figura 37. Daño severo en adultos de *C. edwardsii* concentración-dependiente Peróxido.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 9.2.1.4 Exposición aguda sobre EC<sub>50</sub>

En los experimentos de conducta se evaluó la reincorporación de los animales sometidos a azametifos y cipermetrina por 30 minutos y por 24 h para todos los compuestos a las 6, 24, 30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post-tratamiento. Los indicadores medidos como proporción de reincorporación (Tablas XIV-XV y XVI y XVII) no mostraron un patrón claro en relación a las distintas concentraciones y tiempo post-exposición.

**Tabla XIV Proporción de jaibas (media ± ds) no-reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de azametifos (0: control, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Azametifos (ppb)	Tiempo post-tratamiento (hora)							
	6	24	30	48	54	72	78	96
0	0.22±0.44	0.22±0.44	0.14±0.38	0.5±0.53	0.00±0.00	0.56±0.53	0.56±0.67	0.56±0.5
1	0.00±0.00	0.67±0.5	0.33±0.50	0.78±0.44	0.13±0.35	0.25±0.46	0.11±0.22	0.25±0.44
3	0.11±0.33	0.67±0.5	0.11±0.33	0.56±0.53	0.00±0.00	0.44±0.53	0.33±0.67	0.44±0.5
10	0.44±0.53	0.67±0.5	0.44±0.53	0.56±0.53	0.56±0.53	0.78±0.44	0.50±0.75	0.78±0.46
30	0.13±0.35	0.63±0.52	0.22±0.44	0.67±0.5	0.25±0.46	0.88±0.35	0.44±0.78	0.88±0.44
100	0.11±0.33	0.56±0.53	0.43±0.53	1±0	0.00±0.00	0.33±0.5	0.67±0.44	0.33±0.53
300	0.44±0.53	0.78±0.44	0.11±0.33	0.11±0.33	0.22±0.44	0.67±0.5	0.44±0.56	0.67±0.53
500	0.56±0.53	0.44±0.53	0.44±0.53	0.67±0.53	0.33±0.22	0.56±0.67	0.44±0.44	0.56±0.53

**Tabla XV Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de azametifos por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Azametifos ppb	Tiempo post-tratamiento (hora)							
	6	24	30	48	54	72	78	96
0	77,8	77,8	66,7	33,3	77,8	66,7	100	25
100	55,6	44,4	66,7	11,1	85,7	28,6	77,8	22,2
700	100	66,7	88,9	77,8	87,5	87,5		
1000	44,4	55,6	50	50				



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla XVI. Proporción de jaibas (media±ds) no-reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de cipermetrina (0: control, 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15, 30, 60 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Cipermetrina (ppb)	Tiempo post-tratamiento (hora)							
	6	24	30	48	54	72	78	96
0.0	0.44±0.53	0.44±0.53	0.44±0.53	0.56±0.53	0.33±0.5	0.22±0.44	0.11±0.22	0.33±0.44
0.15	0.33±0.5	0.67±0.5	0.44±0.53	0.33±0.5	0.56±0.53	0.38±0.52	0.44±0.33	0.53±0.5
0.5	0.44±0.53	0.78±0.44	0.56±0.53	0.56±0.53	0.44±0.53	0.67±0.5	0.63±0.78	0.52±0.44
1.5	0.56±0.0	0.67±0	0.56±0.58	0.67±0	0.00±0.58	0.4±0.0	0.25±0.5	0.71±0.0
5.0	0.89±0.33	0.89±0.33	0.44±0.53	0.67±0.5	0.56±0.53	0.67±0.5	0.56±0.89	0.53±0.33
15	0.75±0.47	0.75±0.46	0.63±0.52	0.38±0.52	0.44±0.53	0.44±0.53	0.22±0.00	0.40±0.00
30	0.78±0.44	0.89±0.33	0.44±0.53	0.89±0.33	0.56±0.53	0.44±0.53	0.33±0.56	0.50±0.53
60	0.75±0.46	0.63±0.52	0.57±0.53	0.72±0.49	0.25±0.55	0.38±0.44	0.78±0.44	0.44±0.53

**Tabla XVII Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de cipermetrina por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Cipermetrina ppb	Tiempo post-tratamiento (hora)							
	6	24	30	48	54	72	78	96
0	66,7	11,1	44,4	44,4	88,9	66,7	77,8	33,3
0,5	66,7	44,4	77,8	11,1	77,8	22,2	77,8	44,4
1,5	33,3	0	12,5	12,5	50	37,5	28,6	14,3
5	88,9	88,9	77,8	55,6	75	50	44,4	22,2
15	22,2	0						
30	33,3	0						



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla XVIII Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de deltametrina por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Deltametrina ppb	Tiempo post-tratamiento (hora)							
	6	24	30	48	54	72	78	96
0	12,5	37,5	55,6	66,7	44,4	44,4	66,7	33,3
0,1	55,6	44,4	66,7	33,3	55,6	44,4	44,4	11,1
0,25	44,4	22,2	77,8	66,7	55,6	22,2	77,8	55,6
0,5	75	25	100	22,2	100	44,4	85,7	42,9
1	22,2	44,4	33,3	11,1	50	25	87,5	50
2	0	0	16,7	16,7	33,3	50	33,3	33,3
3	0	0	40	0	80	60		
9	50	0						

**Tabla XIX Porcentaje de jaibas reincorporadas después de 6, 24,30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de peróxido por 24 h. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Peróxido de hidrógeno ppm	Tiempo post-tratamiento (hora)							
	6	24	30	48	54	72	78	96
0	100,0	77,8	100	77,8	87,5	50	87,5	50
50	87,5	25	62,5	62,5	87,5	37,5	87,5	37,5
100	75	75	88,9	88,9	87,5	50	87,5	50
300	77,8	33,3	55,6	22,2	77,8	33,3	66,7	33,3
750	25	37,5	66,7	33,3	55,6	33,3	55,6	33,3
1500	0	0	33,3	50				
2000	0	14,3	0	28,6				

## FISIOLOGIA

### Tasa metabólica

La tasa metabólica o consumo de oxígeno peso-específico para animales expuestos a azametifos y cipermetrina se efectuó exponiendo los animales por 2 tiempos a los compuestos, 30min y 24 h. Luego fueron monitoreados a las 24, 48, 72 y 96 h. La respuesta a las exposiciones por 30 min en ambos compuestos no permitió observar una tendencia



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

concluyente (Tablas XX y XXI) por lo que se repitieron los experimentos exponiendo a los animales por 24h, al igual que a los demás compuestos.

El consumo de oxígeno en animales expuestos a azametifos se incrementó a mayores concentraciones, sin embargo, el factor tiempo post-exposición no presentó variaciones dentro de cada concentración ( $P=0.009$  y  $0.120$ , respectivamente) (Fig. 38)

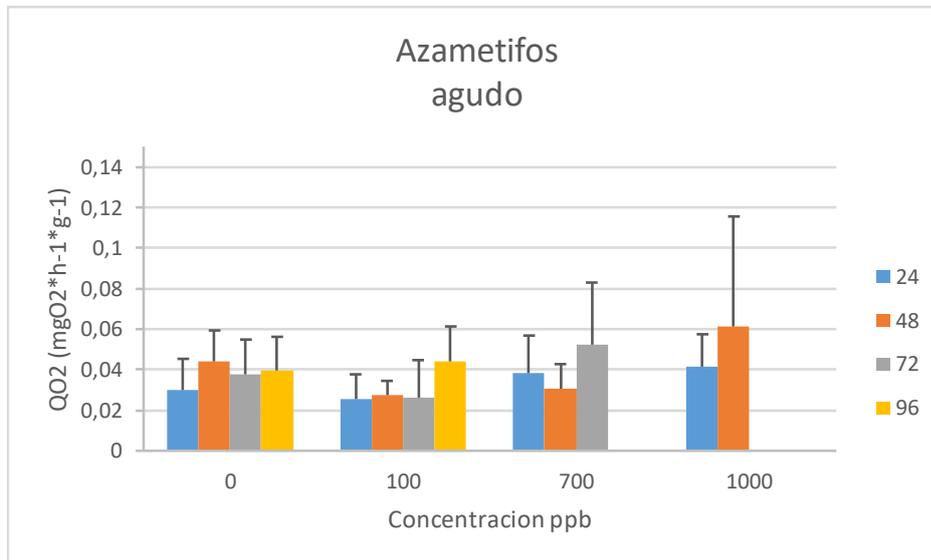
**Tabla XX. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (media $\pm$ ds) de jaibas después de 24, 48, 72 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de azametifos (0: control, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Azametifos (ppb)	Tiempo post- tratamiento (hora)			
	24	48	72	96
0	0.0358 $\pm$ 0.017	0.0282 $\pm$ 0.013	0.0380 $\pm$ 0.0201	0.0250 $\pm$ 0.0111
1	0.0293 $\pm$ 0.0082	0.037 $\pm$ 0.0386	0.0244 $\pm$ 0.011	0.0228 $\pm$ 0.0135
3	0.0283 $\pm$ 0.0111	0.0280 $\pm$ 0.0161	0.0338 $\pm$ 0.0097	0.0357 $\pm$ 0.0135
10	0.0299 $\pm$ 0.160	0.0245 $\pm$ 0.0114	0.0377 $\pm$ 0.0190	0.0349 $\pm$ 0.0163
30	0.0299 $\pm$ 0.0154	0.0202 $\pm$ 0.0146	0.0327 $\pm$ 0.0121	0.0241 $\pm$ 0.0118
100	0.0296 $\pm$ 0.0153	0.018 $\pm$ 0.0146	0.0363 $\pm$ 0.0195	0.0272 $\pm$ 0.0142
300	0.0294 $\pm$ 0.0129	0.0364 $\pm$ 0.0193	0.0470 $\pm$ 0.0204	0.0342 $\pm$ 0.0217
500	0.0316 $\pm$ 0.0250	0.0308 $\pm$ 0.0130	0.0532 $\pm$ 0.051	0.0495 $\pm$ 0.0308



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



38 Figura 38. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de azametifos y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).

No se observó un efecto significativo en la tasa metabólica de los animales expuestos a diferentes concentraciones de cipermetrina, sin embargo, esta tasa aumentó a mediada que pasó el tiempo post exposición dentro de cada concentración ( $P=0.605$  y  $<0.001$ , respectivamente). Este incremento en el tiempo se observó mas notoriamente en las concentraciones de 1.5 y 5 ppb. A mayores concentraciones no hubo sobrevivencia luego de 48 h post exposición (Fig. 39).

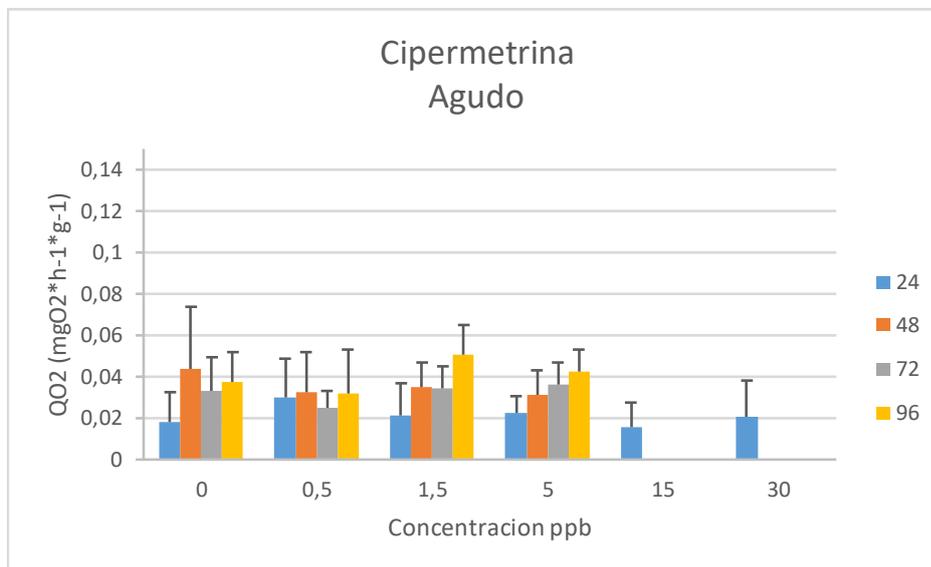


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tabla XXI. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (media  $\pm$  ds) de jaibas después de 24, 48, 72 y 96 horas post tratamiento a distintas concentraciones de cipermetrina (0: control, 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15, 30, 60 ppb) por 30 minutos. Para cada concentración se utilizaron 9 jaibas.**

Cipermetrina (ppb)	Tiempo post- tratamiento (hora)			
	24	48	72	96
0	0.034 $\pm$ 0.0135	0.0213 $\pm$ 0.0134	0.0141 $\pm$ 0.0084	0.0221 $\pm$ 0.010
0.15	0.0210 $\pm$ 0.0182	0.0295 $\pm$ 0.0144	0.0348 $\pm$ 0.0129	0.0366 $\pm$ 0.016
0.5	0.011 $\pm$ 0.0078	0.0365 $\pm$ 0.0190	0.0285 $\pm$ 0.0074	0.0446 $\pm$ 0.029
1.5	0.0225 $\pm$ 0.0155	0.0261 $\pm$ 0.0193	0.0415 $\pm$ 0.0251	0.0233 $\pm$ 0.0123
5	0.0136 $\pm$ 0.0088	0.0224 $\pm$ 0.0091	0.04 $\pm$ 0.0216	0.0459 $\pm$ 0.0248
15	0.0332 $\pm$ 0.0233	0.0283 $\pm$ 0.01186	0.0227 $\pm$ 0.013	0.03 $\pm$ 0.0151
30	0.0193 $\pm$ 0.01	0.0297 $\pm$ 0.0079	0.0326 $\pm$ 0.0158	0.0289 $\pm$ 0.0138
60	0.0215 $\pm$ 0.0099	0.0214 $\pm$ 0.0176	0.0294 $\pm$ 0.0207	0.0183 $\pm$ 0.0082



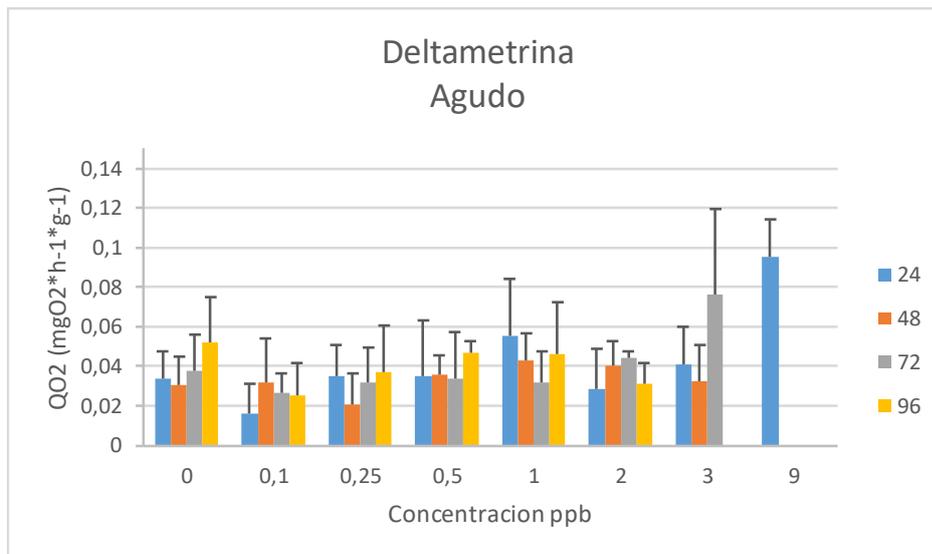
**39 Figura 39. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de cipermetrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).**



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Los animales expuestos a deltametrina por 24 h incrementaron su tasa metabólica a mayores concentraciones y no se observó un efecto del tiempo post-exposición sobre la tasa metabólica ( $P < 0.001$  y  $0.180$ , respectivamente) (Fig. 40).



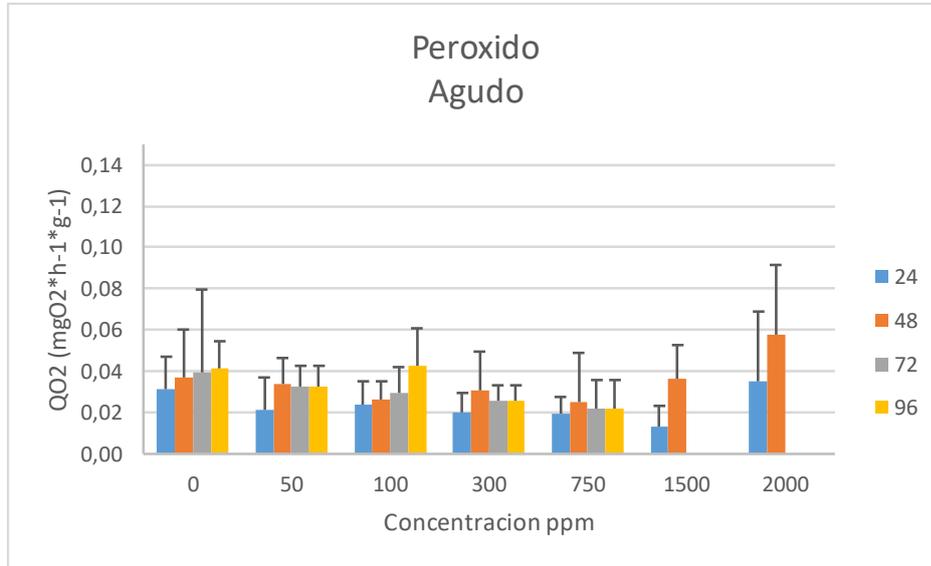
**40 Figura 40.** Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de deltametrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).

En el caso de los animales expuestos por 24h a peróxido de hidrógeno, se observó un efecto significativo tanto de la concentración de peróxido, así como del tiempo post-exposición sobre la tasa metabólica ( $P < 0.001$  y  $0.002$ , respectivamente) (Fig. 41). Los animales tendieron a disminuir su tasa metabólica a mayores concentraciones de peróxido, a excepción de la concentración mas alta donde se observó un incremento 24 y 48h post-exposición.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



41 Figura 41. Consumo de Oxígeno ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de peróxido y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).

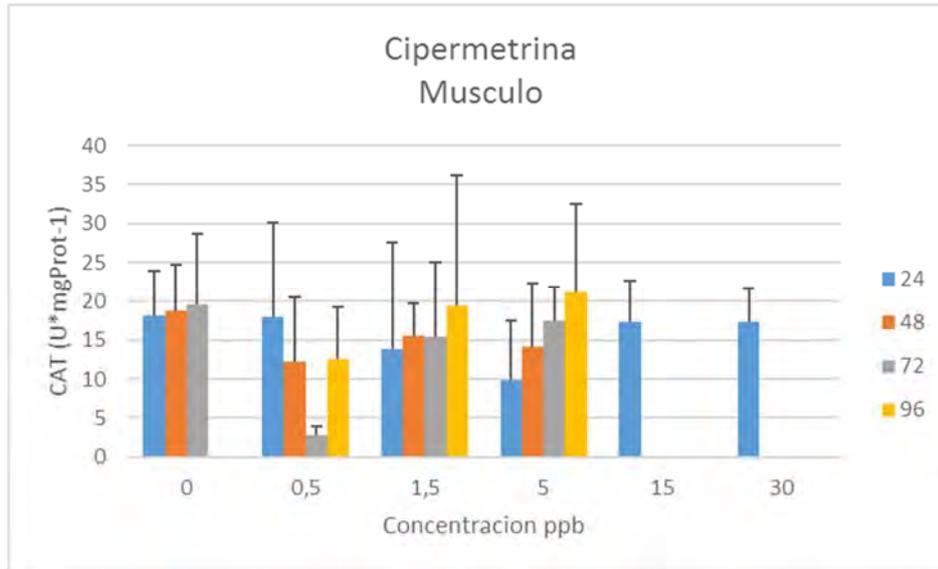
## Actividad de enzimas

La actividad de CAT en musculo de *C. edwardsii* expuestos por 24 h a diferentes concentraciones de Cipermetrina no presentó una tendencia clara. No se observaron diferencias significativas para los factores Concentración y Tiempo post-exposición ( $P=0.847$  y  $0.957$ , respectivamente) (Fig. 42).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



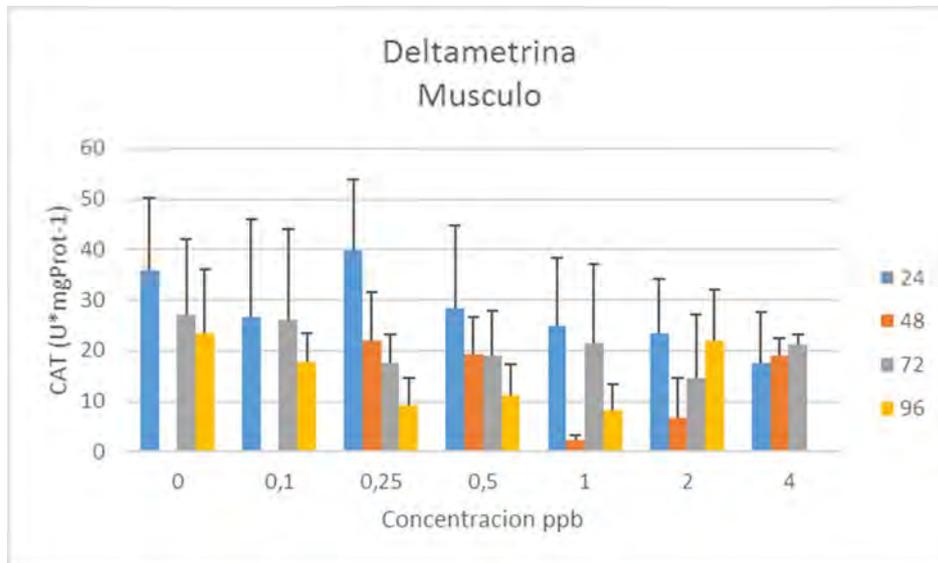
42 Figura 42. Actividad de CAT en músculo de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Cipermetrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).

Jaibas expuestas a Deltametrina presentaron un efecto significativo tanto de la concentración del compuesto como del tiempo post-exposición en la actividad de CAT ( $P=0.003$  y  $<0.001$ , respectivamente). Estas diferencias entre las concentraciones estuvieron dadas por concentraciones altas (concentraciones 1 y 2 ppb) correspondientes a la concentración recomendada por el fabricante y al 50% de esta; y cercanas a las CL50 encontradas en este estudio (0.8 y 3.2 ppb, dependiendo de la biomasa de jaibas expuestas a la concentración). Los valores más altos estuvieron dados por los animales muestreados a las 24 h post exposición, con una tendencia a disminuir en el tiempo para cada concentración (especialmente visible a 0.25 y 0.5 ppb)(Fig. 43).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



**43 Figura 43.** Actividad de CAT en músculo de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Deltametrina y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).

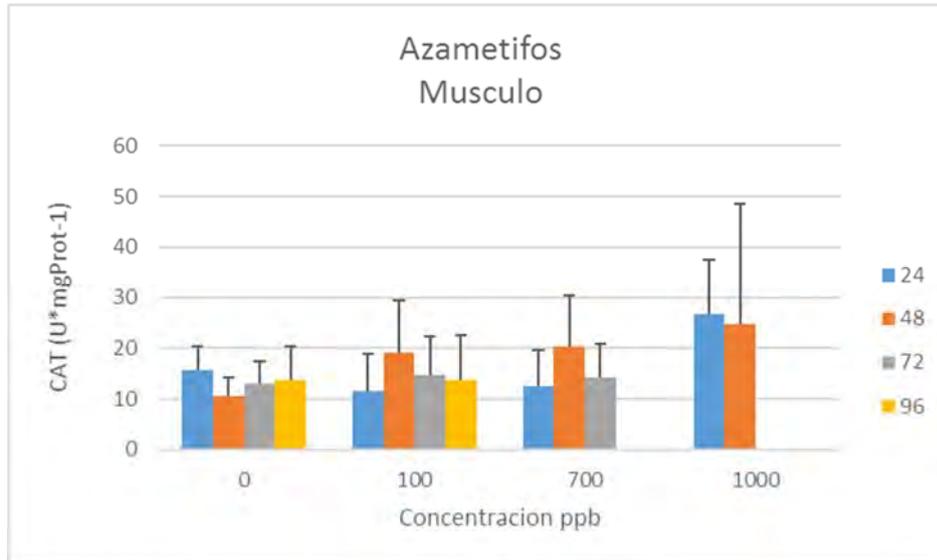
Luego de exponer a jaibas a varias concentraciones de Azametifos por 24 h y monitorear el desempeño de CAT en el tiempo se observó un efecto significativo de la concentración del compuesto, no así del tiempo post-exposición ( $P < 0.001$  y  $0.989$ , respectivamente)

La actividad de CAT en animales expuestos a 1000 ppb es significativamente mayor que las demás concentraciones. Estas concentraciones están muy por encima de los 100 ppb correspondientes a la concentración recomendada por el fabricante (Fig. 44)



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



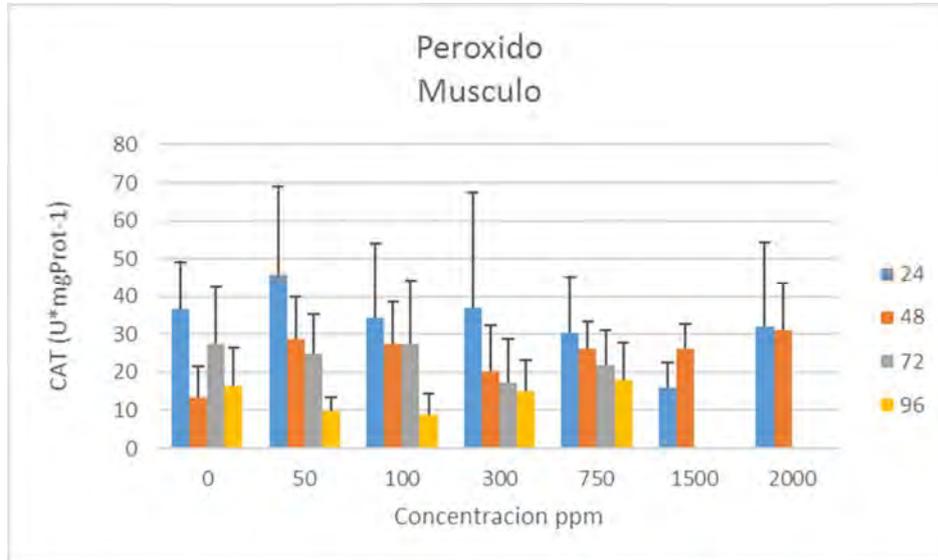
**44 Figura 44. Actividad de CAT en músculo de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Azametifos y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).**

La actividad de CAT en músculo como respuesta a la exposición a peróxido por 24 h a diferentes concentraciones y tiempos de muestreo presentó una disminución significativa solo producto del tiempo (Andeva a dos vías,  $P= 0.659$  y  $<0.001$  para Concentración y Tiempo de seguimiento, respectivamente). Solo 48 h es igual a 72 h y en los demás tiempos se observó una disminución en la actividad de CAT a medida que pasó el tiempo post-exposición a Peroxido. Esto fue especialmente visible a 50 ,100, 300 y 750 ppm (Fig. 45)



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



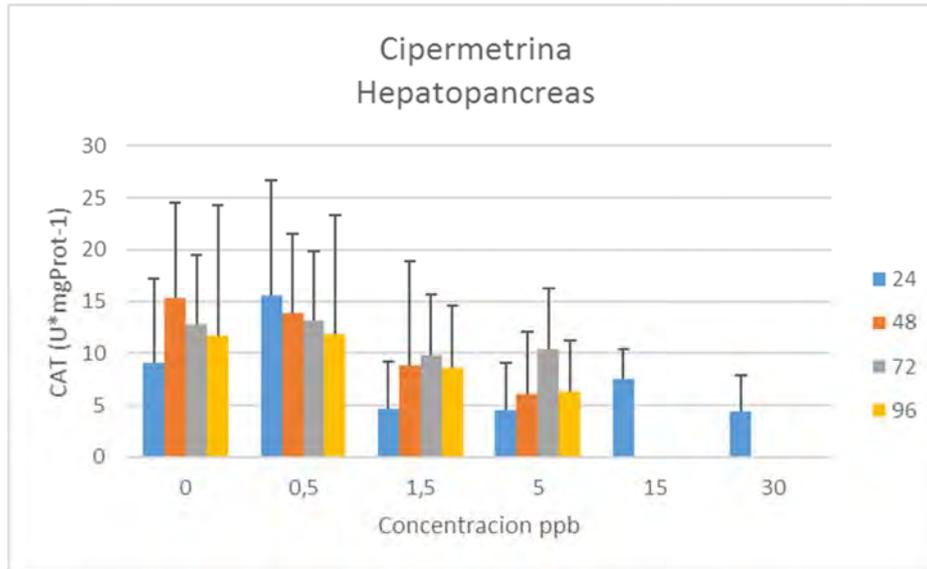
**45 Figura 45.** Actividad de CAT en músculo de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrógeno y monitoreo a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores (media + ds).

En hepatopáncreas de jaiba, la actividad de CAT disminuyó significativamente como respuesta a la concentración de Cipermetrina y no se observaron cambios significativos en el tiempo dentro de cada concentración que pudiesen dar cuenta de algún grado de recuperación de la actividad ( $P=0.012$  y  $0.461$  para Concentración y Tiempo de seguimiento, respectivamente) (Fig. 46).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



**46 Figura 46. Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Cipermetrina y seguimiento por 96 h (media + ds).**

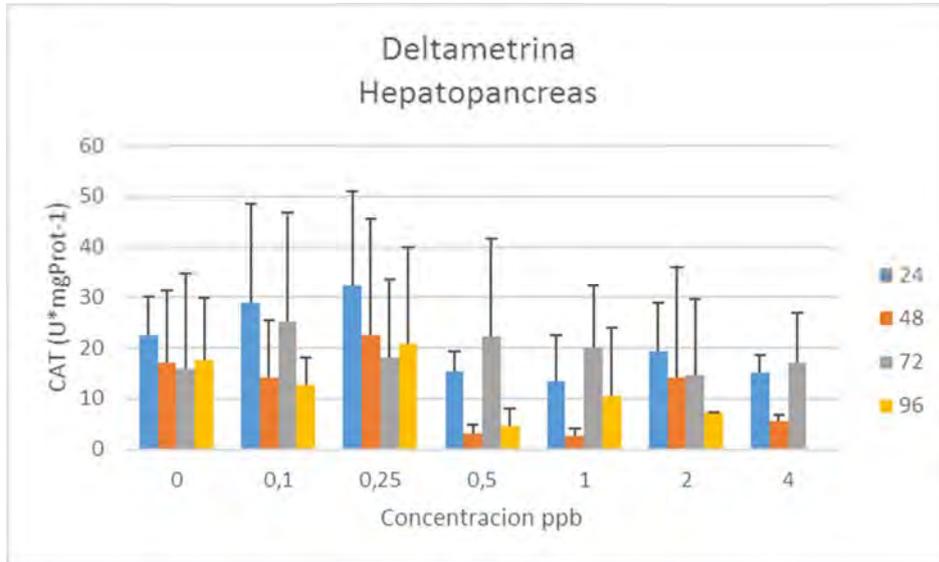
Similar a lo encontrado en tejido muscular, el hepatopáncreas de jaibas expuestas a Deltametrina presentó un efecto significativo en la actividad de CAT tanto para la concentración como el tiempo de seguimiento post-exposición ( $P= 0.027$  y  $0.004$ , respectivamente). La actividad disminuyó a medida que los animales fueron expuestos a mayores concentraciones de Deltametrina y a medida que el tiempo de muestreo se alejó de las primeras 24 h post-exposición (Fig. 47)

A diferencia de lo encontrado en musculo, en el hepatopáncreas de animales expuestos por 24 h a Azametifos la actividad de CAT no presento un efecto significativo de la concentración ni del tiempo post-exposición ( $P=0.107$  y  $0.096$ , respectivamente) (Fig. 48).

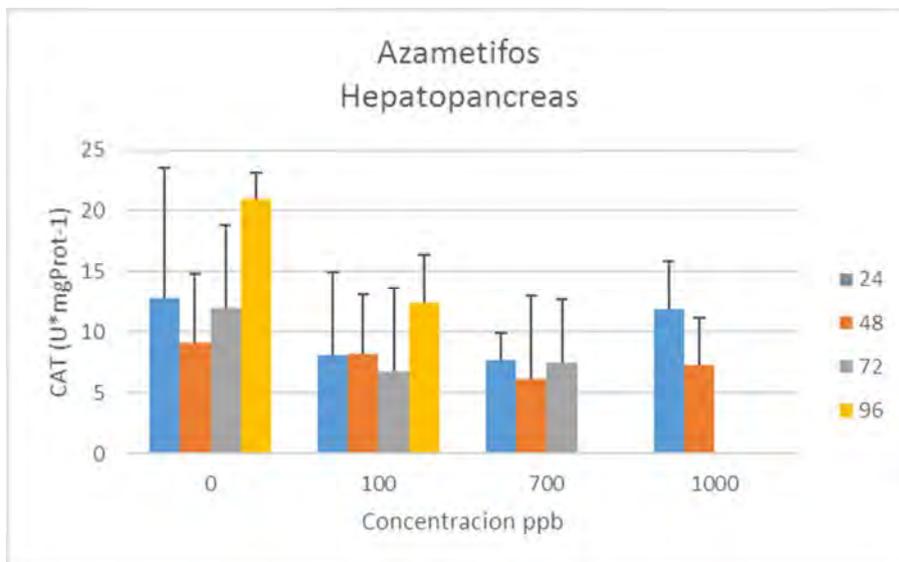


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



47 Figura 47. Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Deltametrina y seguimiento por 96 h (media + ds).



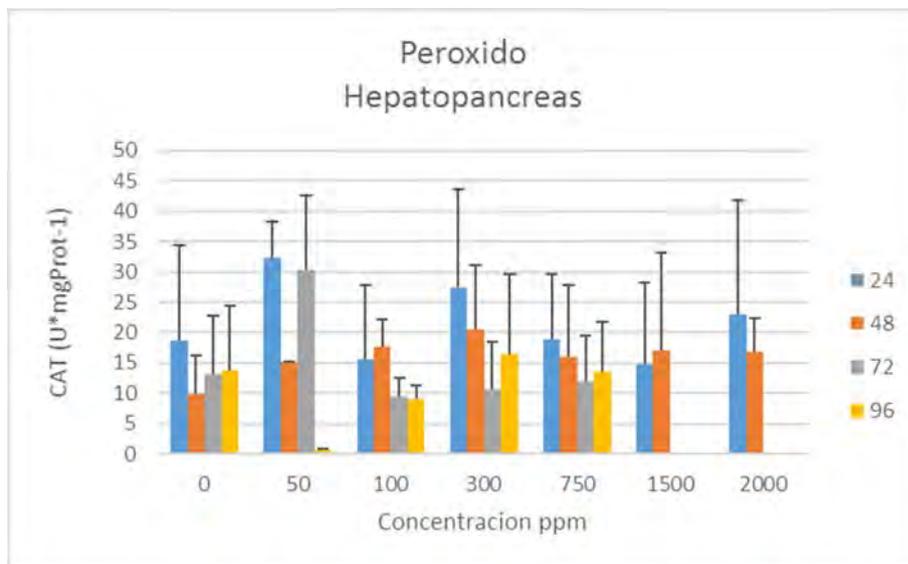
48 Figura 48. Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Azametifos y seguimiento por 96 h (media + ds).



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Similar a lo encontrado en tejido muscular, la actividad de CAT en hepatopáncreas de jaibas expuestas a Peróxido de hidrógeno presentó un efecto significativo del tiempo post-exposición para cada concentración ( $P=0.019$ ) pero el efecto de la concentración es menos claro ( $P= 0.087$ ) (Fig. 49).



**49 Figura 49.** Actividad de CAT en hepatopáncreas de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Peróxido de hidrógeno y seguimiento por 96 h (media + ds).

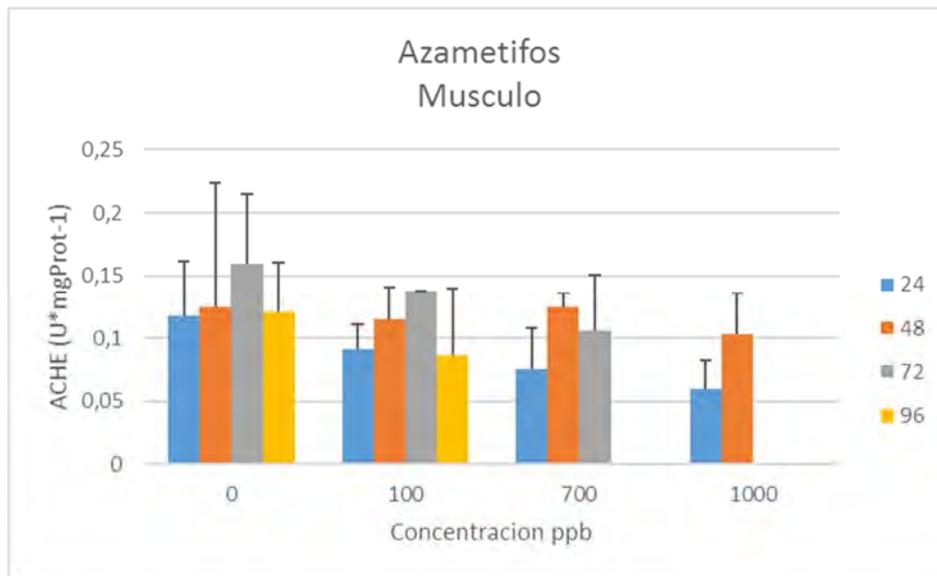
La acetilcolinesterasa ACHE es una enzima que degrada el neurotransmisor acetilcolina luego de la liberación de éste al espacio interneuronal en la sinapsis. Una inhibición de ACHE afecta la transmisión del impulso nervioso entre neuronas. La actividad de acetilcolinesterasa ACHE en musculo de jaibas expuestas a diferentes concentraciones de azametifos por 24 h y luego monitoreadas hasta 96 h se representa en la Fig. 50. A medida que aumentó la concentración de Azametifos, la actividad de ACHE disminuyó, excepto a



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

las 48 h donde no se observó diferencia (Fig. 50). No se observó una modificación de la actividad de ACHE en el tiempo a todas las concentraciones experimentales.



50 Figura 50. Actividad de ACHE en musculo de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición aguda a diferentes concentraciones de Azametifos y seguimiento por 96 h (media + ds).



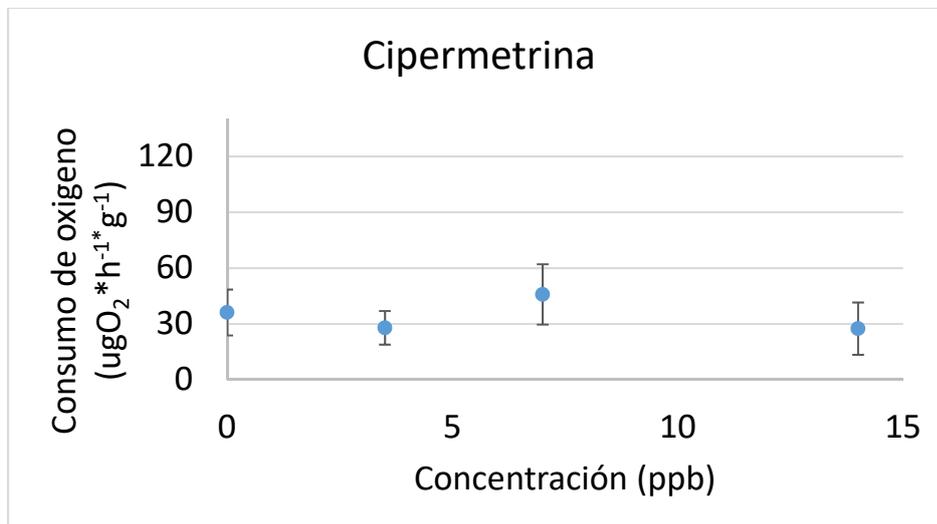
## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 9.2.1.5 Exposición crónica sobre EC<sub>50</sub>

#### Tasa metabólica

La tasa metabólica de jaibas expuestas diariamente por 6 horas a diferentes concentraciones de cipermetrina se mantuvo constante. Los valores promediaron  $33.62 \pm 14.5 \text{ ugO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gWW}^{-1}$  (Fig. 51)



51 Figura 51. Consumo de Oxígeno peso-específico de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Cipermetrina.

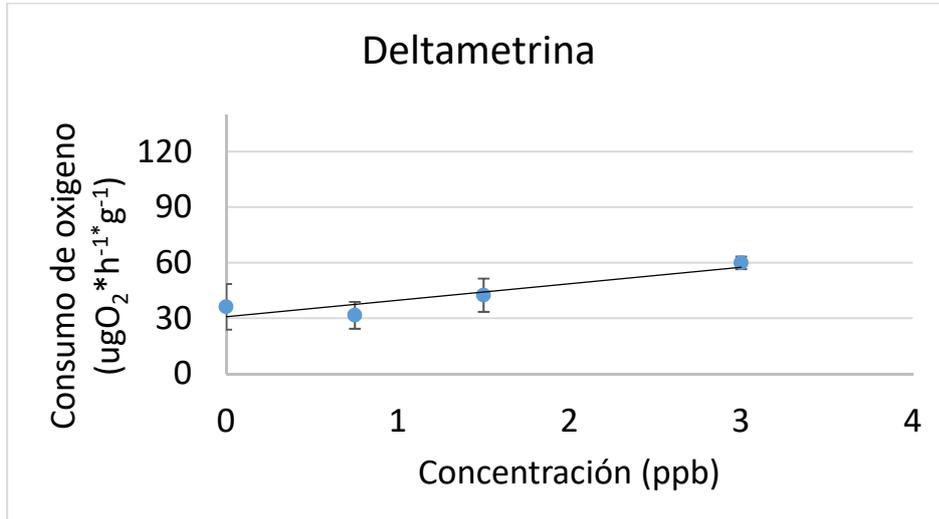
La tasa metabólica se incrementó en forma lineal significativa ( $P < 0.001$ ) a mayor concentración de Deltametrina casi duplicando el consumo de oxígeno del control cuando fueron expuestos a 3 ppb de deltametrina diariamente (Fig. 52; Tabla XXII)

Una situación comparable a la anterior se observó luego de exponer a los animales a azametifos diariamente. La tasa metabólica se incrementó en forma lineal significativa ( $P = 0.007$ ) (Fig. 53; Tabla XXII) a mayor concentración de azametifos, casi triplicando el consumo de oxígeno del control cuando fueron expuestos a 900 ppb de deltametrina diariamente.

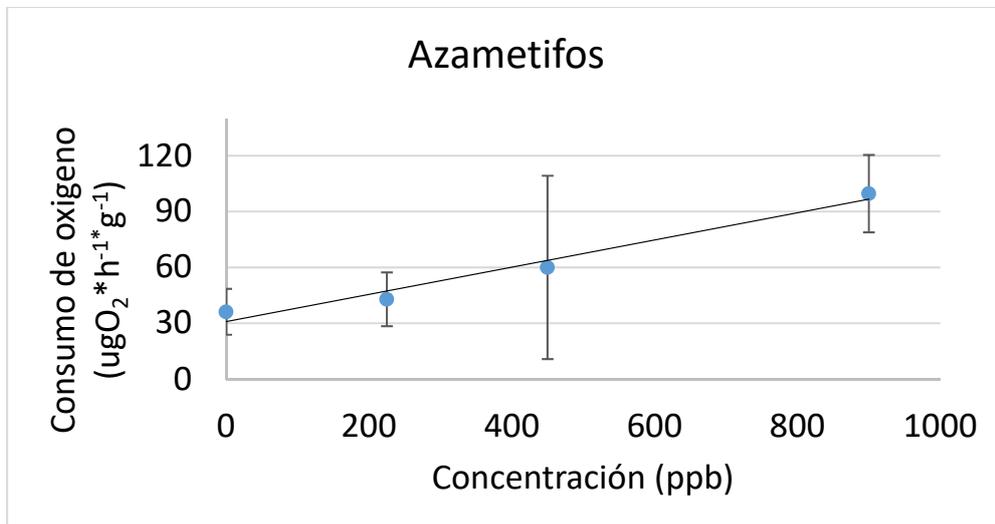


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



52 Figura 52. Consumo de Oxígeno peso-específico de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Deltametrina.



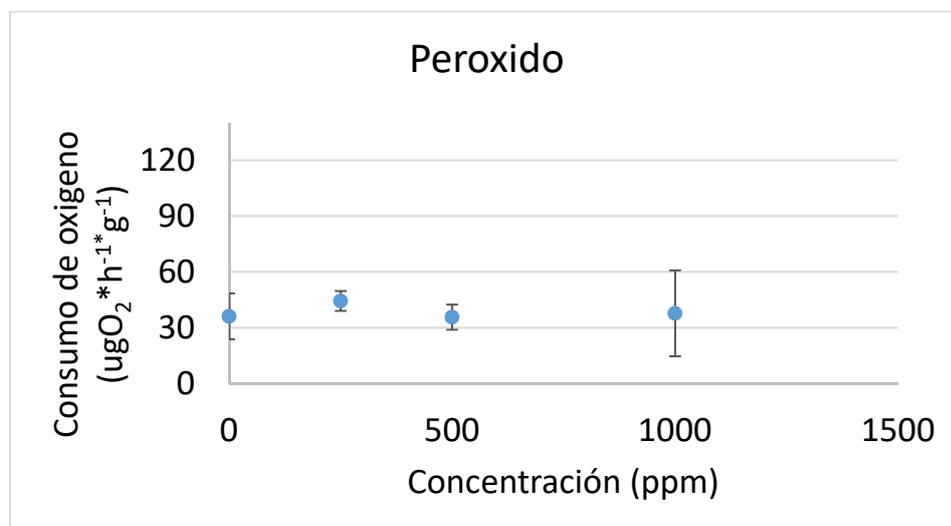
53 Figura 53. Consumo de Oxígeno peso-específico de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Azametifos.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

La tasa metabólica de jaibas expuestas diariamente por 6 horas a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno se mantuvo constante ( $P= 0.74$ ) (Tabla XXII). Los valores promediaron  $38.82 + 13.4 \text{ ugO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gWW}^{-1}$  (Fig. 54)



54 Figura 54. Consumo de Oxígeno peso-específico de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Peróxido de hidrógeno.

Tabla XXII. Relación entre el Consumo de Oxígeno-peso específico ( $\text{ugO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de jaibas después de exposición crónica a distintas concentraciones de compuestos. Para cada concentración se utilizaron 6-9 jaibas.

Compuesto	Parámetros de regresión lineal			
	Intercepto	Pendiente	R2	P
Cipermetrina	$34,69 \pm 5,824$	$-0,1716 \pm 0,7441$	0,003313	0,8205
Deltametrina	$30,30 \pm 4,047$	$8,687 \pm 2,698$	0,4852	<b>0,0082</b>
Azametifos	$29,79 \pm 11,16$	$0,07351 \pm 0,02376$	0,3895	<b>0,0074</b>
Peróxido de hidrogeno	$40,26 \pm 5,194$	$-0,002881 \pm 0,008481$	0,006036	0,7378

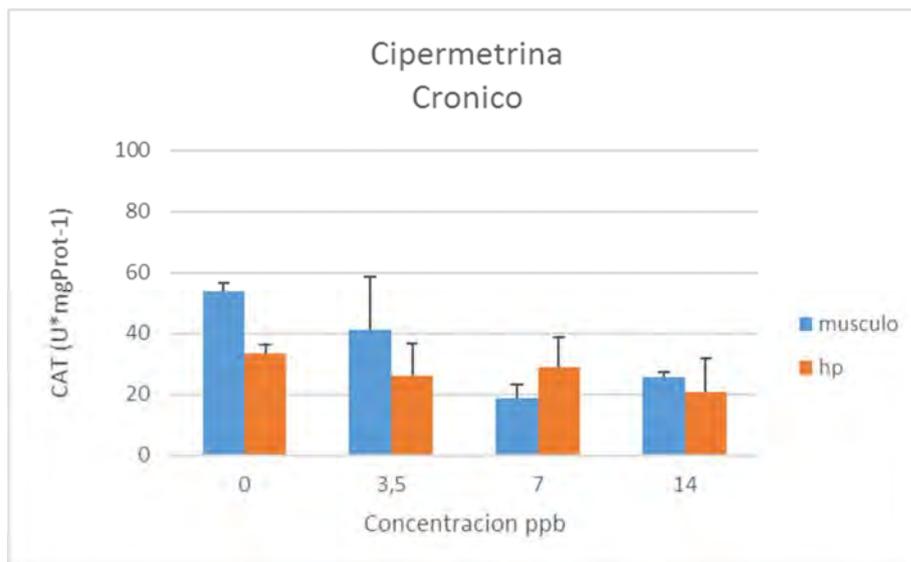


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## Actividad de enzimas

La actividad de CAT en musculo de jaiba expuestas diariamente a Cipermetrina durante el experimento crónico disminuyó en forma lineal a medida que las concentraciones aumentaron ( $CAT = 4.977 - 0.263 * ppb$ ;  $r^2 = 0.26$ ;  $P = 0.029$ ) (Fig. 55). En el hepatopáncreas se observó una tendencia similar pero los análisis estadísticos aplicados indicaron que no hubo una respuesta significativa.



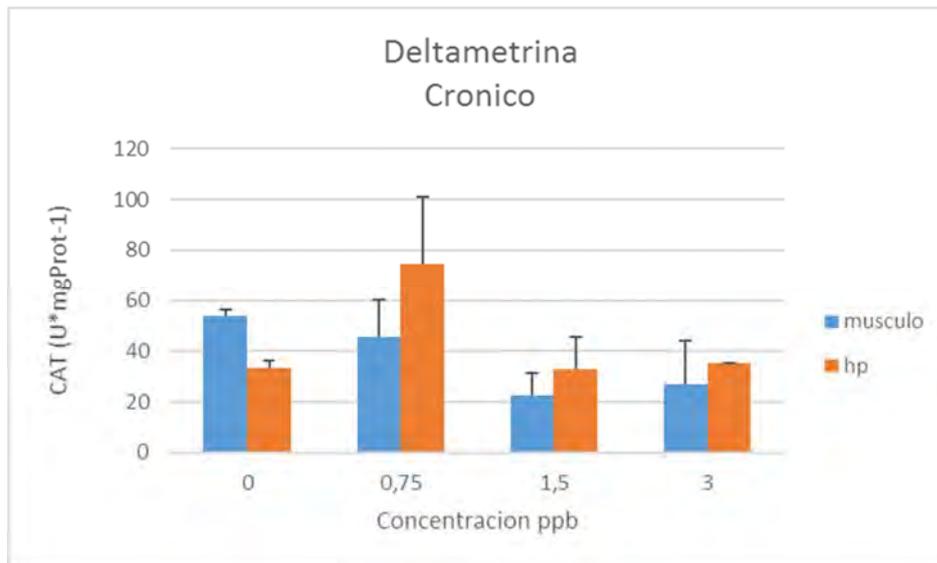
55 Figura 55. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Cipermetrina.

En musculo de jaibas expuestas a Deltametrina diariamente por 6 horas se observó un efecto significativo de la concentración del compuesto ( $P = 0.047$ ). La actividad de CAT disminuye a medida que la concentración de deltametrina aumentó. No se observó un efecto estadísticamente significativo en hepatopáncreas (Fig. 56).



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



**56 Figura 56. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Deltametrina.**

Para azametifos, si bien los valores de CAT en musculo son iguales para los dos primeros tratamientos y el control ( $5.27 \pm 2.4 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$ ), la disminución observada a 900 ppm ( $3.18 \pm 1.1 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$ ), equivalente a un 39%, no fue significativa ( $P=0.37$ ). La misma tendencia se observó para hepatopáncreas de estos animales. La actividad de CAT para los dos primeros tratamientos de azametifos y el control fue de  $3.93 \pm 1.9 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$ , la disminución observada a 900 ppm fue equivalente a un 63% ( $1.46 \pm 1.2 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$ ), pero no fue significativa ( $P=0.11$ ) (Fig. 57).

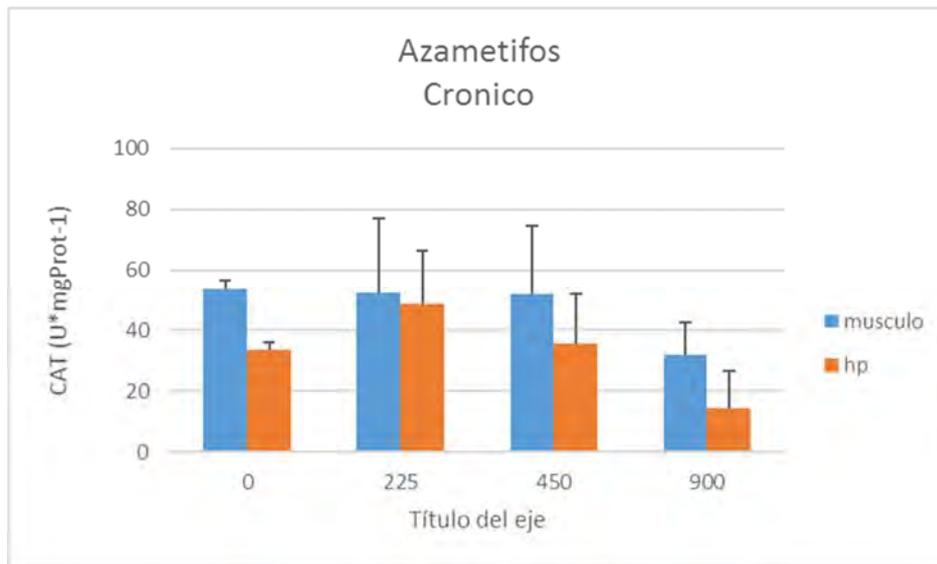
Se observó una disminución significativa en la actividad de CAT en musculo a las concentraciones más altas de peróxido, en comparación al control y 250 ppm ( $H=8.996$ ;  $P=0.029$ ). En el hepatopáncreas se observó la misma respuesta, esto es, una disminución significativa de la actividad de CAT en jaidas expuestas a 500 y 1000 ppm en comparación al control y 250 ppm ( $H=8.79$ ;  $P=0.032$ ). Estos resultados indican que el peróxido de



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

hidrógeno produce un efecto subletal significativo en musculo y hepatopáncreas de jaiba cuando esta fue sometida diariamente por 6 horas durante dos semanas a concentraciones de peróxido inferiores a las concentraciones recomendadas por el fabricante y utilizadas para el tratamiento contra *Caligus* (Fig. 58).



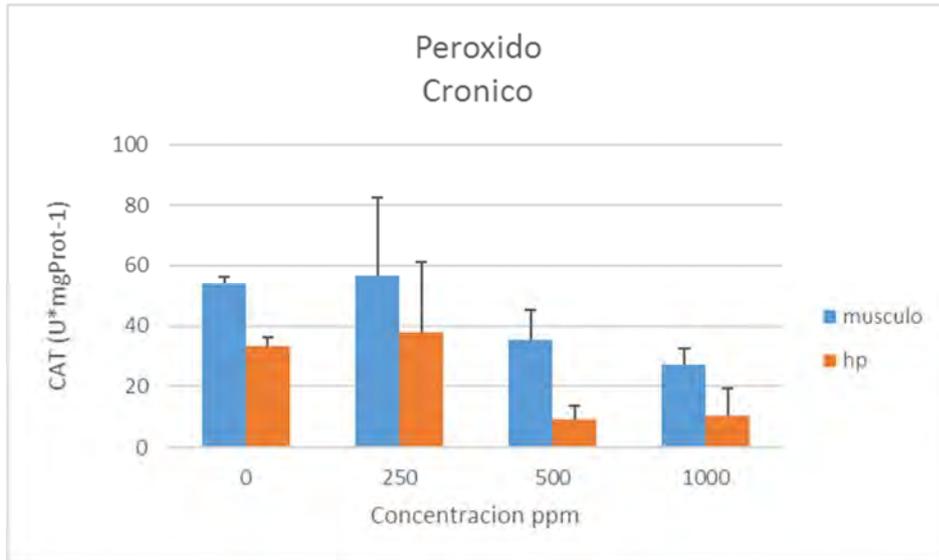
**57 Figura 57. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Azametifos.**

La actividad de acetilcolinesterasa ACHE en musculo de jaiba expuesta diariamente a Azametifos disminuyó en forma lineal a medida que aumentaron las concentraciones experimentales ( $P= 0.02$ ). De  $0.194 \pm 0.04 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$  a  $0.115 \pm 0.03 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$ , para el control y 900 ppb, respectivamente, lo que representa una disminución de casi un 40%. (Fig. 59)

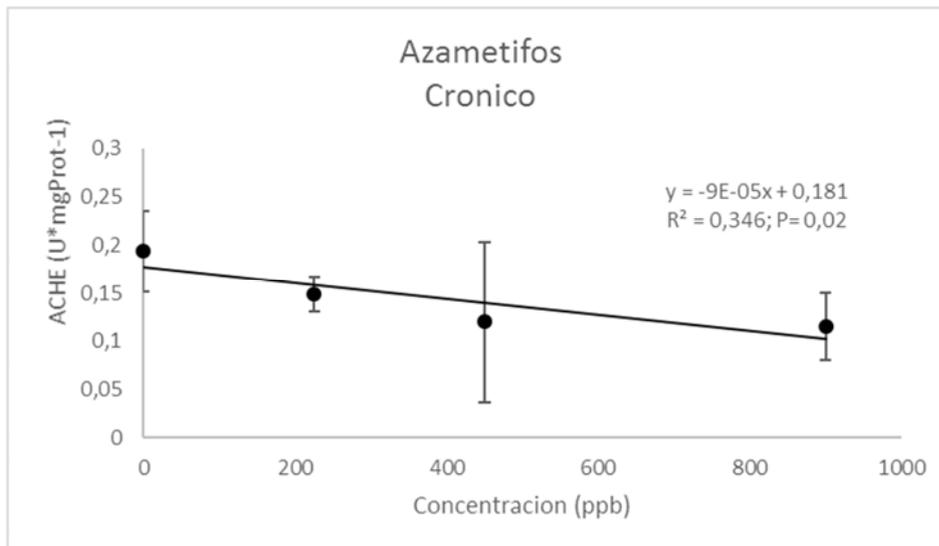


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



58 Figura 58. Actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas (hp) de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Peróxido de hidrógeno.



59 Figura 59. Actividad de ACHE en musculo de adultos de *C. edwardsii* luego de exposición crónica a Azametifos.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 9.2.2 Experimentos en larvas de jaiba marmola y centolla

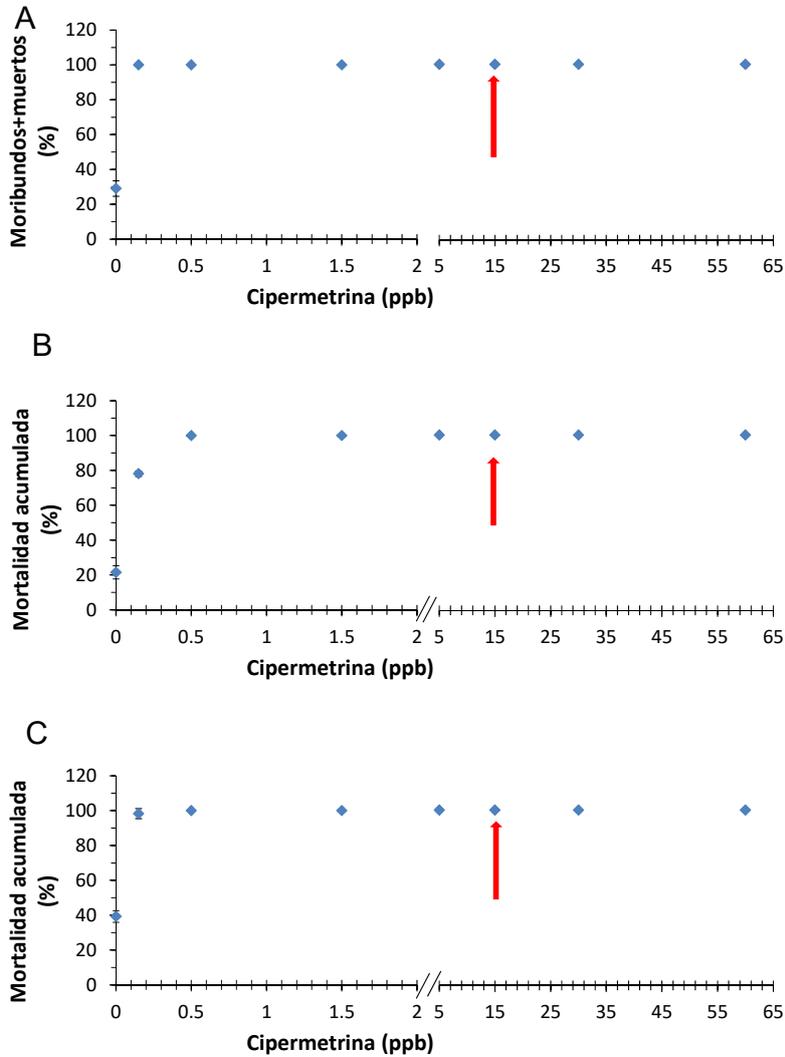
#### 9.2.2.1 Exposición aguda de larvas de *C. edwardsii*

##### **Cipermetrina**

Las larvas expuestas por 30 minutos a cipermetrina inmediatamente después de la exposición y de los lavados con agua de mar correspondientes se encontraban en su totalidad muertas en las concentraciones 0,5, 1,5, 5, 15 (ésta última recomendada por el fabricante), 30 y 60 ppb. En el caso de las Zoea I expuestas a 0.15 ppb, concentración más baja utilizada en el experimento, el  $78,09 \pm 1,53\%$  de las larvas inmediatamente postaplicación se clasificaron como moribundas A, encontrándose en el fondo, presentando débiles movimientos de los apéndices observables con microscopio estereoscópico. Estas larvas sobrevivieron hasta las 24 horas post-aplicación (Fig.60A, B). A las 48 horas post-exposición al fármaco el  $98,83 \pm 2,9\%$  de la concentración 0,15 ppb estaba muerto (Fig.60 C) alcanzando el 100% de mortalidad a las 96 horas post-exposición a la cipermetrina. La concentración letal<sub>50</sub> (CL<sub>50</sub>) no fue posible estimarla debido que todas las concentraciones provocaron altas mortalidades (sobre el 50%) lo cual no permite la estimación de CL<sub>50</sub>. El control presento solo un  $21,48 \pm 3,78\%$  de mortalidad a las 24 horas. Las únicas larvas que sobrevivieron y mudaron al segundo estadio de desarrollo fueron aquellas del control presentando un tiempo de desarrollo de la Zoea I de  $7,77 \pm 0,28$  días y una sobrevivencia de  $34,44 \pm 8\%$  (Fig. 61)



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura

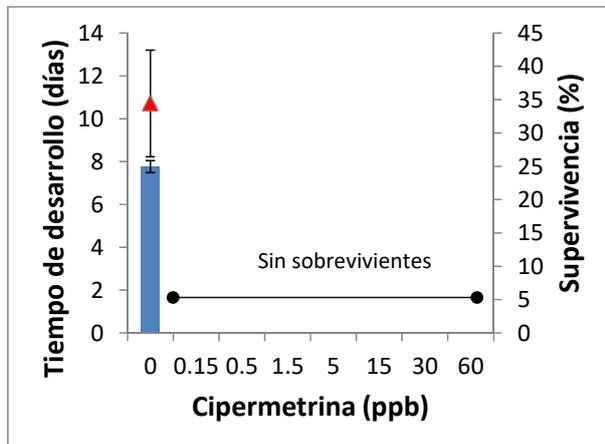


60 Figura 60. Zoea I de *C. edwardsii* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de cipermetrina. A) Larvas muertas más moribundas (%) a 24 horas post-exposición, Mortalidad acumulada B) 48 horas post-exposición y C) 96 horas post-exposición. La flecha la concentración recomendada por el fabricante



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



61 Figura 61: Tiempo de desarrollo (barras azules) de la Zoea I de *C. edwardsii* bajo distintas concentraciones de Cipermetrina y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)

## Deltametrina

El primer estadio larval de *C. edwardsii* después de una exposición de 40min y posterior lavado con agua de mar, sometidas a las concentraciones de deltametrina 0.1, 0.25, 0.5 y 1 ppb se encontraban en estado moribundas B, es decir en el fondo del recipiente sin capacidad de natación, pero con movimientos de los apéndices observable sin la necesidad de la utilización de microscopio estereoscópico. En los siguientes tratamientos correspondientes a 2 (recomendada por el fabricante), 3, 8 ppb de deltametrina el 33% aproximadamente de las larvas murieron y el resto estaban moribundas con débil movimiento de los apéndices observable bajo un microscopio estereoscópico (moribunda A).

A las 24 horas post-exposición el control, solo sujeto a la manipulación de exposición al fármaco, presentó un  $3.5 \pm 0.96\%$  de larvas moribundas y/o muertas, para el caso de las larvas sometidas a cualquier concentración de deltametrina se alcanzó un 100% (Fig. 62A). Si solo se considera las larvas muertas a las distintas concentraciones a las 24 horas post-aplicación es posible calcular la concentración letal 50, la cual fue  $1.252 \pm 0.0457$  ppb, la cual se encuentra por debajo de las concentraciones recomendadas por el fabricante (2 ppb de



## Universidad Austral de Chile

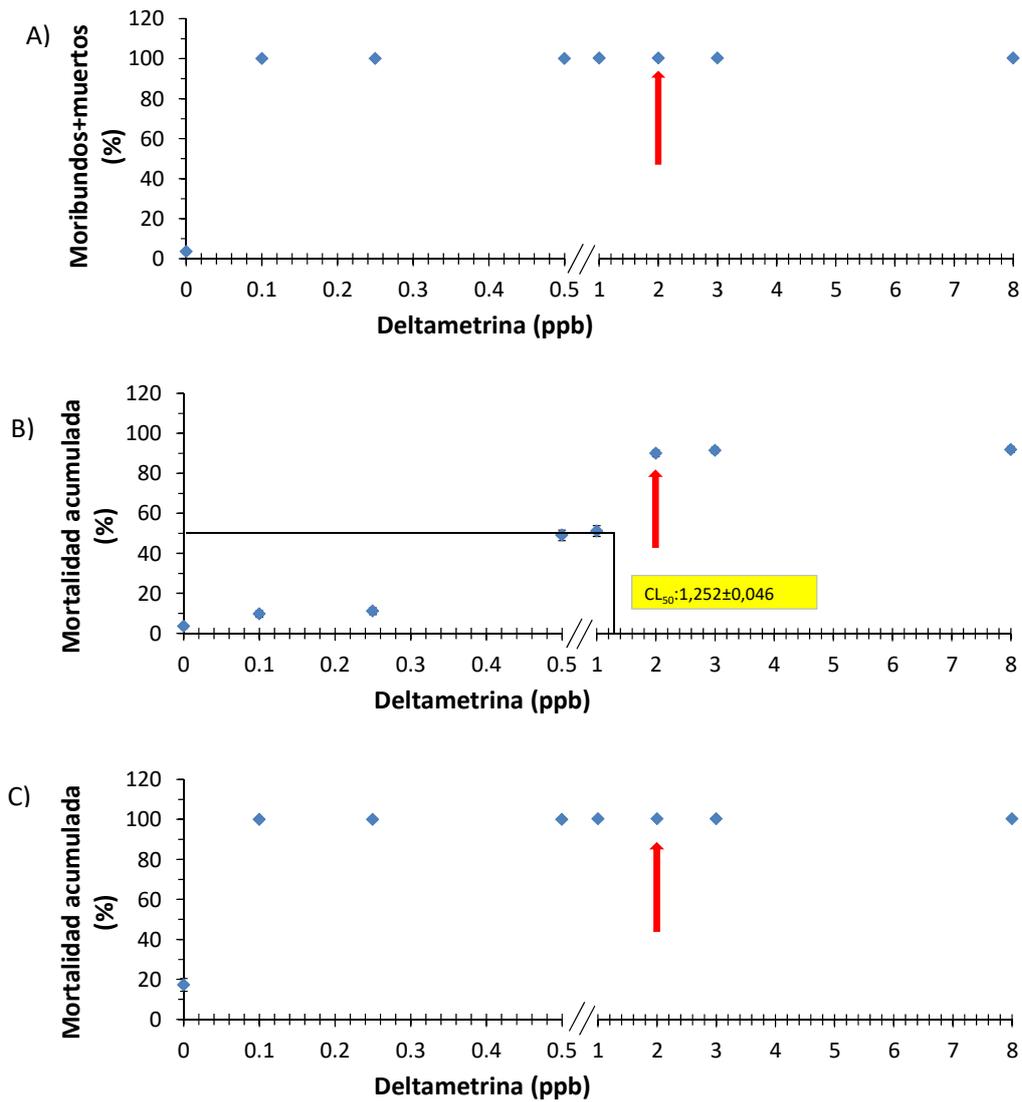
Instituto de Acuicultura

deltametrina). En la concentración anteriormente mencionada (2 ppb) las Zoea I de *C. edwardsii* presenta un 100% de mortalidad (Fig. 62B). Los tratamientos de las concentraciones de 0.1 y 0.25 ppb presentaron aproximadamente un 10% de mortalidad a las 24 horas post-aplicación (Fig. 62B). Las larvas sobrevivientes de los distintos tratamientos estaban en estado moribundo (A), en el fondo del recipiente sin capacidad de nadar y/o capturar alimento. A las 48 post-aplicación el 100% de las larvas tratadas con deltametrina presentaron un 100% de mortalidad y el control solo presento un  $17.23 \pm 3.17$  % de mortalidad (Fig. 62C). El tiempo de desarrollo de las larvas del control fue de  $8.37 \pm 0.14$  días y la supervivencia de  $35.09 \pm 8.9$  % (Fig. 63)



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

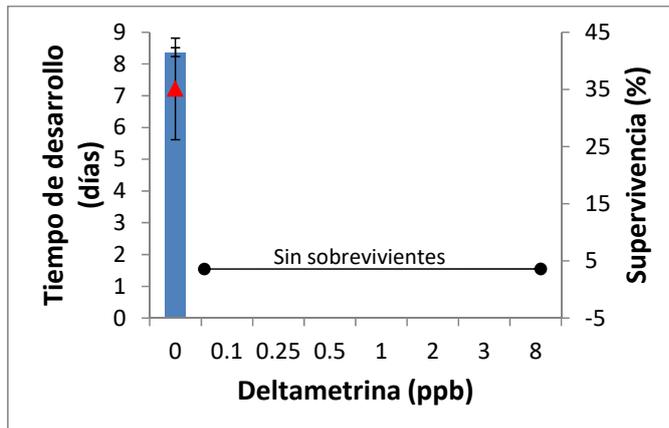


62 Figura 62. Zoea I de *C. edwardsii* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de deltametrina A) Larvas muertas más moribundas (%) a 24 horas post-exposición, Mortalidad acumulada B) 24 horas post-exposición y C) 48 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo indica la  $CL_{50} \pm es$ .



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



63 Figura 63. Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *C. edwardsii* bajo distintas concentraciones de deltametrina y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)

## Azametifos

Las Zoeas I de *C. edwardsii* sometidas solo a la manipulación que conlleva la aplicación de los fármacos en este caso de azametifos (control: solo agua de mar) así como las larvas expuestas a las dos concentraciones menores de azametifos (1y 3 ppb), se observaron vivas y activas inmediatamente después de la aplicación. Las larvas sometidas a 10, 30, 100 (correspondiente esta última a la recomendada por el fabricante), 300 y 500 ppb después de 30 minutos de exposición a azametifos estaban moribundas, encontrándose todas en el fondo de los recipientes, en el caso de las concentraciones 10 y 30 ppb las larvas presentaron movimiento de los apéndices observables a simple vista, pero sin ninguna posibilidad de nadar y capturar alimento (Moribunda B). En el caso de las larvas sometidas a 100 ppb, concentración correspondiente a la utilizada en la industria salmonera para el control del Caligus, las larvas se encontraban en el fondo del recipiente con débil movimiento de los apéndices y con el telson encorvado. Las larvas expuestas a 300 y 500ppb al igual que en las concentraciones anteriores las larvas después de la aplicación estaban



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

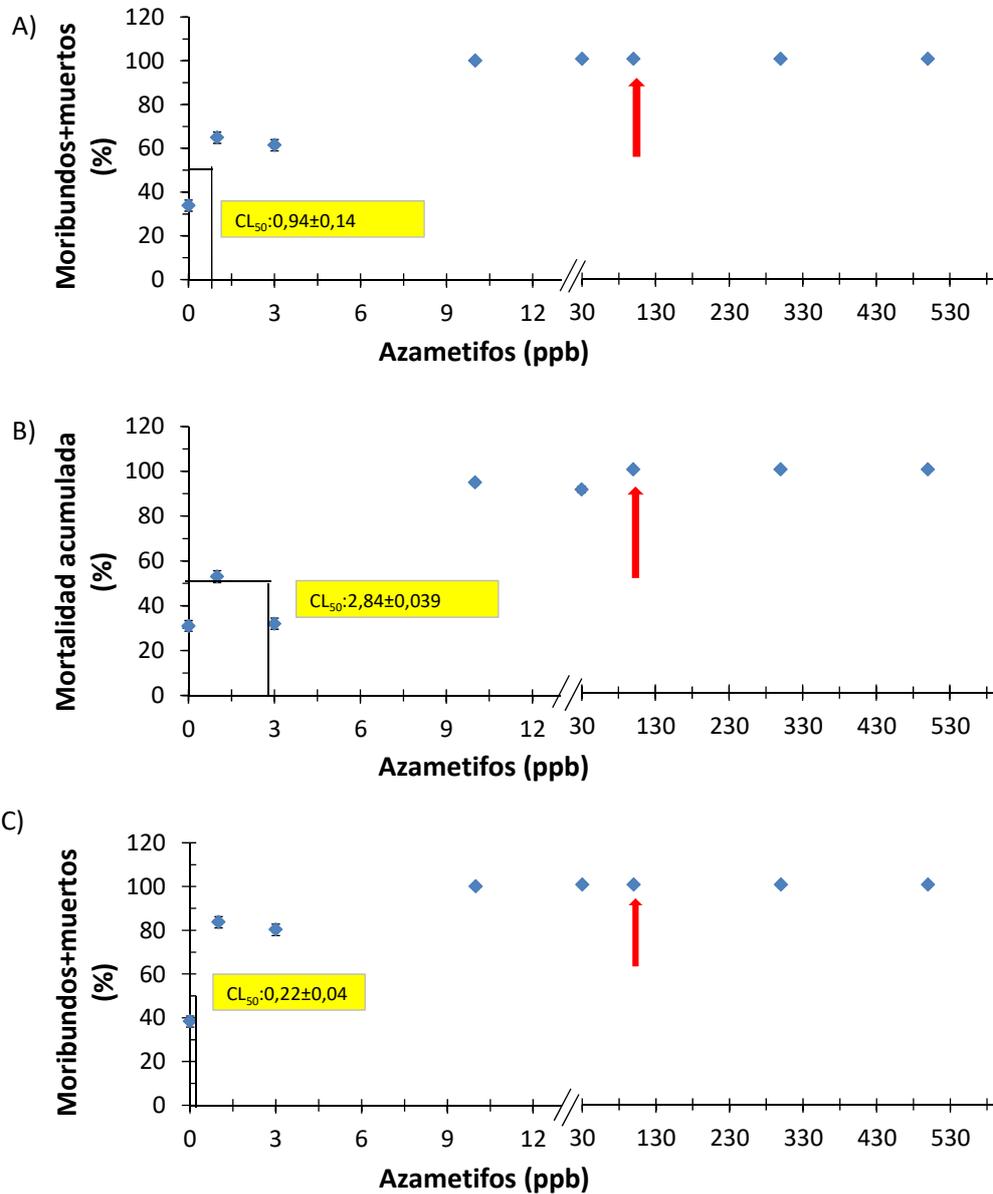
moribundas, encontrándose en el fondo de los recipientes, pero en este caso solo con débil latido cardíaco (Moribunda A).

A las 24 horas post-exposición a azametifos los tratamientos correspondientes a las dos concentraciones más bajas 1 y 3 ppb presentaron un  $64.85 \pm 2.55$  y un  $61.42 \pm 2.6\%$  de larvas moribundas y/o muertas en los respectivos tratamientos, calculándose una concentración letal 50 a las 24 horas de  $0.94 \pm 0.14$  ppb de azametifos, siendo este valor aproximadamente 106 veces más bajo que el utilizado para el control del Caligus. El control presentó una  $33.8 \pm 2.42\%$  de las moribundas y/o muertas (Fig. 64A). Al considerar solamente las larvas muertas a las 24 horas post-aplicación se observan 2 grupos aquellos tratamientos entre 0 a 3 ppb de azametifos cuya mortalidad es menor al 53%, y entre 10-500 ppb con mortalidad superior al 90%. Si solo se considera las larvas muertas la concentración letal 50 es de  $2.84 \pm 0.039$  ppb, aunque es superior a la estimada considerando las muertas y/o moribundas es considerablemente mayor a 100 ppb utilizada para el control de la caligidosis (Fig. 64B). A las 48 horas post-exposición los tratamientos con las concentraciones más bajas (1 y 3 ppb de azametifos) alcanzaron el 80% de larvas moribundas y/o muertas acumuladas, el control presentó  $38.3 \pm 2.5\%$  de larvas moribundas y/o muertas acumuladas y los otros tratamientos presentaron 100% de mortalidad. La concentración letal 50 calculada para las 48 horas fue de  $0.22 \pm 0.04$  ppb de azametifos (Fig. 64C).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



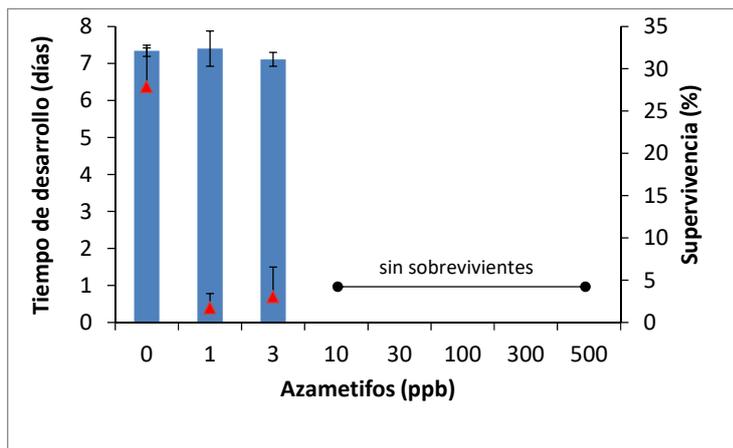
64 Figura 64 Zoea I de *C. edwardsii* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de azametifos A) Larvas muertas más moribundas (%) a 24 horas post-exposición, Mortalidad acumulada B) 24 horas post-exposición y C) 48 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo indica la  $CL_{50} \pm es$ .



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Sobrevivieron hasta mudar a Zoea II, aquellas larvas mantenidas en el control, presentando un tiempo de desarrollo de  $7.34 \pm 0.15$  días, y las tratadas con 1 y 3 ppb de azametifos, cuyo tiempo de desarrollo fue  $7.4 \pm 0.48$  y  $7.11 \pm 0.19$  días respectivamente. Los tiempos de desarrollo de las larvas no difirieron entre los tratamientos y el control. Un  $27.89 \pm 4.57\%$  de las larvas en el control mudaron a Zoea II y solamente un  $1.71 \pm 1.7$  y  $3.04 \pm 3.5\%$  en los tratamientos 1 y 3 ppb de azametifos, observándose claramente el efecto del azametifos en la supervivencia de las larvas, no así en el tiempo requerido para mudar al segundo estadio de desarrollo (Fig. 65).



65 Figura 65: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *C. edwardsii* bajo distintas concentraciones de azametifos y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)

## Peróxido de Hidrógeno

Las larvas de *C. edwardsii* que fueron sometidas a las 3 más altas concentraciones consideradas para el peróxido de hidrógeno por 20 minutos (3000, 2000, 1500 ppm siendo esta última la recomendada por el fabricante) después de los lavados con agua de mar correspondientes, se encontraban vivas, pero no nadaban activamente encontrándose en el fondo del recipiente, observándose el movimiento de los apéndices sin la necesidad de



## Universidad Austral de Chile

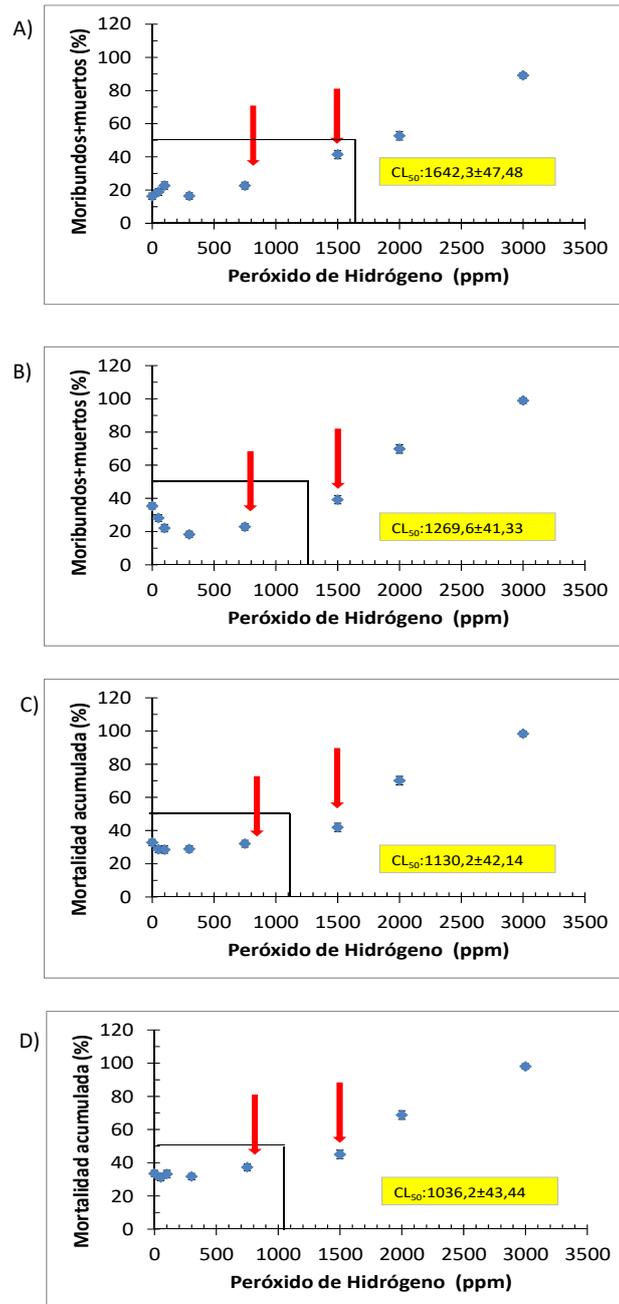
Instituto de Acuicultura

utilizar microscopio estereoscópico (Moribundas B). En el caso de las larvas que fueron expuestas a 750 ppm de peróxido de hidrógeno, después de los lavados correspondientes con agua de mar, aproximadamente el 15% no nadó activamente ubicándose en el fondo del recipiente, pero con movimiento activo de los apéndices, el resto de las larvas (aprox. el 85% de las larvas) nadaban activamente. En el caso de las larvas sometidas a las concentraciones 50, 100 y 300 ppm de peróxido de hidrógeno, así como las larvas enfrentadas solo a la manipulación (control: solo agua de mar) se observaron vivas, nadando activamente.

El porcentaje de larvas muertas y/o moribundas de *C. edwardsii* a las 24 horas post-exposición al peróxido de hidrógeno, en las concentraciones entre 0 y 750 ppm de peróxido de hidrógeno, fluctuó entre  $16.27 \pm 1.89\%$  y  $22.71 \pm 2.05$ , respectivamente. Para las larvas sometidas a la concentración recomendada por el fabricante, 1500 ppm la mortalidad y/o las larvas moribundas se elevó a  $41.43 \pm 2.5\%$ . Las Zoeas I expuestas a las dos concentraciones más alta, 2000 y 3000 ppm, la mortalidad y/o las larvas moribundas fue de  $52.7 \pm 2.6\%$  y  $89.07 \pm 1.68\%$  (Fig. 66A). La concentración letal 50 estimada a las 24 horas post-aplicación fue de  $1642.3 \pm 47.48\%$  ppm de peróxido de hidrógeno, por sobre la recomendada por el fabricante de 1500 ppm y a la utilizada comúnmente en Chile alrededor de 800 ppm. A las 48 horas post-exposición a peróxido de hidrógeno, el tratamiento correspondiente a la concentración recomendada por el fabricante (1500 ppm) alcanzó un 39.2 % de larvas muertas acumuladas más las moribundas y las concentraciones de 2000 y 3000 ppm presentaron un  $69.8 \pm 2.3$  y  $98.9 \pm 0.5\%$ , respectivamente. La concentración letal 50 estimada para las 48 horas post-exposición fue de  $1269.6 \pm 41.33$  ppm (Fig. 66B). A partir de las 72 horas post-aplicación se observaron pocas larvas moribundas y la mortalidad presentó pocas variaciones en relación a las 96 horas post-aplicación (Fig. 66C, D), la concentración letal 50% a las 72 horas correspondió a  $1130.2 \pm 42.14$  ppm de peróxido de hidrógeno y a las 96 horas fue levemente inferior ( $1036.2 \pm 43.44$  ppm), pero en ambos casos concentraciones inferiores a las recomendadas por el fabricante.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



66 Figura 66. Mortalidad acumulada (%) de Zoea I de *C. edwardsii* expuestas por 20 minutos a distintas

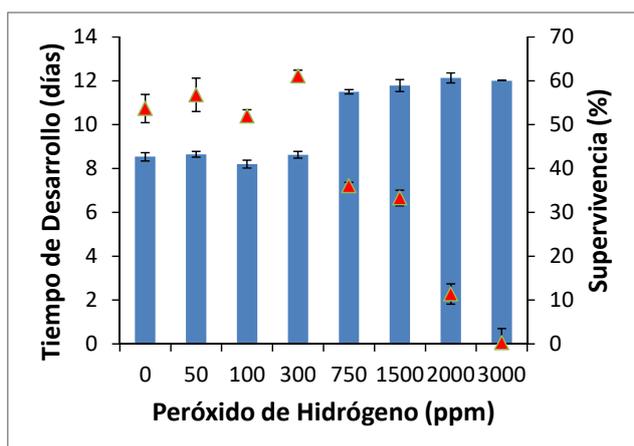


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

concentraciones (ppm) de Peróxido de Hidrógeno A) 24 horas post-exposición, B) 48 horas post-exposición. C) 72 horas post-exposición D) 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la  $CL_{50} \pm es$ .

El tiempo de desarrollo de las Zoea I del control fue de  $8.54 \pm 0.19$  días y de los tratamientos 50, 100, 300 ppm; de  $8.65 \pm 0.13$ ,  $8.2 \pm 0.18$  y  $8.63 \pm 0.15$  días respectivamente, el tiempo de desarrollo, así como la supervivencia no presentaron diferencias significativas. En promedio estos tratamientos incluido el control presentaron un  $55.89 \pm 4\%$  de supervivencia hasta alcanzar el segundo estadio de desarrollo. Las larvas que fueron expuestas a 750, 1500, 2000 y 3000 ppm de peróxido de hidrógeno prolongaron el desarrollo, mudando a Zoea II a los  $11.5 \pm 0.1$ ,  $11.78 \pm 0.27$ ,  $12.13 \pm 0.23$  y 12 días, respectivamente y diferenciándose significativamente del control y de los tratamientos 50, 100 y 300 ppm de peróxido de hidrógeno. La supervivencia de los tratamientos 750 y 1500 ppm no presento diferencias entre sí, sobreviviendo aproximadamente un 35%, pero si se diferenció del control y de los 50, 100, 3000 ppm, así como de las dos más altas concentraciones (2000 y 3000ppm) donde la supervivencia fue de  $11.4 \pm 2.3$  y  $0.28 \pm 3.2\%$ , respectivamente (Fig. 67).



67 Figura 67: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *C. edwardsii* bajo distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)



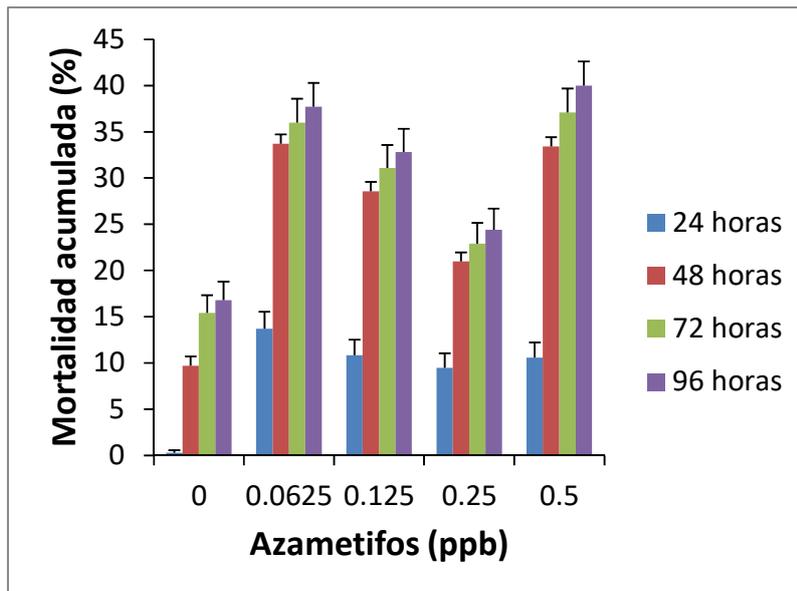
## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 9.2.2.2 Exposición crónica de larvas de *C. edwardsii*

#### Azametifos

La mortalidad de las larvas de *C. edwardsii* después de 24 horas de la primera aplicación con azametifos presentaron diferencias significativas entre el control y las 4 concentraciones utilizadas, pero no entre los tratamientos siendo la mortalidad de aproximadamente un 10%. Después de 2 aplicaciones de azametifos (48 horas), la mortalidad acumulada en los tratamientos se mantuvo significativamente distinta del control, alcanzando éste solo un 10% de mortalidad acumulada versus el 30% aproximadamente en los tratamientos, el mayor incremento en la mortalidad se registró después de la segunda aplicación del fármaco en todos los tratamientos (Fig. 68).



68 Figura 68. Mortalidad acumulada (%) de Zoea I de *C. edwardsii* expuestas a 4 aplicaciones de azametifos a distintas concentraciones.

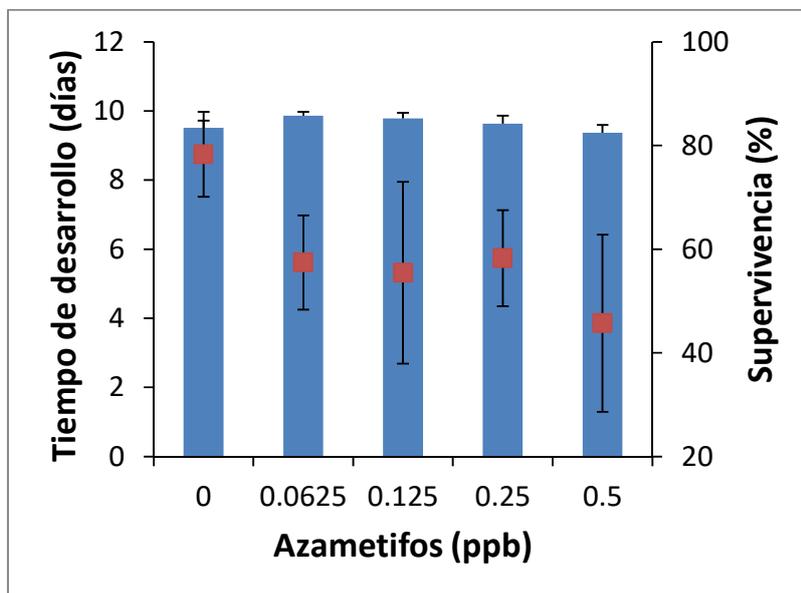
El tiempo de desarrollo de las Zoea I después de 7 días de aplicaciones diarias de azametifos no presentó diferencias significativas con el control, y fluctuó entre  $9.367 \pm 0.2264$  y  $9.865 \pm 0.106$  días, tratamiento 0.5 y 0.00625 ppb respectivamente, pero sí se encontraron diferencias significativas entre la supervivencia del control ( $78.28 \pm 8.19\%$ ) y la



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

presentada en los tratamientos 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5 ppb. Para el caso de los 3 tratamientos con las más bajas concentraciones la supervivencia fue aproximadamente de un 56% versus el tratamiento con la más alta concentración (0.5) que alcanzó aproximadamente un 10% menos (Fig.69).



69 Figura 69: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *C. edwardsii* bajo exposición crónica (7 días) a distintas concentraciones de azametifos y supervivencia hasta mudar a Zoea II (cuadrados rojos)

## Peróxido de Hidrógeno

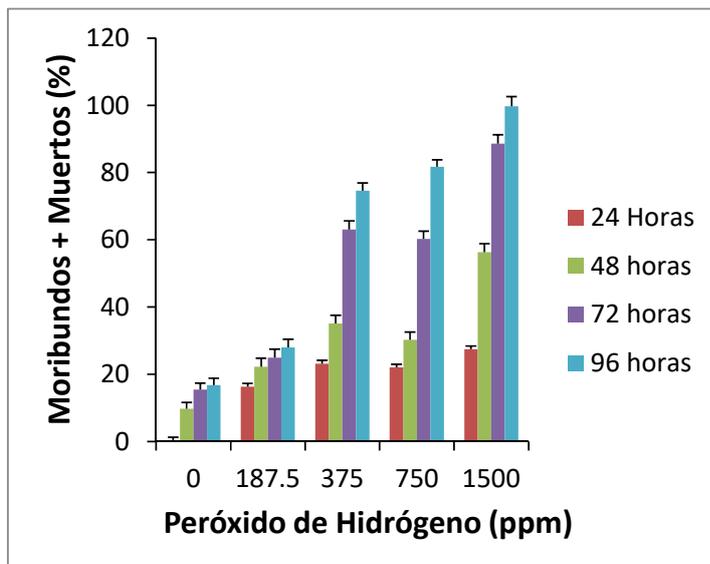
La mortalidad de las larvas a las 24 horas posteriores a la primera aplicación de peróxido de hidrógeno no superó el 5% en ninguno de los tratamientos, sin embargo, cuando se considera no solo la mortalidad sino también las larvas moribundas, aproximadamente el 23% de las larvas de los tratamientos caen en esta categoría (Fig. 70), presentando diferencias significativas con el control. Después de dos aplicaciones de 1500 ppm de peróxido de hidrógeno, sobre el 50% de las larvas han muerto y/o se encuentran moribundas, las 3 anteriores concentraciones (187.5 a 750 ppm) presentan entre 22.2 y 35.1% de larvas muertas y/o moribundas. A partir de la tercera aplicación de peróxido de



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

hidrógeno a concentraciones de 375 y 750 ppm, estos tratamientos alcanzan sobre el 60% de larvas moribundas y/o muertas. Distinguiéndose estadísticamente 4 grupos: a) el control con 15.5%, b) el tratamiento de 187.5 ppm con 24.9% c) los tratamientos de 375 y 750 ppm con un 62% aproximadamente y d) el tratamiento de 1500 ppm con 88.6% de larvas muertas y/o moribundas. Después de la tercera aplicación, es cuando se produce el mayor incremento de larvas muertas y/o moribundas principalmente en las tres concentraciones más altas utilizadas (Fig. 70). Cercano al 100% de las larvas se encuentran muertas y/o moribundas con 4 aplicaciones de peróxido de hidrogeno a 1500 ppm, manteniéndose los 4 grupos anteriormente descritos.



70 Figura 70. Mortalidad acumulada (%) de Zoea I de *C. edwardsii* expuestas a 4 aplicaciones de Peróxido de Hidrógeno a distintas concentraciones.

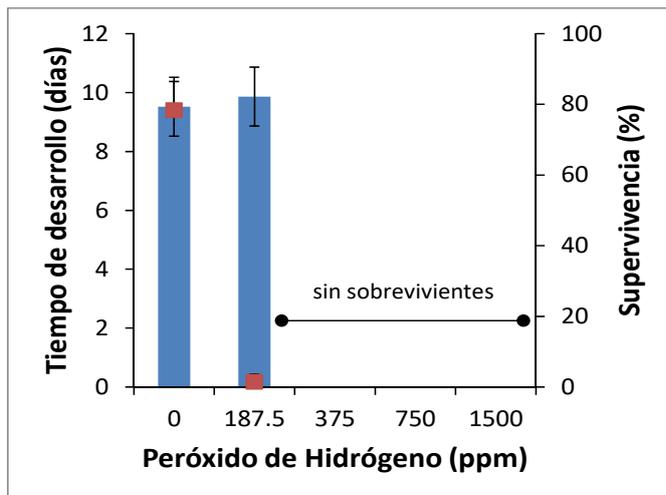
Con 6 aplicaciones de peróxido de hidrógeno a las concentraciones de 375 y 750 ppm ninguna larva se encuentra activa, cayendo en la categoría de muertas o moribundas. Las larvas del tratamiento 187.5 ppm después de 7 aplicaciones de peróxido permanecen como Zoea I sin mudar a Zoea II por un máximo de 22 días, muriendo aproximadamente el 98%



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

de ellas en este periodo, las larvas que sobreviven mudan a Zoea II a los  $9.8 \pm 0.10$  días. Las larvas del control mudan a Zoea II en promedio a los  $9.514 \pm 0.021$  y presentan una supervivencia de un  $70.28 \pm 8.2\%$  (Fig.71).



71 Figura 71. Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *C. edwardsii* bajo exposición crónica (7 días) a distintas concentraciones de Peróxido de Hidrógeno y supervivencia hasta mudar a Zoea II (cuadrados rojos)

## 9.2.2.3 Exposición aguda de larvas de *Lithodes santolla*

### Cipermetrina

#### Zoea I

Las larvas del control como las de la concentración 0.15 ppb de cipermetrina se observaron activas post-aplicación, las larvas sometidas a las concentraciones 0.5 y 1.5 se encontraban en el fondo del recipiente. Las Zoea I sometidas a concentraciones iguales o sobre 5 ppb se observaron en el fondo con débiles movimiento de los apéndices, pero observables sin necesidad de microscopio estereoscópico (moribunda B) inmediatamente después de los lavados con agua de mar post-aplicación del fármaco.



## Universidad Austral de Chile

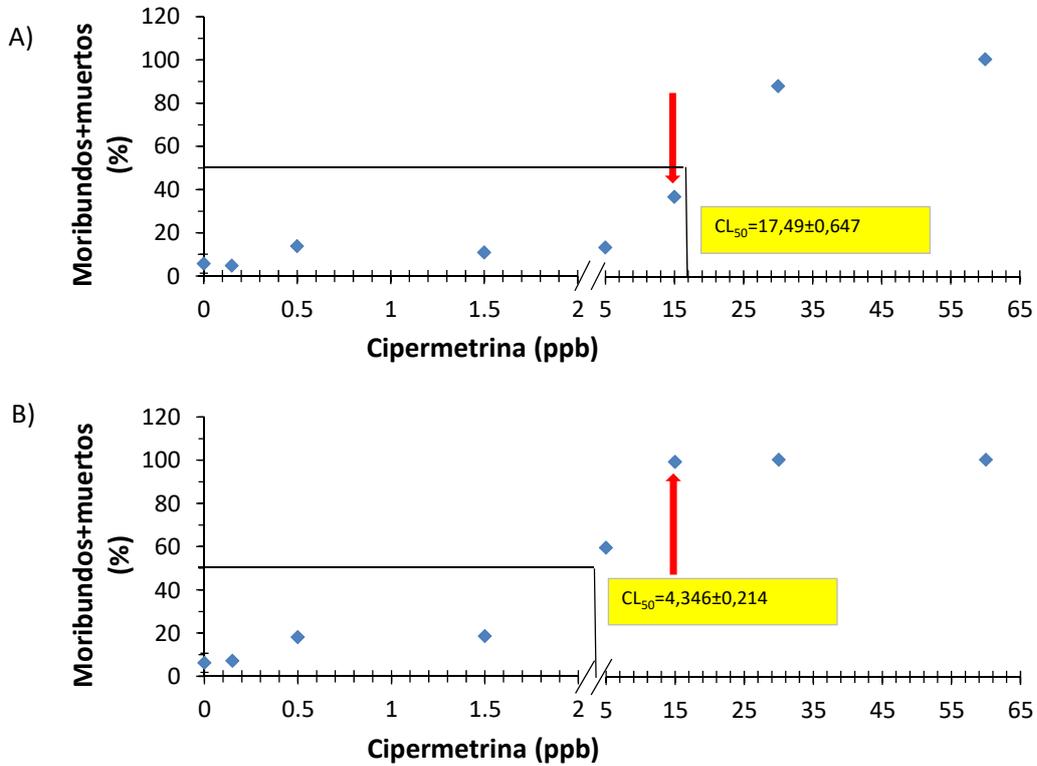
Instituto de Acuicultura

A las 24 horas post-tratamiento se observó bajo número de Zoea I muertas o moribundas no superando el 5% en todos los tratamientos y el control con excepción de las expuestas a 60 ppb que en un 100% estaban muertas o moribundas. A las 72 horas post aplicación (Fig. 72 A) se distinguieron estadísticamente 4 grupos en relación al porcentaje de larvas muertas y/o moribundas a) el control con el tratamiento 0.15 ppb donde no se superó el 6% b) los tratamientos 0.5; 1.5; 5 ppm con aproximadamente 12%, c) el tratamiento 30 ppb con  $36.6 \pm 3.32$  % y d) el tratamiento 60 ppb con 100%, ya alcanzado a las 24 horas post-aplicación. La concentración letal 50 calculada para las 72 horas fue de  $17.49 \pm 0.64$  ppb. A las 96 horas tanto el control como el tratamiento de 0.15 presentaron aproximadamente un 7% de larvas muertas y/o moribundas, levemente superior a lo observado a las 72 horas, de igual manera los tratamientos 0.5 y 1.5 también presentan un leve aumento (18%), pero los tratamientos 5, 15, 30 presentan los mayores incrementos en larvas muertas y/o moribundas, 59.5%, 99% y 100% respectivamente. A las 96 horas post-exposición, la concentración letal 50 para las Zoea I *L. santolla* fue de  $4.34 \pm 0.21$ , superando aproximadamente en 3 veces a la concentración recomendada (Fig. 72 B).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



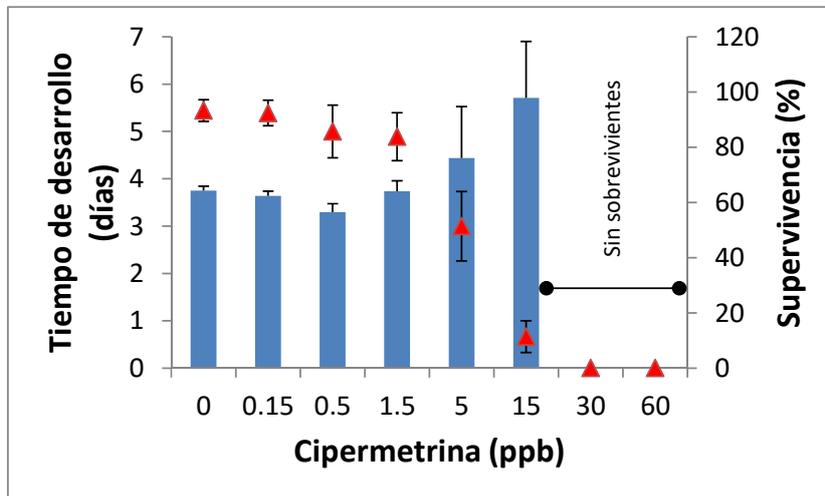
**72** Figura 72. Moribundas más muertas (%) de Zoa I de *L. santolla* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de cipermetrina A) 72 horas post-exposición, B) 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la  $CL_{50} \pm es$ .

El tiempo de desarrollo de la Zoa I no presento diferencias entre el control y los tratamientos menores o iguales a 1.5 ppb, pero si prolongo en aproximadamente en 1 y 2 días en los tratamientos de 5 y 15 ppb, presentando en estos tratamientos solo un  $51.42 \pm 12.59$  y  $11.43 \pm 5.72\%$  de supervivencia (Fig. 73).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



73 Figura 73: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *L. santolla* bajo distintas concentraciones de cipermetrina (ppb) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)

## Megalopa:

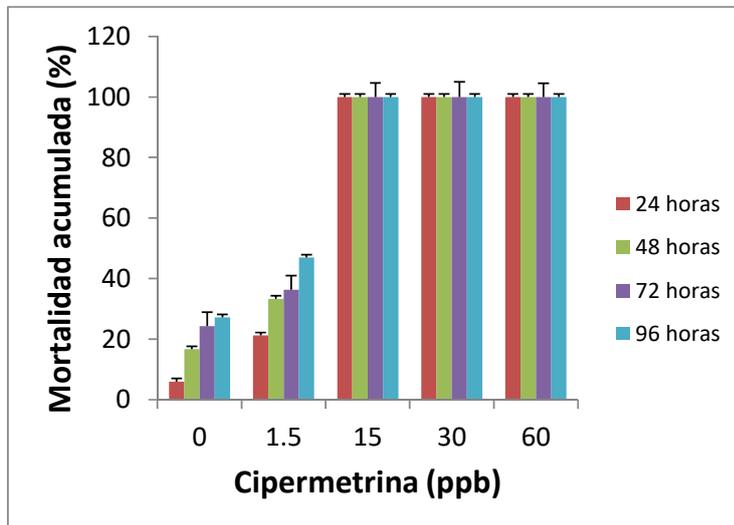
Las larvas del control después de los lavados con agua de mar se observaban activas, nadando, aquellas megalopas expuestas a 1.5 ppb si bien estaban activas y nadaban sus movimientos eran más lentos en comparación al control. Las larvas sometidas a las concentraciones 15, 30 y 60 ppb fueron clasificadas como moribundas A, casi sin movimientos requiriéndose varios minutos para observar algún movimiento de los apéndices y/o telson.

Las megalopas expuestas a concentraciones iguales o mayores de 15 ppb (recomendada por el fabricante) murieron a las 24 horas post-aplicación. La mortalidad de la megalopas del control incremento desde un  $6 \pm 2.93\%$  a  $27.2 \pm 5.48\%$  a las 96 horas post-aplicación siendo significativamente menor a la mortalidad presentada por las larvas expuestas a 1.5 ppb a las 24 horas como a las 96 horas post-exposición (Fig. 74).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



74 Figura 74. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de *L. santolla* sometidas a distintas concentraciones de cipermetrina en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición).

## Deltametrina Zoea I:

Las larvas de *L. santolla* post-aplicación de 0.1 ppb de deltametrina por 40 minutos se observaron activas, al igual que aquellas sometidas solo a la manipulación (control). Las larvas de la concentración 0.25 ppb presentan movimientos más lentos, pero sin caer en la categoría de moribundas, la mayoría de las larvas de la concentración 0.5 ppb se encuentran en el fondo post-aplicación. A partir de la concentración 1 ppb de deltametrina las larvas se encuentran en mal estado, todas en el fondo, moribundas A.

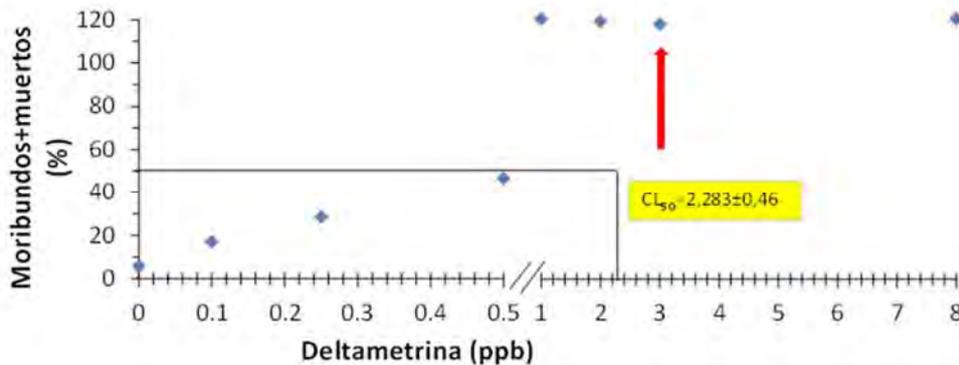
El 100% de las larvas sometidas a concentraciones mayores o iguales a 1 ppb de deltametrina se encontraban muertas y/o moribundas y el 98% aproximadamente de las larvas expuestas a concentraciones menores o iguales a 0.5 ppb se encontraban vivas y activas sin presentar diferencias con el control a las 24 horas post-exposición. Las larvas expuestas 2 y 3 ppb de deltametrina presentan una recuperación a las 48 y 72 horas post-aplicación, pero a las 96 horas se observa nuevamente que cerca del 100% de las larvas están muertas y/o moribundas. El tratamiento de 1 ppb a las 96 horas post-aplicación



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

también presenta un 100% de larvas muertas y/o moribundas. En este periodo el control solo presenta un 6% de larvas muertas y/o moribundas. La concentración letal 50 determinada a las 96 horas post-exposición correspondió a  $2.28 \pm 0.46$  ppb (Fig. 75).



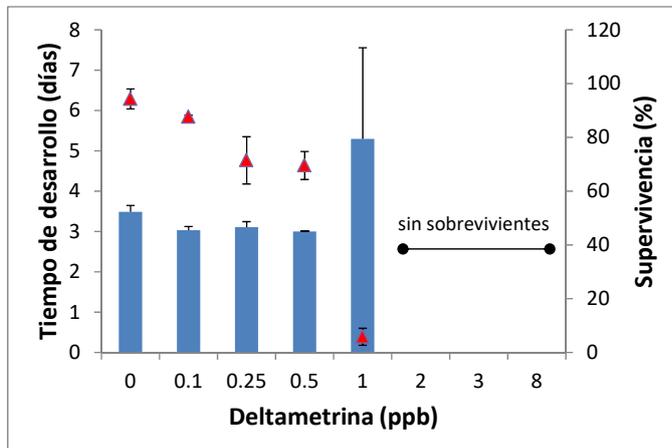
**75** Figura 75. Moribundas más muertas (%) de Zoea I de *L. santolla* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de deltametrina a las 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la  $CL_{50} \pm es$ .

El tiempo de desarrollo de la Zoea I fue de aproximadamente 3 días en los tratamientos expuestos a concentraciones menores o iguales a 0.5 ppb sin presentar diferencias con el control, las pocas larvas que sobrevivieron ( $5.83 \pm 3.191\%$ ) a la exposición de 1ppb de deltametrina mudaron a Zoea I aproximadamente dos días después ( $5.29 \pm 2.26$  días). La supervivencia de la Zoea I hasta alcanzar el segundo estadio de desarrollo larval vario, para los tratamientos que no presentaron diferencias en el tiempo de desarrollo con el control, entre  $87.6 \pm 0.6$  y  $69.5 \pm 5.2$  %, tratamiento 0.1 y 0.5 ppb, respectivamente (Fig. 76).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



76 Figura 76: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *L. santolla* bajo distintas concentraciones de deltametrina (ppb) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)

## Megalopa:

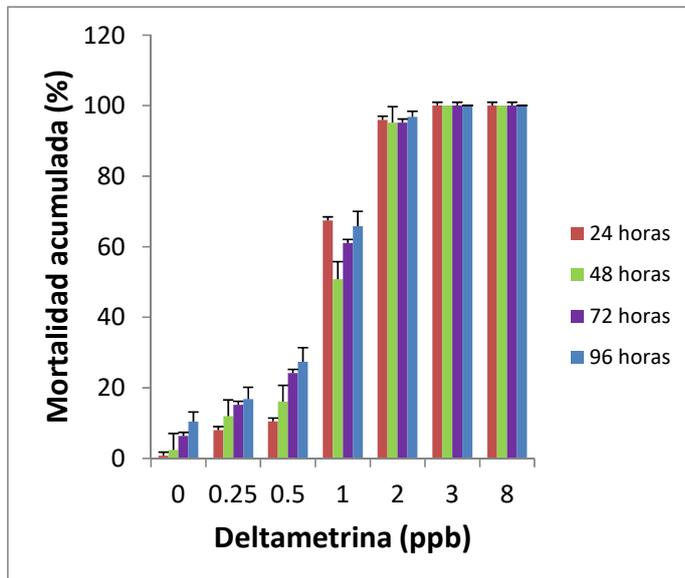
Las megalopas del control, así como las expuestas a 0.25, 0.5, 1.0 ppb de deltametrina inmediatamente después de los lavados post-aplicación se observaron activas, nadando. Las larvas expuestas a 2.0 ppb post-aplicación se observaron moribundas (B) con débiles movimientos en los apéndices y aquellas expuestas a 3 y 8 ppb fueron clasificadas como moribundas A.

A las 24 horas post-exposición, a las concentraciones iguales o superiores a 2 ppb, ya presentaban sobre el 95% de las larvas muertas. La mortalidad del control fluctuó entre 0.8 y 10 %, 24 y 96 horas post-aplicación (Fig. 77). Las concentraciones letales 50 calculadas para las 24, 48, 72 y 96 horas post aplicación fueron  $1.04 \pm 0.041$ ,  $0.99 \pm 0.042$ ,  $0.87 \pm 0.041$  y  $0.79 \pm 0.03$  ppb, encontrándose por debajo en todos los casos que la concentración recomendadas por el fabricante (2 ppb).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



77 Figura 77. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de *L. santolla* sometidas a distintas concentraciones de deltametrina en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición).

## Azametifos

### Zoea I:

Tanto las larvas del control como aquellas sometidas a 1 y 3 ppb de azametifos se observaron activas, la mayoría de las larvas sometidas a las concentraciones 10, 30, 100 ppb de azametifos se encuentran en el fondo, pero presentan movimiento de los apéndices observables a simple vista (moribunda B). Las larvas que fueron tratadas con 300 y 500 ppb se encontraban moribundas con débiles movimientos de los apéndices solamente observable bajo microscopio estereoscópico (Moribunda A).

A las 24 post-exposición el control como los tratamientos menores o iguales a 30 ppb no superaron el 5% de larvas muertas y/o moribundas y aquellas expuestas a las dos concentraciones mayores 300 y 500 ppm alcanzaron sobre el 90% de larvas muertas y/o moribundas (Fig. 78 A) ajustándose un  $CL_{50}=204.27\pm 6.8$  ppb para las 24 horas post-aplicación. A las 96 horas post-aplicación los tratamientos 30 y 100 ppb presentaron aproximadamente el 31.0% de larvas muertas y/o moribundas y los tratamientos entre 1 y



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

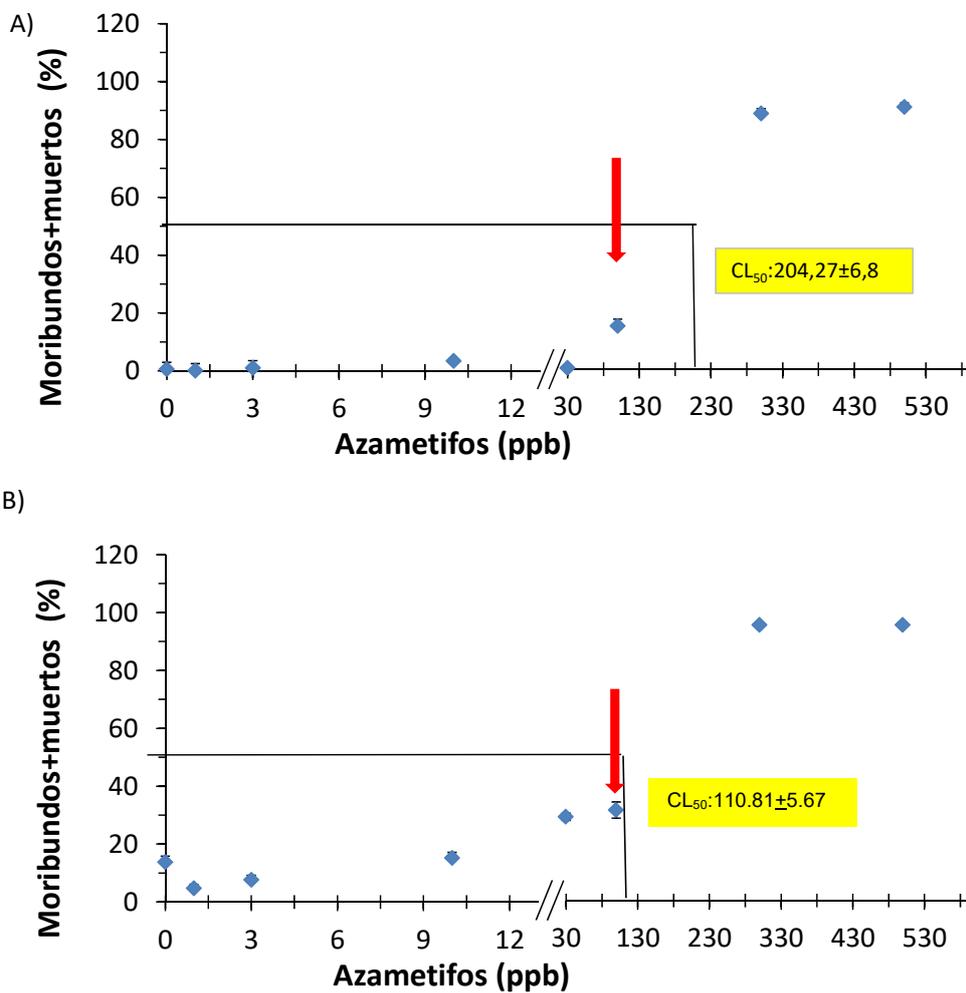
10 ppb no alcanzaron el 20% de mortalidad (Fig. 78 B). La  $CL_{50}=110.81\pm 5.7$  ppb estimada para las 96 horas post aplicación fue 100 ppb menor que la estimada a las 24 horas y aproximándose a la concentración recomendada por el fabricante (Fig. 78 B).

La supervivencia de los tratamientos que completaron el desarrollo de Zoea I vario entre 69.52 y 95.23%, 100 y 1-30 ppb, respectivamente (Fig. 79). El tiempo de desarrollo en el control y el tratamiento a 1 ppb fue de aproximadamente 3.3 días y levemente inferior en los tratamientos entre 3 y 100 ppb, aproximadamente 2.8 días (Fig. 79)



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

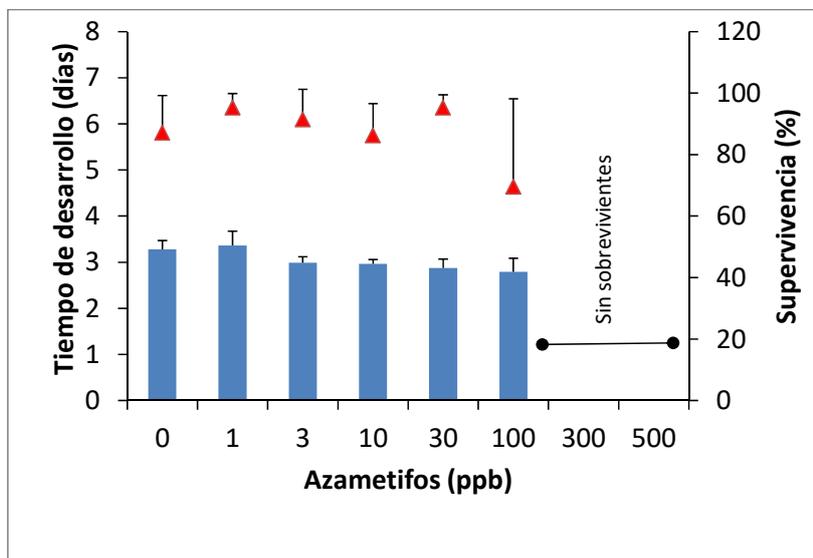


78 Figura 78. Moribundas más muertas (%) de Zoea I de *L. santolla* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de azametifos A) a las 24 horas post-exposición y B) a las 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante. En el recuadro amarillo se indica la  $CL_{50} \pm es$ .



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



79 Figura 79. Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *L. santolla* bajo distintas concentraciones de azametifos (ppb) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)

## Megalopa:

Tanto las larvas del control como las expuestas a 3 y 30 ppb se observaron activas después de los lavados con agua de mar post-exposición. Las megalopas expuestas a 100ppb se presentaron menos activas que los tratamientos anteriores y las expuestas a 500ppb se clasificaron como moribundas A.

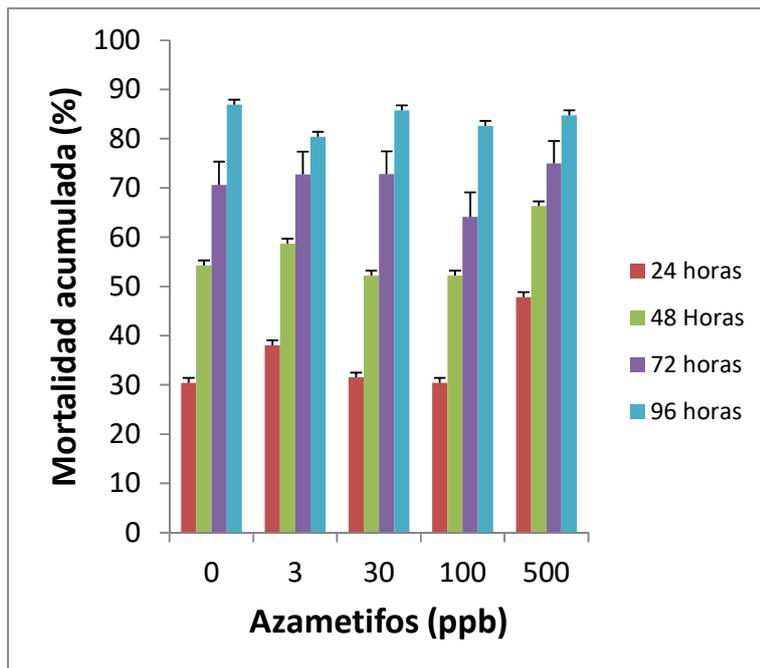
La mortalidad de las megalopas en el control fue muy alta a las 24 horas post-aplicación,  $30.43 \pm 4.79\%$  y aumento gradualmente hasta las 96 horas siguiendo un patrón similar la mortalidad en los distintos tratamientos, no distinguiéndose un efecto de la exposición a las distintas concentraciones de azametifos (Fig. 80). Estos resultados no permiten establecer



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

si el azametifos tiene efecto sobre la supervivencia de las megalopas de *L. santolla*, probablemente los efectos de la exposición al azametifos fueron enmascarados por la calidad de las megalopas utilizadas en el experimento.



80 Figura 80. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de *L. santolla* sometidas a distintas concentraciones de Azametifos en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición).

## Peróxido de Hidrógeno

### Zoea I:

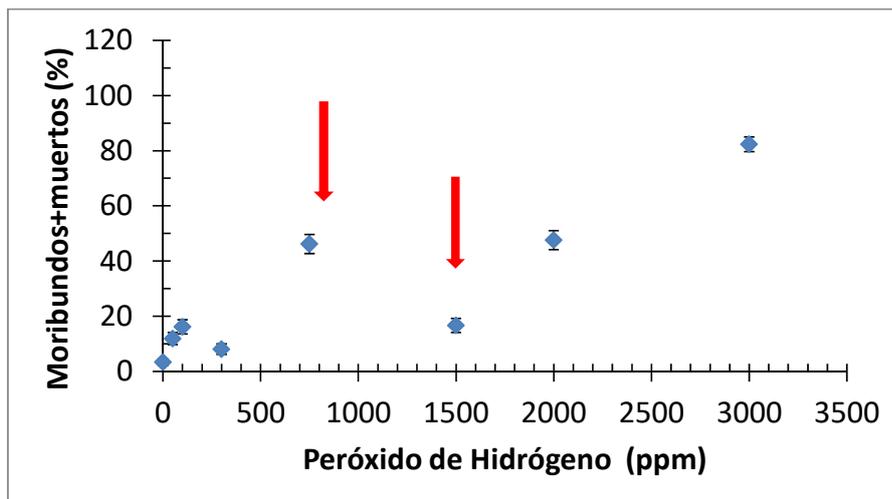
Después de los lavados con agua de mar post-aplicación las larvas del control como de los tratamientos 50 y 100 ppm se encontraban en buen estado, las larvas sometidas a las concentraciones 100 y 300 ppm se observaron menos activas con movimientos más lentos. A partir de la concentración 750 ppm las larvas presentaron dos comportamientos: a) movimientos lentos y b) movimientos rápidos especialmente reflejado en el telson. En los tratamientos de 2000 y 3000 ppm se observaron algunas larvas flotando en la superficie del recipiente, pero vivas.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

El porcentaje de larvas muertas y/o moribundas a las 24 horas post- exposición no supero en ninguna de las concentraciones el 20 %. El control presento un muy bajo porcentaje de larvas muertas y/o moribundas alcanzando a las 96 horas solo un  $3.3\pm 1.23\%$ . La mortalidad y/o larvas moribundas de los tratamientos 50 a 300ppm fue de aproximadamente 12%, seguido por los tratamientos entre 750 y 2000 donde la mortalidad fue cercana al 50%. El mayor porcentaje de larvas muertas y/o moribundas se concentró en el tratamiento de 3000 ppm alcanzando un 82.3% (Fig. 81).



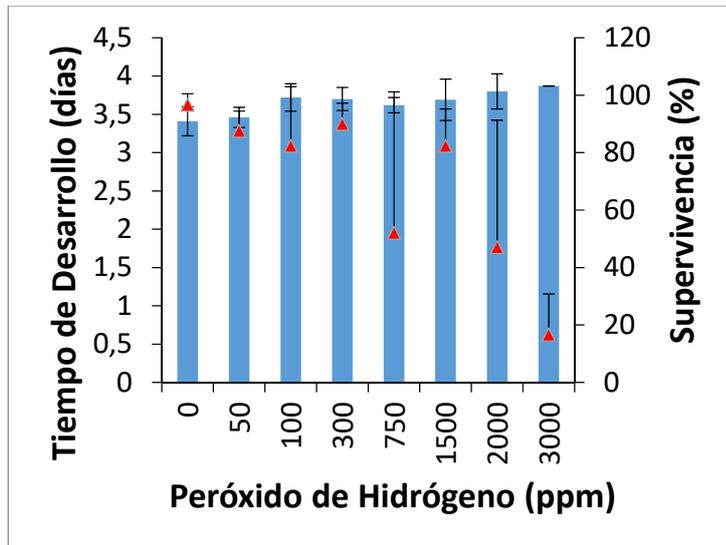
81 Figura 81. Moribundas más muertas (%) de Zoea I de *L. santolla* expuestas a distintas concentraciones (ppb) de Peróxido de Hidrogeno a las 96 horas post-exposición. La flecha indica la concentración recomendada por el fabricante.

Las Zoeas I mudaron a Zoea II en todos los tratamientos, presentándose diferencias significativas en el tiempo de desarrollo de las larvas expuestas a 50 ppm y el control versus las larvas de los tratamientos iguales o superiores a 100 ppm. La menor supervivencia (16.6%) fue observada a 3000 ppm, y las mayores sobre 80% se presentaron en general en los tratamientos correspondientes a concentraciones menores o iguales a 1500 ppm (Fig. 82).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



82 Figura 82: Tiempo de desarrollo (barras azules) de Zoea I de *L. santolla* bajo distintas concentraciones de Peróxido de Hidrógeno (ppm) y supervivencia hasta mudar a Zoea II (triángulos rojos)

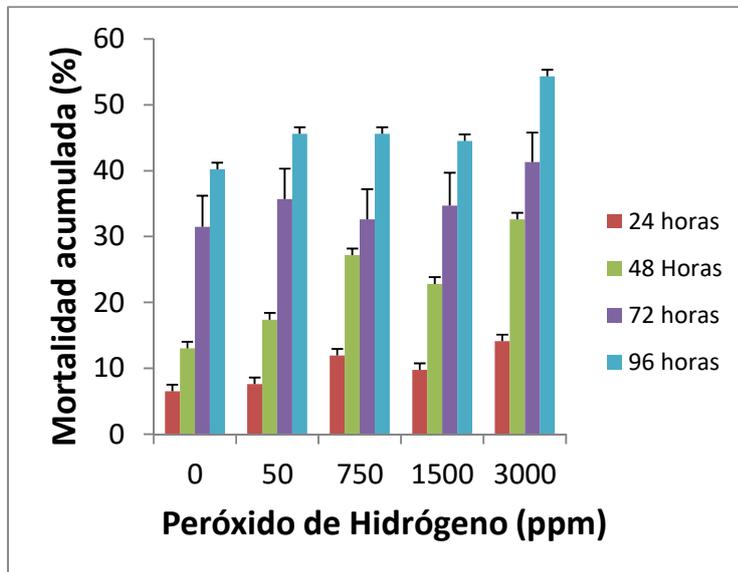
### Megalopas:

Tanto las megalopas del control como las expuestas a concentración de 100, 750 y 1500 ppm se observaron activas después de los baños con agua de mar post aplicación del peróxido de hidrógeno. Aproximadamente el 12 % de las larvas después de ser expuestas a 3000 ppm están muertas y/o moribundas, a las cuales se le observaron burbujas al interior. A las 24 horas post aplicación, la mortalidad fluctuó entre 6.52 y 14.13%, control y tratamiento de 3000 ppm respectivamente, a partir de las 72 horas post aplicación la mortalidad presentada en el control como en los tratamientos menores o iguales a 1500 ppm son similares, cerca del 33% y aproximadamente un 10% menos que lo observado en el tratamiento de 3000 ppm, esta tendencia se mantiene a las 96 horas (Fig. 83)



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



83 Figura 83. Mortalidad acumulada (%) de megalopas de *L. santolla* sometidas a distintas concentraciones de Peróxido de hidrógeno en distintos tiempos de recuperación (24-48-72 y 96 horas post-exposición).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

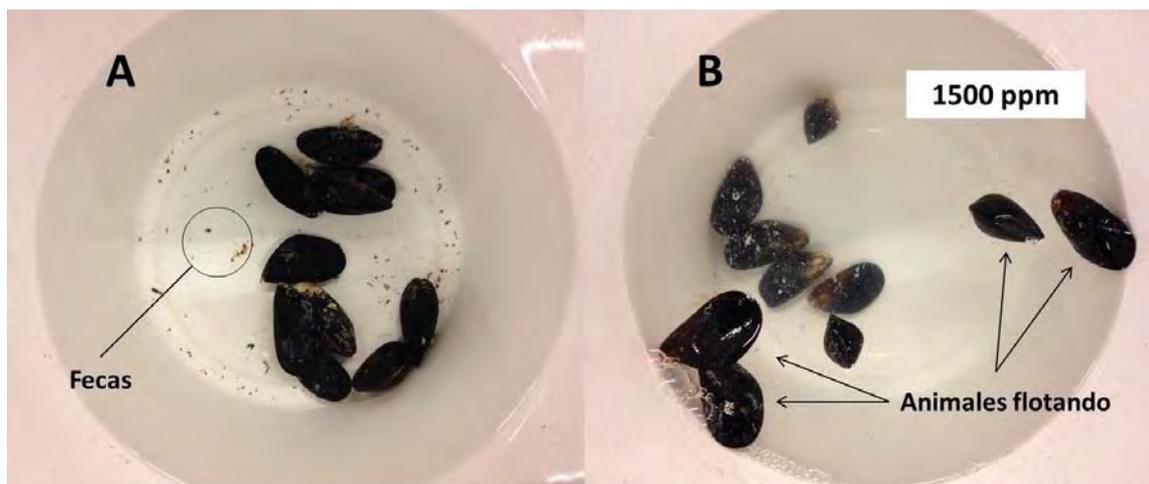
9.3 Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito (*Mytilus chilensis*) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas

9.3.1 Resultados de los experimentos fisiológicos

## Peróxido de Hidrógeno

**Observaciones no cuantificables:** A medida que se realizaron los recambios en las unidades experimentales, se realizaron algunas observaciones, las cuales fueron comparadas con la unidad control.

a) Producción de Biso: Se observó que, en el acuario control, todos los individuos produjeron biso, adhiriéndose de esta forma al fondo de la batea. Esto no se observó en los 3 acuarios expuestos a peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], en los cuales ningún animal produjo biso. Inmediatamente luego de agregar el compuesto a la unidad experimental, algunos animales adquirieron flotabilidad y pérdida del biso (Fig. 84B).



84 Figura 84. A) Batea control con 10 animales con agua de mal filtrada y aireación. B) Batea con el tratamiento luego de 48 h de exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1500 ppm (la recomendación del fabricante).



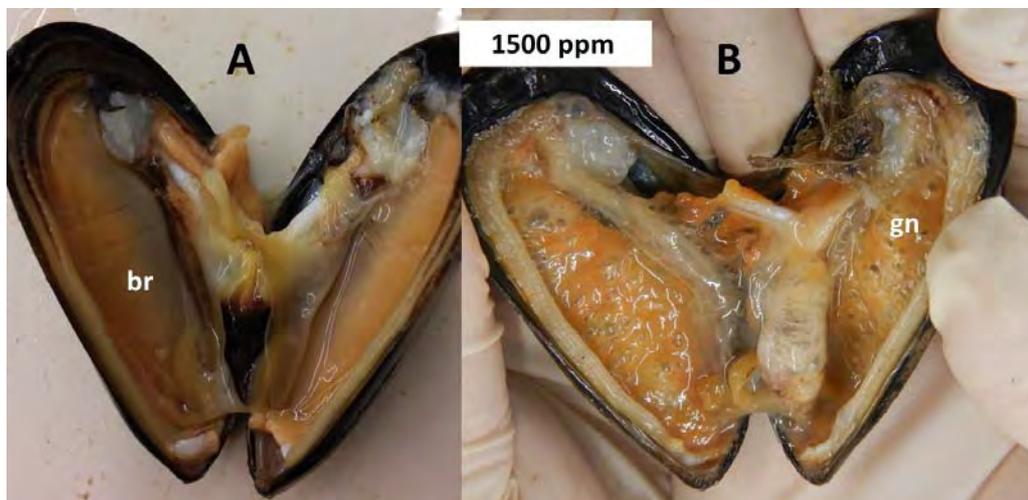
## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

b) Flotabilidad: Durante el tiempo que duro la exposición al  $H_2O_2$  no se evidenció presencia de flotabilidad por parte de los choritos en el acuario control, lo que se contrasta con el resto de los acuarios con los tratamientos (Fig. 84B). Alrededor del 50% de los animales en tratamiento se encontraban flotando, esto producto de las burbujas generadas por el peróxido de hidrógeno.

c) Producción de fecas: La producción de fecas fue observada solo en el acuario control, quedando retenida en el fondo de este (Fig. 84A). Esto evidencia que solo en los animales no expuestos al  $H_2O_2$  hubo acción metabólica.

d) Daño en el tejido: Luego de la exposición de Peróxido de Hidrógeno a la concentración de 1500 ppm (la concentración recomendada y utilizada por la salmonicultura en Chile) durante 48 h, las gónadas se destruyeron y las branquias fueron desintegradas (Fig. 85).



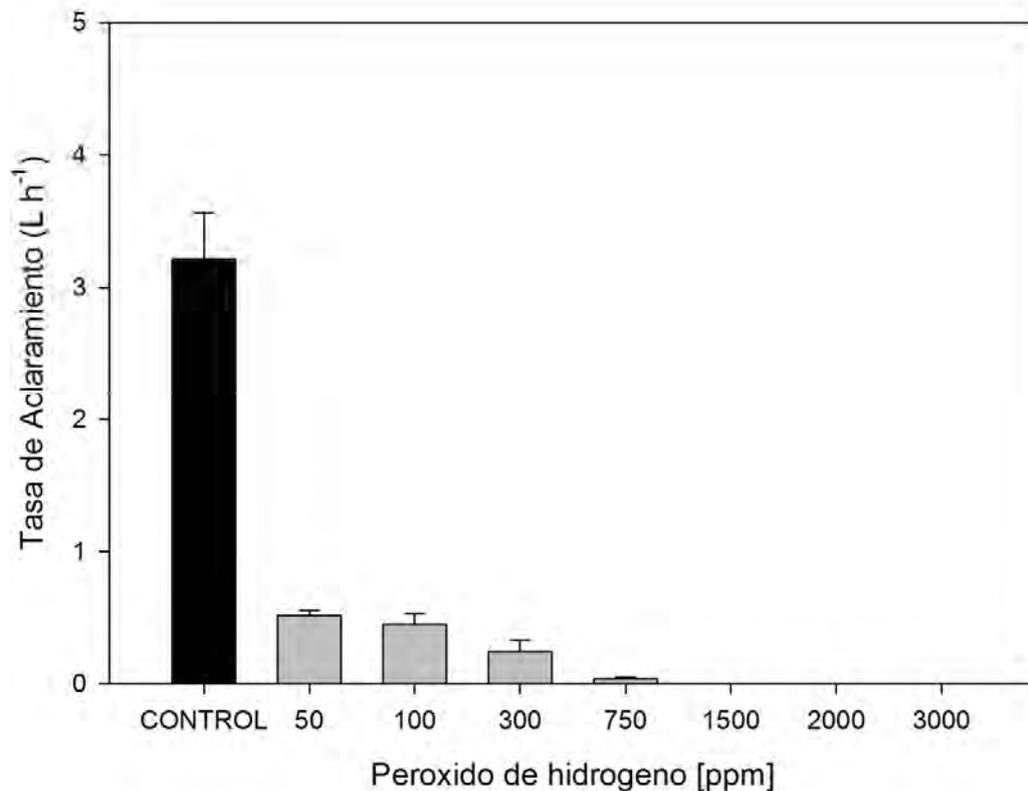
85 Figura 85. A) un ejemplar de *Mytilus chilensis* de la batea control (Sin Peróxido de hidrógeno). B) un ejemplar de *Mytilus chilensis* de la batea expuesta por 48 h a una concentración de 1500 ppm de Peróxido de Hidrogeno. br = Branquias; gn = gónadas.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**Tasa de Aclaramiento:** la tasa de aclaramiento en *Mytilus chilensis* se reduce significativamente cuando los animales son expuestos al compuesto Peróxido de Hidrogeno. Se observó una reducción de la tasa de aclaramiento de un 85% a la concentración experimental mas baja (50 ppm) y una nula tasa de aclaramiento a la concentración de 1500 ppm (Fig. 86).



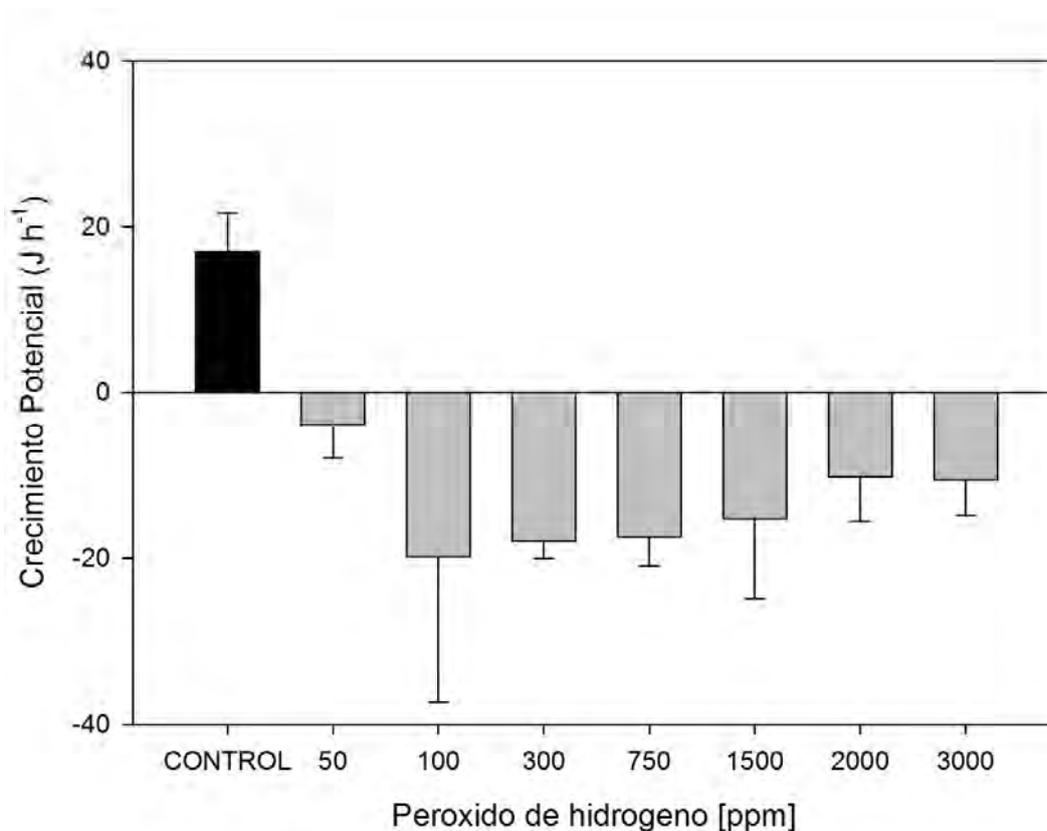
86 Figura 86. Resultados de tasa de aclaramiento para choritos (*Mytilus chilensis*) expuesto a las siete concentraciones de peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (marca Europharma) durante 48 horas previa su medición.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Para todos los tratamientos con Peróxido de hidrógeno, se evidenciaron valores de crecimiento potencial negativos, llegando a alcanzar hasta  $-30 \text{ Jh}^{-1}$  (Fig. 87).



87 Figura 87. Resultados del crecimiento potencial (energía absorbida – [energía gastada por excreción + energía gastada por consumo de oxígeno]) del chorito *Mytilus chilensis* (pesando entre 900-1800 g) expuestos a las diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrógeno por 48 horas previa su medición. Las barras grises corresponden a los tratamientos y la barra negra representa al control.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## Azametifos

La regresión mostró que existe una correlación lineal positiva entre tasa de aclaramiento y el peso seco del cuerpo de los animales ( $r=0.31$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 91). Los mismos resultados estadísticos mostraron las variables crecimiento potencial y peso del cuerpo ( $r=0.28$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 92). El análisis de varianza evidenció una independencia entre la covariable (Peso) y las concentraciones ( $F_{7,43}=1.89$ ;  $P=0.10$ ), Este es un supuesto esencial para realizar un ANCOVA (análisis de covarianza).

Hay una correlación lineal positiva entre el crecimiento potencial y las demás variables fisiológicas a excepción del consumo de oxígeno (Tabla XXIII, Fig. 88). Como el crecimiento potencial representa la integración de todas las respuestas fisiológicas, tanto de adquisición como de pérdida de energía, es justamente esta variable y la tasa de aclaramiento a las que se les realizaron los análisis estadísticos.

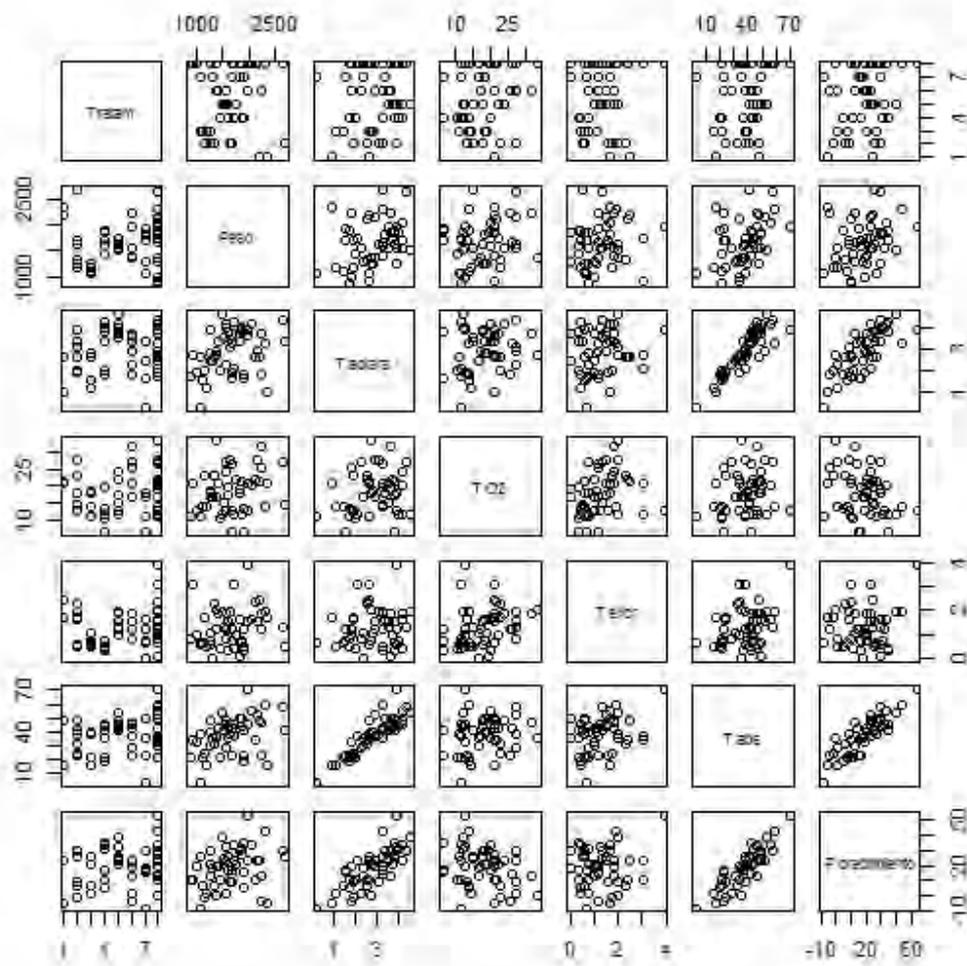
El ANCOVA que se realizó para evaluar si existe relación entre el crecimiento potencial y la variable independiente (las concentraciones de azametifos) incorporando la influencia del tamaño del animal en el análisis, mostro que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{7,42}=1.85$   $P = 0.102$ ).

Por otro lado, el ANCOVA realizado para evaluar si existe relación entre la tasa de aclaramiento y la variable independiente (las concentraciones de azametifos) incorporando la influencia del tamaño del animal en el análisis, mostro que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{7,42}=4.20$   $P = 0.001$ ). Es decir, la presencia de azametifos afecta la ingesta inmediata de alimento a los choritos (Figs. 89 y 92).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



88 Figura 88. Gráfico de interacción de las principales variables fisiológicas estimadas para *Mytilus chilensis* expuestos a 7 concentraciones de azametifos.



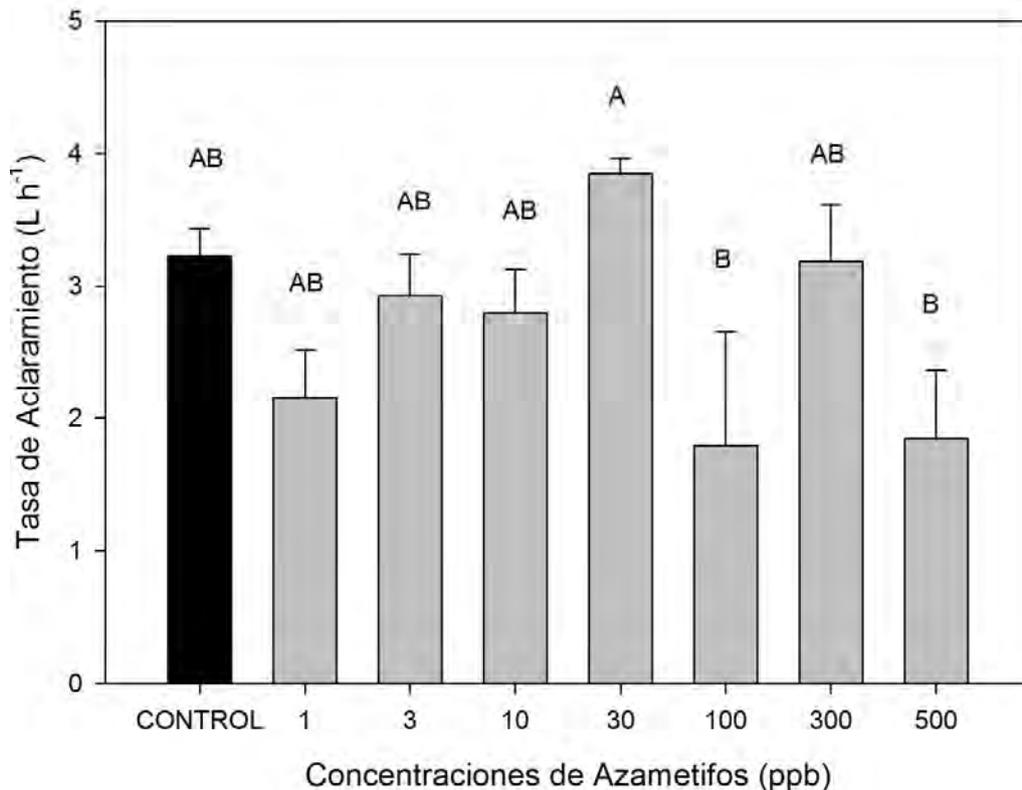
# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tabla XXIII. Correlaciones entre las variables fisiológicas determinadas para animales adultos de *Mytilus chilensis* expuestos a azametifos. T. acia = Tasa de aclaramiento; C.Oxig = consumo de oxígeno; T.Exc = Tasa de excreción; T.abs = Tasa de absorción; E. abs = Eficiencia de absorción; C.Poten = Crecimiento Potencial.

	T.Acl	C.Oxig	T.Exc	T.abs	C.Poten
C.Oxig	0.207				
T.Exc	0.132	0.278			
T.abs	<b>0.892*</b>	0.217	<b>0.337*</b>		
C.Poten	<b>0.777*</b>	<b>-0.950*</b>	0.136	<b>0.867*</b>	
E.abs	0.094	-0.194	<b>-0.273**</b>	-0.021	0.092

• = significativo ( $\alpha = 0.05$ ); \*\* = marginalmente significativo ( $\alpha = 0.05$ )

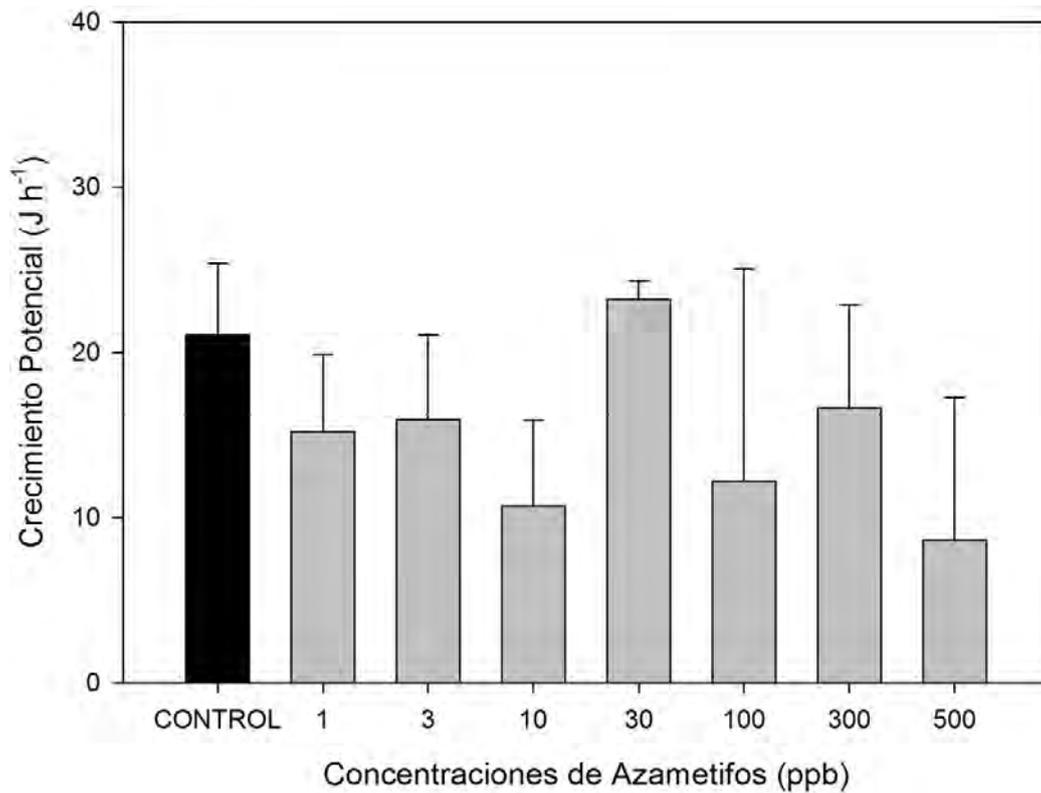


89 Figura 89. Resultados de tasa de aclaramiento para choritos (*Mytilus chilensis*) expuesto a las siete concentraciones de Azametifos ( $C_9H_{10}ClN_2O_5PS$ ) durante 48 horas previa su medición. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas del test a posteriori de Tukey.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

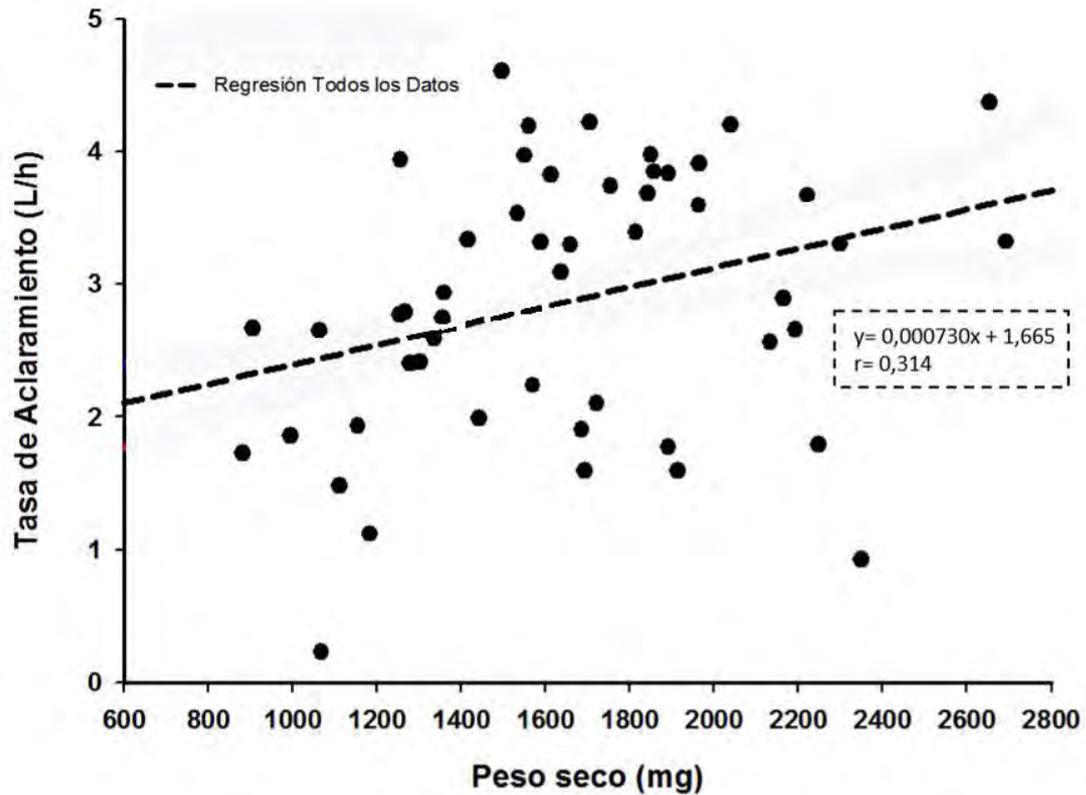


90 Figura 90. Resultados del potencial de crecimiento (= energía absorbida – [energía gastada por excreción + energía gastada por consumo de oxígeno]) del chorito *Mytilus chilensis* (pesando entre 900-1800 gr) expuestos a las diferentes concentraciones de azametifos (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS) por 48 horas previa su medición. Las barras grises corresponden a los tratamientos y la barra negra representa al control.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

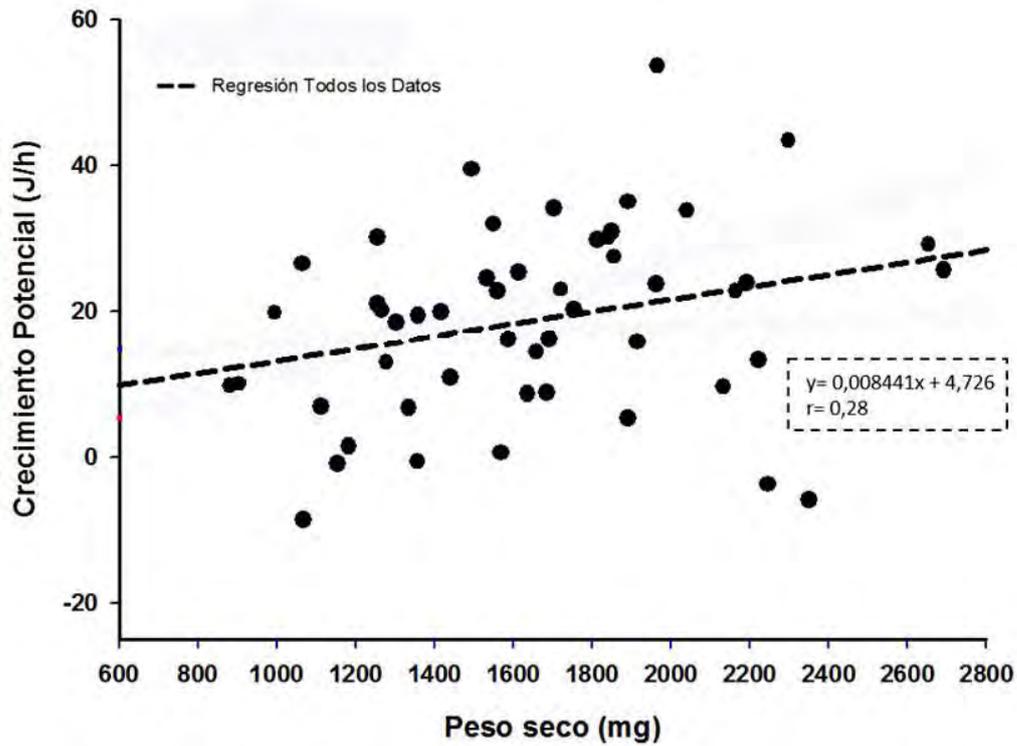


91 Figura 91. Regresión lineal entre la tasa de aclaramiento (L/h) y el peso seco de los mejillones (mg). En el grafico se representa la ecuación de regresión y la correlación de Pearson para cada pendiente ( $P < 0.05$ ).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



92 Figura. 92. Regresión lineal entre crecimiento potencial (J/h) y el peso seco de los mejillones (mg). En el grafico se representa la ecuación de regresión y la correlación de Pearson para cada pendiente ( $P < 0.05$ ).



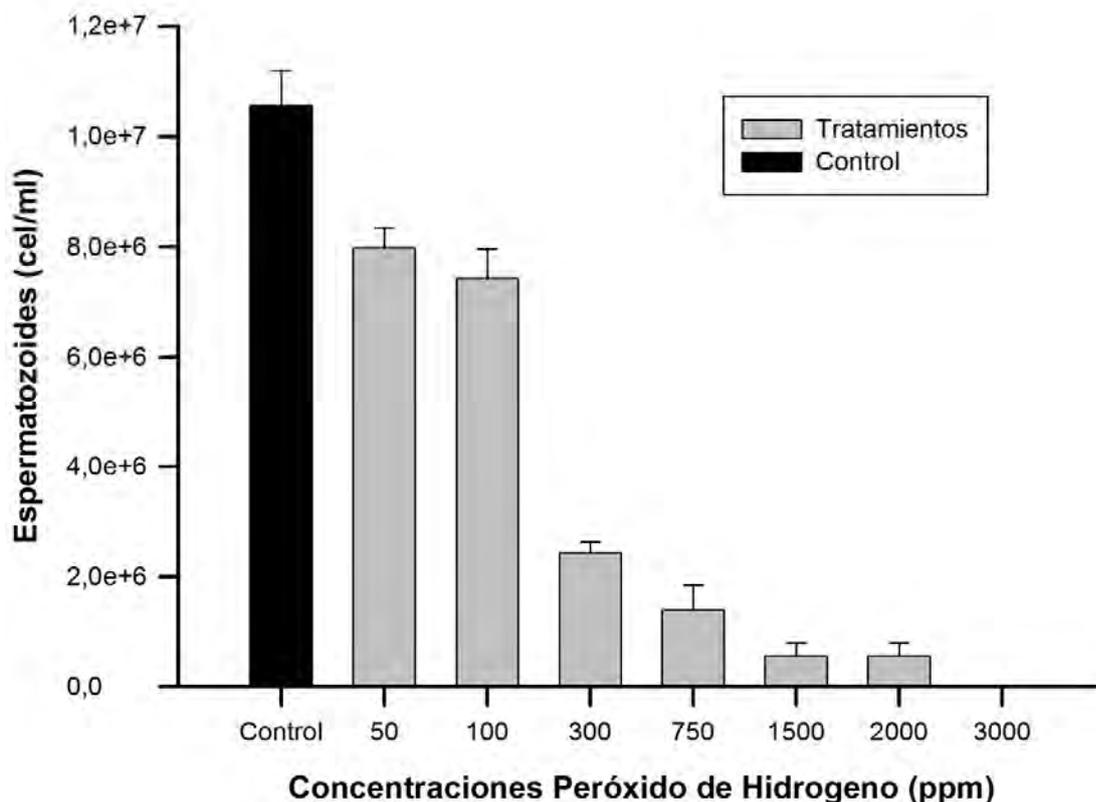
# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 9.3.2 Efecto en la fecundación de *Mytilus chilensis*

### Peróxido de hidrógeno

Se observa una evidente disminución de espermatozoides vivos a medida que las concentraciones de peróxido de hidrógeno aumentan. A partir de los 300 ppm de concentración se produce una disminución significativa en movimiento de los espermatozoides. Esto indudablemente afecta negativamente la fecundación (Fig. 93).



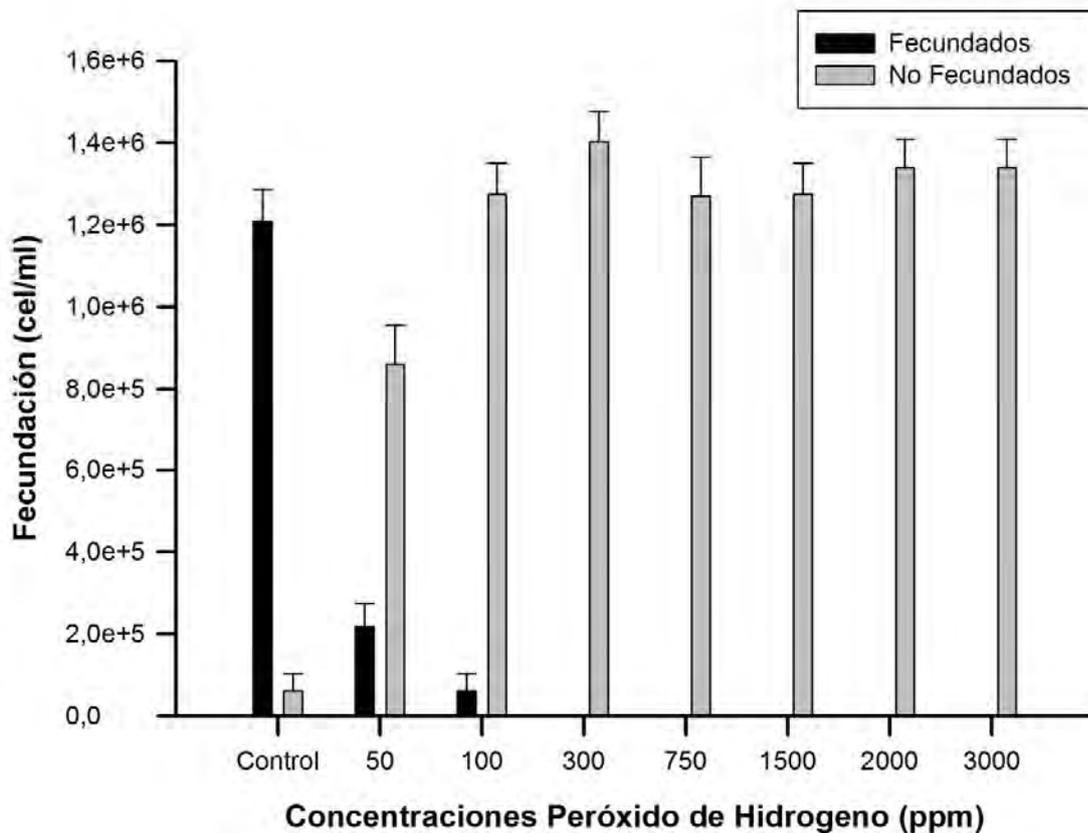
93 Figura. 93. Número de espermatozoides con movimiento luego de la exposición por 30 minutos a las siete concentraciones de Peróxido de Hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Nota =1500 ppm es la concentración recomendada por el fabricante para utilizar ante caligidosis. Barras grises representan los tratamientos y barra negra representan las unidades experimentales control (sin Peróxido de Hidrógeno).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

En el experimento de fecundación en presencia de Peróxido de hidrógeno se observa que la fecundación se reduce en un 80% para la concentración de 50 ppm y en un 93% en la concentración de 100 ppm. La inhibición de la fecundación es total en todas las demás concentraciones experimentales (300, 750, 1500, 2000, 3000 ppm) (Fig.94).



94 Figura 94. Resultados de los experimentos de inhibición de la fecundación de *Mytilus chilensis* en presencia de siete concentraciones del compuesto Peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] luego de dos horas post-fertilización. Barras negras representa ovocitos en estado mórula (fecundación) y barras grises representan ovocitos sin división celular (inhibición de la fecundación).

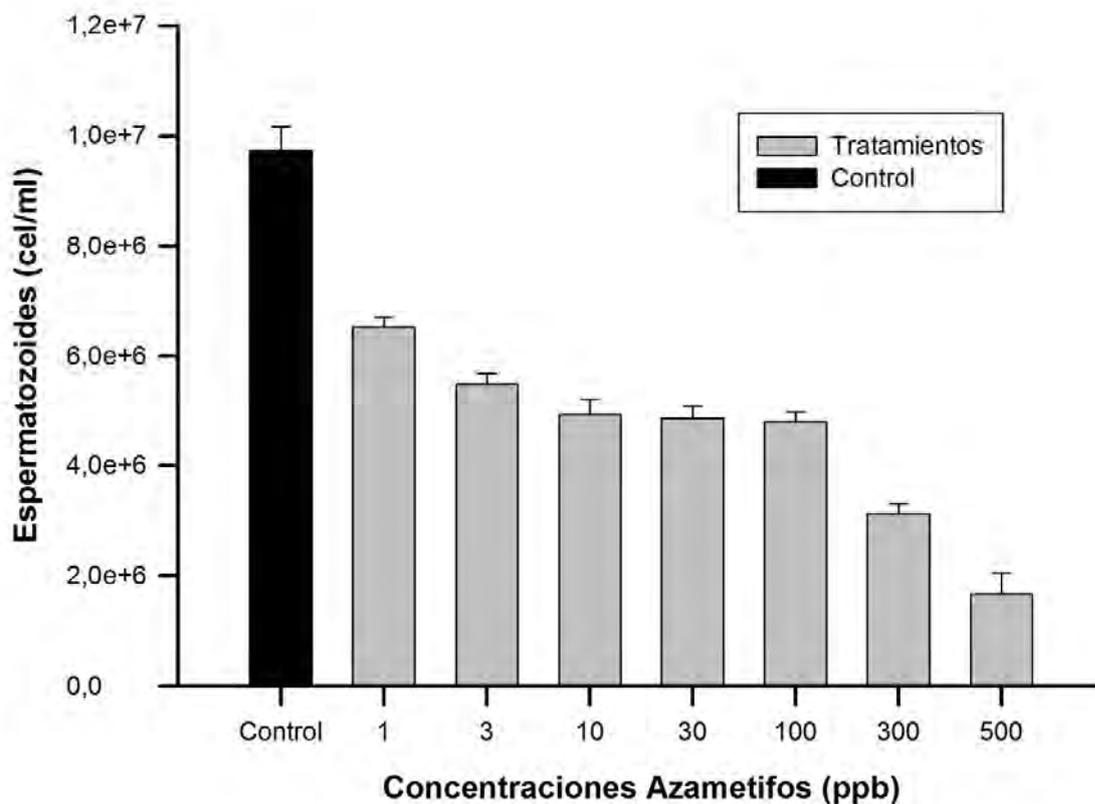


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## Azametifos

Se evidenció una disminución de espermatozoides vivos a medida que las concentraciones de azametifos aumentaron. Los análisis arrojaron que no hubo diferencias significativas de espermatozoides vivos entre las concentraciones 3,10,30,100 ppb. No obstante, todos los tratamientos con azametifos implicaron una reducción significativa de los espermatozoides de *Mytilus chilensis* (Fig. 95).



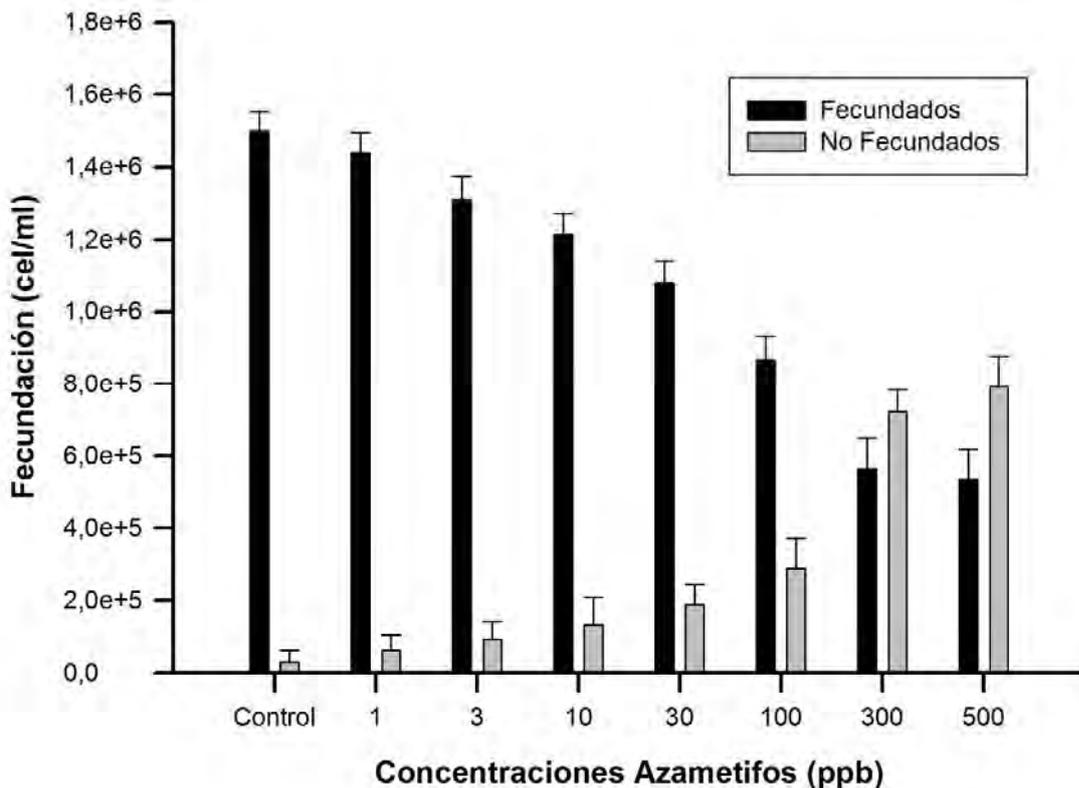
95 Figura. 95. Número de espermatozoides con movimiento luego de la exposición por 30 minutos a las siete concentraciones del compuesto Azametifos [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS]. Barras grises representan los tratamientos y barra negra representan las unidades experimentales control (sin Azametifos).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

El experimento mostró que la fecundación se reduce en presencia de azametifos. Por otro lado, el número de células no fecundadas incremento a medida que aumentaron las concentraciones experimentales (1,3,10,30,100,300,500 ppb). La fecundación disminuyó en un 40% cuando las células estuvieron expuestas a la concentración recomendada por el fabricante (100 ppb) (Fig.96).



96 Figura 96. Resultados de los experimentos de inhibición de la fecundación de *Mytilus chilensis* en presencia de siete concentraciones del compuesto Azametifos [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS] luego de dos horas post fertilización. Barras negras representa ovocitos en estado mórula (fecundación) y barras grises representan ovocitos sin división celular (inhibición de la fecundación).



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 9.3.3 Resultados de los experimentos larvales

Tanto Peróxido de Hidrógeno como el organofosforado Azametifos en las concentraciones y condiciones utilizadas en estos experimentos, produce mortalidad en larvas de *Mytilus chilensis*. El efecto de la exposición de larvas pediveligeras a Azametifos es menos drástica que al compuesto Peróxido de Hidrógeno (Figs. 97 y 98). En el caso del compuesto Azametifos, la sobrevivencia de larvas se redujo significativamente (73%; Figura 98) a partir de la concentración experimental de 3 ppb. Aunque en la literatura son muy escasos los trabajos respecto al efecto que tiene Azametifos sobre larvas de invertebrados, los autores Pahl and Opitz (1999) demostraron que tanto Azametifos como Cipermetrina producen mortalidades significativas en larvas de langosta. En base a los resultados obtenidos en este estudio estos compuestos anti caligidosis (Peróxido de Hidrógeno y Azametifos) afectarían larvas competentes de *Mytilus chilensis*. La literatura indica que la presencia de larvas de *Mytilus chilensis* en el mar interior de Chiloé se produce preferentemente entre octubre y diciembre (Avendaño et al. 2011; Barría et al. 2012), por lo tanto, en esta ventana de tiempo las larvas de choritos son susceptibles al contacto con los compuestos analizados.

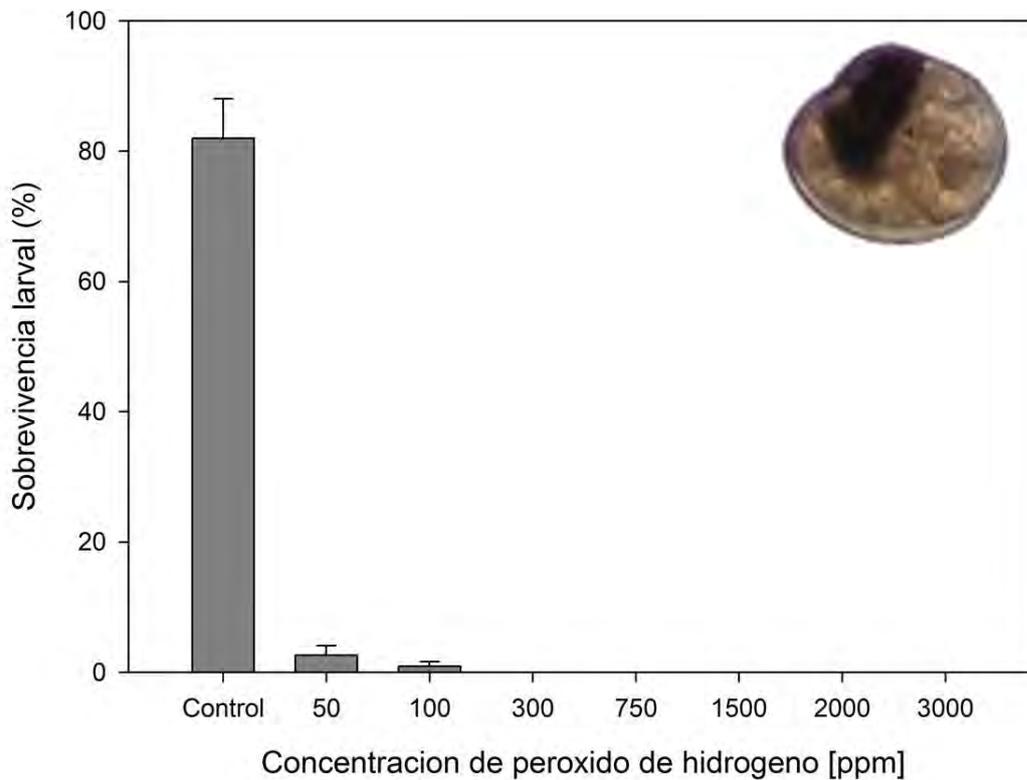
Las larvas de choritos (*Mytilus chilensis*) en las concentraciones y condiciones experimentales que fueron expuestas frente al compuesto Peróxido de Hidrógeno sufrieron una alta mortalidad (Fig. 98), lo cual tuvo un efecto importante en el porcentaje de fijación de las mismas (Fig. 99). Sin embargo, el experimento de fijación de larvas en presencia de Azametifos mostró algunos resultados interesantes. En primer lugar, la presencia de este compuesto redujo el número de larvas asentadas (Fig. 100). Al utilizar la concentración de Azametifos de 100 ppb (CRF para la caligidosis) el número de larvas asentadas se redujo en un 90% respecto a los controles y cuando la concentración fue 1 ppb el asentamiento se redujo en un 44% luego de 96 h post exposición al compuesto Azametifos (Fig. 100). Sin embargo, una concentración de 1 ppb de Azametifos no afectó la sobrevivencia de las



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

larvas, pero si el asentamiento (Fig. 98 y 100). Este resultado indicaría que este compuesto al ser incorporado en las larvas no produjo una mortalidad inmediata, sin embargo, afectó su desarrollo y posterior capacidad de asentamiento.

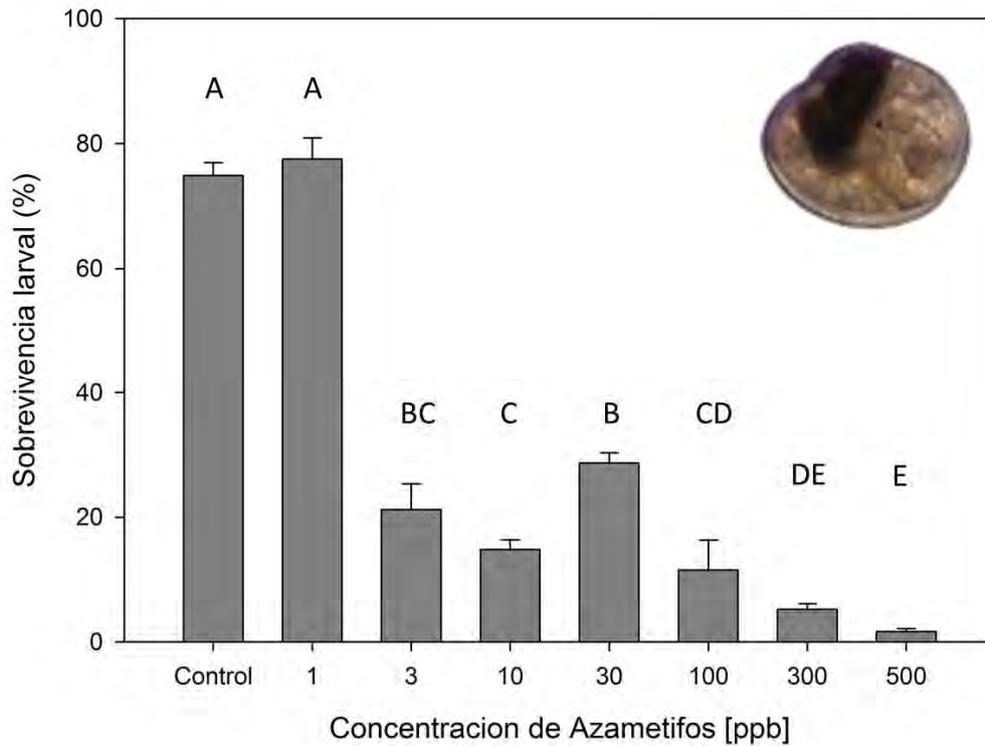


97 Figura 97. Resultados del porcentaje de sobrevivencia de las larvas competentes de *Mytilus chilensis* (ultimo estado de la larva de *Mytilus* antes de la fijación en los colectores) luego de exponerla a una concentración de las siete concentraciones experimentales de Peróxido de Hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>].



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

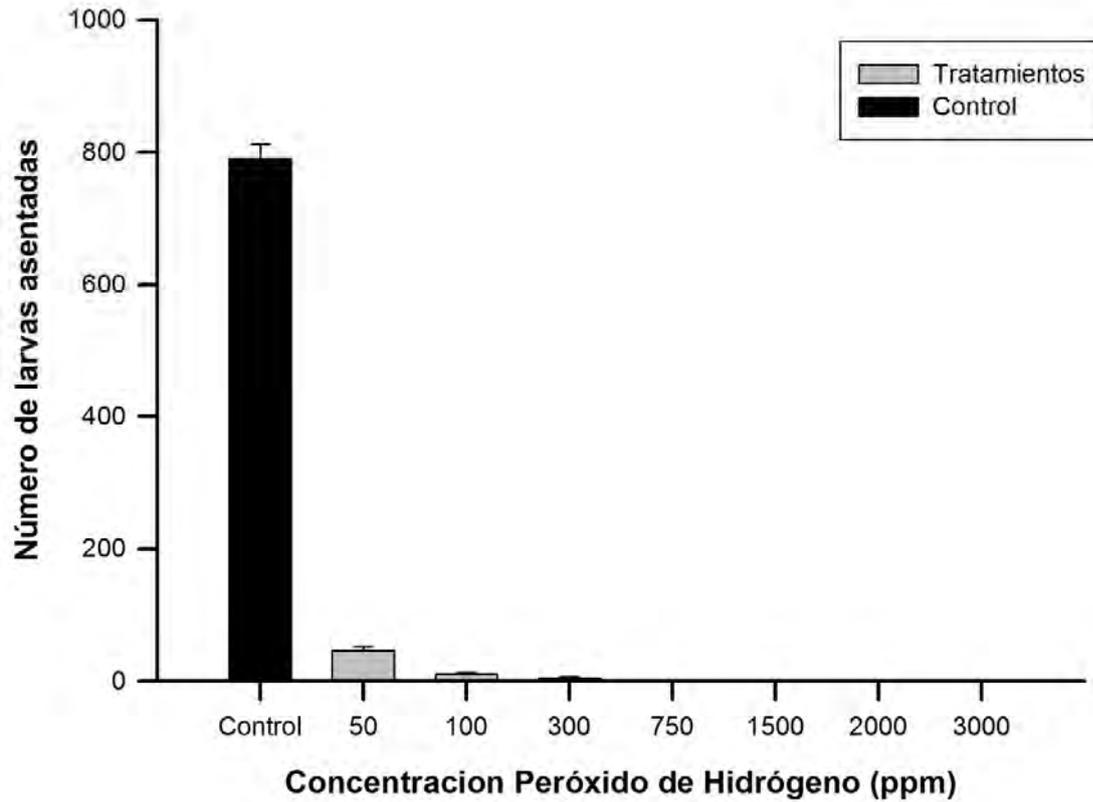


98 Figura 98. Resultados del porcentaje de sobrevivencia de las larvas competentes de *Mytilus chilensis* (ultimo estado de la larva de *Mytilus* antes de la fijación en los colectores) luego de exponerlas a una concentración de Azametifos [ $C_9H_{10}ClN_2O_5PS$ ] usando las siete concentraciones experimentales. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas del test a posteriori de Tukey.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

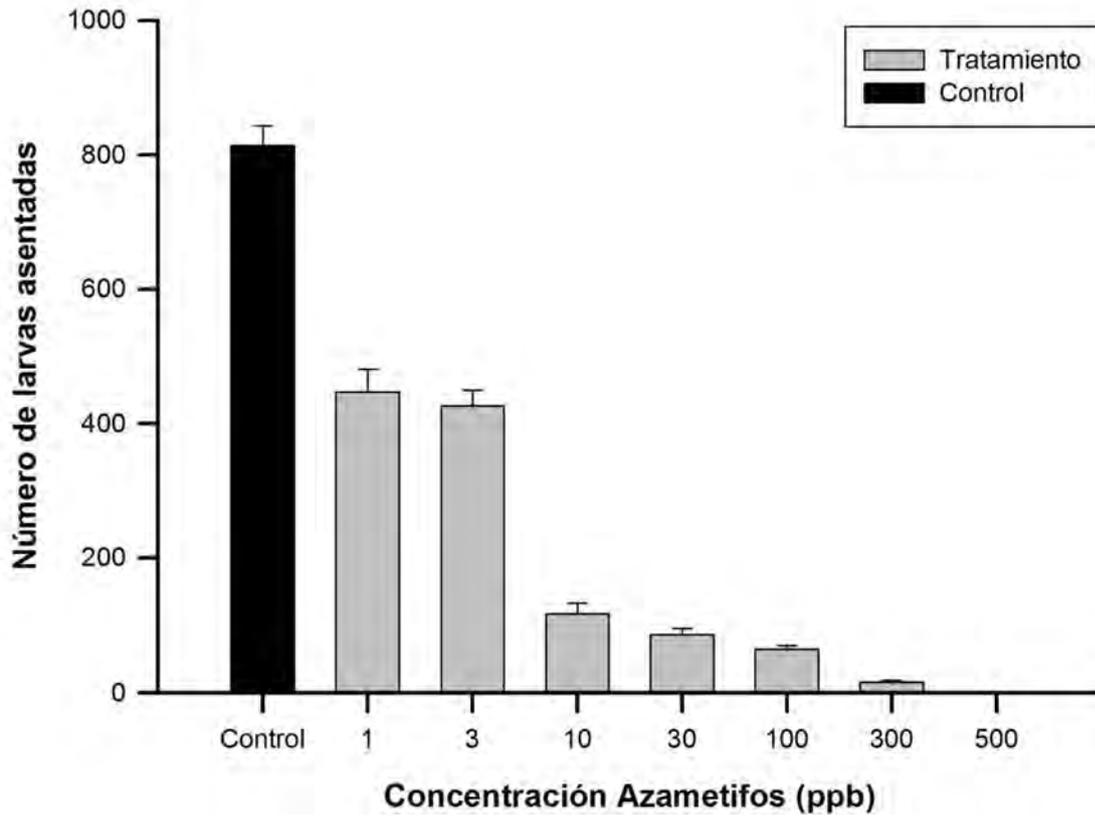


99 Figura 99. Resultados del experimento de fijación de larvas de *Mytilus chilensis*. Número de larvas asentadas a las 96 h, previa a su exposición a 7 concentraciones experimentales del compuesto Peróxido de Hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>].



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



100 Figura 100. Resultados del experimento de fijación de larvas de *Mytilus chilensis*. Número de larvas asentadas a las 96 h, previa a su exposición de una concentración de cada una de las 7 concentraciones experimentales del compuesto azametifos [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>CIN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS].



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 9.3.4 Resultados de los análisis reproductivos

Los resultados evidenciaron diferentes patrones reproductivos entre las dos localidades analizadas (Fig. 101-106). Los choritos de Caleta Amargos registraron un desove entre octubre y noviembre, en cambio en Bahía Yal (localidad expuesta a estos compuestos), emitieron sus gametos entre septiembre y noviembre (Figs. 101 y 104). Sin embargo, no se puede atribuir que estas diferencias se deban a la exposición de Peróxido de Hidrógeno y/o Azametifos, sino mas bien a diferencias de tipo latitudinal.

No se evidencio diferencias significativas entre los tamaños de los ovocitos maduros de las hembras de ambas localidades (Tabla XXIV). Además, las proporciones sexuales (macho: hembra) en ambas poblaciones no mostraron diferencias significativas ante la proporción esperada 1:1 (Caleta amargo = 1H:1.03M, n = 871; Bahía Yal = 1H:1M, n = 890).

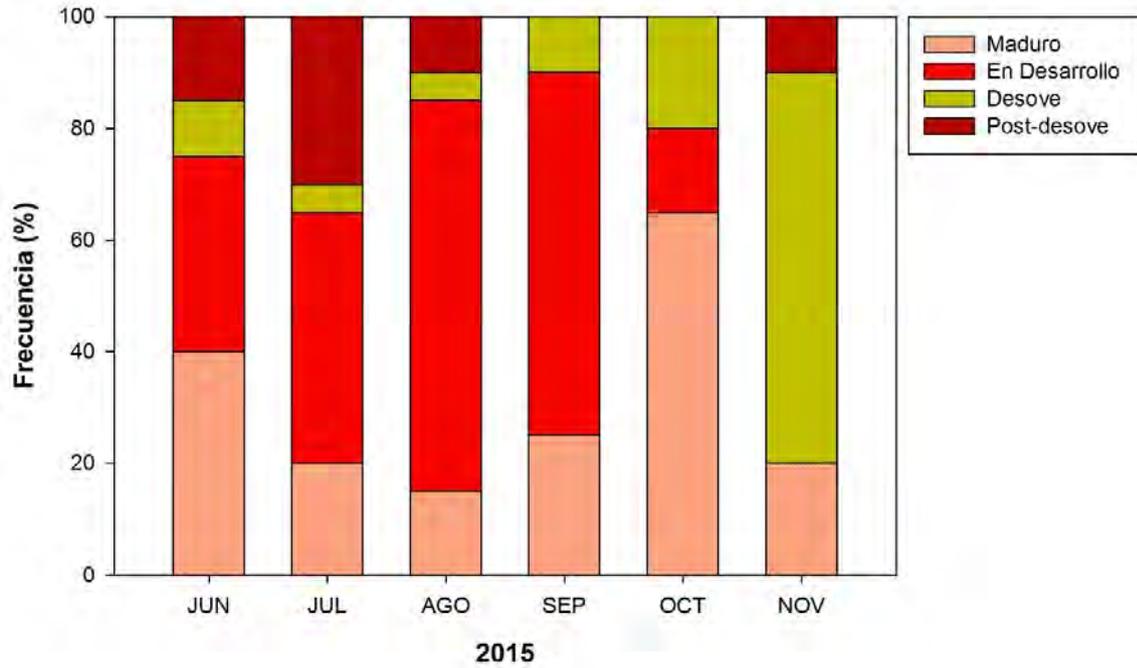
**Tabla XXIV. Resultados de los tamaños de los ovocitos maduros de las hembras de *Mytilus chilensis* provenientes de las localidades de Caleta Amargos y Bahía Yal. El número entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.**

Localidades	Diámetro (µm)
Caleta Amargo	58.19 (5.96)
Bahía Yal	57.63 (6.12)

**Reproducción para los choritos provenientes de caleta Amargo:** En la localidad de caleta Amargo (cerca de Valdivia), los choritos mostraron gónadas maduras en todos los muestreos (Fig. 103). No obstante, el análisis de Volumen de Fracción gamética evidencio que la temporada de mayor madurez fue en octubre de 2015 (Fig. 102). Además, los mayores valores de desoves fueron en noviembre de 2015, lo que concuerda con los mayores valores de tejido interfolicular en la gónada femenina (Fig. 103).



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura

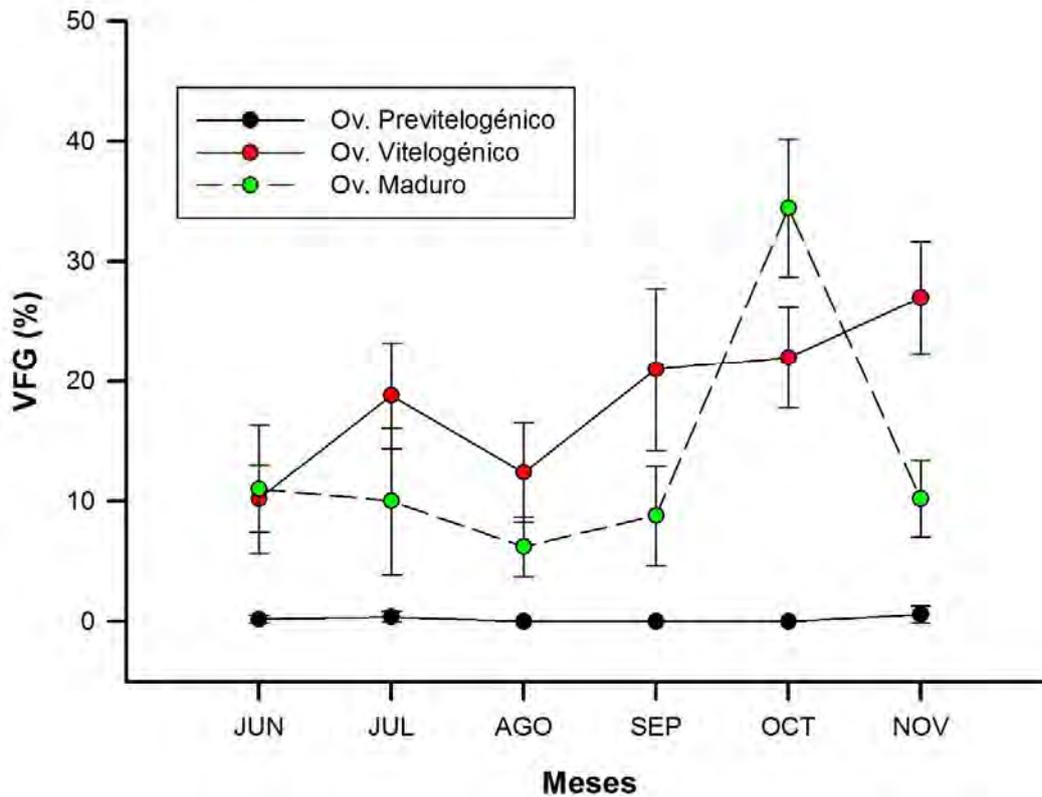


101Figura 101. Frecuencia de los estados de maduración gonadal de *Mytilus chilensis* entre junio de 2015 a noviembre de 2015 en la localidad de Caleta Amargos -Valdivia.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

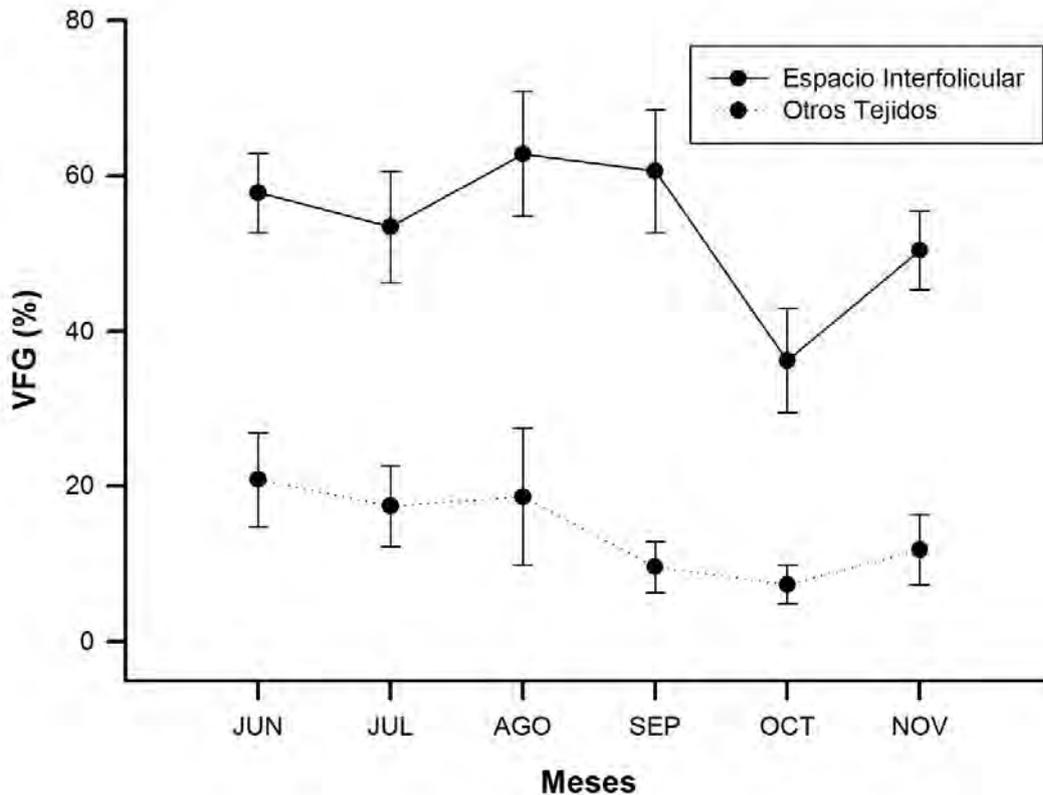


102Figura 102. Volumen de la fracción gamética (VFG) para los ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y maduros (media + EE) en las hembras de *Mytilus chilensis* de la localidad de Caleta Amargos -Valdivia, (área libre de Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), entre junio de 2015 a noviembre de 2015.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

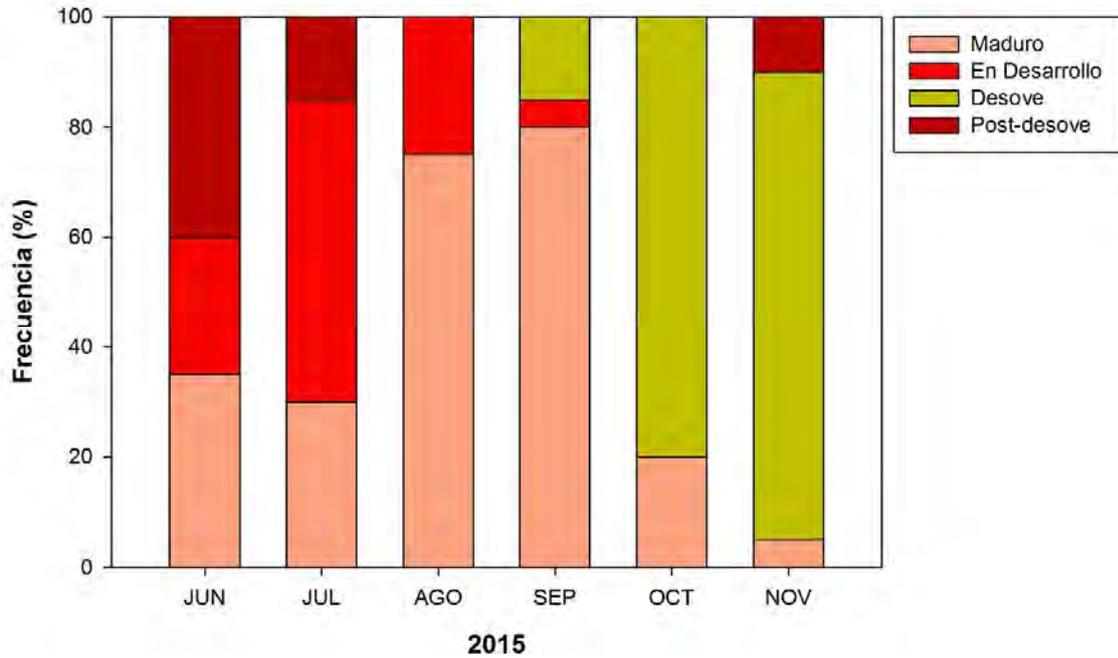


103Figura 103. Volumen de la fracción gamética para el tejido interfolicular y otros tejidos (media + EE) en las hembras de *Mytilus chilensis* de la localidad de Caleta Amargos (área libre de Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), Valdivia, entre junio de 2015 a noviembre de 2015.

**Reproducción para los choritos provenientes de Bahía Yal:** En la localidad de Bahía Yal (Chiloé), los choritos mostraron gónadas maduras en todos los muestreos (Fig. 104). No obstante, el análisis de Volumen de Fracción Gamética evidencio que la temporada de mayor madurez fue en septiembre de 2015 (Fig. 105). Además, los mayores valores de desoves fueron en noviembre de 2015, lo que concuerda con un aumento de tejido interfolicular en la gónada femenina (Fig. 106).



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura

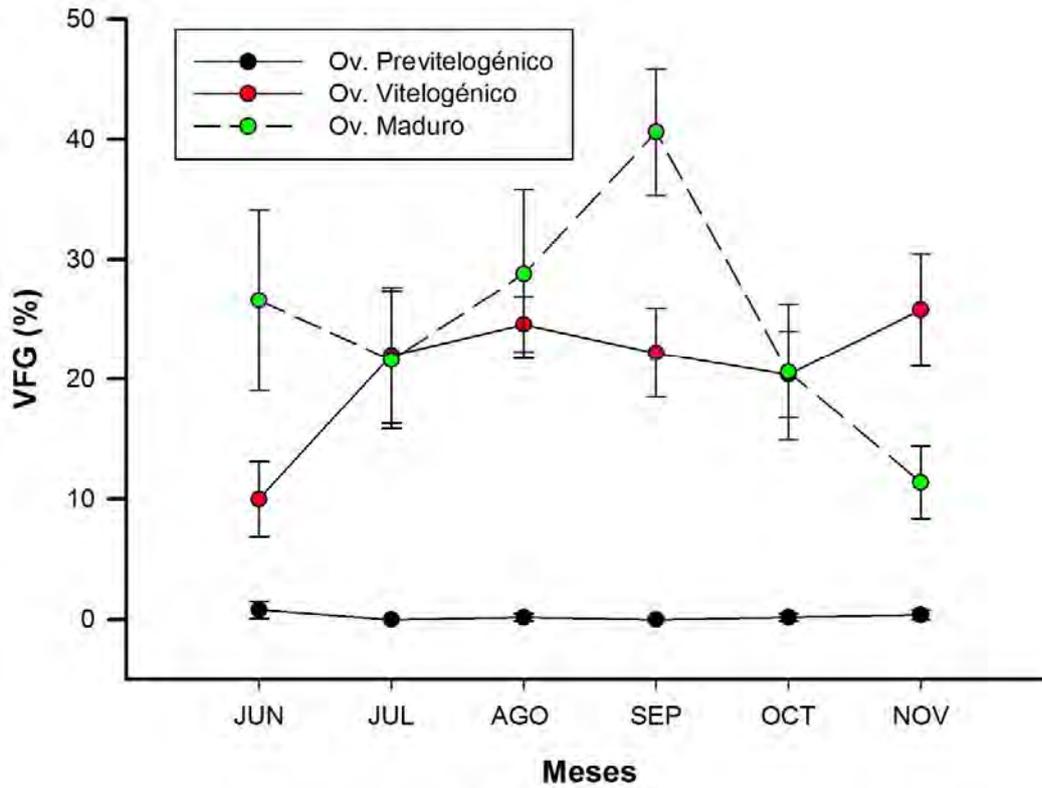


104Figura 104. Frecuencia de los estados de maduración gonadal de *Mytilus chilensis* entre junio de 2015 a noviembre de 2015 en la localidad de Bahía Yal - Chiloé.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

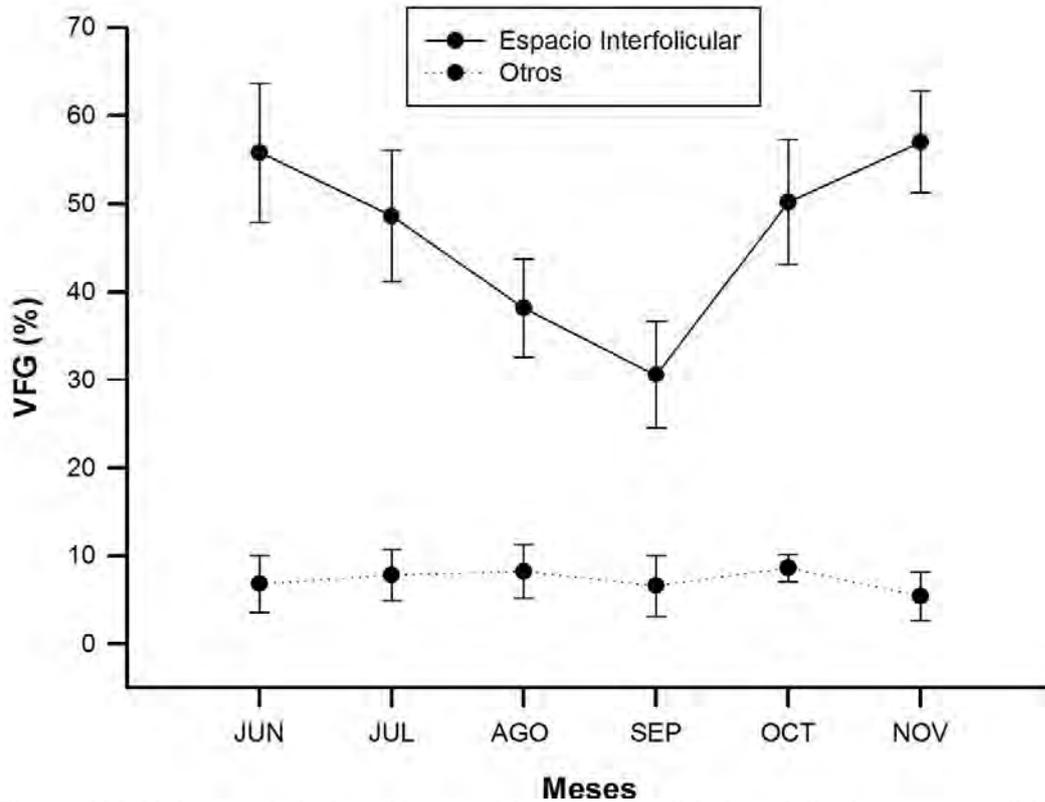


105Figura 105. Volumen de la fracción gamética (VFG) para los ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y maduros (media  $\pm$  EE) en las hembras de *Mytilus chilensis* de la localidad de Bahía Yal - Chiloé (área expuesta a Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), entre junio de 2015 a noviembre de 2015.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



106Figura 106. Volumen de la fracción gamética para el tejido interfolicular y otros tejidos (media  $\pm$  EE) en las hembras de *Mytilus chilensis* de la localidad de Bahía Yal- Chiloé (área expuesta a Azametifos y Peróxido de Hidrógeno), entre junio de 2015 a noviembre de 2015.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 9.3.5 Resultados del ensayo crónico en adultos de *Mytilus chilensis*

Se estimaron las respuestas fisiológicas, de adquisición y pérdida de energía en animales adultos de *Mytilus chilensis*. No obstante, las variables de mayor representatividad fueron la tasa de aclaramiento y el crecimiento potencial, que tuvieron correlaciones significativas con las demás variables fisiológicas. Los resultados demuestran que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, existe un efecto significativo sobre las tasas fisiológicas de los choritos cuando estos son expuestos al compuesto Peróxido de Hidrógeno. Este efecto sobre las tasas fisiológicas analizadas es menor al exponerlos a Azametifos. Por ejemplo, la actividad alimenticia en los choritos experimentales se reduce en un ~85% cuando se encuentran en presencia del compuesto Peróxido de Hidrógeno a la concentración de 50 ppm y dejan de alimentarse a partir de la concentración de 750 ppm. Los ejemplares de choritos experimentales reaccionan en forma inmediata ante la presencia de este compuesto. Como a modo de defensa conductual estos bivalvos sueltan el biso y cierran sus valvas, sin embargo, retienen las partículas de Peróxido de Hidrógeno en la cavidad del manto, causando un daño irreparable en el tejido interno del bivalvo. El fuerte efecto oxidante del Peróxido de Hidrógeno produce en los ejemplares experimentales que las gónadas sean destruidas y las branquias desintegradas. Ello, sin duda repercute y es el motivo por el cual la tasa de aclaramiento y el crecimiento potencial tuvieron valores extremadamente bajos.

El resultado de este ensayo permite aseverar que al exponer a los ejemplares de chorito adulto a la concentración recomendada por el fabricante (CRF: 1500 ppm) causa un daño irreversible en los tejidos de estos (Fig. 108). El ensayo crónico muestra que a partir del día ocho se producen diferencias en la sobrevivencia de choritos experimentales expuestos a Peróxido de Hidrógeno (Fig. 107 y 108). Estos datos concuerdan con el cálculo  $CL_{90}$  estimado a los 15 días del ensayo, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Para el compuesto Peróxido de Hidrogeno se obtuvo que la  $CL_{90}$  fue de  $1627 \pm 209$  ppm (IC 95%)



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

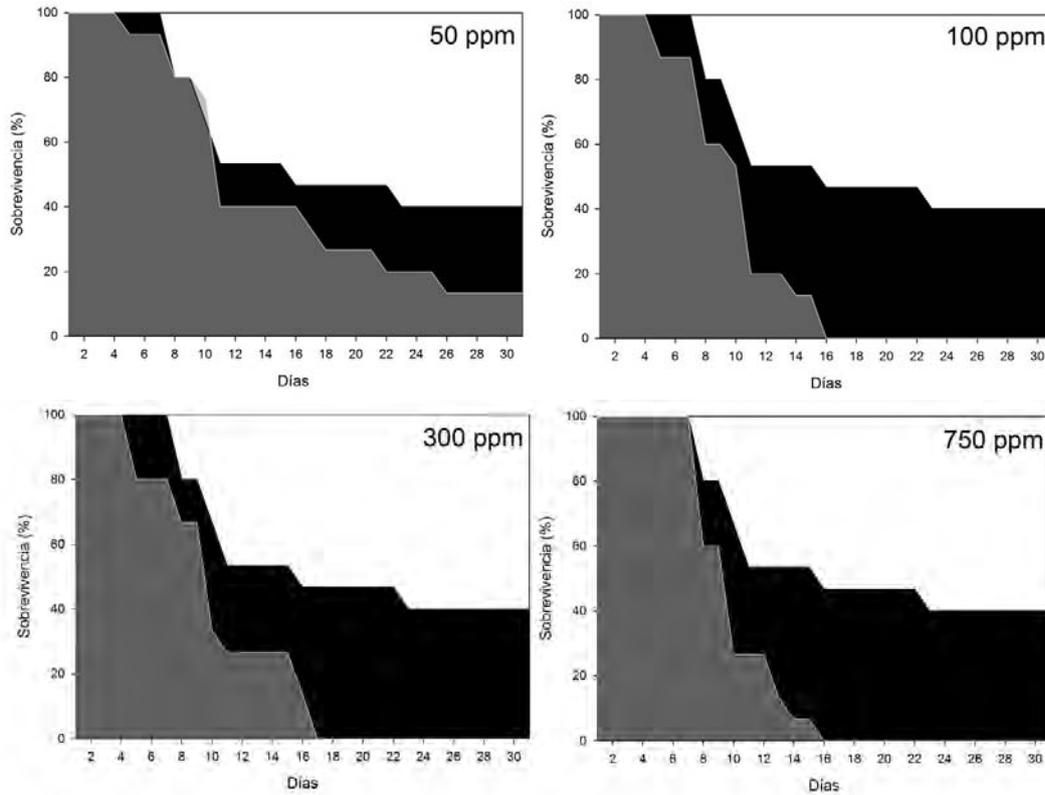
que es el rango de la CRF. Es decir, al exponer los ejemplares de choritos a este compuesto, ésta concentración del compuesto produce una mortalidad del 90%.

Por otro lado, la exposición al compuesto Azametifos, mostró que el efecto sobre el crecimiento potencial no tuvo diferencias significativas entre los ejemplares de choritos expuestos al compuesto Azametifos y los del grupo control, es decir, el compuesto Azametifos sobre estos bivalvos (*Mytilus chilensis*) no tuvo un efecto instantáneo sobre el crecimiento. Sin embargo, se desconocen valores de acumulación de este compuesto en los tejidos de estos organismos. El ensayo crónico, sin embargo, mostro que a partir del día ocho de exposición a este compuesto se produjeron mortalidades significativas (Figs. 109 y 110). Para el compuesto Azametifos se estimó una  $CL_{50}$  de  $139,4 \pm 8,8$  ppb (IC 95%). Según los resultados de este ensayo, la exposición a la concentración recomendada por el fabricante (100 ppb) causaría un efecto letal en el 45% de los ejemplares de *Mytilus chilensis* expuestos a este compuesto.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

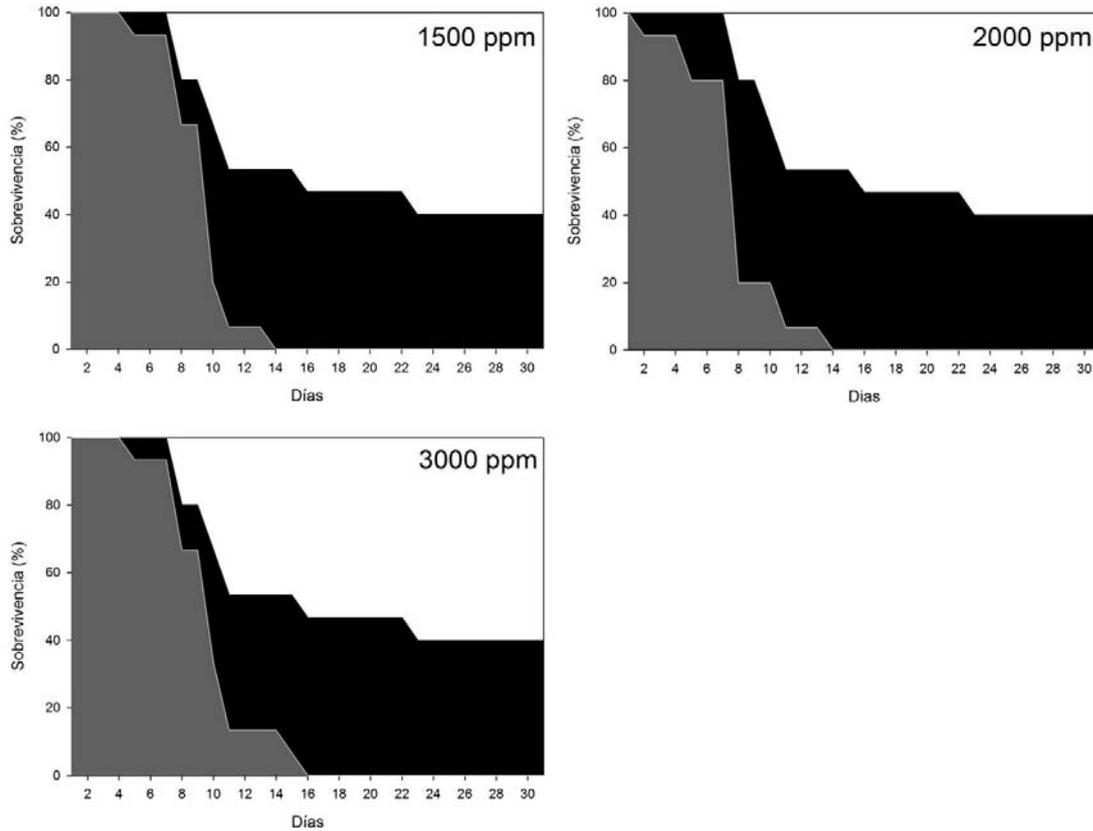


**107 Figura 107. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de *Mytilus chilensis* expuestos al compuesto Peróxido de Hidrógeno (concentraciones experimentales → 50, 100, 300 y 750 ppm). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a peróxido de hidrogeno); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a peróxido de hidrogeno.**



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

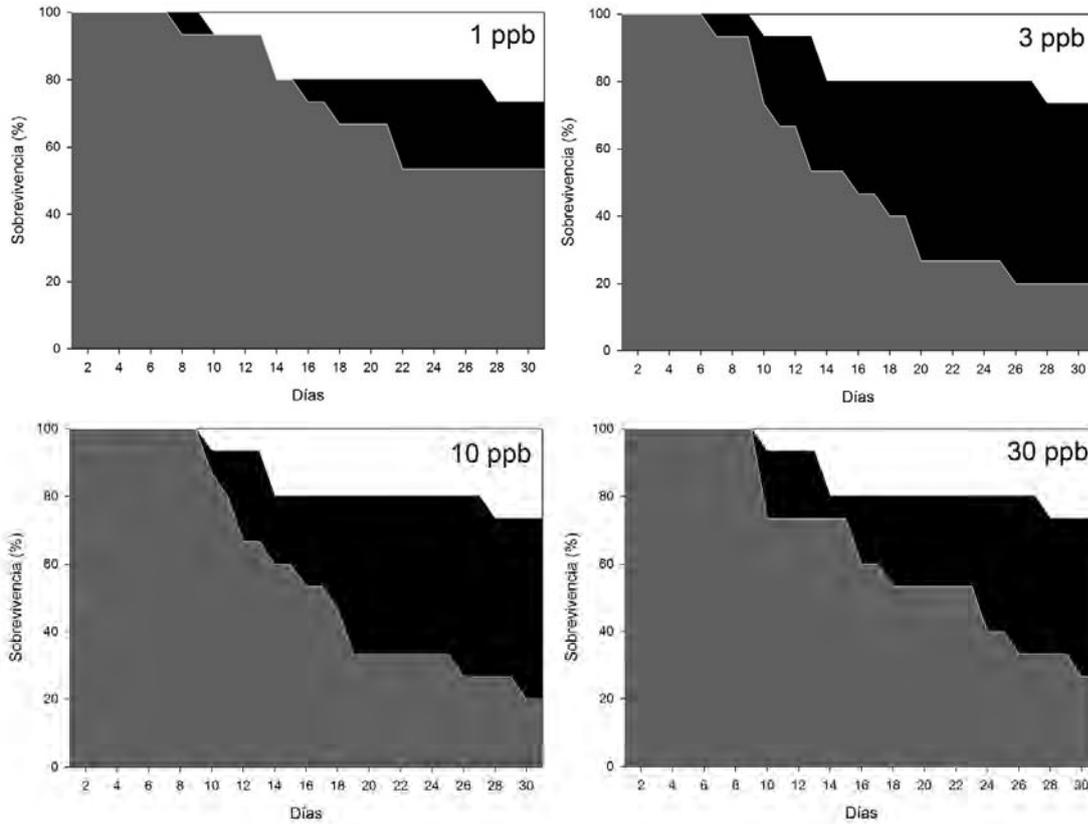


**108 Figura 108. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de *Mytilus chilensis* expuestos a Peróxido de Hidrógeno (concentraciones experimentales → 1500, 2000 y 3000 ppm). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a Peróxido de Hidrógeno); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a Peróxido de Hidrógeno.**



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

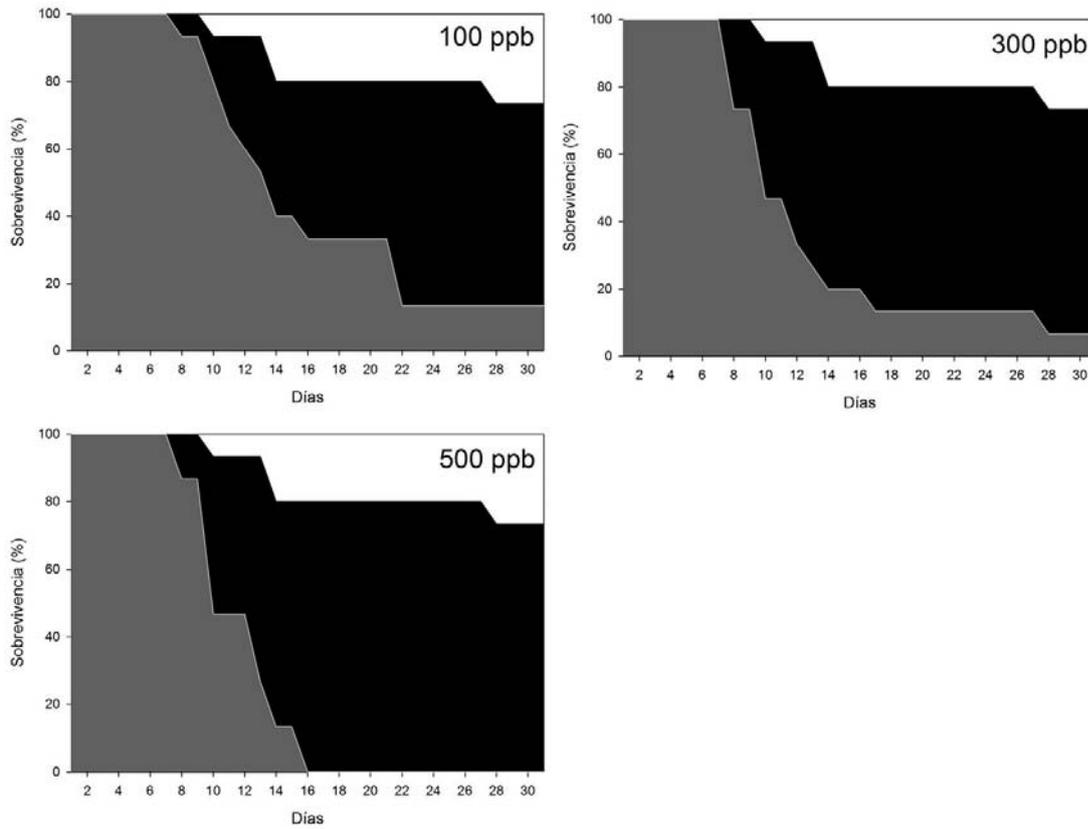


109 Figura 109. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de *Mytilus chilensis* expuestos al compuesto Azametifos (concentraciones experimentales → 1, 3, 10 y 30 ppb). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a azametifos); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a Azametifos.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



**110 Figura 110. Porcentaje de sobrevivencia (%) diaria de animales adultos de *Mytilus chilensis* expuestos al compuesto Azametifos (concentraciones experimentales → 100, 300 y 500 ppb). El área de color negro representa la sobrevivencia de los animales control (sin exposición a azametifos); el área gris representa la sobrevivencia de los animales expuestos a Azametifos.**



## Universidad Austral de Chile

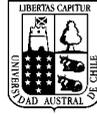
Instituto de Acuicultura

9.4 Determinar la concentración que alcanza el azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas

### 9.4.1 Correntimetría

#### **Centro A**

Los valores de máxima velocidad para la marea llenante, se presentaron en las capas 1 y 2 con valores de 2.5 y 1.4 nudos a los 3.0 y 5.5 m de profundidad respectivamente, medidos desde la superficie (Tabla XXV). Para la marea vaciante los valores máximos en velocidad de corriente se observaron en las capas 1 y 2 con valores de 2.3 y 1.4 nudos a los 3.0 y 5.5 m de profundidad respectivamente, medidos desde la superficie (Tabla XXVI). En la capa menos profunda (3 m) equivalente a la profundidad de muestreo de los compuestos antiparasitarios involucrados, se observan direcciones predominantes de NORTE y SURESTE con 23.4 y 24.2%, respectivamente (Fig. 111) lo que se mantiene en las capas profundas mas relevantes, pero con menor velocidad de corriente (Fig. 112, 113, 114). La dirección con mayor predominancia en porcentaje ocurre en la capa 9 en la dirección SURESTE con un 26.1 % (Tabla XXVII).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tabla XXV. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase llenante.

<b>VELOCIDAD DE CORRIENTE FASE LLENANTE ( NUDOS )</b>						
<b>Prof. (m)</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Moda</b>	<b>Mediana</b>
<b>-3,0</b>	2,5	0,7	0,0	0,6	0,2	0,4
<b>-5,5</b>	1,4	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2
<b>-8,0</b>	1,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2
<b>-10,5</b>	0,9	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2
<b>-13,0</b>	0,8	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2
<b>-15,5</b>	0,6	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2
<b>-18,0</b>	0,6	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1
<b>-20,5</b>	0,5	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
<b>-23,0</b>	0,5	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tabla XXVI. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase vaciante.

<b>VELOCIDAD DE CORRIENTE FASE VACIANTE ( NUDOS )</b>						
<b>Prof. (m)</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Moda</b>	<b>Mediana</b>
<b>-3,0</b>	2,3	0,7	0,0	0,6	0,1	0,4
<b>-5,5</b>	1,4	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2
<b>-8,0</b>	0,9	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1
<b>-10,5</b>	0,8	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
<b>-13,0</b>	0,8	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
<b>-15,5</b>	0,7	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
<b>-18,0</b>	0,6	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
<b>-20,5</b>	0,5	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
<b>-23,0</b>	0,5	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

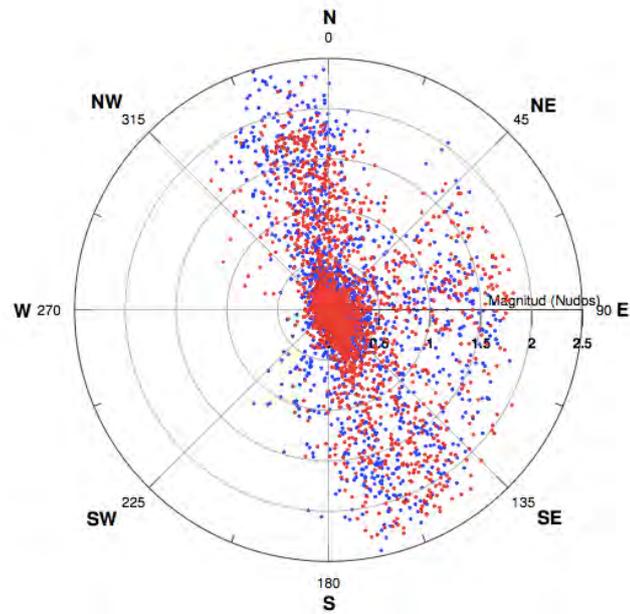
Tabla XXVII. Frecuencias en % de la dirección de la corriente por profundidad.

FRECUENCIAS DE DIRECCIÓN DE CORRIENTES (%)								
Prof. (m)	NORTE	NE	ESTE	SE	SUR	SO	OESTE	NO
-3,0	23,4	9,4	13,5	24,2	17,4	3,7	2,6	5,9
-5,5	17,3	7,7	10,1	25,4	17,9	5,2	4,7	11,9
-8,0	18,6	8,1	9,1	20,6	14,3	5,7	7,7	15,8
-10,5	21,3	7,8	8,6	16,9	12,5	6,8	8,5	17,5
-13,0	23,6	8,1	7,3	16,7	12,4	6,7	8,0	17,2
-15,5	22,4	5,7	7,2	18,1	13,6	6,9	7,9	18,4
-18,0	18,6	6,0	6,8	21,8	14,0	6,7	7,9	18,3
-20,5	16,1	5,9	7,3	25,0	16,2	5,2	6,9	17,5
-23,0	16,1	5,6	7,6	26,1	16,2	5,9	6,6	16,0

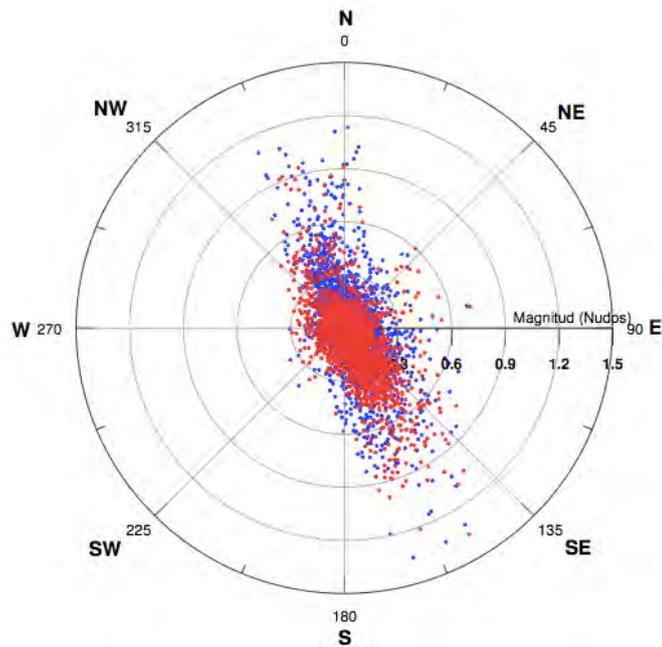


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



111 Figura 111. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 1 (3 metros de profundidad).

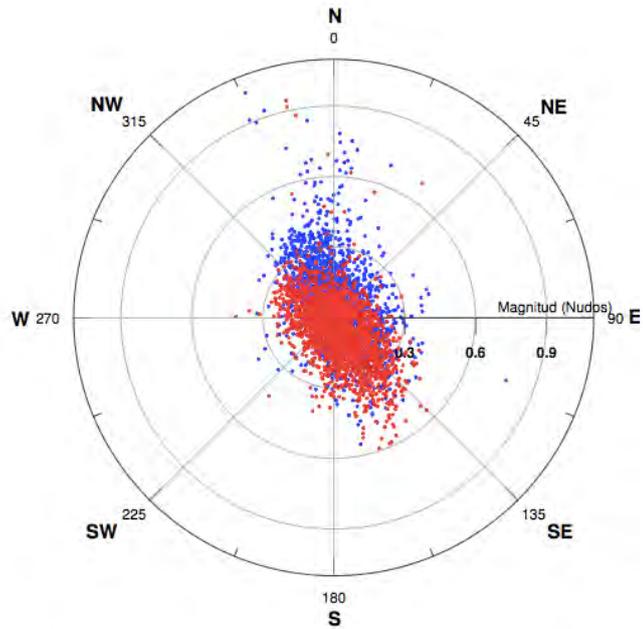


112 Figura 112. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 2 (5.5 metros de profundidad).

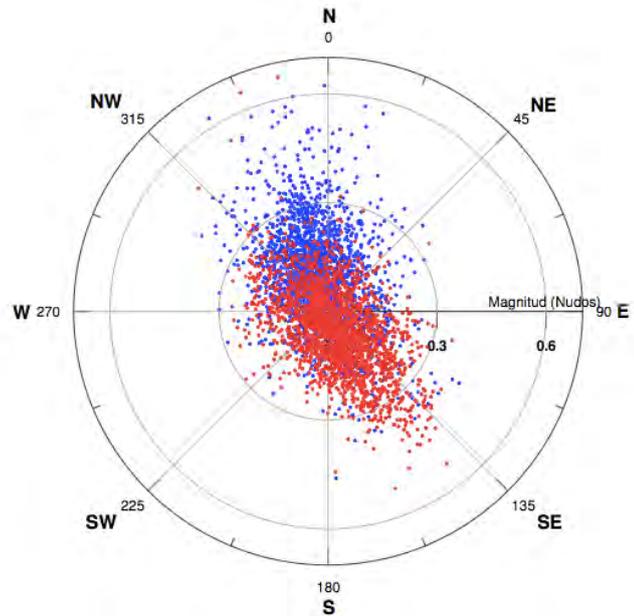


# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



113 Figura 113. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 3 (8 metros de profundidad).



114 Figura 114. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro A, capa 6 (15.5 metros de profundidad).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## Centro B

Las diferentes velocidades registradas con ambos equipos van de 0 a 0.9 nudos, registrándose un máximo de 0.8 a 0.9 nudos, que corresponden a un porcentaje que no supera el 0.01 % de los registros (2 registros) (Tabla XXVIII). Los datos sobre los 0.4 nudos correspondieron a las velocidades de corrientes más altas del periodo en estudio, registradas por el correntómetro ubicado a 8 metros de la superficie.

Se observa claramente que, a mayor profundidad, menor es la velocidad de corriente en el sector. El correntómetro instalado a 16 m de la superficie presentó la mayor frecuencia de ocurrencia en velocidades menores a 0.2 nudos, cuyo valor asciende al 95.06% del total de registros.

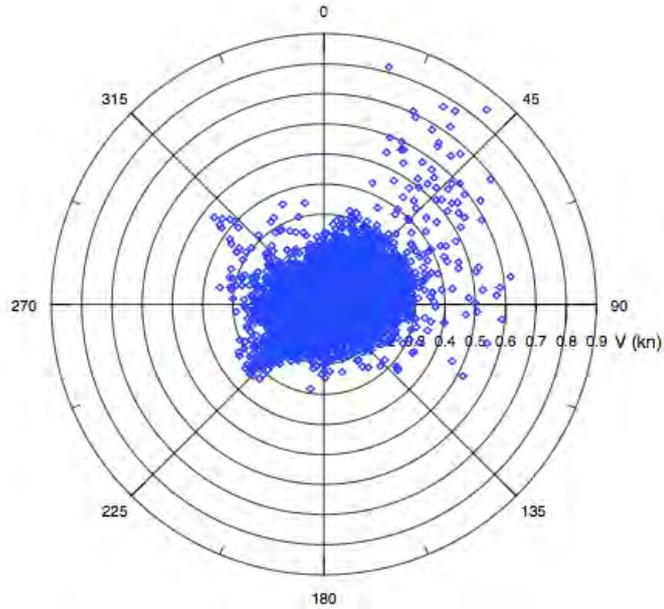
Los gráficos polares (Fig. 115 y 116) muestran las veces que existieron registros en una dirección determinada. En ambos correntómetros se observó que la dirección predominante es NORESTE especialmente en marea llenante (Fig. 117).

Tabla XXVIII. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente.

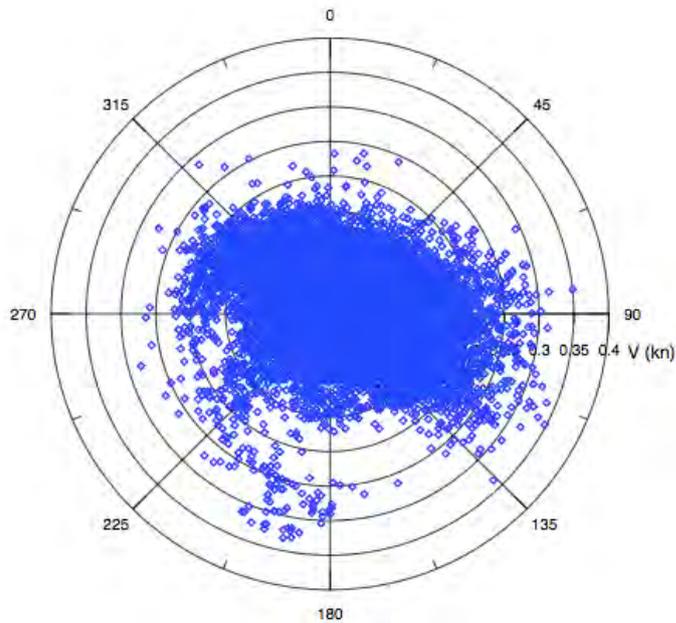
VELOCIDAD DE CORRIENTE ( NUDOS )						
Prof. (m)	Máximo	Promedio	Mínimo	Desv. Est.	Moda	Mediana
-8,0	0,9	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
-16,0	0,4	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



115 Figura 115. Diagrama polar de velocidad (nudos) y dirección (8 m profundidad)

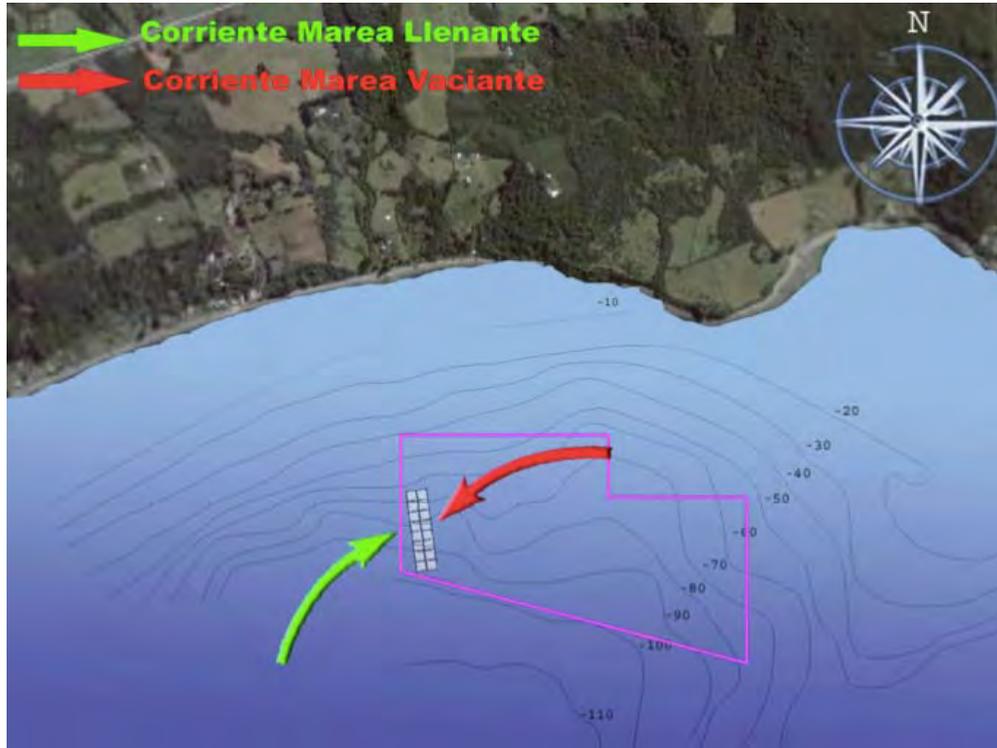


116 Figura 116. Diagrama polar velocidad (nudos) y dirección (16 m profundidad).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



117 Figura 117. Esquema de comportamiento de dirección de corrientes en mareas llenante y vaciante en el Centro B.

## Centro C

Durante la realización de los muestreos de agua en el Centro C se registró una velocidad promedio de corriente a 2.5 metros de profundidad de 0.045 Nudos (boya de señal GPS, Data Logger X-Route Modelo: XR-6100). La condición fue de marea llenante y dirección de corriente SURESTE.

## Correntometría Centro C

Durante la realización de los muestreos de agua en el Centro C se registró una velocidad



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

promedio de corriente a 2.5 metros de profundidad de 0.045 Nudos (boya de señal GPS. Data Logger X-Route Modelo: XR-6100). La condición fue de marea llenante y dirección de corriente SURESTE. En general esta zona de estudio se caracteriza por tener una tendencia direccional definida en el flujo de corriente. Los valores promedios para cada fase corresponden a 0.18 y 0.20 nudos para las fases llenante y vaciante respectivamente (Tabla XXIX y XXX). Con respecto a los valores máximos observados existe una diferencia no muy amplia entre ambas fases ya que el promedio de los máximos para la fase llenante alcanzó 0.70 nudos y para la fase vaciante 0.86 nudos, presentando un máximo puntual en fase vaciante de 0.93 nudos. La dirección de corriente predominante es NOROESTE y en segunda componente SURESTE, para ambas mareas (Tabla XXXI). La representación gráfica de la dirección de corriente y su intensidad se observan en las figuras 118, 119, 120 y 121 para las profundidades de 3, 6, 9 y 15 metros respectivamente.

**Tabla XXIX. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase llenante.**

<b>VELOCIDAD DE CORRIENTE FASE LLENANTE ( NUDOS ) CENTRO C</b>						
<b>Prof. (m)</b>	<b>Media</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Moda</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvest</b>
<b>-3</b>	0.19	0.8	0	0.12	0.17	0.12
<b>-6</b>	0.19	0.7	0	0.12	0.16	0.12
<b>-9</b>	0.18	0.62	0	0.12	0.16	0.12
<b>-12</b>	0.17	0.72	0	0.16	0.16	0.11
<b>-15</b>	0.17	0.7	0	0.08	0.14	0.11
<b>-18</b>	0.15	0.68	0	0.1	0.14	0.1



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Tabla XXX. Estadísticas básicas para la magnitud de corriente en fase vaciante.

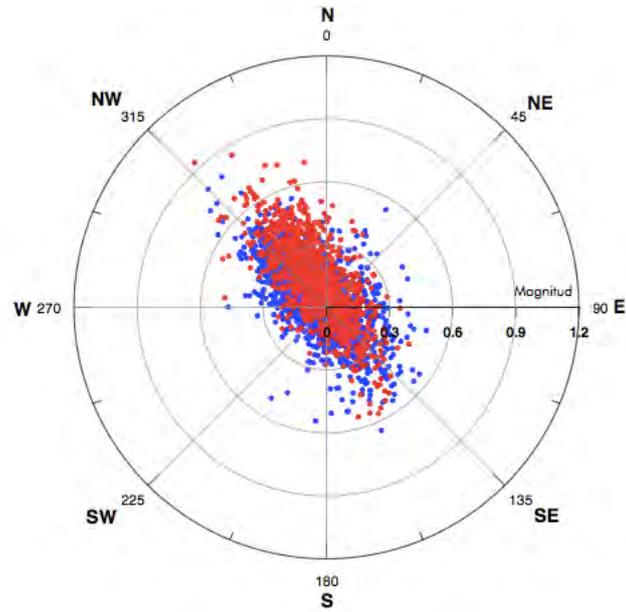
VELOCIDAD DE CORRIENTE FASE VACIANTE ( NUDOS ) CENTRO C						
Prof. (m)	Promedio	Máximo	Mínimo	Moda	Mediana	Desvest
-3	0.22	0.93	0	0.08	0.17	0.15
-6	0.22	0.91	0	0.14	0.17	0.14
-9	0.2	0.89	0	0.08	0.17	0.13
-12	0.19	0.84	0	0.08	0.17	0.12
-15	0.18	0.8	0	0.1	0.16	0.12
-18	0.17	0.82	0	0.1	0.14	0.11

Tabla XXXI. Frecuencias en % de la dirección de la corriente por profundidad.

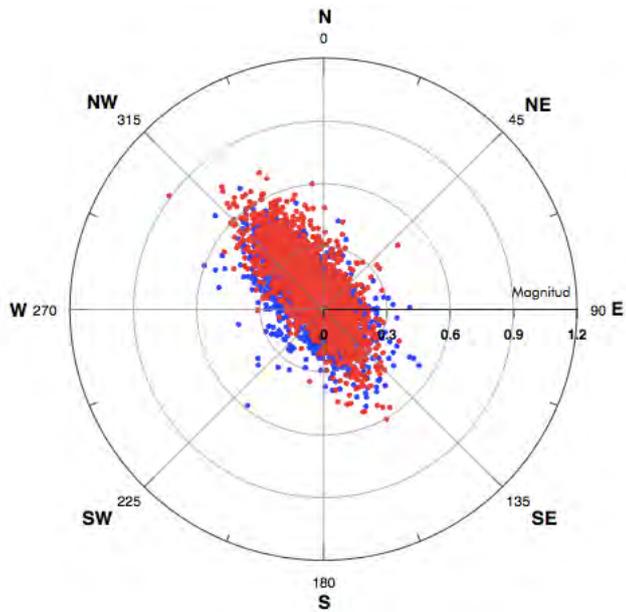
FRECUENCIAS DE DIRECCIÓN DE CORRIENTES (%) CENTRO C								
Prof. (m)	NORTE	NE	ESTE	SE	SUR	SO	OESTE	NO
-3	12	6	7	13	10	5	11	38
-6	11	4	7	13	11	6	11	39
-9	11	4	6	15	11	6	10	37
-12	12	3	6	18	10	5	8	38
-15	12	4	8	20	10	5	9	34
-18	13	6	9	20	11	4	8	29



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



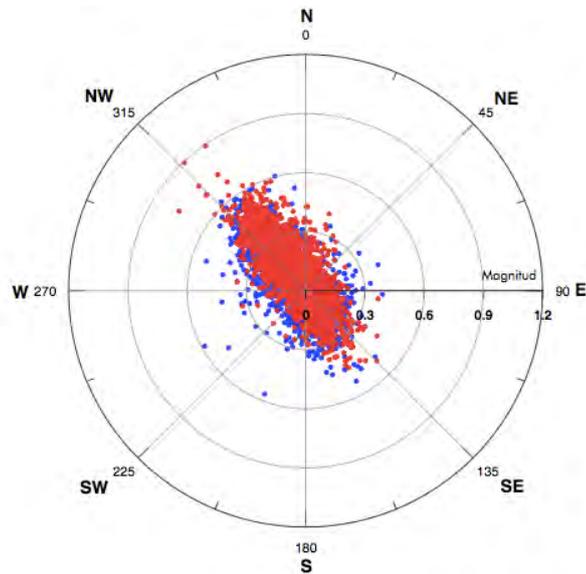
118 Figura 118. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 1 (3 metros de profundidad).



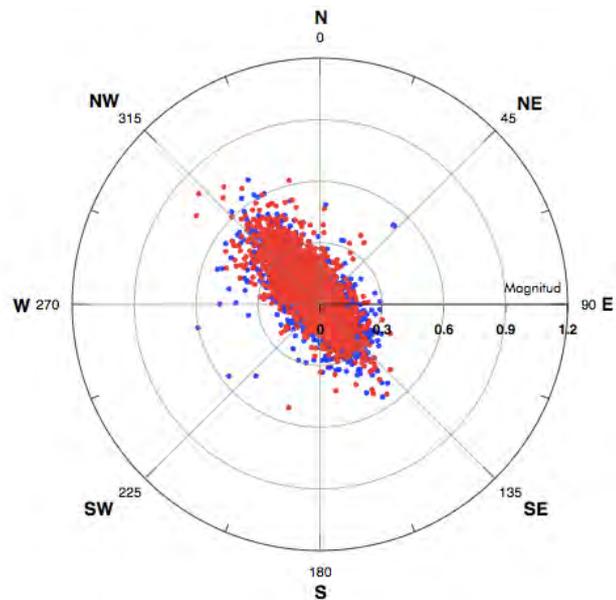
119 Figura 119. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 2 (6 metros de profundidad).



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Acuicultura



120 Figura 120. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 3 (9 metros de profundidad).



121 Figura 121. Representación gráfica de velocidad y dirección de corrientes de Centro C, capa 4 (15 metros de profundidad).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

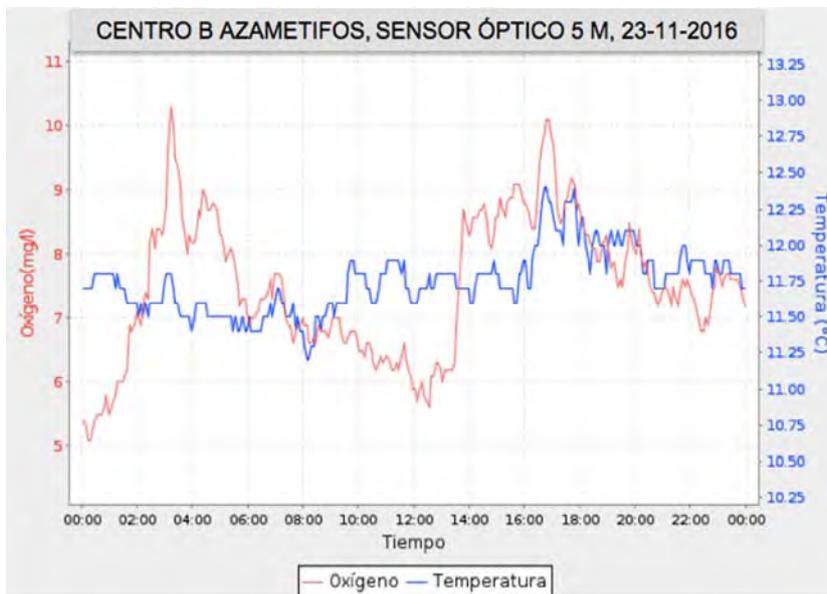
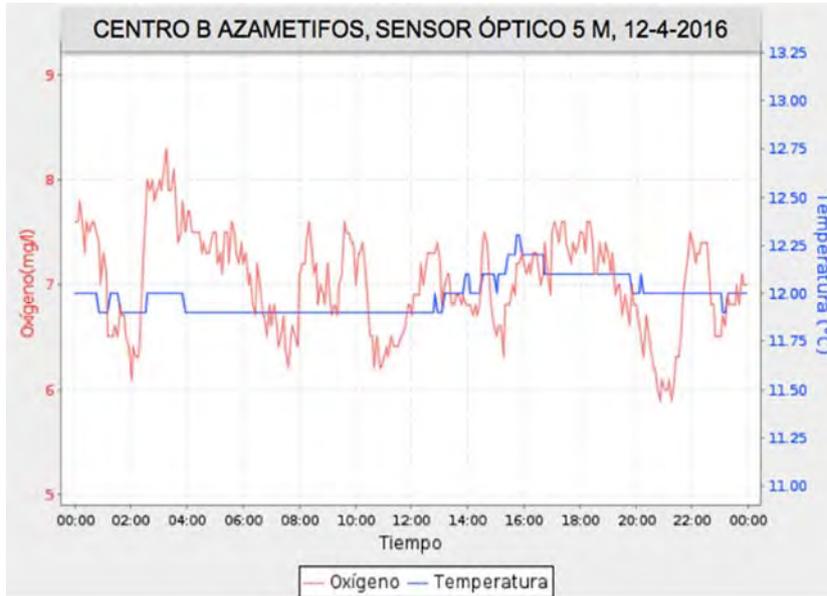
## 9.4.2 Temperatura y oxígeno disuelto durante el muestreo.

La temperatura a los 5 m de profundidad para el día del muestreo en los 3 centros fue estable y se encontró en el rango de los 11 a 12.5 °C (Fig. 122 y 123). El oxígeno disuelto fue algo más variable, observándose condiciones más estables en el Centro A, donde los valores se ubicaron entre los 5.8 a 7.2 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. En el Centro B se observaron variaciones mayores con máximos de 8.4 y mínimos de 5.2 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. En el Centro C el oxígeno disuelto el día del muestreo fluctuó entre los 5.2 y los 10.2 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Fig. 122 y 123).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

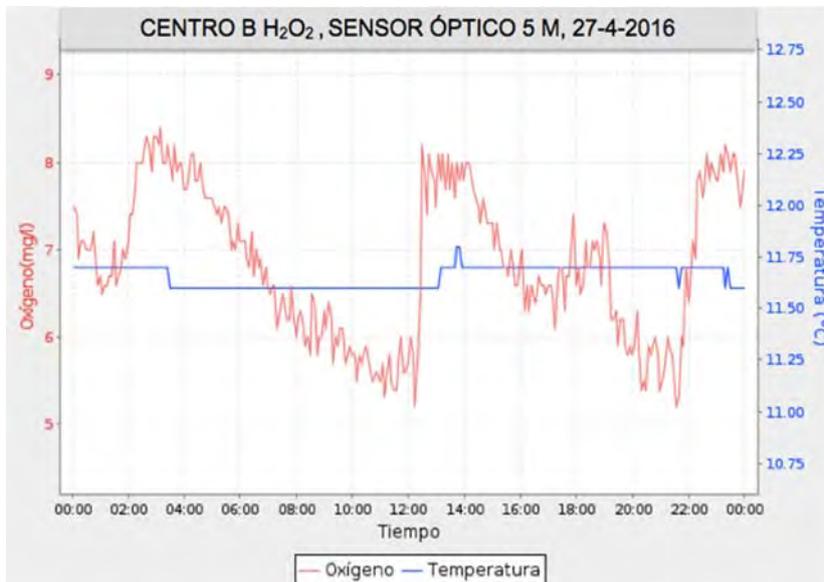
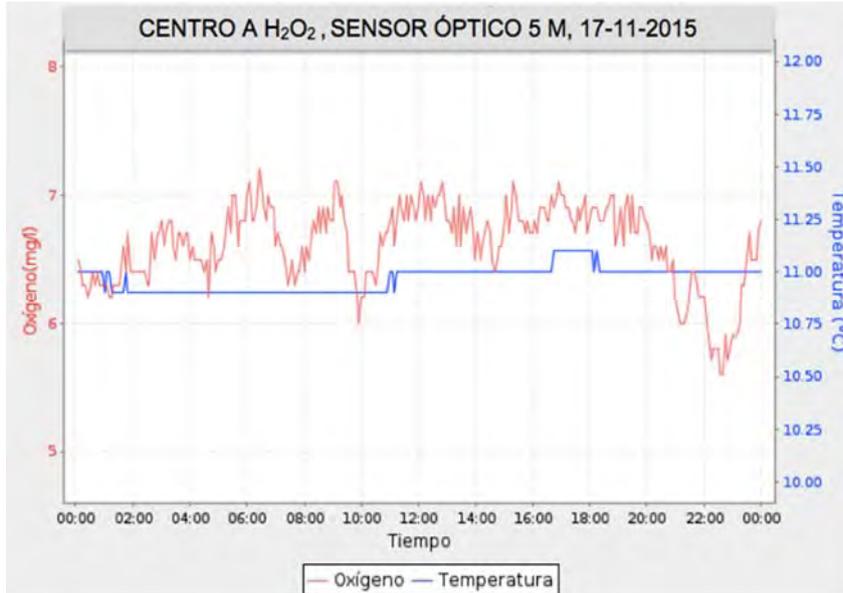


122 Figura 122. Temperatura (°C) y Oxígeno disuelto (mg\*L-1) a 5m de profundidad en los centros de cultivo B y C para el día del muestreo Azametifos.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



123 Figura 123. Temperatura (°C) y Oxígeno disuelto (mg\*L-1) a 5m de profundidad en los centros de cultivo A y B para el día del muestreo Peróxido.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 9.4.3 Estimación de concentraciones dentro y fuera de la jaula durante y posterior a un baño con lona cerrada de azametifos.

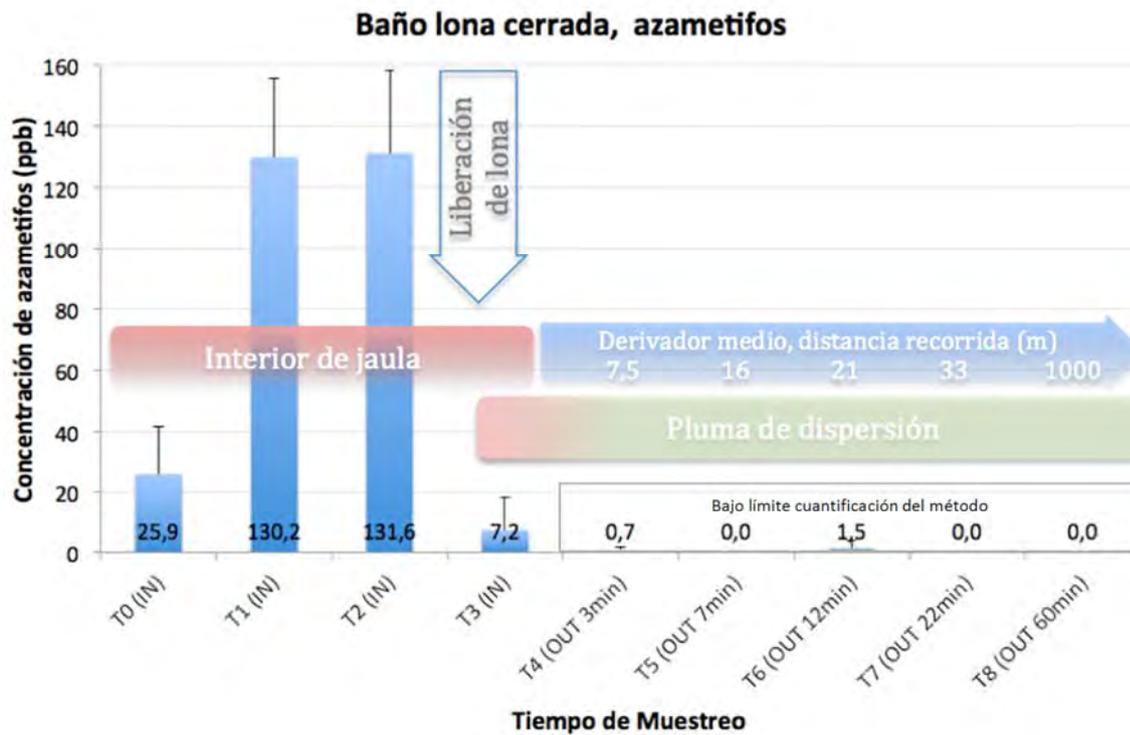
#### **Centro B - Azametifos**

Durante la ejecución de un baño con azametifos en el “Centro B”, se observó una concentración relativamente alta (25.9 ppm) en las botellas que recolectaron el agua previo a la aplicación del baño (T 0 IN). A partir de los 10 minutos (T 1 IN) de la aplicación del compuesto, la concentración se mantiene homogénea por sobre los 130 ppb (Fig. 124). Esta concentración no disminuyó manteniéndose con un nivel de concentración similar hasta los 40 minutos de aplicación (T2 IN). Si bien la concentración esperada es de 100 ppb, el éxito de un baño depende de muchos factores operacionales y climáticos, por lo que lograr exactitud con los volúmenes de baño no es habitual. Una vez que el baño de 40 minutos finalizó, la lona fue retirada y comenzó el monitoreo de la concentración de la pluma de dispersión. Para este centro se evaluaron 5 estaciones de muestreo; 7.5, 16, 21, 33 y 1000 metros desde la jaula bañada, con tiempos acumulados de 3, 7, 12, 22 y 60 minutos. Los valores de concentración encontrados fueron de 0.7, 0, 1.5 y 0 ppm en cada estación respectiva, todos bajo el límite de cuantificación del método de 2.1 ppb. Por otra parte, se evaluó la concentración dentro de la jaula, pero 10 minutos después de liberada la lona, encontrando una concentración de 7.2 ppm (T3 IN).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



124 Figura 124. Centro B. Concentración azametifos en la columna de agua durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios +ds

## Centro C- Azametifos

Durante la ejecución de un baño con azametifos en el “Centro C”, se observó una concentración relativamente baja en relación a lo esperado (100 ppb). Las concentraciones promedio dentro de la jaula se mantuvieron por debajo de 26 ppb, presentando bastante variabilidad con valores máximos de 50 ppb. Las botellas que recolectaron el agua previo a la aplicación del baño (T 0 IN) registraron valores de 0 ppb. A partir de los 10 minutos (T 1 IN) de la aplicación del compuesto, la concentración se mantuvo en promedio a 25.4 ppb (Fig. 125). Esta concentración disminuyó al término del baño, que en esta ocasión fue de 35 minutos, momento en que se liberó la lona y se registró un nivel de concentración de 22



## Universidad Austral de Chile

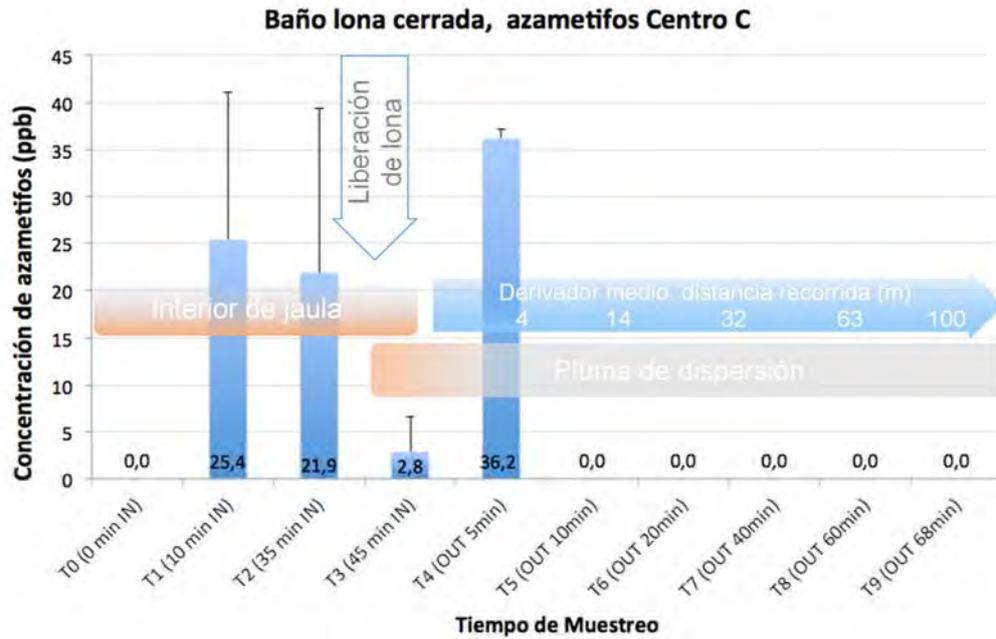
Instituto de Acuicultura

ppb. Luego de 10 minutos desde la finalización del baño (T3 IN) los valores llegaron a 2.8 ppb dentro de la jaula. Si bien la concentración esperada es de 100 ppb, el éxito de un baño depende de muchos factores operacionales y climáticos, por lo que lograr exactitud con los volúmenes de baño no es habitual. Una vez que el baño de 35 minutos finalizó, la lona fue retirada y comenzó el monitoreo de la concentración de la pluma de dispersión. Para este centro se evaluaron 6 estaciones de muestreo: 4, 14, 32, 63, 100 y 1000 metros desde la jaula bañada. Esto fue equivalente a tiempos acumulados de 5, 10, 20, 40, 60 y 68 minutos, respectivamente. Las muestras de 1000 metros corresponden a aguas control fuera de la influencia de la pluma de dispersión de compuesto. Los valores de concentración encontrados fueron de 36.2 ppb a los 4 metros (5 min) fuera de la jaula y 0 ppb en los demás puntos de muestreo (Fig. 125).



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura



125 Figura 125. Centro C. Concentración azametifos en la columna de agua durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios + desviación estándar.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

- 9.5 Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas
- 9.5.1 Estimación de concentraciones dentro y fuera de la jaula durante y posterior a un baño con lona cerrada de peróxido de hidrógeno.

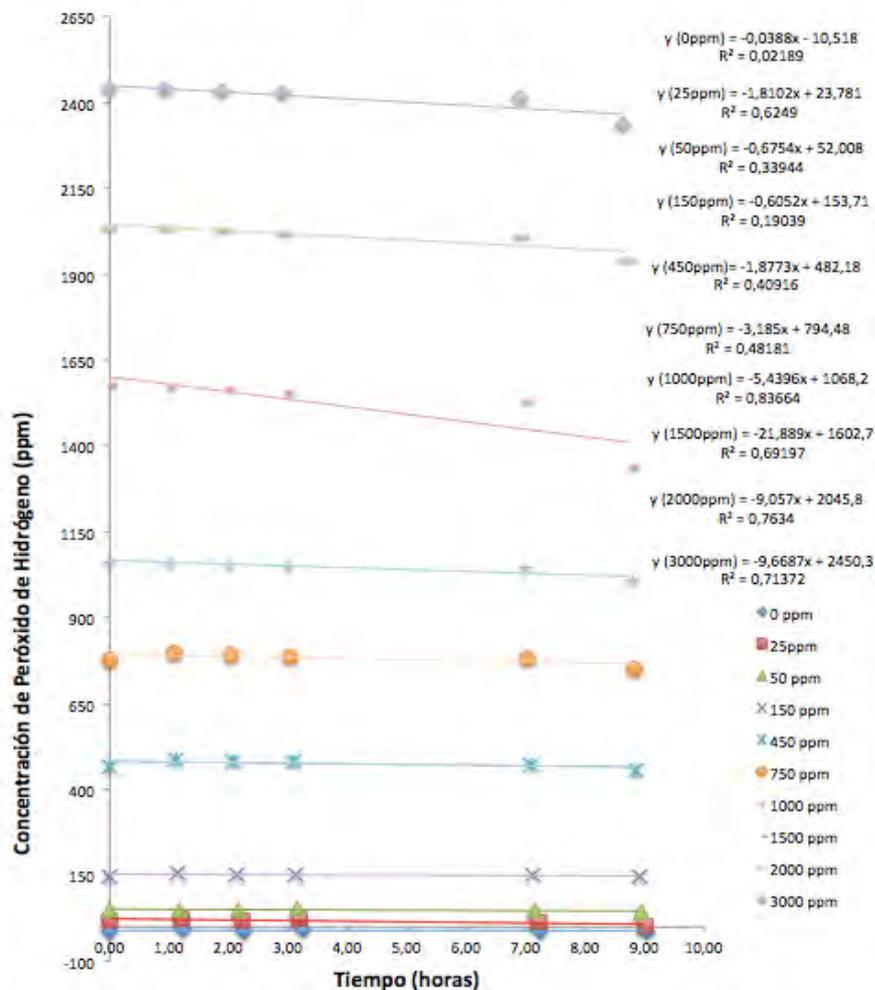
Una vez tomadas las muestras fueron llevadas en oscuridad y frías a la UACH para la medición de concentración mediante un espectrofotómetro, a longitud de onda 240 nm. Los datos fueron ajustados de acuerdo a las curvas de calibración y de pérdida de concentración en el tiempo, utilizando 3 botellas de vidrio de 500 ml por concentración y cada una seguida en el tiempo, como se muestra en la figura 126.

### **Centro A Peróxido de hidrógeno**

Durante la ejecución de un baño con peróxido de hidrógeno en el “Centro A”, se observó una concentración relativamente alta (104 ppm) en las botellas que recolectaron el agua previo a la aplicación del baño. A partir de los 5 minutos de la aplicación del compuesto, la concentración se mantuvo homogénea por sobre los 540 ppm (Fig. 127). Esta concentración no disminuyó manteniéndose con un nivel de concentración similar hasta los 20 minutos de aplicación. Si bien la concentración esperada era de 750 ppm, el éxito de un baño depende de muchos factores operacionales y climáticos, por lo que lograr exactitud con los volúmenes de baño no es habitual. Una vez que el baño de 20 minutos finalizó, la lona fue retirada y comenzó el monitoreo de la concentración de la pluma de dispersión.



### Perdida de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tiempo



126 Figura 126 Disminución de la concentración del compuesto peróxido de hidrógeno en el tiempo, realizado con agua del mismo centro muestreado

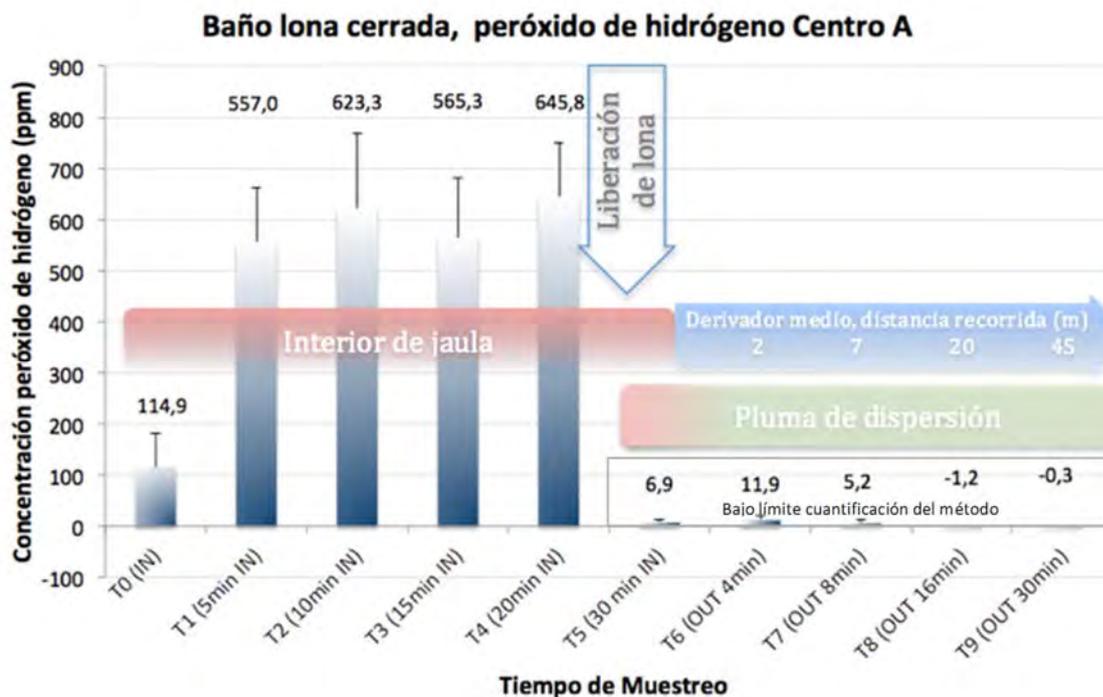
Para este centro se evaluaron 4 estaciones de muestreo; 2, 7, 20 y 45 metros desde la jaula bañada, con tiempo acumulados de 4, 8, 18 y 30 minutos. Los valores de concentración encontrados fueron de 11.9, 5.2, -1.2 y -0.3 ppm en cada estación respectiva, todos bajos los límites de cuantificación del método (25ppm). Por otra parte, se evaluó la concentración



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

dentro de la jaula 10 minutos después de liberada la lona, encontrando una concentración de 6.9 ppm, también bajo el límite de cuantificación del método.



127 Figura 127. Centro A. Concentración de peróxido de hidrógeno durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios +SD.

## Centro B Peróxido de hidrógeno

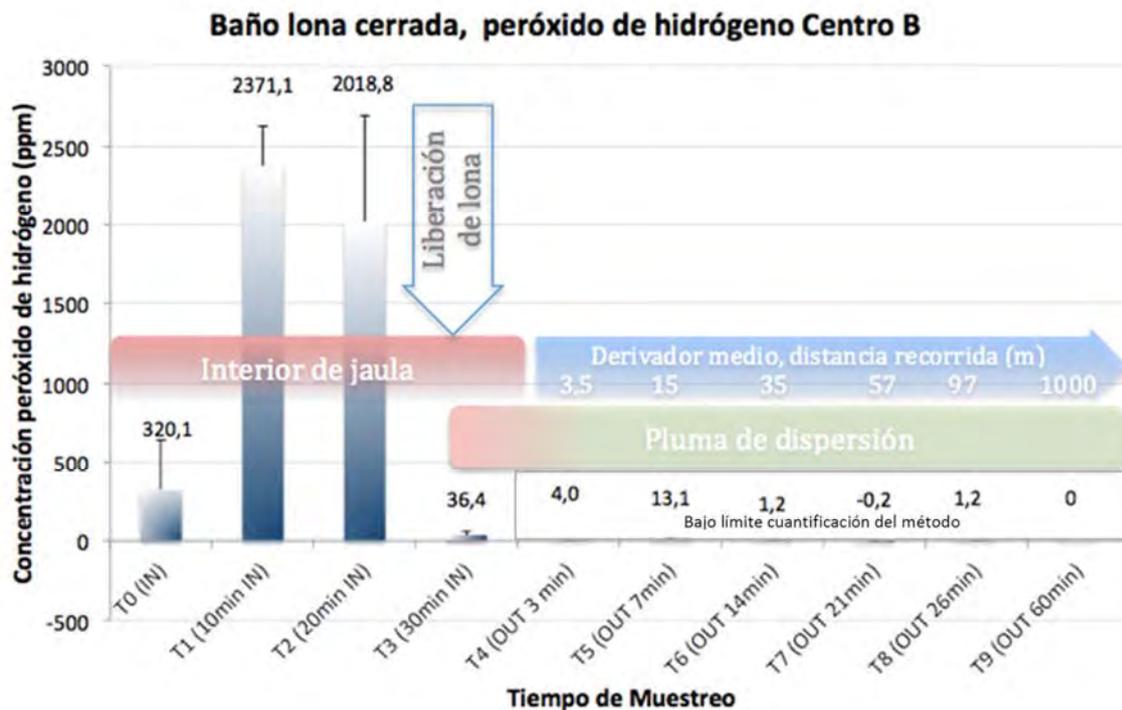
Durante la ejecución de un baño con peróxido de hidrógeno en el “Centro B”, se observó una concentración relativamente alta (323 ppm) en las botellas que recolectaron el agua previo a la aplicación del baño (T 0). A partir de los 10 minutos de la aplicación del compuesto y hasta los 20 minutos, la concentración se mantuvo homogénea por sobre los 2019 ppm (Fig. 128). Si bien la concentración esperada era de 750 ppm, el plegamiento de



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

la lona por corriente alta redujo el volumen aumentando la concentración del compuesto. Una vez que el baño de 20 minutos finalizó, la lona fue retirada y comenzó el monitoreo de la concentración de la pluma de dispersión. Para este centro se evaluaron 6 estaciones de muestreo; 3.5, 15, 35, 57, 97 y 1000 metros desde la jaula bañada, con tiempo acumulados de 3, 7, 14, 21, 26 y 60 minutos. Los valores de concentración encontrados fueron de 4, 13.1, 1.2, -0.2, 1.2 y 0 ppm en cada estación respectiva, todos valores bajo el límite de cuantificación del método. Por otra parte, se evaluó la concentración dentro de la jaula, 10 minutos después de liberada la lona, encontrando un nivel de 36.4 ppm (T 3).



128 Figura 128. Centro B. Concentración de peróxido de hidrógeno durante y posterior a un baño con lona cerrada. Se muestran valores promedios + ds.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 10 DISCUSION

### 10.1 Revisión bibliográfica.

La revisión bibliográfica pone en evidencia que el quimioterapéutico azametifos utilizado como baño en especies diferentes que los ectoparásitos caligidios, puede desencadenar diferentes efectos como, por ejemplo: un efecto directo letal o subletales como afectar el comportamiento, afectar la reproducción, modular la actividad de la acetilcolinesterasa, cambiar la asignación de energía corporal, afectar la viabilidad de hemocitos y la función inmune. La respuesta de las especies frente a este quimioterapéutico dependerá de la propia especie evaluada, con sus factores intrínsecos y extrínsecos de regulación poblacional, dependerá además de las concentraciones del compuesto y el tiempo de exposición, así como de la repetitividad de la exposición. A medida que aumente la concentración del quimioterapéutico o el tiempo de exposición, aumentarán las probabilidades de afectar a una especie. Debido a la metodología actual de baños con lona cerrada en los centros productivos de salmones, es muy probable que algunas especies no objetivo coincidan con el momento del tratamiento antiparasitario o que estos organismos se encuentren con la masa de agua que deriva una vez que la lona es retirada.

Los efectos del peróxido de hidrogeno son especie específicos, por lo que estos deben ser cuidadosamente evaluados para la o las especies de interés, y usando una estimación real del tiempo de exposición. La concentración recomendada de peróxido de hidrógeno para el control del Caligus, está por sobre los valores LC50 reportados para crustáceos, y por sobre las concentraciones necesarias para causar daños a nivel fisiológico, morfológicos y causar respuestas a nivel molecular. Además, es importante considerar el tiempo de exposición, ya que aun en bajas concentraciones producto de la dilución una vez liberado el peróxido de hidrógeno al ambiente marino, puede ser letal bajo una exposición prolongada. Estudios muestran que la exposición a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno tiene efectos sobre la progenie de algunas especies, potencialmente no solo afectando poblaciones futuras de esta especie, sino que también causando efectos en la trama trófica.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Dada la alta toxicidad reportada para organismos acuáticos, incluyendo peces, y las recomendaciones explícitas de extrema precaución en su uso cercano a ambientes acuáticos, es sorprendente que deltametrina sea usado por la industria salmonera para el control de la caligidosis. Más aun luego de la falta de información evidenciada por el presente trabajo, concluyendo que los efectos de la exposición a deltametrina en invertebrados marinos, especialmente bivalvos y crustáceos, no son claros ni han sido extensivamente evaluados.

La concentración recomendada, de  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  (SEPA, 2005), la que se aplica por baños de 40 minutos es muy superior a la mayoría de las  $LC_{50}$  encontradas en la literatura, por lo que efectos negativos en poblaciones no objetivo son muy probables. Dado que la deltametrina afecta la habilidad locomotora del organismo expuesto, esto lo imposibilita de desplazarse correctamente, escapar de depredadores, alimentarse y por ende compromete su sobrevivencia en forma directa. A bajas dosis, también incrementa el estrés oxidativo, por lo que efectos negativos a largo plazo también son probables. Dada la elevada toxicidad de la deltametrina y su intensivo uso por la industria salmonera, es fundamental realizar una evaluación más acabada de sus potenciales efectos sobre poblaciones naturales no objetivo.

Los efectos de la cipermetrina claramente dependen de la especie y estadio de desarrollo, y de la concentración, así como del periodo de exposición al piretroide. Las concentraciones utilizadas de cipermetrina para el control de la caligidosis son  $5000 \text{ ng L}^{-1}$  (Excis) y  $15000 \text{ ng L}^{-1}$  (Betamax), las cuales exceden en la mayoría de los casos las concentración letales para las especies de invertebrados no objetivos estudiados, y en general concentraciones significativamente menores causan daños fisiológicos teniendo como consecuencia peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas, daños morfológicos principalmente en el hepatopáncreas y branquias y probablemente una depresión en el sistema inmune. Sin embargo, es importante considerar que, si bien la cipermetrina es altamente tóxica, tiene



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

rápida dilución en el agua y la mayoría de los estudios consideran exposiciones más prolongadas (24 o más horas) que las recomendadas por el fabricante (1 h para Excis® y 30 minutos para Betamax®). Tomando en cuenta estas consideraciones es posible indicar basado en la información disponible que los anfípodos *E. finmarchicus*, *P. flexuosus*, así como los adultos y el primer estadio larval de la langosta americana *H. americanus* serían afectadas por concentraciones 1 orden de magnitud menor que las utilizadas para el control de la caligidosis bajo periodos de exposición al fármaco similares o menores a los recomendados por el fabricante.

## 10.2 Efectos de cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola (*Cancer edwardsii*)

### 10.2.1 Efectos en la etapa adulta de jaiba marmola (*Cancer edwardsii*)

#### **Aspectos reproductivos y mortalidad**

Los porcentajes de viabilidad espermática, así como el efecto en el tejido ovárico de jaiba, no mostraron mayores diferencias entre los tratamientos, incluidos el control, para los compuestos cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno durante exposiciones agudas. Luego de exposiciones crónicas a estos mismos compuestos tampoco se observó un daño evidente en tejido ovárico de jaiba, independiente del estadio de desarrollo de la gónada. Aunque hay pocos antecedentes sobre el efecto de los compuestos utilizados contra la caligidosis en la reproducción de decápodos, reiteradas exposiciones quincenales a azametifos pueden tener un efecto negativo en la supervivencia y el desove de la langosta americana *Homarus americanus* (Burrige et al., 2008), sin embargo, no se reporta daño en gónada.

Con respecto a la mortalidad de los adultos expuestos a estos compuestos se puede concluir que, a excepción de Azametifos, todos los compuestos analizados matan o dañan severamente al 50% de los individuos a concentraciones inferiores a las concentraciones



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

recomendadas por el fabricante CRF; Cipermetrina casi un orden de magnitud menor a CRF, Deltametrina casi 2.5 veces menor a la CRF; peróxido, si bien no se registró mortalidad, los animales fueron severamente afectados (flotaron) a concentraciones por debajo de la CRF. En la repetición del experimento con azametifos se trabajó con 24 h de exposición al compuesto y se evaluaron concentraciones mucho mas altas que las originalmente planificadas con el fin de intentar obtener una mortalidad que permitiese determinar  $CL_{50}$  para este compuesto. Si bien se obtuvo esta condición, el análisis estadístico ajustando una curva dosis-respuesta (o en el presente caso, concentración-respuesta) no convergió y no se pudo estimar el valor y su error estadístico por este método. Si se hace una estimación manual utilizando el gráfico, la concentración que mata al 50% de las jaibas estaría entre los 1000 y 2500 ppb, muy por encima de las concentraciones utilizadas por la industria y cuantificada durante baños en uno de los objetivos del presente trabajo. Al comparar con la literatura se puede observar que la jaiba es mas resistente a Azametifos que otros decápodos adultos como *Crangon septemspinosa*, que presentó  $LC_{50}$  de 19.2 ppb con 24 h de exposición (Ernst et al., 2014) o hembras adultas de *H. americanus* sometidas por 48 horas a un gradiente de concentraciones, donde se observó que la  $LC_{50}$  fue de 0.6 ppb en época estival y de 3.2 ppb en los meses fríos (Burrige et al., 2005). Para el Peróxido de Hidrógeno la información sobre  $LC_{50}$  encontrada en la literatura es escasa y los valores reportados se ubicarían por encima de 3750 mg L<sup>-1</sup> en adultos de langosta americana (*H. americanus*) o 3182 mg L<sup>-1</sup> en adultos de *Crangon septemspinosa* para una exposición de 1 hora (Burrige et al., 2014). El tiempo de exposición tiene un importante efecto sobre los animales por lo que las comparaciones con los valores obtenidos en el presente estudio deben hacerse con cautela. Independientemente de esto, los valores cercanos a 1500 mg L<sup>-1</sup> encontrados en el presente trabajo para exposiciones por 24 h evidencian una sensibilidad mayor de adultos de jaiba marmola al peróxido de hidrógeno que las especies mencionadas anteriormente. Las  $CL_{50}$  encontradas en el presente trabajo para Deltametrina de 0.8 y 3.25 ppb dependiendo de la biomasa expuesta a la concentración, indican que *C. edwardsii* sería



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

más resistente que adultos de otros decápodos como la langosta quelada o bogavante americano *Homarus americanus* (Burrige et al., 2014) o el camarón *Crangon septemspinosa* (Fairchild et al., 2010). Al efectuar la comparación con los resultados de cipermetrina, podemos decir que para jaiba los valores de CL<sub>50</sub> 1.8 y 14.64 ppb, dependiendo de la biomasa expuesta a la concentración, son comparables a los obtenidos para tiempos similares de exposición en adultos de otros decápodos como *Macrobrachium lar* (1.3 ppb, Bajet et al., 2012) y 1.8 ppb en *H. americanus* (Burrige et al., 2000a). Aunque queda de manifiesto en el presente trabajo la diferencia entre los valores obtenidos dependiendo de la biomasa expuesta, en ambas situaciones experimentales los valores de CL<sub>50</sub> son inferiores a la Concentración Recomendada por el Fabricante CRF y utilizada por la industria para el tratamiento contra *Caligus*.

## Efectos sobre EC<sub>50</sub>

En la literatura se han reportado algunos efectos sobre la conducta de varios crustáceos ante exposiciones de los compuestos utilizados en el presente trabajo. Abgrall et al. (2000) observaron que en *H. americanus*, exposiciones de 10 minutos a azametifos, reduce la capacidad locomotora a medida que aumenta la concentración del compuesto. Esto causó un retardo en la búsqueda de refugio cuando los animales fueron sometidos a 100 ppb, comparado con los controles. Este retraso fue aún más evidente en concentraciones de 500 y 1000 ppb. Copépodos marinos son inmovilizados al exponerlos a cipermetrina, siendo la alimentación de partículas inhibida y la EC<sub>50</sub> (determinada a través de la inhibición de la alimentación) determinado en concentraciones de cipermetrina entre 0.098-0.36 ppb, basado en una exposición de 1 h y recuperación de 5 h. (Van Geest et al., 2014). La inhibición de la alimentación también ha sido observada por Barata et al. (2002a) en *A. tonsa* indicando que EC<sub>50</sub> fue de 0.065 (0.041-0.089 ppb) y para adultos de *Tisbe battagliai* de 0.098-0.32 ppb. Las concentraciones utilizadas si bien no conducen a la muerte directamente, la inmovilización aumenta las probabilidades de mortalidad al aumentar los riesgos de depredación, así como disminuir la probabilidad de permanecer en la columna



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

de agua en el caso de los Copépodos. En el camarón *P. serratus* se demostró que la velocidad de nado disminuye significativamente en concentraciones iguales o superiores a  $0.6 \text{ ng L}^{-1}$  ( $0.0006 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) de deltametrina (Oliveira et al., 2012). Los autores enfatizan la importancia de este efecto, ya que la capacidad de desplazarse determina su capacidad para escapar de depredadores, encontrar alimento y una pareja para reproducirse. Adultos, nauplii y copepoditos de distintas especies de copépodos mostraron cambios en su comportamiento alimenticio luego de ser expuestos a 5 ppm peróxido de hidrógeno, inhibiendo por completo su alimentación; concentraciones de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  o ppm de peróxido de hidrógeno causaron la total parálisis luego de 15 minutos de exposición (Van Geest et al., 2014). En *D. magna*, similares concentraciones de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  peróxido de hidrógeno han sido reportadas de causar una disminución en la velocidad de nado y en la frecuencia cardiaca (Bownik and Stępniewska, 2015).

En jaiba marmola no se pudo observar una tendencia en la conducta de reincorporación proporcional a la concentración de los diversos compuestos utilizados, o si alguno de ellos provocaba una respuesta mas clara que otro, pero si es evidente que hay una disminución del porcentaje de jaibas reincorporadas en los animales expuestos comparados con los controles sin adición de compuestos.

Si bien se ha evaluado tradicionalmente el efecto de la letalidad de los compuestos (ver Revisión Bibliográfica), el efecto de ellos sobre su conducta (provocar que las jaibas floten por acumulación de burbujas en la zona branquial luego de exponerlas a peróxido de hidrogeno; afectar la transmisión del impulso nervioso y por lo tanto su actividad muscular) puede tener consecuencias en la capacidad de obtener y manipular su alimento así como disminuir su capacidad de huir de depredadores y, por lo tanto, afectar su viabilidad en la naturaleza.

Desde el punto de vista de la aproximación fisiológica utilizada en el presente trabajo podemos decir que se encontraron respuestas comparables en otros decápodos a los compuestos utilizados. Del mismo modo, los valores encontrados para CAT y ACHE en jaiba



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

marmola están en el rango reportado para una variedad de organismos acuáticos, lo mismo que los valores de consumo de oxígeno.

Estudios indican que la cipermetrina puede producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y por esto inducir el estrés oxidativo. ROS como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2$ ) y radicales de hidroxilos (OH) son capaces de reaccionar con macromoléculas biológicas y conducir a la carbonilación de proteínas, peroxidación de lípidos y daño del DNA (Bagchi et al., 1995). En el hepatopáncreas del camarón de agua dulce *Procambarus clarkii*, la exposición a la cipermetrina en concentraciones entre 0.005 a 0.04  $\mu g L^{-1}$  (ppb) a partir de las 24 h de exposición, produce un incremento en las especies reactivas de oxígeno y presenta los más altos niveles de ROS a las 48 h de exposición a 0.04  $\mu g L^{-1}$ . Este aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes no es sostenido y decrece después de 72 h de exposición a la cipermetrina (Wei and Yang, 2015a), teniendo como consecuencia altos niveles de carbonilación de proteínas y peroxidación de lípidos en el hepatopáncreas de *P. clarkii* con el aumento de la concentración de cipermetrina. Considerando los antecedentes que demuestran la generación de ROS como consecuencia de una exposición a cipermetrina y que en jaiba marmola no se observó una modificación de la actividad de la enzima antioxidante CAT a las diferentes concentraciones y tiempos en musculo producto de exposición aguda, podría indicar potencial daño en jaiba. Esto sería especialmente importante en hepatopáncreas donde disminuyó la actividad de CAT a mayores concentraciones de cipermetrina y donde la exposición crónica no mostro cambios en la actividad de la enzima. Evaluaciones del daño por estrés oxidativo deberían ser realizadas para comprobar esta situación.

Al igual que con cipermetrina, para el otro piretroide analizado se ha reportado peroxidación de lípidos producto de la exposición a deltametrina de crustáceos decápodos (Dorts et al., 2009, Oliveira et al., 2012). Como consecuencia de la exposición a deltametrina, la actividad de enzimas antioxidantes muestra diferentes patrones: un incremento en glutatión transferasa (entre 19 a 39  $ng L^{-1}$  deltametrina) y catalasa (a 19  $ng L^{-1}$  deltametrina) en *P. serratus* (Oliveira et al., 2012), una inhibición de catalasa y glutatión peroxidasa en *P.*



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

*monodon* (Tu et al., 2012) y actividad similar en adultos de *P. monodon* (Dorts et al., 2009). En el presente trabajo, *C. edwardsii* presentó una disminución de la actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas al ser expuestos a mayores concentraciones de deltametrina por 24 h coincidiendo con lo reportado para *P. monodon* por Tu et al. (2012). Dado que se ha reportado que deltametrina provoca un incremento en la generación de ROS y, que en el presente trabajo se observó un incremento en la tasa metabólica a mayores concentraciones de deltametrina, la disminución de la actividad de CAT provocaría mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo en jaiiba.

Esta situación es especialmente preocupante en las exposiciones crónicas donde un incremento lineal en la tasa respiratoria a mayores concentraciones de deltametrina generaría mayor liberación de ROS. Esto, debido a que, en condiciones no estresantes, entre un 1 y un 4% del oxígeno consumido por un animal es destinado a la generación de ROS (Hochachka and Somero, 2002). Si aumenta el consumo de oxígeno, provocado por deltametrina, por ejemplo, debería traducirse en un incremento en la producción de ROS. Este incremento en la generación de ROS debe ser controlado por mecanismos antioxidantes. Sin embargo, en *C. edwardsii* al mismo tiempo que incrementa el consumo de oxígeno a mayores concentraciones de deltametrina durante la exposición crónica, disminuye la actividad de la enzima antioxidante CAT en musculo (y permanece constante en hepatopáncreas). Esta interacción sugiere que se incrementaría el riesgo potencial de generar daño celular por estrés oxidativo, aunque se requieren estudios específicos debiesen comprobar esta situación.

En *D. magna* se ha descrito daño por estrés oxidativo a concentraciones de 5ppm de peróxido de hidrogeno (Bownik and Stępniewska, 2015). Un incremento en el daño al ADN branquial fue también observado en adultos de *Sinopotamon henanense* luego de 24 h de exposición a 170 mg L<sup>-1</sup> peróxido de hidrógeno (Wang et al., 2014) y en *D. magna* luego de exposición a concentraciones tan bajas como 0.17 mg L<sup>-1</sup> (Pelegri et al., 2014). En general, un incremento en la actividad y expresión de enzimas antioxidantes han sido reportadas como respuesta del animal para protegerse del incremento del estrés oxidativo causado por



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

la exposición al peróxido de hidrogeno. En el presente trabajo, sin embargo, no se observó una modificación de la actividad de CAT de musculo y hepatopáncreas producto de exposición aguda a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno. Al igual que para los piretroides, esto estaría sugiriendo estrés oxidativo (no cuantificado en este trabajo). Esta situación se podría ver intensificada como consecuencia de los tratamientos crónicos, donde hubo una disminución de CAT en musculo y hepatopáncreas en concentraciones de 500 y 1000 ppm. Estos resultados indican que el peróxido de hidrógeno produce un efecto subletal significativo en músculo y hepatopáncreas de jaiba cuando esta fue sometida diariamente por 6 horas a concentraciones de peróxido inferiores a las concentraciones recomendadas por el fabricante y utilizadas para el tratamiento contra Caligus

El efecto de azametifos en exposiciones agudas sobre *C. edwardsii* moduló su tasa metabólica, la actividad de las enzimas CAT y ACHE en músculo. En general, los efectos más notorios se encontraron a concentraciones por sobre la CRF. La exposición crónica a este compuesto tuvo efectos mas marcados. En *H. americanus* el efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones (61 ng L<sup>-1</sup>) de azametifos de forma continua durante 10 días fue evaluada y se determinó que, el daño oxidativo medido como carbonilación de proteínas en branquias y suero, aumentó (Coulliard and Burrige, 2015). Una situación similar seria esperable en *C. edwardsii* donde se produjo un incremento lineal del consumo de oxígeno a mayor concentración de azametifos, asociado con una constancia en la actividad de CAT en musculo y hepatopáncreas.

La acetilcolinesterasa ACHE es una enzima que degrada el neurotransmisor acetilcolina luego de la liberación de éste al espacio interneuronal en la sinapsis. Una inhibición de ACHE afecta la transmisión del impulso nervioso entre neuronas

En *H. americanus* la exposición crónica a bajas concentraciones (61 ppb) provoca un efecto de neurotoxicidad, encontrando niveles de colinesterasa disminuidos en el músculo (Coulliard and Burrige, 2015). Una situación similar se observó para jaiba marmola en el presente estudio, pero el efecto se percibe especialmente a concentraciones por sobre la CRF de 100 ppb.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

En términos generales, al incluir en el análisis los efectos sobre la fisiología de adultos de jaiba expuestos en forma aguda y crónica a los compuestos (incremento en la tasa respiratoria, alteración de la actividad de enzimas antioxidantes y vinculadas a la transmisión del impulso nervioso), se puede afirmar que el impacto de los compuestos es mayor que la que se puede evidenciar analizando la mortalidad exclusivamente. La mortalidad representa la variable mas extrema, utilizada entre otras razones, por la facilidad para ser cuantificada, pero la incorporación de otras variables que permitan medir “afectación” a un determinado nivel (conductual, fisiológico, ecológico, etc.) permite una mejor comprensión del efecto del factor (en este caso un compuesto químico) sobre el organismo y el potencial impacto en su desempeño y rol en el ecosistema. Estos efectos subletales pueden tener implicancias a corto o largo plazo en el desempeño del animal. Para jaiba marmola, por ejemplo, un incremento provocado por alguno de los compuestos estudiados sobre la tasa respiratoria implica una serie de limitaciones para el animal que se relacionan con su gasto energético aumentado, la necesidad de compensar ese incremento en los costos energéticos con mecanismos de ahorro energético (suspender síntesis de proteínas por ejemplo) y/o incremento en la incorporación de energía vía aumento en la ingesta, un aumento en la vulnerabilidad a factores abióticos como hipoxia (dado que requiere mas oxígeno por minuto, no puede incursionar en ambientes con menor disponibilidad de oxígeno), etc. Una “afectación” en la actividad de ACHE altera la transmisión del impulso nervioso. En el presente trabajo se observaron espasmos y perdida de la posición vertical durante las exposiciones a los compuestos. Desde el punto de vista del desempeño individual, la pérdida del control por parte del sistema nervioso impactará severamente la capacidad de desplazarse, buscar refugio, huir de depredadores, alimentarse, o en estadios larvales mantenerse nadando en la columna de agua y capturar su alimento, etc.

Del mismo modo, para jaiba marmola, el presente trabajo presenta indicios que permiten hipotetizar sobre la generación de estrés oxidativo, cuyo impacto no necesariamente es



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

instantáneo. Las especies reactivas de oxígeno ROS pueden provocar daño en lípidos (peroxidación de lípidos), proteínas (carbonilación de proteínas), ADN (provocando mutaciones y/o ruptura del esqueleto de azúcares y grupos fosfato) (Hermes-lima et al., 2001). Estos daños pueden provocar un envejecimiento precoz, disminución de respuesta inmune o inclusive afectar el potencial reproductivo (Monaghan et al., 2009). Especies de aguas frías tienden a incorporar mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados PUFA con el fin de mantener el desempeño de las membranas a baja temperatura. Sin embargo, los PUFA son especialmente sensibles a la peroxidación por las ROS. De esta forma, estos animales serían más vulnerables al estrés oxidativo que especies que habitan menores latitudes. Para combatir el estrés oxidativo hay varios mecanismos (Hermes-lima et al., 2001) pero todos ellos requieren energía para ponerlos en funcionamiento (Monaghan et al., 2009). De esta forma, los compuestos aquí evaluados no solo podrían provocar daño celular por estrés oxidativo, sino que para evitar o reparar ese daño, los animales deben destinar energía que podría haber sido utilizada en otros procesos fisiológicos y/o en crecimiento y/o en reproducción (Monaghan et al., 2009). De esta forma, un animal “afectado” por un compuesto, aunque sobreviva, puede tener comprometido severamente su desempeño individual y su rol ecológico.

## 10.2.2 Efectos de cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en larvas de jaiba marmola (*Cancer edwardsii*) y centolla (*Lithodes santolla*)

Todos los fármacos utilizados contra el *Caligus*, cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno, por la industria salmonera a las concentraciones y tiempo de exposición recomendadas por el fabricante tienen efectos letales en el primer estadio larval de *C. edwardsii*. La exposición crónica de las Zoea I de *C. edwardsii* por 7 días a azametifos en las concentraciones entre 0.00625 a 0.5 ppb no tiene efectos sub letales en el tiempo de desarrollo de las larvas, pero sí incrementa la mortalidad aproximadamente en un 20%. Por



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

su parte las exposiciones crónicas a peróxido de hidrógeno a concentraciones entre 187.5 a 1500 ppm provocan altas mortalidades en todas las concentraciones, pero ningún efecto en el tiempo de desarrollo de las pocas larvas sobrevivientes. Si bien las Zoea I de *L. santolla* fueron más resistentes a la cipermetrina que las de *C. edwardsii*, las primeras a las 96 horas post-aplicación también presentaban un 100% de larvas muertas a la concentración recomendada por el fabricante, similar efecto fue observado en las megalopas de *L. santolla*. La concentración de deltametrina (3ppb) utilizada para los baños contra Caligus también provoca el 100% de Zoea I y megalopas muertas y/o moribundas de *L. santolla*. En las Zoea I de *L. santolla* no se observaron efectos del azametifos a concentraciones similares a las utilizadas contra la caligidosis en el tiempo de desarrollo y/o mortalidad. Los resultados obtenidos de las megalopas a la exposición de azametifos no permiten realizar conclusiones, debido que la calidad de las larvas no fue el adecuado, presentando alta mortalidad en todos los tratamientos y control. La concentración de peróxido de hidrogeno recomendada por el fabricante no produce efectos en la sobrevivencia ni en el tiempo de desarrollo de las larvas de *L. santolla* (Zoea I y Megalopa)

En el caso de la cipermetrina el 100% de las larvas de *C. edwardsii* murieron antes de las 24 horas post-exposición en la concentración 10 menor que la recomendada por el fabricante y a las 48 horas post-exposición el 100% de las larvas habían muerto en la concentración 100 veces menor que la recomendada por el fabricante. Presentándose este fármaco como uno de los más letales y de rápido efecto en el caso de las larvas de *C. edwardsii*. Para este fármaco no fue posible calcular la concentración letal  $_{50}$ , debido a las altas mortalidades producidas por todas las concentraciones utilizadas lo que conlleva a que al ajustar la curva para calcular concentración letal $_{50}$ , no convergiera. Las Zoea I de *L. santolla* fueron más resistentes a la cipermetrina que las de *C. edwardsii*, y la concentración letal 50 a las 24 horas fue levemente menor a la utilizada contra el control del Caligus, sin embargo, la concentración letal 50 a las 96 horas post-aplicación es aproximadamente 3 veces menor que la concentración recomendados y encontrándose 100% de las larvas muertas y/o moribundas a 15 ppb de cipermetrina. Además, en el caso de las Zoea I de *L.*



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

*santolla* se detectaron efectos subletales en el tiempo de desarrollo en la concentración recomendada por el fabricante. Las megalopas de *L. santolla* fueron más sensibles a la cipermetrina que las Zoeas I

Antecedentes sobre efecto de la cipermetrina en estadios larvales de crustáceos se restringen a los realizados en *Homarus americanus* por Burridge et al. (2000 a, b), donde la concentración letal<sub>50</sub> para los estadios larvales I-II-III y IV, después de una exposición de 48 horas, fue de 0.18, 0.12, 0.06 y 0.12 ppb, respectivamente. Otras estimaciones de concentración letal<sub>50</sub> para larvas de *H. americanus* (estadio II) bajo distintas condiciones de exposición, 5 minutos de exposición + 12 horas de recuperación o 12 horas de exposición + 12 de recuperación, realizadas por Pahl and Ortiz (1999) son 0.66 ppb y 0.058 ppb. En general, en los estudios antes mencionados las exposiciones son más extensas a las realizadas en el presente estudio lo que estaría indicando que las larvas de *C. edwardsii* son altamente sensibles a la cipermetrina, así el 78% de las larvas expuestas por 30 minutos a 0.15 ppb mueren a las 24 horas post-exposición, esta misma concentración, pero con 48 horas de exposición, afectaría (mataría) al 50% de las larvas de *H. americanus*. Los resultados en Zoea I de *Lithodes santolla* indican que estas larvas serían menos sensibles que las de *C. edwardsii*, debido las diferencias en el tiempo de exposición de las larvas de *H. americanus* con las utilizados en el presente estudio no es posible realizar comparaciones con los resultados obtenidos para las larvas de centolla. En general, es posible postular que la alta sensibilidad de las larvas de *C. edwardsii* estaría dado por su pequeño tamaño en comparación a las larvas de *L. santolla*, y además podría estar jugando algún rol que las primeras son planctotróficas y las segundas son lecitotróficas.

Todas las concentraciones de deltametrina utilizadas ocasionaron el 100% de mortalidad a las 48 post exposición y todas las larvas de *C. edwardsii* inmediatamente después de la exposición a las distintas concentraciones de deltametrina o murieron o estaban moribundas. Al igual que en el caso de la cipermetrina las Zoea I de *L. santolla* fueron más resistentes al fármaco presentando 100% de larvas muertas y/o moribundas a las 96 horas post aplicación en concentraciones iguales o superiores a 1 ppb y las megalopas de *L.*



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

*santolla* a su vez fueron más resistentes a la deltametrina que las Zoea I de ambas especies. Es importante indicar que, si bien las larvas pueden sobrevivir por algunos días post-exposición a las concentraciones utilizadas de deltametrina en condiciones de laboratorio, en condiciones de campo probablemente sean fácil presa de depredadores y además precipiten rápidamente al fondo debido a la nula capacidad natación, teniendo como consecuencia la muerte de las larvas.

Al igual que en la cipermetrina los estudios del efecto de la deltametrina en los estadios tempranos de crustáceos se reducen al estudio en larvas de *H. americanus* (Burrige et al. 2014). En este estudio se determinó la concentración letal<sub>50</sub> siendo esta para los estadios I, II y IV con 24 horas de exposición de 0.0008, 0.0006 y 0.0017 ppb. Con una hora de exposición lo que podría ser más comparable con las condiciones del presente estudio que considero 40 minutos de exposición la concentración letal<sub>50</sub> fue de 0.0034 ppb para el estadio I y 0.0037 para estadio III, ambos valores inferiores a las concentraciones donde se contabilizó el 50% de mortalidad de las larvas de *C. edwardsii* que fueron 0.5 y 1ppb, ajustándose una concentración letal 50 a las 24 horas post-aplicación de 1.25 ppb. Las Zoea I de *L. santolla* nuevamente fueron más resistentes que las Zoea I de *C. edwardsii* presentando una concentración letal 50 a las 96 horas de 2.28 ppb, y más resistentes que las megalopas de su especie presentando estas una concentración letal 50 a las 96 horas post-aplicación de 0.79 ppb. La concentración letal de las megalopas de *L. santolla* a las 24 horas (1.04) fue levemente inferior que la ajustada para las Zoea I de *C. edwardsii*. La deltametrina a concentraciones de 1ppb presenta efectos subletales en el tiempo de desarrollo de la Zoea I de *L. santolla* prolongándose este en un 157%.

Aproximadamente el 50% de las larvas de *C. edwardsii* sometidas a concentraciones de azametifos de 1-3 ppb mueren a las 24 horas post-exposición, similares concentraciones son encontradas como concentración letal<sub>50</sub> en los estadios I, II, III y IV de *Homarus americanus*, sin embargo, esto es obtenido a las 48 horas post-exposición (Burrige et al. 1999). Bajo condiciones de aplicaciones prolongadas, crónica, a concentraciones entre 0.0625 a 0.5 ppb disminuye aproximadamente en un 30% la supervivencia de las larvas de



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

*C. edwardsii*, pero no produce efectos subletales en el tiempo de desarrollo. Las Zoea I de *L. santolla* presenta una concentración letal 50 a las 24 horas post-aplicación 217 veces más alta que la determinada para la Zoea I de *C. edwardsii*. Para tanto *H. americanus* como *C. edwardsii* las concentraciones críticas más bajas se encuentran aproximadamente al 1% de la concentración utilizada para combatir la caligidosis y en el caso del primer estadio larval de centolla la concentración crítica (50% de mortalidad) se encuentra cercana a la concentración utilizada contra la caligidosis (100 ppb).

Dentro de los fármacos utilizados por la industria salmonera contra el *Caligus* el peróxido de hidrógeno se presenta como el menos dañino. Los tres anteriores fármacos cipermetrina, deltametrina y azametifos ocasionan alta mortalidad en las larvas de las dos especies estudiadas a la concentración sugerida por los fabricantes. En cambio, para el peróxido de hidrógeno se reporta una mortalidad cercana al 50% a las 96 horas post exposición a 1500 ppm para las Zoea I de *C. edwardsii* y de 2000 y 3000 ppm para las Zoea I y megalopas de *L. santolla*. Sin embargo, hay que considerar que inmediatamente después de la aplicación de peróxido de hidrógeno a la concentración utilizada para los baños contra el *Caligus*, el 100% de las larvas de *C. edwardsii* se encuentran en el fondo del recipiente sin capacidad de nadar y alimentarse. Si esta condición se da en condiciones de campo, estas larvas tendrán altas probabilidades de morir. La exposición crónica (4 días) a peróxido de hidrógeno a concentraciones entre 375 a 1500 ppm generan sobre un 80% de mortalidad en las larvas de *C. edwardsii* y aplicaciones a 187.5 ppm por 7 días prolongan el desarrollo por 12.2 días finalizando con la muerte de la mayoría de las larvas antes de mudar a Zoea II. El efecto del peróxido de hidrogeno sobre estadios larvales de crustáceos al igual que en los fármacos antes mencionados han sido restringido a larvas de *H. americanus*, específicamente ha sido determinada la concentración letal  $LD_{50}$  para estadio I de la langosta americana en 1637 ppm con una exposición de una hora (Burrige et al. 2014), valor similar al determinado para Zoea I de *C. edwardsii* de 1642 ppm a las 24 horas de post-exposición, para *L. santolla* tanto las Zoea I y Megalopa a las 96 horas post-exposición a 1500 ppm de peróxido de hidrógeno alcanzan el 20% y 45 % de mortalidad, respectivamente . Para los



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

estadios larvales de *H. americanus* como *C. edwardsii*, así como la Megalopa de *L. santolla* aproximadamente el 50% de las larvas morirían con las concentraciones utilizados para el control del Caligus.

En resumen, en general se observa que las larvas Zoea I de *C. edwardsii* son más sensibles a los quimioterapéuticos utilizados contra el control del Caligus que las larvas de centolla y siendo el último estadio larval de esta especie más sensible que el primero. Probablemente, en las diferencias de sensibilidad juegue un rol importante el tamaño de la larva y las características de alimentación. El 100% de las larvas de *C. edwardsii* mueren con una concentración 100 veces menor a la recomendada por el fabricante para la cipermetrina a las 24 horas post-exposición. A las 48 horas post exposición el 100% de las larvas mueren al ser expuesta una concentración de deltametrina 20 veces menor a la utilizada contra el Caligus. Una concentración 10 veces menor de azametifos a la recomendada por el fabricante mata el 100% de las larvas de *C. edwardsii* después de 72 horas de exposición y por último el 50% de las larvas mueren al ser sometidas a las concentraciones de peróxido de hidrogeno utilizadas contra la caligidosis a las 96 horas post-exposición bajo condiciones controladas de laboratorio. En el caso de las larvas de centolla el 100% de las larvas se encuentran moribundas y/o muertas a la concentración recomendada por el fabricante de cipermetrina a las 96 horas post-exposición. Para la deltametrina el 100% de las larvas están muertas o moribundas a concentraciones 33% inferiores a las recomendadas por el fabricante. Una concentración superior 200 ppb de azametifos a la utilizada contra la caligidosis genera el 100% de larvas de *L. santolla* muertas y/o moribundas. Por último, el 50% de las larvas de *L. santolla* son afectadas por concentraciones de 2000 ppm (1500 ppm recomendadas por el fabricante) de peróxido de hidrogeno después de 96 horas post aplicación. Presentándose este quimioterapéutico como el menos dañino para las especies no objetivo evaluadas en este estudio.

Es importante destacar que comparaciones entre especies deben ser realizadas cuidadosamente debido a las diferencias de tamaño, características de alimentación, tiempo de exposición y a las diferencias en las condiciones experimentales.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 10.3 Efectos de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito (*Mytilus chilensis*)

En términos generales se observa un mayor efecto en las tasas fisiológicas cuando los mejillones adultos son expuestos a peróxido de hidrogeno que cuando se exponen a azametifos. El crecimiento potencial no mostró diferencias significativas ante la exposición a las concentraciones de azametifos y el control, es decir, el azametifos en el agua de mar no tiene un efecto instantáneo en el crecimiento. El efecto del peróxido de hidrogeno no ha sido extensivamente evaluado en bivalvos, por lo que no es posible dimensionar los alcances que el uso de peróxido de hidrogeno pueda tener sobre las poblaciones de bivalvos, comunes en las cercanías de los centros de cultivo de salmones. Un estudio reporta una mortalidad de ~30% en adultos de *Perna viridis* luego de 14 días de exposición a ~2 mg L<sup>-1</sup> (Leung et al., 2011). Tanto en el número de espermatozoides móviles como en la fecundación, se observa un efecto mas notorio del peróxido de hidrógeno en comparación a azametifos. Mas marcado es el efecto sobre la sobrevivencia larval, donde menos que un 5% sobrevive luego de ser expuestas a concentraciones de peróxido de hidrógeno 30 veces menores a la CRF. Para Azametifos el efecto sobre la sobrevivencia larval de *M. chilensis* también es significativo a concentraciones 30 veces menores que CRF con solo un 20%. Ambos compuestos, Peróxido de Hidrogeno y Azametifos, bajo las condiciones experimentales en las que se realizó el ensayo inhiben la fecundación *Mytilus chilensis*. Sin embargo, el efecto que causa el compuesto Peróxido de Hidrógeno a las concentraciones utilizadas en el experimento sobre la anfimixis es letal. En la figura 94 se observa que la fecundación se reduce en un 80% para la concentración de 50 ppm y en un 93% en la concentración de 100 ppm. La inhibición de la fecundación es total en todas las demás concentraciones experimentales (300, 750, 1500, 2000, 3000 ppm). Esto se produce por dos vías simultaneas: (i) la primera detonada por la citólisis del ovocito como consecuencia del contacto del Peróxido de Hidrogeno con los lípidos de la membrana celular; por lo tanto,



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

la membrana se degrada en presencia de este compuesto. Esto se refleja en la figura 94 en el número de células no fecundadas, que aumenta de forma significativa cuando la fecundación se realiza en presencia de Peróxido de Hidrógeno. La segunda explicación se debe a que el compuesto Peróxido de Hidrógeno causa un efecto importante sobre la movilidad espermática de *Mytilus chilensis*, imposibilitando de esta forma la fertilización. Lo anterior se observa en la figura 93 donde la movilidad espermática se reduce a partir de la exposición de Peróxido de Hidrógeno a la concentración de 50 ppm. Los espermatozoides de *Mytilus chilensis* se categorizan dentro del tipo acuaesperma. Estos poseen un acrosoma, un núcleo, cinco mitocondrias y un flagelo que le entrega un movimiento helicoidal (Oyarzún et al. 2014). Este movimiento es trascendental para que se produzca la fecundación (Liu et al. 2011). No obstante, el flagelo de los espermatozoides tiene una disposición 9+2 de microtúbulos lipídicos, y por tanto es sensible al contacto con el Peróxido de Hidrógeno. Es importante destacar que este tipo de espermatozoides lo poseen varios animales marinos de interés comercial (i.e. Choro maltón, Cholga, Almejas y Machas; Garrido and Gallardo, 1996). Por lo tanto, podría hipotetizarse que el compuesto Peróxido de Hidrógeno podría tener un efecto similar en las células germinales masculinas de moluscos con fecundación externa, sin embargo, se deben realizar los estudios al respecto. La utilización de Peróxido de Hidrógeno para combatir la caligidosis es común y al parecer eficiente en la eliminación del ectoparásito del salmón. Algunos datos indican que los niveles de eficiencia en la eliminación del *Caligus* bordean el 90%, utilizando la concentración de 1500 ppm (Armasur, 2016). En la mesa de trabajo del “*Peróxido de Hidrógeno para el tratamiento de la caligidosis*”, constituido por SERNAPESCA el año 2014, se expuso sobre los bajos impactos ambientales que tiene la utilización del compuesto Peróxido de Hidrógeno, considerándolo como un compuesto amigable ya que se degrada fácilmente en el agua y oxígeno (Sernapesca 2015). Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en este estudio esta degradación no sería rápida. Nuestros resultados indican que la concentración del compuesto (Peróxido de Hidrógeno) recomendada por el fabricante [1500 ppm] se degradó un 15% [1275 ppm] luego de un período de 7 horas (Fig. 2). Por tanto, el



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

compuesto Peróxido de Hidrógeno podría permanecer activo en el medio acuático al menos por más de 7 horas. En base a los resultados obtenidos, si el cuerpo de agua marino contiene Peróxido de Hidrógeno, aun en bajas concentraciones, durante el período de desove de *Mytilus chilensis* (principalmente entre los meses de octubre y enero – Oyarzún et al. 2011), el resultado sería la inhibición de la fecundación en esta especie, lo que podría reducir la disposición de semillas para la industria mitilicultura. Por otro lado, Azametifos bajo las condiciones experimentales utilizadas, también inhibe la fecundación, pero nuestros datos muestran que es de forma menos aguda que el compuesto Peróxido de Hidrógeno. Azametifos a partir de la concentración de 10 ppb produce un negativo efecto en la anfidixis, reduciéndola en un 19% con respecto al control. Específicamente la presencia de este compuesto afecta la movilidad espermática de los choritos experimentales, lo que se traduce en la muerte de la célula germinal masculina. Desde que fue introducido en mayo de 2013, el organofosforado Azametifos ha sido el producto más eficaz en el control del *Caligus* en Chile. Por tanto, ha tenido una masiva utilización principalmente en la Regiones de los Lagos y Aysén a través de baños en jaulas, lo que se convierte en una vía directa del ingreso de este pesticida al ambiente marino. Sin embargo, aún son escasos los estudios respecto al efecto que puede tener este compuesto en choritos (*Mytilus* spp). Se ha descrito que la exposición de *Mytilus* spp a esta pesticida causa una reducción significativa en la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) tanto en la hemolinfa como en las branquias y además altera la viabilidad celular (Canty et al. 2007). Es decir, tendría un efecto tóxico en estos animales. Pero hasta ahora no se habían realizado ensayos exponiendo este compuesto a células germinales. En base a los resultados obtenidos, se recomienda utilizar estos compuestos (método lona cerrada, faldón o wellboat) solo durante periodos donde no exista la etapa reproductiva externa en *Mytilus chilensis* (i.e. entre los meses de octubre y enero – Jaramillo y Navarro 1995; Oyarzún et al. 2011).



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

### 10.4 Determinación de la concentración de azametifos y peróxido de hidrogeno en condiciones de campo

Los valores de correntometría para las capas superficiales cuantificados para los centros estudiados coinciden con los valores aproximados calculables el día del muestreo para cada compuesto. Para el Centro A los valores promedio para el tiempo de registro del equipo reportado por el correntómetro fluctuaron en torno a los 0.7 nudos (unos  $21 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ ) y durante el muestreo para peróxido los derivadores se ubicaron a 45 m de distancia luego de 30 min de haber sido liberados, lo que indica unos  $1.3 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ . Para el Centro B los valores reportados por el correntómetro fluctuaron entre 0 a 0.9 nudos ( $0 - 28 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ ) y durante el muestreo de peróxido los derivadores se ubicaron a 97 m luego de 26 min de haber sido liberados lo que sugiere una velocidad superficial comparable ( $3.7 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ ), mientras que para el muestreo de azametifos los derivadores se ubicaron a 33 m luego de 22 min de haber sido liberados lo que sugiere una velocidad superficial de  $1.5 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Para el Centro C los valores promedio para el tiempo de registro del equipo reportado por el correntómetro fluctuaron en torno a los 0.2 nudos (unos  $6 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ ) y durante el muestreo para azametifos los derivadores se ubicaron a 32 m de distancia luego de 20 min de haber sido liberados, lo que indica unos  $1.6 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ .

El comportamiento de los compuestos durante el baño al interior de la lona fue, en general homogéneo, especialmente para peróxido. Para azametifos del Centro B esto también es aplicable, pero la alta desviación estándar observada para la concentración de azametifos en el Centro C durante la aplicación sugiere que en este centro la aplicación no fue homogénea. También cabe mencionar que, salvo en el Centro C para azametifos, en todos los casos se observó un valor inicial (previo a la aplicación del compuesto en cada jaula) diferente de cero. Esto podría deberse a que en estos casos la jaula muestreada no fue la primera en ser tratada y la lona utilizada es la misma durante toda la maniobra de tratamiento del centro. Probablemente la corriente podría haber desplazado el agua recién tratada, aun con el compuesto, de la jaula vecina. Por otra parte, la lona podría traer una



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

cantidad residual del compuesto producto de la aplicación en la jaula previa solo algunos minutos antes, el que pudo haber sido muestreado por nuestro sistema, dado que fue ubicado relativamente próximo a la lona en los 4 puntos considerados en el diseño. Esta idea se fortalece al considerar que el Tiempo 0 o inicial debía muestrearse tan pronto la lona fuese ubicada en su sitio con el fin de no retrasar/entorpecer la maniobra de baño de todo el centro.

Durante las evaluaciones de azametifos como las de peróxido de hidrógeno se evidenció una caída de la concentración importante a los 10 min, incluso antes de 10 metros desde la jaula tratada. Si bien se pudo detectar una señal de presencia de los compuestos, los valores están por debajo del límite de cuantificación del método, por lo tanto, con la metodología utilizada estos valores no debiesen ser considerados.

En comparación a los resultados de laboratorio, resultados de evaluación de quimioterapéuticos en campo son muy poco explorados. Ernst et al. (2014) demostraron que inmediatamente después de un baño con lona cerrada de azametifos a 100 ppb de concentración, equivalente a la CRF en Chile también, este compuesto se diluía a niveles indetectables a una distancia de 1000 m del baño una vez que la lona fue retirada. Esto coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, los límites de detección de Ernst et al. (2014) (0.07 ppb para muestras de agua de mar) están muy por debajo de los límites de detección/cuantificación del laboratorio contratado para el presente proyecto (1.4 y 2.1 ppb, respectivamente).

Al incorporar en esta discusión los valores de mortalidad encontrados para Zoea I de jaiba; exposición aguda ( $CL_{50}$  0.22 ppb luego de 48 h post-exposición) y crónica (menor a 0.5 ppb provoca mas del 30% de mortalidad de Zoea I de jaiba), podemos indicar que concentraciones “indetectables” o “incuantificables” por los laboratorios de análisis podrían estar provocando hasta un 80% de afectación severa (muertas+moribundas) de Zoea I de jaiba luego de exposición aguda y seguimiento hasta 48 h post-exposición.

Por lo tanto, con estos límites de cuantificación usados por la industria salmonera no es posible extrapolar el radio de impacto de los compuestos liberados sobre los organismos



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

estudiados, dado que una condición 0 ppb podría indicar efectivamente 0 ppb o 1.3 ppb, lo que podría implicar 0 afectación severa o un 80% de afectación, respectivamente. Ante este escenario, se debe recurrir a información de la literatura donde las evaluaciones de los compuestos en el mar han sido más precisas. Ernst et al. (2014) detectan concentraciones de azametifos cercanas a 3 ppb ( $CL_{50}$  para *Zoeas* I de jaiba en el presente trabajo) a 100 m de distancia de la jaula tratada.

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno es totalmente miscible en agua y tiene un  $K_{ow}$  (Coeficiente de octanol-agua) calculado de menos de 1 ( $K_{ow} = -1,5$ ) indica que hay muy escasa posibilidad de que sea persistente o se bio-acumule (HERA, 2005). El peróxido de hidrógeno se considera generalmente como un método de tratamiento de bajo riesgo ambiental, ya que se descompone en oxígeno y agua. Sin embargo, a 4 y 15 °C, el peróxido de hidrógeno se descompone 21 y 54%, respectivamente, después de 7 días en agua de mar. Si el agua de mar se airea la descomposición después de 7 días es de 45% y 67%, respectivamente (Bruno and Raynard, 1994). Las observaciones de campo sugieren que la descomposición es más rápida, debido a la reacción con la materia orgánica en la columna de agua (Haya et al., 2005; Burr ridge, 2013).

Los valores de las variables físico-químicas del agua durante el desarrollo de los muestreos coinciden con otras fuentes para las fechas de muestreo: la temperatura superficial del mar fue de 13°C para el Seno de Reloncaví (ACS 2) el 17/11/2015 y 12/4/2016 y de 12°C para el 27/4/2016, y que es coincidente con lo reportado recientemente por la Comisión Marea Roja (Buschmann et al 2016) para fines de mayo 2016 (estaciones E15; Temp: ca 12°C, Salinidad ca 32 PSU;  $O_2$  ca 200uM equivalentes a ca 6.5 mg $O_2$ /L). Para el mar Interior de Chiloé (ACS 14), abarcando la zona del Centro C, esta Comisión reporta valores de 12°C, salinidad de 33 PSU,  $O_2$  ca 220uM equivalentes a ca 7 mg $O_2$ /L. Estos valores son comparables entre los diferentes centros muestreados y son muy similares a las condiciones en que se realizaron los experimentos en laboratorio. Esto favorece una comparación entre los resultados obtenidos en los experimentos en laboratorio con las condiciones de campo.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

Los baños de los piretroides, cipermetrina y deltametrina, y del organofosforado, azametifos son coordinados en Chile a través de un calendario de aplicación a cargo del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA), el cual consiste en aproximadamente 8 días de aplicación de piretroides o azametifos y 8 días sin aplicación, bajo este régimen los organismos no objetivos pueden estar sometidos a exposiciones prolongadas a los fármacos. Como muestran nuestros resultados la exposición aguda y crónica de adultos, larvas y gametos (cuando corresponda) de las especies estudiadas jaiba marmola y chorito, provocan una disminución en la viabilidad y desempeño. Así esta estrategia de control del parasito podría ocasionar mayores daños en las especies no objetivos que los considerados en estudios previos.

Los tratamientos de baño requieren un considerable esfuerzo humano y por lo general sólo hay suficiente personal para tratar desde una hasta cuatro jaulas por día. Así, es posible que las especies no objetivo puedan estar expuestas periódicamente durante varias horas a los tratamientos de baño liberado del mismo sitio o, posiblemente, de varios sitios en la misma zona (múltiples exposiciones o exposiciones crónicas a los quimioterapéuticos).

La información sobre la toxicidad generada en laboratorio sugiere que estos pesticidas presentan un riesgo alto para el zooplancton y especies de invertebrados bentónicos.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 11 CONCLUSIONES

### 11.1 Revisión bibliográfica.

Con la literatura disponible a la fecha incluidas en esta revisión, queda en evidencia que las concentraciones de estos quimioterapéuticos utilizadas por la salmonicultura superan las concentraciones que provocan un 50 % de mortalidad en muchos de los organismos analizados (concentración recomendada  $> LC_{50}$ ). La información disponible también muestra que incluso luego de diluir estos fármacos y químicos, producto de su liberación al medio, concentraciones superiores a las  $LC_{50}$  de varios organismos aún persisten a varios metros (100 – 1000 m) de la jaula bañada o del agua liberada por los wellboats.

Sin embargo, cabe mencionar que la mayoría de las evaluaciones reportadas son producto de exposiciones a los compuestos por tiempos mayores a los utilizados por la industria.

Se evidencia la falta de estudios en estadios tempranos del ciclo de vida de invertebrados marinos, tales como larvas, en comparación con estadios adultos, pese a que estadios tempranos presentan mayor sensibilidad a los compuestos y su desarrollo ocurre en el mismo cuerpo de agua que es utilizado para los baños.

Adicionalmente se observó que hay pocos estudios que evalúen efectos subletales (conducta, respuestas fisiológicas, sistema inmune, reproductivas, etc.), concentrándose la mayoría en reportar valores de mortalidad solo hasta 96 h post-exposición.

### 11.2 Efectos de cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola (*Cancer edwardsii*)

Los porcentajes de viabilidad espermática, así como el efecto en el tejido ovárico de jaiba, no mostraron mayores diferencias entre los tratamientos, incluidos el control, para los



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

compuestos cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno. Con respecto a la mortalidad de los adultos expuestos a estos compuestos se puede concluir que, a excepción de Azametifos, todos los compuestos analizados matan o dañan severamente al 50% de los individuos a concentraciones inferiores a las concentraciones recomendadas por el fabricante CRF; Cipermetrina casi un orden de magnitud, Deltametrina casi 2.5 veces menor a la CRF; peróxido, si bien no se registró mortalidad, los animales fueron severamente afectados (flotaron) a concentraciones por debajo de la CRF.

Adultos de jaiba mostraron un efecto diferencial en la tasa metabólica y actividad de la enzima antioxidante catalasa en músculo y hepatopáncreas dependiendo del compuesto al que fueron expuestos. Exposiciones agudas a azametifos y deltametrina provocaron un aumento de la tasa metabólica. Con Cipermetrina no se observó un efecto en esta variable mientras que con peróxido de hidrógeno la tasa metabólica tendió a disminuir excepto en la concentración mas alta (2000ppm) donde se observó un gran incremento. El efecto sobre la actividad de la enzima antioxidante catalasa CAT fue diferente dependiendo del compuesto estudiado. Mientras que deltametrina provocó una disminución en músculo y hepatopáncreas al incrementar las concentraciones, cipermetrina disminuyó la actividad solo en hepatopáncreas, y azametifos provocó un incremento de la actividad en músculo y no en hepatopáncreas a mayores concentraciones. Luego de exposiciones crónicas por 6 h diarias a cipermetrina y peróxido no se observó un efecto sobre la tasa metabólica, pero esta variable aumentó en forma lineal con el incremento de la concentración de deltametrina y azametifos. La exposición crónica a cipermetrina y peróxido de hidrógeno no provocaron alteraciones en la tasa metabólica de adultos de jaiba. La actividad de CAT luego de exposiciones crónicas a cipermetrina, deltametrina y peróxido disminuyó al incrementar las concentraciones de los compuestos. Azametifos no afectó la actividad de CAT. Azametifos disminuyó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, especialmente luego de exposiciones crónicas.

El 100% de las larvas de *C. edwardsii* mueren con una concentración 100 veces menor a la CRF para Cipermetrina a las 24 horas post- exposición. Especialmente preocupante resulta



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

el hecho de que esta concentración (0.15 ppb) que provoca 100% de mortalidad de la Zoea I de *C. edwardsii* está bajo el límite de detección de las técnicas usadas por los laboratorios comerciales que monitorean estos productos en la industria salmonera (0.7 - 0.8 ppb), por lo tanto, están ejerciendo su efecto letal sin ser detectable. A las 48 horas post exposición el 100% de las larvas mueren al ser expuesta a una concentración de Deltametrina 20 veces menor a la utilizada contra Caligus. Una concentración 10 veces menor de Azametifos a la CRF mata el 100% de las larvas después de 72 horas de haber sido expuestas y, por último, el 50% de las larvas mueren al ser sometidas a las concentraciones de Peróxido de Hidrógeno utilizadas contra la caligidosis a las 96 horas post-exposición bajo condiciones controladas de laboratorio.

En el caso de las larvas de centolla, el 100% de las larvas se encuentran moribundas y/o muertas a la concentración recomendada por el fabricante de cipermetrina a las 96 horas post-exposición. Para deltametrina el 100% de las larvas están muertas o moribundas a concentraciones 33% inferiores a las recomendadas por el fabricante. Una concentración de 100 ppb de azametifos afecta al 40% de larvas de *L. santolla*. Por último, el 50% de las larvas de *L. santolla* son afectadas por concentraciones de 2000 ppm (1500 ppm recomendadas por el fabricante) de peróxido de hidrogeno después de 96 horas post aplicación.

Exposiciones crónicas sobre larvas de jaiba marmola indican que cerca del 100% de larvas fueron afectadas luego de 4 días de aplicaciones por 20 min de Peróxido de hidrogeno a 1500 ppm y aproximadamente el 80% de ellas fueron afectadas a 375 y 750 ppm.

En azametifos, el 44% de las larvas murieron a 0.0625 – 0.25 ppb, y 54% a 0.5 ppb después de 7 días de aplicaciones diarias de 30 min.

Es importante indicar que, si bien las larvas pueden sobrevivir por algunos días post-exposición a algunas concentraciones utilizadas para algunos compuestos en condiciones de laboratorio, en condiciones de campo probablemente sean fácil presa de depredadores y además precipiten rápidamente al fondo debido que pierden la capacidad para nadar, así



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

como pierden la capacidad de alimentarse, teniendo como consecuencia altas probabilidades de morir.

Cabe destacar que, en términos generales, en *C. edwardsii* las larvas resultaron más sensibles que los adultos a las mismas concentraciones experimentales a pesar de que los tiempos de exposición fueron menores.

## 11.3 Efectos de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito (*Mytilus chilensis*)

En términos generales se observa un mayor efecto en las tasas fisiológicas cuando los mejillones adultos son expuestos a peróxido de hidrógeno que cuando se exponen a azametifos. El crecimiento potencial no mostró diferencias significativas ante la exposición a las concentraciones de azametifos y el control, es decir, el azametifos en el agua de mar no tiene un efecto instantáneo en el crecimiento. Este mayor efecto de Peróxido de Hidrógeno en comparación con Azametifos es aún más notorio sobre viabilidad de gametos y, especialmente sobre larvas de *Mytilus chilensis*, donde menos que un 5% sobrevive luego de ser expuestas a concentraciones de peróxido de hidrógeno 30 veces menores a la CRF. Para Azametifos el efecto sobre la sobrevivencia larval de *M. chilensis* también es significativo a concentraciones 30 veces menores que CRF con solo un 20%.

## 11.4 Determinación de la concentración de azametifos y peróxido de hidrógeno en condiciones de campo

La concentración de los compuestos durante el baño al interior de la lona fue, en general, homogénea especialmente para peróxido de hidrógeno y con algo de mayor variabilidad para azametifos. Durante las evaluaciones de ambos compuestos se evidenció una caída de la concentración importante a los 10 min del retiro de la lona. Del mismo modo, a los 10



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

m de la jaula tratada los valores cayeron bajo los límites de cuantificación de los métodos. Sin embargo, estas conclusiones deben ser consideradas sitio-específicas puesto que hay características ambientales de los centros de cultivo como exposición al viento, corrientes de marea y otros factores hidrográficos que pueden influir en la dilución y/o dispersión de los productos químicos.

En términos generales, los resultados del presente proyecto indican que hay un efecto significativo de los compuestos utilizados sobre todos los estadios de desarrollo estudiados en chorito y jaiba en casi todas las variables analizadas. El efecto observado es diferente para cada compuesto dependiendo de la especie estudiada y estado de desarrollo analizado, siendo los estadios tempranos del desarrollo los afectados en forma más severa. La viabilidad de los estadios analizados se vio severamente afectada en todas las condiciones por concentraciones inferiores a la Concentración Recomendada por el Fabricante CRF.

Mientras que para chorito el peróxido de hidrógeno provocó mayores efectos en las variables estudiadas, al compararlo con azametifos, en jaiba el peróxido provocó efectos menos perjudiciales. Para esta última especie, donde se analizaron cuatro compuestos químicos, el efecto de piretroides sobre el desarrollo larval de jaiba y centolla es devastador, presentando un efecto significativo en la sobrevivencia larval a concentraciones órdenes de magnitud menores a la CRF. Mas aún, para el caso de larvas de jaiba, las concentraciones letales en algunos de los compuestos estudiados, están por debajo del límite de detección del compuesto por parte de los laboratorios comerciales y esto representa una situación muy preocupante. Esto es especialmente importante al contrastar los resultados obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio con la información obtenida de terreno o campo. Si bien, el enfoque del proyecto era marcadamente de laboratorio, dos de los objetivos buscaban tener una aproximación a las condiciones experimentadas en terreno. El efecto de dilución/degradación de los compuestos utilizados en los baños sugiere que no hay presencia cuantificable del compuesto a poca distancia (o tiempo) del lugar de aplicación, sin embargo, esto es debido a la capacidad limitada de detección y cuantificación del



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

compuesto, dado que en laboratorio los efectos de concentraciones nominales por debajo de los límites de detección del compuesto son evidentes. Dicho de otra forma, el efecto de los compuestos sobre los diferentes estadios de desarrollo de los animales estudiados podría estarse generando, aunque el compuesto no pueda ser cuantificado en el ambiente por la metodología utilizada en el presente proyecto y por los laboratorios comerciales. La principal dificultad radica entonces en la estimación de la cantidad de compuesto en el ambiente y el tiempo y frecuencia al que los animales podrían estar expuestos en condiciones de campo (objetivos no requeridos en el presente proyecto).

Otro aspecto interesante dice relación con el concepto de aplicar baños basados en la concentración del compuesto en el medio y no en términos de concentración de compuesto por unidad de biomasa a tratar. La importancia de suministrar compuestos químicos terapéuticos basados en dosis relativas a la biomasa, reconocida por la medicina tanto humana como animal, no se aplica a los tratamientos con baños en acuicultura. Esto es especialmente interesante puesto que las características de cada compuesto utilizado por la industria son diferentes en términos de reactividad (con materia orgánica, por ejemplo), o de hidrofobicidad (mantenerse disuelto o adherirse a superficies o partículas, ser bioacumulados, etc.), entre otros. Dado que no se considera la biomasa de peces a tratar, la disponibilidad de compuesto para afectar a *Caligus* podría ser diferente si en un baño hay mas biomasa de peces que, por su presencia y características del compuesto, disminuya la cantidad de compuesto que efectivamente pueda actuar sobre *Caligus*, traduciéndose en baños potencialmente menos efectivos. En el presente proyecto se observó un aumento de la  $CL_{50}$  cuando la biomasa de animales tratada era mayor. Una hipótesis explicatoria estaría dada por la disponibilidad de compuesto por gramo de animal, ie. igual concentración, pero distinta concentración-peso específica. Parte de la mayor sensibilidad de gametos y larvas a los compuestos estudiados podría estar dada por la mayor relación superficie/volumen de organismos mas pequeños y/o una mayor relación entre g de compuesto disponible/g de biomasa. O sea, aunque la concentración del compuesto disuelto en el agua sea mantenga, la concentración por g de animal disminuye. Esto provocaría que la  $CL_{50}$  aumente cuando



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

hay mayor biomasa tratada durante la aplicación. Esto también podría explicar parte de la variabilidad reportada en la literatura de ecotoxicología en variables de especies acuáticas para el mismo compuesto y concentración aplicado. En general se reporta la concentración aplicada y no siempre se mantiene la dosis masa-dependiente. Cuando la biomasa en relación al volumen de agua es muy pequeña, el efecto de la relación concentración/dosis también es pequeña y la biomasa no ejercería un impacto muy notorio en la disponibilidad efectiva de compuesto. Sin embargo, por varias razones, entre otras que los recursos son limitados tanto para experimentos de laboratorio como para realizar baños en terreno, en la práctica se trata de concentrar la biomasa a aplicar con el fin de utilizar la menor cantidad de compuesto en el menor volumen posible para alcanzar la concentración requerida. Esto podría cambiar la relación cantidad de compuesto /g de biomasa.

Finalmente, dadas las características de los experimentos realizados en laboratorio en términos de condiciones controladas y calidad del agua utilizada, aclimatación de animales, etc., la aplicabilidad directa a condiciones de terreno debe hacerse con cautela considerando que las condiciones de terreno son más complejas, donde interactúan más factores que los analizados en el presente proyecto. Se requiere mucho mayor información del comportamiento de los compuestos en terreno, tanto en la columna de agua como su potencial acumulación en material particulado y sedimentos, así como en la flora y fauna marina tanto pelágica como bentónica, así como su transferencia o flujo en la trama trófica. Del mismo modo como se sugiere cautela al extrapolar los datos obtenidos en laboratorio a condiciones de terreno, la información obtenida es concluyente en términos de evaluación del efecto negativo de la mayoría de los compuestos utilizados como quimioterapéutico para el control de *Caligus* sobre diferentes etapas del ciclo de vida de dos especies de importancia ecológica y socioeconómica para el país.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

## 12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aaen S.M. Helgesen, K.O., Bakke M. J., Kaur, K., Horsberg, T.E. 2015. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology*, 31:72:81.
2. Abgrall P., Rangeley R.W., Burrige L.E., Lawton P. 2000. Sublethal effects of azamethiphos on shelter use by juvenile lobsters (*Homarus americanus*). *Aquaculture*, 181,1-10.
3. Adam O., Badot P.M., Degiorgi F., Crini G. 2009. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:441–449.
4. Adam O., Degiorgi F., Crini G., Badot P.M. 2010. High sensitivity of *Gammarus* sp. juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 1402–1407.
5. Amweg E.L., Weston D.P., Ureda N.M. 2005. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:966–72.
6. Anderson R.L. 1989. Toxicity of synthetic pyrethroids to freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:403–410.
7. AQUA acuicultura y pesca: <http://www.aqua.cl/2015/08/25/control-del-caligus-la-receta-para-reducir-en-hasta-un-50-el-coste-en-farmacos/>
8. Armasur (2016). <http://www.arnasur.cl/noticias/sernapesca-realiza-seminario-sobre-peroxido-de-hidrogeno/> visitado el 24 de febrero de 2016.
9. Ashauer R., Hintermeister A., Potthoff E., Escher B.I. 2011. Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action. *Aquat. Toxicol.* 103:38–45.
10. Astorga, M.P.; Cardenas, L. & J. Vargas (2015). Phylogenetic approaches to delimit genetic lineages of the *Mytilus* complex of South America: How many Species are There ?. *Journal of Shellfish Research*, 34 (3): 1-12.
11. Avendaño M, Castellán M, Le Pennec M, Varela C y García C (2011). Distribución temporal de larvas de *Mytilus chilensis* (Hupé, 1954) (Mollusca: Mytilidae), en el mar interior de Chiloé, sur de Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39:416-426.
12. Bagchi M., Bagchi D., Hassoun E.A., Stohs S.J. 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicol.* 104(1–3):129–140.
13. Bajet C.M., Kumar A., Calingacion M.N., Narvacan T.C. 2012. Toxicological assessment of pesticides used in the Pagsanjan-Lumban catchment to selected non-target aquatic organisms in Laguna Lake Philippines. *Agric. Water Manage.* 106:42–49.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

14. Baillie, A.C., 1985. The biochemical mode of action of insecticides. In: Jones, N.F. (Ed.), Recent Advances in the Chemistry of Insect Control. The Royal Society of Chemistry, Special Publication 53, pp. 1–23.
15. Barata C., Medina M., Telfer T., Baird D.J. 2002a. Determining demographic effects of cypermethrin in the marine Copepod *Acartia tonsa*: stage-specific short tests versus life-table tests. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 43:373–378.
16. Barata C., Baird D.J., Medina M., Albalat A., Soares A. 2000b. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 230:183-194.
17. Barria A, Gebauer P y Molinet C (2012). Variabilidad espacial y temporal del suministro larval de mitílidos en el Seno de Reloncaví, sur de Chile. Latin American Journal of Aquatic Research, 47: 475-487.
18. Bayne BL (1983) Physiological ecology of marine molluscan larvae. In: The Mollusca, Wilbur KM ed. Pp 299-343. Academic Press, London, UK.
19. Bocking, S. 2012. Science, Salmon, and Sea lice: Constructing Practice and Place in an environmental controversy. Journal of the History of Biology, 45(4): 681-716.
20. Bownik, A., Stępniewska, Z. 2015. Protective effects of ectoine on behavioral, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna* subjected to hydrogen peroxide. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 170, 38–49.
21. Boxshall, G.A., Bravo, S., 2000. On the identity of the common Caligus (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen system in southern Chile. Contributions to Zoology. 69, 137–146.
22. Bravo S, V Pozo & MT Silva. 2015. Evaluación de la efectividad del tratamiento con agua dulce para el control del piojo de mar *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000. Lat. Am. J. Aquat. Res. 43: 322-328.
23. Bravo S., J. Treasurer, M. Sepulveda , C. Lagos. 2010. Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of *Caligus rogercresseyi* in Chile and implications for sea louse management. Aquaculture 303:22–27
24. Bravo, S., Sepulveda, M., Silva, M.T., Costello, M.J., 2014. Efficacy of deltamethrin in the control of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) using bath treatment. Aquaculture 432, 175–180.
25. Brown M., Davies I.M., Moffat C.F., Redshaw J., Craft J.A. 2004. Characterisation of choline esterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*). Marine Environmental Research, 57, 155-169.
26. Bruno, D.W. and Raynard, R.S. 1994. Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon. Aquacult. Int. 2: 10–18
27. Burrige L.E., Haya K., Zitko V., Waddy S. 1999. The lethality of Salmosan (azamethiphos) to American lobster (*Homarus americanus*) larvae, postlarvae, and adults. Ecotoxicology and Environmental Safety, 43, 165-169



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

28. Burrige L., Weis J., Cabello F., Pizarro J., Bostick K. 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306, 7-23.
29. Burrige L.E., Haya K., Waddy S.L. 2005. Seasonal lethality of the organophosphate pesticide, azamethiphos to female American lobster (*Homarus americanus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(3): 277-281
30. Burrige L.E., Haya K., Waddy S.L. 2008. The effect of repeated exposure to azamethiphos on survival and spawning in the American lobster (*Homarus americanus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 411-415.
31. Burrige L.E., Haya K., Waddy S.L., Wade J. 2000a. The lethality of anti-sea lice formulations Salmosan® (Azamethiphos) and Excis® (Cypermethrin) to stage IV and adult lobsters (*Homarus americanus*) during repeated short-term exposures. *Aquaculture* 182: 27-35
32. Burrige L.E., Haya, K., Page, F.H., Waddy, S.L., Zitko, V., Wade, J. 2000b. The lethality of cypermethrin formulation Excis® (Cypermethrin) to larval and post-larval stages of the American lobster (*Homarus americanus*). *Aquaculture* 182, 37-47.
33. Burrige L.E., Lyons M.C., Wong D.K.H., MacKeigan K., VanGeest J.L. 2014. The acute lethality of three anti-sea lice formulations: AlphaMax®, Salmosan®, and Interox®Paramove™50 to lobster and shrimp. *Aquaculture* 420-421:180-186
34. Buschmann A., Farías L., Tapia F., Varela D., Vàsquez M. 2016. Informe final Comisión Marea Roja. [http://www.subpesca.cl/institucional/602/articles-95146\\_documento.pdf](http://www.subpesca.cl/institucional/602/articles-95146_documento.pdf)
35. Canty M.N., Hagger J.A., Moore R.T.B., Cooper L., Galloway T.S. 2007. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 54, 396-402.
36. Chen X., Zhou Y., Yang D., Zhao H., Wang L., Yuan X. 2012. CYP4 mRNA expression in marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* in response to petroleum hydrocarbon and deltamethrin. *Mar. Pollut. Bull.* 64:1782–1788.
37. Clarke, P.J. Jewess. 1990. The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron *Pestic. Sci.*, 28 (4): 377–388
38. Coats J.R., Symonik D.M., Bradbury S.P., Dyer S.D., Timson L.K., Atchison G.J. 1989. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: an overview. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:671–679.
39. Conover R.J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 11: 338-345.
40. Costello M.J. 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *J. Fish Dis.* 32(1):115-8.
41. Coughlan, J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.* 2:356-8.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

42. Couillard C.M., Burridge L.E. 2015. Sublethal exposure to azamethiphos causes neurotoxicity, altered energy allocation and high mortality during simulated live transport in American lobster. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 115, 291-299.
43. Crane M., Gross M., Maycock D.S., Grant A., Fossum B.H. 2011. Environmental quality standards for a deltamethrin sea louse treatment in marine finfish aquaculture based on survival time analyses and species sensitivity distributions. *Aquac. Res.*42:68–72.
44. Cunningham, P.A. 1996. A review of toxicity testing and degradation studies used to predict the effects Diflubenzuron (Dimilin ®) on estuarine crustaceans. *Environmental Pollution (Series A)*. 40: 63-86.
45. Davies J.H. 1985. The pyrethroids: an historical introduction. In: Leahey, J.P. (Ed.), *The Pyrethroid Insecticides*. Taylor & Francis, London and Philadelphia, pp. 1/31.
46. Day K. 1991. Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (straus). *Environmental Toxicology and Chemistry* 10:91-101
47. Dorts, J., Silvestre, F., Thi Tu, H. Tyberghein, A. Thanh Phuong, N, Kestemont, P. 2009. Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28:302-310.
48. Elliott JM , Davison W .1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia*, 19: 195–201.
49. Ernst W., Doe K., Cook A., Burridge L., Lalonde B., Jackman P., Aube J.G., Page F. 2014. Dispersion and toxicity to non-target crustaceans of azamethiphos and deltamethrin after sea lice treatments on farmed salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 424-425, 104-112.
50. Ernst W., Jackman P., Doe K., Page F., Julien G., MacKay K., Sutherland T. 2001. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures. *Marine Pollution Bulletin*, 42:432-443.
51. Fairchild, W.L., Doe, K.D., Jackman, P.M., Arsenault, J.T., Aube, J.G., Losier, M., Cook, A.M., 2010. Acute and chronic toxicity of two formulations of the pyrethroid pesticide deltamethrin to an amphipod, sand shrimp, and lobster larvae. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2876 (vi +34 pp.)
52. Fedoseeva, E.V., Stom, D.I. 2013. Effect of hydrogen peroxide on behavioural reactions and survival of various Lake Baikal amphipods and Holarctic *Gammarus lacustris* (G. O. SARS, 1863). *Crustaceana* 86, 1139-1154.
53. Feo M.L., Corcellas, C., Barata, C., Ginebreda, A., Eljarrat, E., Barceló, D. 2013. Organic carbon content effects on bioavailability of pyrethroid insecticides and validation of Solid Phase Extraction with Poly (2,6-diphenyl-p-phenylene oxide) Polymer by *Daphnia magna* toxicity tests. *Sci. Total Environ.* 442:497–502



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

54. Fernández-Tajes, J., A. Longa, J. García-Gil, Y.W. Chiu, Y.S. Huang, J. Méndez , R.S. Lee. 2011. Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *Eur. Food Res. Technol.*, 233: 791-796.
55. Flannagan, J.F., 1973. Field and laboratory studies of the effect of exposure to fenitrothion on freshwater aquatic invertebrates. *Manit. Entomol*, 7, 15–25.
56. Fu, M., Zou, Z., Liu, S., Lin, P., Wang, Y., Zhang, Z. 2013. Selenium-dependent glutathione peroxidase gene expression during gonad development and its response to LPS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Scylla paramamosain*. *Fish & Shellfish Immunology* 33, 532 – 542.
57. Garrido, O. y C.S. Gallardo. 1996. Ultrastructure of sperms in bivalve molluscs of the *Mytilidae* family. *Invertebrate Reproduction Development*, 29: 95-102.
58. Harwood A.D., You J., Lydy M.J. 2009. Temperature as a toxicity identification evaluation tool for pyrethroid insecticides: toxicokinetic confirmation. *Environ. Toxicol. Chem.* 28:1051–1058.
59. Haya K., 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:381–391.
60. Haya K., Burrige L.E., Davies I.M., Ervik A. 2005. A review and assessment of environmental risk of chemicals used for the treatment of sea lice infestations of cultured salmon. In: Hargrave, B. (Ed.), *Handbook of Environmental Chemistry: Water Pollution, Part M*, vol. 5, pp. 305–341.
61. Helgesen, K.O., Bravo, S., Sevatdal, S., Mendoza, J., Horsberg, T.E., 2014. Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxhall and Bravo) in Chile: bioassay results and usage data for antiparasitic agents with references to Norwegian conditions. *J. Fish Dis.* 37 (10), 877–890.
62. HERA 2005. Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products. Hydrogen Peroxide CAS N°:7722-84-1.
63. Hermes-Lima, M., Storey, J.M. and Storey, K.B. 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress In: *Cell and Molecular Responses to Stress* Edited by K.B. Storey and J.M. Storey Vol. 2: Protein Adaptations and Signal Transduction. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 263-287
64. Hochachka, P.W. and Somero, G.N. 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. New York : Oxford University Press
65. Humason GL 1962. *Animal tissue technique*, 661 pp. WH freeman & Company, San Francisco.
66. Hunter R.P., Fraser N. 1995. Field monitoring of the effects of cypermethrin as GPRD01. Report of Grampian Pharmaceuticals Limited, Research Division. Ref GP95033.
67. Inoue, K., J.H. Waite, M. Matsuoka, S. Odo & S. Harayama. 1995. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *Biol. Bull.*, 189:370-375.



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

68. Intorre L., Soldani G., Cognetti-Varriale A.M., Monni G., Meucci V., Pretti C. 2004. Safety of azamethiphos in eel, seabass and trout. *Pharmacological Research*, 49, 171-176.
69. Jaramillo JR , JM Navarro. (1995). Reproductive cycle of the Chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1782). *Journal of Shellfish Research*, 14(1): 165-171.
70. Khazri A., Sellami B., Dellali M., Corcellas C., Eljarrat E., Barceló D., Mahmoudi E. 2015. Acute toxicity of cypermethrin on the freshwater mussel *Unio gibbus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115:62–66.
71. Kontreczky Cs., Farkas A., Nemcsók J., Salánki J. 1997. Short and long term effects of deltamethrin on filtering activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea* L.) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38:195–199.
72. Köprücü S.S., Yonar E., Seker E. 2008. Effects of deltamethrin on antioxidant status and oxidative stress biomarkers in freshwater mussel, *Unio elongates eucirrus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81:253-257.
73. Kumar A., Correll R., Grocke S., Bajet C. 2010. Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae): use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73:360–369.
74. Labieniec M., Gabryelak T. 2006. Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Cu<sub>2</sub><sup>+</sup> ions. *Toxicol. In vitro* 21:146-156.
75. Larraín, M.A.; Diaz, N.F.; Lamas, C.; Uribe, C.; Jilberto, F. , C. Araneda. 2015. Heterologous microsatellite-based genetic diversity in the blue mussel (*Mytilus chilensis*) and differentiation among localities in southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43 (5): 998-1010.
76. Leung, P.T.Y., Wang Y., Mak, S.S.T., Ng, W.C., Leung, K.M.Y., 2011. Differential proteomic responses in hepatopancreas and adductor muscles of the green-lipped mussel *Perna viridis* to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide. *Aquatic Toxicology* 105, 49– 61.
77. Liu G, Innes D y Thompson RJ .2011. Quantitative analysis of sperm plane circular movement in the blue mussels *Mytilus edulis*, *M. trossulus* and their hybrids. *Journal of Experimental zoology part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315:280-290.
78. Marín S.L., Ibarra R., Medina M.H., Jansen P.A. 2015. Sensitivity of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo 2000) to pyrethroids and azamethiphos measured using bioassay tests—A large scale spatial study. *Preventive Veterinary Medicine*, 122, 33-41
79. Maund S.J., Hamer M.J., Lane M.C.G., Farrelly E., Rapley J.H., Goggin U.M., Gentle W.E. 2002. Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:9–15.
80. Mayor D.J., Solan M., Martinez I., Murray L., McMillan H., Paton G.I., Killham K. 2008. Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

- industry to *Corophium volutator* and *Hediste diversicolor*. Whole sediment bioassay tests. *Aquaculture*, 285, 102-108.
81. McLeese D.W., Metcalfe C.D., Zitko V. 1980. Lethality of permethrin, cypermethrin and fenvalerate to salmon, lobster and shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25:950–955.
  82. Medina M., Barata C., Telfer T., Baird D.J. 2002. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:17–22.
  83. Meinertz, J., Greseth, S. L., Gaikowski, M. P., Schmidt, L. J. 2008. Chronic toxicity of hydrogen peroxide to *Daphnia magna* in a continuous exposure, flow-through test system. *Science of The Total Environment* 392(2-3):225-232.
  84. Mian L.S., Mulla M.S. 1992. Effects of pyrethroid insecticides on non target invertebrates in aquatic ecosystems. *J. Agric. Entomol.* 9:73–98.
  85. Miller T.A., Adams M.E. 1982. Mode of action of pyrethroids. In: Coats, J.R. (Ed.), *Insecticide Mode of Action*. Academic Press, New York, pp. 3-27.
  86. Moes APC, Oliveira CCM, Tavares MPC, Muzitano LF, Silva MV & Oliveira MM. 2014. Effect of TBT in Acetylcholinesterase of *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mytilidae). *The Biologist*, 12: 165-170.
  87. Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and Interpretation. *Ecology Letters*, 12: 75–92.
  88. Morky L., Hoagland K.D. 1990. Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9:1045-1051.
  89. Mubiana VK, Blust R (2007) Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 63:219-235.
  90. Mugni H., Paracampo A., Marrochi N., Bonetto C. 2013. Acute toxicity of cypermethrin to the non target organism *Hyalella curvispina*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35:88–92.
  91. Nash, C., 2003. Interactions of Atlantic salmon in the Pacific northwest VI. A Synopsis of the risk and uncertainty. *Fisheries Res.* 62, 339-347.
  92. Oliveira C, Almeida J, Guilhermino L, Soares A.M.V.M, Gravato C. 2012. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquat. Toxicol.* 124–125:209–216.
  93. Oyarzún PA, Toro JE, Garrido O, Briones C, Guiñez R (2014). Differences in sperm ultrastructure between *Mytilus chilensis* and *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae): could be used as a taxonomic trait? *Latin American Journal of aquatic research* 42:172-179.
  94. Oyarzún PA, Toro JE, Jaramillo R, Guiñez R, Briones C & Astorga M (2010). Comparative analysis of the gametogenic cycle from *Perumytilus purpuratus*



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

- (Bivalvia: Mytilidae), at the localities of Taltal and Huasco, northern Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45: 43-58.
95. Oyarzún PA, Toro JE, Jaramillo R, Guíñez R, Briones C & Astorga M (2011). Ciclo gonadal del chorito *Mytilus chilensis* (Bivalvia: Mytilidae) en dos localidades del sur de Chile. *Latin American Journal Aquatic Research*, 39: 512-525.
  96. Oyarzún, P.A.; Toro, J.E.; Cañete, J.I. & J.P.A. Gardner. 2016. Bioinvasion threatens the genetic integrity of native diversity and natural hybrid zone: smooth-shelled blue mussels (*Mytilus* spp.) in the Strait of Magellan. *Biological Journal of the Linnean Society*, 117: 574-585.
  97. Pahl B.C., Opitz H.M. 1999. The effects of cypermethrin (Excis) and azamethiphos (Salmosan) on lobster *Homarus americanus* H. Milne Edwards larvae in a laboratory study. *Aquaculture Research* 30(9):655-665
  98. Pardo, L.M., Fuentes, J.P., Olguin, A., Orensanz, JM. 2009. Reproductive maturity in the edible Chilean crab *Cancer edwardsii*: methodological and management considerations. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 89(8): 1627–1634
  99. Paschke K, Cumillaf JP, Loyola S, Gebauer P, Urbina M, Chimal ME, Pascual C, Rosas C. 2010. Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology, and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae). *Mar Biol* 157:7–18
  100. Pellegrini, P., Gorbi, G., Buschini, A.M. 2014. Comet Assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing. *Aquatic Toxicology* 155, 261–268.
  101. Pfenning A.P., Roybal J.E., Turnipseed S.B., Gonzales S.A., Hurlbut J.A. 1999. Determination of residues of azamethiphos in salmon tissue by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 82, 1224-1228.
  102. Pretti C., Soldani G., Cognetti-Varriale A.M., Monni G., Meucci V., Intorre L. 2002. Efficacy and safety of azamethiphos for the treatment of pseudodactylogyrosis in the European eel. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25, 155-157.
  103. Rawn D.F.K., Krakalovich T., Forsyth D.S., Roscoe V. 2009. Analysis of fin and non-fin fish products for azamethiphos and dichlorvos residues from the Canadian retail market. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1510-1516.
  104. Reichwaldt, E.S., Zheng, L., Barrington, D.J., Ghadouani, A., 2012. Acute toxicological response of *Daphnia* and *Moina* to hydrogen peroxide. *J. Environ. Eng.* 138, 607–611.
  105. Reyes, X., Bravo, S., 1983. Nota sobre una copepoidosis en salmones de cultivo. *Investigaciones Marinas. Valparaíso* 11, 55–57
  106. Roth M., Richards R.H., Sommerville C. 1993. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases* 16:1-26.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

107. Ruiz M, Tarifeño E, Llanos-Rivera A, Padget C, Campos B .2008. Temperature effect in the embryonic and larval development of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) Revista de Biología Marina y Oceanografía, 43:51-62.
108. Saha S., Kaviraj A. 2008. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 80:49–52, <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-007-9314-4>.
109. Sánchez-Fortún S., Barahona M.V. 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. Chemosphere 59:553–559.
110. Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), 2005. See attachments in: Fish Farm Manual. [http://www.sepa.org.uk/water/water\\_regulation/regimes/aquaculture/marine\\_aquaculture/fish\\_farm\\_manual.aspx](http://www.sepa.org.uk/water/water_regulation/regimes/aquaculture/marine_aquaculture/fish_farm_manual.aspx).
111. Sernapesca (2015) [https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1894:avanzan-gestiones-para-establecer-tratamientos-no-farmacologicos-contr-el-caligus&catid=1:ultimas&Itemid=69](https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=1894:avanzan-gestiones-para-establecer-tratamientos-no-farmacologicos-contr-el-caligus&catid=1:ultimas&Itemid=69) visitado el 8 de marzo de 2016.
112. Sevatdal, S., Fallang, A. Ingebriksen, K., Horsberg, T.E. 2005. Monooxygenase mediated pyrethroid detoxication in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). Pest. Manag. Sci. 61:772-778.
113. Shen M.F., Kumar A., Dinga S.Y., Grocke S. 2012. Comparative study on the toxicity of pyrethroids,  $\alpha$ -cypermethrin and deltamethrin to *Ceriodaphnia dubia*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 78:9–13.
114. Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), 2008. The occurrence of chemicals used in sea louse treatments in sediments adjacent to marine fish farms: results of screening surveys during 2007. [http://www.sepa.org.uk/water/water\\_regulation/regimes/aquaculture/marine\\_aquaculture/reports\\_and\\_publications.aspx](http://www.sepa.org.uk/water/water_regulation/regimes/aquaculture/marine_aquaculture/reports_and_publications.aspx).
115. Smit, M.G.D., Ebbens, E., Jak, R.G., Huijbregts, M.A.J. 2008. Time and concentration dependency in the potentially affected fraction of species: the case of hydrogen peroxide treatment of ballast water. Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 746–753.
116. Solórzano L .1969. Determination ammonia in natural water by the phenolhypochlorite method. Limnology Oceanography, 14, 799-801.
117. Tahara, E.B., Navarete, F.D.T., Kowaltowski, A.J., 2009. Tissue-, substrate-, and sitespecific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic. Biol. Med. 46, 1283–1297.
118. Toro JE, Montoya MP, Martínez V, Gutiérrez D, Vergara AM (2010) consecuencias de la autofecundación sobre la tasa de crecimiento y supervivencia de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Archivos de medicina veterinaria, 42:63-70.
119. Toro JE, Oyarzún PA, Peñaloza C, Alcapán A, Videla V, Tilleria J, Martinez V (2012) Production and performance of larvae and spat of pure and hybrid species of *Mytilus*



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

- chilensis* and *M. galloprovincialis* from laboratory crosses. Latin American Journal aquatic research, 40:243-247.
120. Toro JE, Thompson RJ & Innes DJ. 2002. Reproductive isolation and reproductive output in two sympatric mussel species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*) and their hybrids from Newfoundland. Marine Biology, 141: 897-909.
  121. Toro, J.E. 1998. PCR-based nuclear and mtDNA markers and shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). Aquatic Living Resources, 11 (5): 347-353.
  122. Toro, J.E., Ojeda, J.A., Vergara, A.M., Castro, G.C. and A.C. Alcoa. 2005. Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. Journal of Shellfish Research, 24: 1117 – 1124.
  123. Toumi H., Boumaiza M., Immel F, Sohm, B., Felten, V., Férard J.F. 2015. Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation. Aquat. Toxicol. 148:40–47
  124. Toumi H., Boumaiza M., Millet M., Radetski C.M., Felten V., Fouque C., Férard J.F. 2013. Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). Sci. Total Environ. 458–460:47–53
  125. Tully O., Mc Fadden Y. 2000. Variation in sensitivity of sea lice [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] to dichlorvos on Irish salmon farms in 1991–92. Aquaculture Research 34:849-854.
  126. Tu N.T., Silvestre F., Meulder B.D., Thome J.P., Phuong N.P., Kestemont P. 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Chemosphere 86:83–91.
  127. Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552, 335–344.
  128. Van Geest J.L., Burrige L.E., Fife F.J., Kidd K.A. 2014. Feeding response in marine copepods as a measure of acute toxicity of four anti-sea lice pesticides. Marine Environmental Research, 101, 145-152.
  129. Van Geest J.L., Burrige L.E., Kidd, K.A. 2014b. The toxicity of the anti-sea lice pesticide AlphaMax® to the polychaete worm *Nereis virens*. Aquaculture 430:98–106.
  130. Veeramani S., Baskaralingam, V. 2011. Shell-bound iron dependant nitric oxide synthesis in encysted *Artemia parthenogenetica* embryos during hydrogen peroxide exposure. Biometals 24, 1035–1044.
  131. Waddy, S.L., L.E. Burrige, M.N. Hamilton, S.M. Mercer, D.E. Aiken, and K. Haya. 2002. Emamectin benzoate induces molting in American lobster, *Homarus americanus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59: 1096–1099



## Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

132. Wang, J., Wang, Q., Liu, N., Jing, W., Wang, L., Zhou, F. 2014. Hydrogen peroxide leads to cell damage and apoptosis in the gill of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiologia* 741, 13–21.
133. Wei K., Yang J. 2015a. Oxidative damage of hepatopancreas induced by pollution depresses humoral immunity response in the freshwater crayfish *Procambarus clarkia*. *Fish Shellfish Immun.* 43:510–519
134. Waller D.L., Fisher S.W. 1998. Evaluation of Several Chemical Disinfectants for Removing Zebra Mussels from Unionid Mussels. *The Progressive Fish-Culturist* 60: 307-310.
135. Wei K., Yang J. 2015b. Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkia*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113:446–453
136. Weibel ER (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *International Review of Cytology*, 26: 235 - 302.
137. Wendt-Rasch L., Friberg-Jensen U., Woin P., Christoffersen K. 2003. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on a freshwater community studied under field conditions. II. Direct and indirect effects on the species composition. *Aquat. Toxicol.* 63:373–389
138. Whyte J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60:231-241.
139. Widdows J. 1985. Physiological procedures. In: Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR and 6 others (eds) *The effects of stress and pollution on marine animals*. Praeger, New York, p 161–178
140. Widdows J, Donkin P, Staff FJ, Matthiessen P, Law RJ, Allen YT, Thain JE, Allchin CR, Jones BR. 2002. Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. *Marine Environmental Research*, 53: 327-356.
141. Willis K.J., Gillibrand P.A., Cromey C.J., Black K.D. 2005. Sea lice treatments on salmon farms have no adverse effect on zooplankton communities: a case study. *Mar. Pollut. Bull.* 50:806–816.
142. Willis K.J., Ling N. 2004. Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine copepods. *Aquac. Res.* 35:263–270.
143. Willis, K. J., Ling, N. 2003. The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide, to planktonic marine copepods. *Aquaculture* 1:289-297.
144. Wolcott, D. L., W. B. Hopkins, T. G. Wolcott. 2005. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: Effects of male mating history, male size, and season. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 319:43-55.
145. Worthing C. R., Walker S. R. 1987. *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 8th edn. British Crop Protection Council, Thornton Heath.
146. Worthing C.W. (Ed.) 1991. *The Pesticide Manual*, ninth edition. British Crop Protection Council, London.



# Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

147. Zhou J.L., Rowland S.J., Mantoura R.F.C., Harland B.J. 1995. Influence of the nature of particulate organic matter on the sorption of cypermethrin: implications on KOC correlations. *Environ. Int.* 21:187–195.

## 13 ANEXOS

# ANEXO I

## 1. Carta Gantt

Carta Gantt FIP N° 2014-65														
"IMPACTO DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DEL ECTOPARASITO <i>Caligus rogercresseyi</i> , SOBRE LOS RECURSOS CHORITO Y JAIBA MARMOLA														
Objetivo y actividad	MESES DEL PROYECTO													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M
1.1 Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos														
revisión bases de datos literatura			X	X	X	X	X	X	X	X				
confección base de datos y análisis			X	X	X	X	X	X	X	X				
1.2 Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola ( <i>Cancer edwardsii</i> ), bajo condiciones controladas														
adquisición de reproductores y aclimatación Adultos			X	X			X	X						
exposición aguda			X	X										
cuantificaciones fisiológicas			X	X										
exposición crónica			X	X	X									
cuantificaciones fisiológicas			X	X	X									
evaluación de efecto en fecundación			X	X	X									
análisis viabilidad espermatocítica e histología de ovarios			X	X	X	X	X							
Larvas														
cultivo larval Jaiba							X	X	X	X				
exposición aguda Jaiba							X	X	X	X				
exposición crónica Jaiba							X	X	X	X				
cultivo larval Centolla							X	X	X	X				
exposición aguda Centolla							X	X	X	X				
1.3 Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito ( <i>Mytilus chilensis</i> ) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas														
Colección de los animales adultos para experimentos larvales	X	X	X	X	X									(X)
Ensayo agudo de las larvas de chorito	X	X	X	X	X									(X)
Análisis de los datos del ensayo agudo de larvas	X	X	X	X	X									(X)
Ensayo crónico de las larvas de chorito	X	X	X	X	X									(X)
Análisis de los datos del ensayo crónico de larvas		X	X	X	X	X								(X)
Análisis de identificación taxonómica de <i>Mytilus</i> spp			X			X	X							
Colección de los animales para experimentos en adultos			X				X			X				
Ensayo agudo en adultos de <i>Mytilus chilensis</i>			X				X							
Análisis de los datos de ensayo agudo			X				X							
Ensayo crónico en adultos de <i>Mytilus chilensis</i> (Fisiología)			X	X			X	X						
Análisis de los datos de ensayo crónico				X	X				X	X				
Análisis de la relación hembra/macho en dos localidades													X	
Colección de animales adultos para análisis reproductivos							X	X	X	X	X	X		
Metodología histológica							X	X	X	X	X	X		
Estimación de parámetros reproductivos de <i>Mytilus chilensis</i>							X	X	X	X	X	X		
1.4 Determinar la concentración que alcanza el azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas														
recolección oceanográfica de ambos centros de cultivo	X													
estudio preliminar de campo en ambos centros de cultivo	X													
muestreo y cuantificación de Azametifos en ambos centros		X												
análisis de muestras e información oceanográfica de ambos centros		X	X	X	X	X								
1.5 Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrógeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones de campo														
recolección oceanográfica de ambos centros de cultivo	X													
estudio preliminar de campo en ambos centros de cultivo	X													
muestreo y cuantificación de Peróxido de Hidrógeno en ambos centros		X												
análisis de muestras e información oceanográfica de ambos centros		X	X	X	X	X								
Coordinación y Administración del Proyecto														
Reuniones Coordinación Inicial Subpesca	X													
Reuniones Coordinación equipo de trabajo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
coordinación Talleres de difusión							X	X	X					
Taller difusión Puerto Aysen												X		
Taller difusión Puerto Montt												X		
Informe avance					X									
Preinforme final										X				
Informe Final												X		
análisis y respuesta a eventuales observaciones informe final													X	X
(X) representa potencial repetición de experimento														



Figura 1. Vista de acuarios experimentales de 205 L de vidrio, con 100 L de agua de mar filtrada 5um-UV, con burbujeo, para la aplicación de los tratamientos.

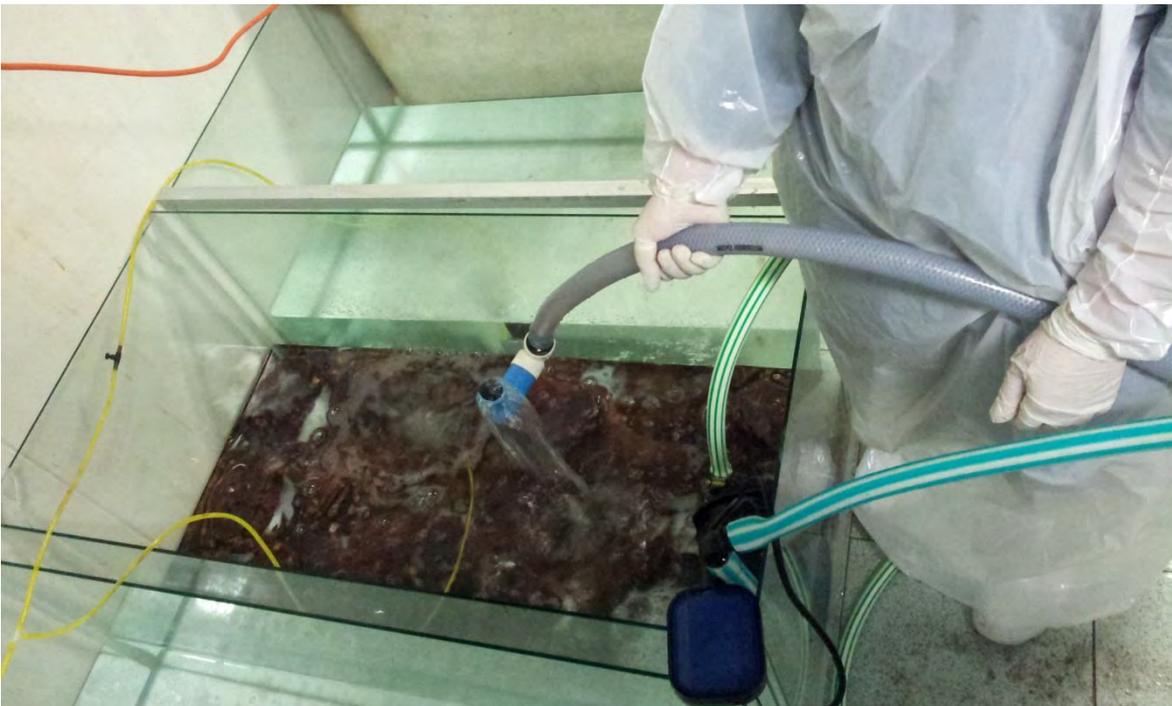


Figura 2. Vista del proceso de recambio de agua (“lavado”) para restituir la concentración inicial de cada tratamiento y luego de finalizada la exposición al compuesto.



Figura 3. Fotografías de experimento preliminar con Peroxido 1500 ppm por 24 h. Los animales se encontraron flotando, vivos, pero al disectarlos se observó gran numero de burbujas al interior de las branquias (flechas rojas) y daño severo a simple vista en las lamelas (manchas blanquecinas opacas cerca de flechas) y otros órganos como hepatopáncreas.



Figura 4. Vista de sistema de mantención con 144 acuarios plásticos transparentes que permiten evaluar la conducta de los animales experimentales. Los acuarios están ubicados en 4 niveles correspondientes a los tiempos de evaluación post-tratamiento (24 h (nivel superior), 48 h (segundo nivel), 72 h (tercer nivel) y 96 h (nivel inferior)). En cada nivel de cada uno de los 3 racks hay 3 réplicas de las cuatro concentraciones experimentales correspondientes

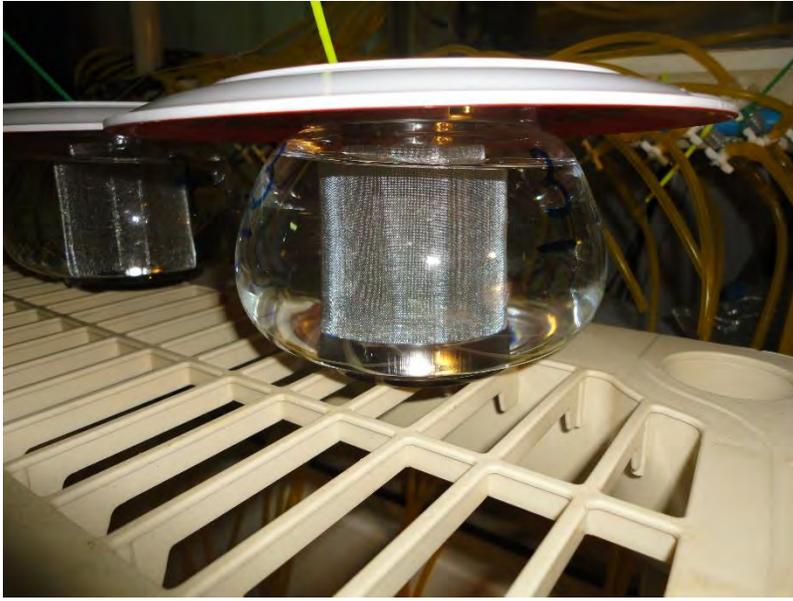


Figura 5. Vista de recipientes para exposición a larvas de jaiba y para su posterior seguimiento en baño termorregulado

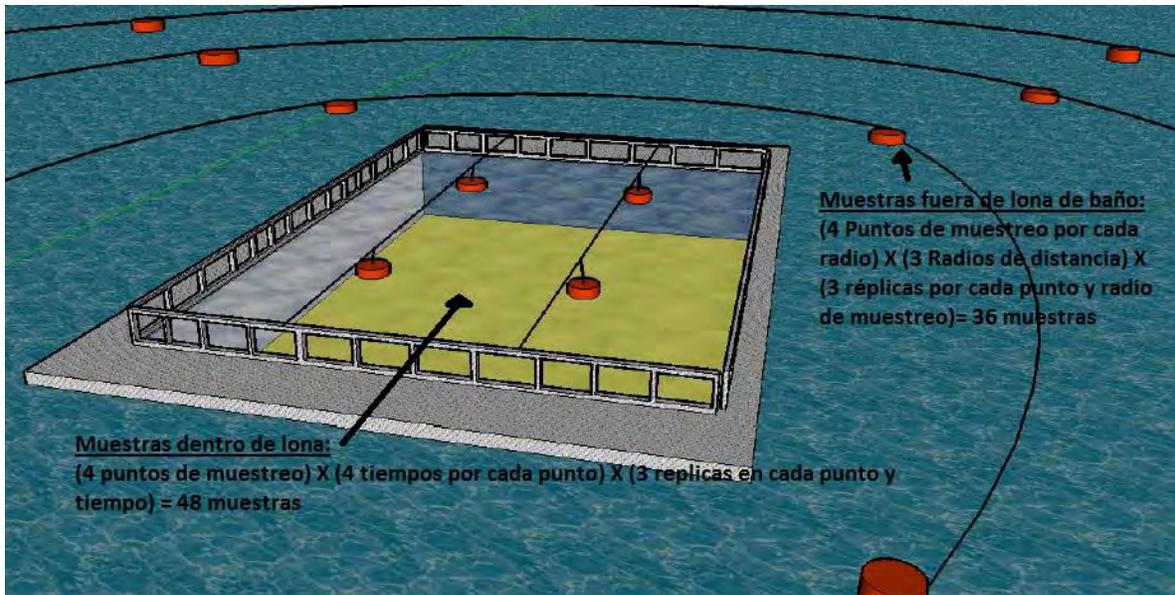


Figura 6. Esquema de los puntos de muestreo dentro y fuera (radios de impacto) de las jaulas de cultivo, representados por las boyas naranjas.

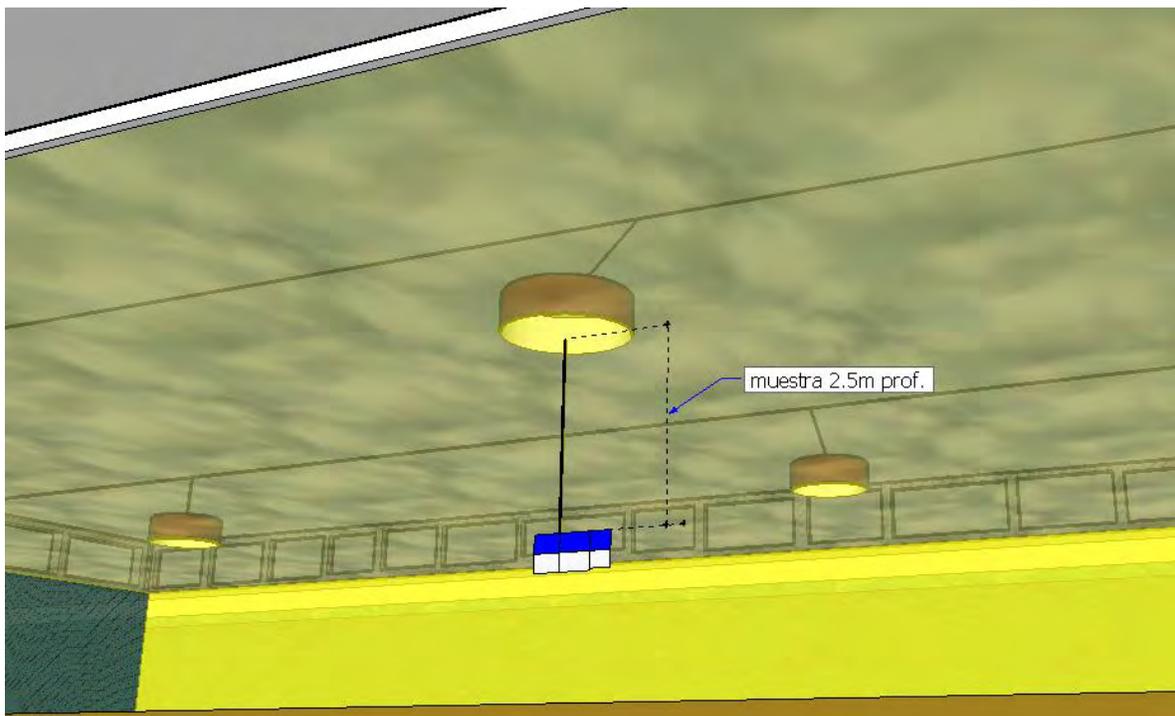


Figura 7. Esquema de botellas para toma de muestras de agua a 2.5m de profundidad.

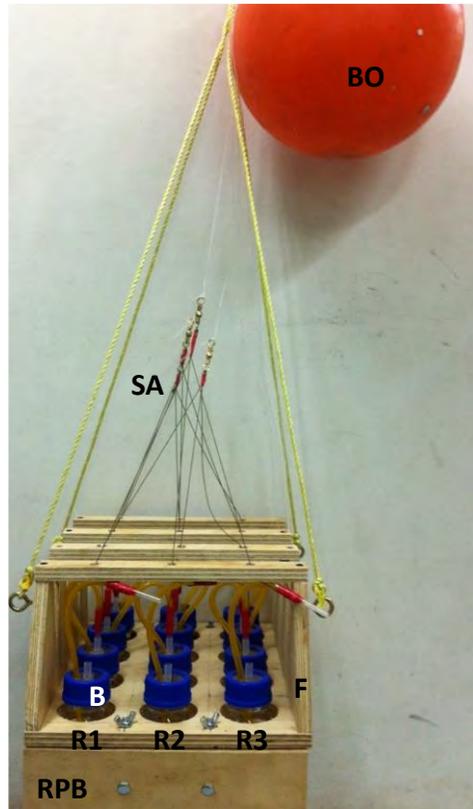


Figura 8. Dispositivo para muestreo de agua de mar, en posición de muestreo (botella abierta). B: Botella de muestreo tipo Schott; BO: boyarín; R1-3: Réplicas accionadas simultáneamente por el sistema de apertura; RPB: rack porta botellas con tapa desmontable por medio de pernos y tuerca-mariposa para reemplazo de botellas; SA: sistema de apertura que consiste en un monofilamento conectado a otros tres que van atados a un extremo de cada manguera de cierre de la tapa modificada de la botella de muestreo (réplica). Cada monofilamento es accionado solo una vez (tiempo y posición de muestreo) desde el pasillo de la jaula.



Figura 9. Detalle de dispositivo para muestreo de agua de mar



Figura 10. Espectrofotómetro para mediciones de peróxido en terreno.

Tabla I: Artículos relacionados a) Azametifos, b) Peroxido de Hidrogeno, c) Deltametrina, d)Cipermetrina, e)Expertos

#### A) Azametifos

Couillard C.M., Burrige L.E.	2015	Sublethal exposure to azamethiphos causes neurotoxicity, altered energy allocation and high mortality during simulated live transport in American lobster
Ernst W., Doe K., Cook A., Burrige L., Lalonde B., Jackman P., Aube J.G., Page F.	2014	Dispersion and toxicity to non-target crustaceans of azamethiphos and deltamethrin after sea lice treatments on farmed salmon, <i>Salmo salar</i>
Burrige L.E., Lyons M.C., Wong D.K.H., MacKeigan K., VanGeest J.L.	2014	The acute lethality of three anti-sea lice formulations: AlphaMax®, Salmosan®, and Interlox®Paramove™50 to lobster and shrimp
Van Geest J.L., Burrige L.E., Fife F.J., Kidd K.A.	2014	Feeding response in marine copepods as a measure of acute toxicity of four anti-sea lice pesticides
Carro A.M., Garcia-Rodriguez D., Gonzalez-Siso P., Lorenzo R.A.	2012	Determination of chemotherapeutic agents in fish and shellfish by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Rawn D.F.K., Krakalovich T., Forsyth D.S., Roscoe V.	2009	Analysis of fin and non-fin fish products for azamethiphos and dichlorvos residues from the Canadian retail market
Mayor D.J., Solan M., Martinez I., Murray L., McMillan H., Paton G.I., Killham K.	2008	Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture industry to <i>Corophium volutator</i> and <i>Hediste diversicolor</i> : Whole sediment bioassay tests
Stefano B., Ilaria C., Silvano F.	2008	Cholinesterase activities in the scallop <i>Pecten jacobaeus</i> : Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants

Burridge L.E., Haya K., Waddy S.L.	2008	The effect of repeated exposure to azamethiphos on survival and spawning in the American lobster ( <i>Homarus americanus</i> )
Hannam M.L., Hagger J.A., Jones M.B., Galloway T.S.	2008	Characterisation of esterases as potential biomarkers of pesticide exposure in the lugworm <i>Arenicola marina</i> (Annelida: Polychaeta)
Canty M.N., Hagger J.A., Moore R.T.B., Cooper L., Galloway T.S.	2007	Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc <i>Mytilus edulis</i>
Corsi I., Pastore A.M., Lodde A., Palmerini E., Castagnolo L., Focardi S.	2007	Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, <i>Anodonta woodiana</i> (Bivalvia: Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, <i>Anodonta</i> sp.
Romani R., Corsi I., Bonacci S., Focardi S., De Medio G.E., De Santis A., Incarnato F., Giovannini E., Rosi G.	2006	Organophosphate-resistant forms of acetylcholinesterases in two scallops-the Antarctic <i>Adamussium colbecki</i> and the Mediterranean <i>Pecten jacobaeus</i>
Burridge L.E., Haya K., Waddy S.L.	2005	Seasonal lethality of the organophosphate pesticide, azamethiphos to female American lobster ( <i>Homarus americanus</i> )
Brown M., Davies I.M., Moffat C.F., Redshaw J., Craft J.A.	2004	Characterisation of choline esterases and their tissue and subcellular distribution in mussel ( <i>Mytilus edulis</i> )
Intorre L., Soldani G., Cognetti-Varriale A.M., Monni G., Meucci V., Pretti C.	2004	Safety of azamethiphos in eel, seabass and trout
Pretti C., Soldani G., Cognetti-Varriale A.M., Monni G., Meucci V., Intorre L.	2002	Efficacy and safety of azamethiphos for the treatment of pseudodactylogyrosis in the European eel
Shao Z.J.	2001	Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: Current perspectives and future possibilities
Ernst W., Jackman P., Doe K., Page F., Julien G., MacKay K., Sutherland T.	2001	Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on almon in net pen enclosures
Treasurer J.W., Grant A., Davis P.J.	2000	Physical constraints of bath treatments of Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> ) with a sea lice burden (Copepoda: Caligidae)
Roth M.	2000	The availability and use of chemotherapeutic sea lice control products
Burridge L.E., Haya K., Waddy S.L., Wade J.	2000	The lethality of anti-sea lice formulations Salmosan® (Azamethiphos) and Excis® (Cypermethrin) to stage IV and adult lobsters ( <i>Homarus americanus</i> ) during repeated short-term exposures
Abgrall P., Rangeley R.W., Burridge L.E., Lawton P.	2000	Sublethal effects of azamethiphos on shelter use by juvenile lobsters ( <i>Homarus americanus</i> )
Pahl B.C., Opitz H.M.	1999	The effects of cypermethrin (Excis) and azamethiphos (Salmosan) on lobster <i>Homarus americanus</i> H. Milne Edwards larvae in a laboratory study
Pfenning A.P., Roybal J.E., Turnipseed S.B., Gonzales S.A., Hurlbut J.A.	1999	Determination of residues of azamethiphos in salmon tissue by liquid chromatography with fluorescence detection
Burridge L.E., Haya K., Zitko V., Waddy S.	1999	The lethality of Salmosan (azamethiphos) to American lobster ( <i>Homarus americanus</i> ) larvae, postlarvae, and adults

Burka J.F., Hammell K.L., Horsberg T.E., Johnson G.R., Rainnie D.J., Speare D.J.	1997	Drugs in salmonid aquaculture - A review
Sievers G., Palacios P., Inostroza R., Dolz H.	1995	Evaluation of the toxicity of 8 insecticides in <i>Salmo salar</i> and the in vitro effects against the isopode parasite, <i>Ceratothoa gaudichaudii</i>
Roth M., Richards R.H., Sommerville C.	1993	Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review
Burridge L., Weis J., Cabello F., Pizarro J., Bostick K.	2010	Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects

## B) Peróxido de Hidrógeno

Bravo, S., Silva, M.T., Agusti, C., Sambra, K., Horsberg, T.E.	2015	The effect of chemotherapeutic drugs used to control sea lice on the hatching viability of egg strings from <i>Caligus rogercresseyi</i>
Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Mahmoudi, E.	2015	Acute toxicity of cypermethrin on the freshwater mussel <i>Unio gibbus</i>
Bownik, A., Stępniewska, Z.	2015	Protective effects of ectoine on behavioral, physiological and biochemical parameters of <i>Daphnia magna</i> subjected to hydrogen peroxide
Burridge, L.E., Lyons, M.C., Wong, D.K.H., MacKeigan, K., VanGeest, J.L.	2014	The acute lethality of three anti-sea lice formulations: AlphaMax®, Salmosan®, and Interox®Paramove™50 to lobster and shrimp
Wang, J., Wang, Q., Liu, N., Jing, W., Wang, L., Zhou, F.	2014	Hydrogen peroxide leads to cell damage and apoptosis in the gill of the freshwater crab <i>Sinopotamon henanense</i> (Crustacea, Decapoda)
Van Geest, J.L., Burridge, L.E., Fife, F.J., Kidd, K.A.	2014	Feeding response in marine copepods as a measure of acute toxicity of four anti-sea lice pesticides
Pellegrini, V., Gorbi, G., Buschini, A.	2014	Comet assay on <i>daphnia magna</i> in eco-genotoxicity testing
Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferrán, M.V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Amé, M.V.	2014	Oxidative stress response induced by atrazine in <i>Palaemonetes argentinus</i> : The protective effect of vitamin E
Stom, D.I., Fedoseeva, E.V.	2013	Effect of hydrogen peroxide on Behavioural reactions and survival of various Lake Baikal amphipods and Holarctic <i>Gammarus Lacustris</i> G. O. Sars, 1863
Goswami, A.R., Aich, A., Pal, S., Chattopadhyay, B., Datta, S., Mukhopadhyay, S.K.	2013	Antioxidant response to oxidative stress in zooplankton thrived in wastewater-fed ponds in East Calcutta Wetland Ecosystem, a Ramsar site
Garcia, J.C., De Souza Freitas, T.K.F., Palácio, S.M., Ambrósio, E., Souza, M.T.F., Santos, L.B., De Cinque Almeida, V., De Souza, N.E.	2013	Toxicity assessment of textile effluents treated by advanced oxidative process (UV/TiO <sub>2</sub> and UV/TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in the species <i>Artemia salina</i> L.

Barrington, D.J., Reichwaldt, E.S., Ghadouani, A.	2013	The use of hydrogen peroxide to remove cyanobacteria and microcystins from waste stabilization ponds and hypereutrophic systems
Loram, J., Raudonis, R., Chapman, J., Lortie, M., Bodnar, A.	2012	Sea urchin coelomocytes are resistant to a variety of DNA damaging agents
Vincent-Hubert, F., Revel, M., Garric, J.	2012	DNA strand breaks detected in embryos of the adult snails, <i>Potamopyrgus antipodarum</i> , and in neonates exposed to genotoxic chemicals
Fu, M., Zou, Z., Liu, S., Lin, P., Wang, Y., Zhang, Z.	2012	Selenium-dependent glutathione peroxidase gene expression during gonad development and its response to LPS and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> challenge in <i>Scylla paramamosain</i>
Reichwaldt, E.S., Zheng, L., Barrington, D.J., Ghadouani, A.	2012	Acute toxicological response of <i>Daphnia</i> and <i>Moina</i> to hydrogen peroxide
Lauritano, C., Procaccini, G., Ianora, A.	2012	Gene expression patterns and stress response in marine copepods
Matthijs, H.C.P., Visser, P.M., Reeze, B., Meeuse, J., Slot, P.C., Wijn, G., Talens, R., Huisman, J.	2012	Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide
Veeramani, S., Baskaralingam, V.	2011	Shell-bound iron dependant nitric oxide synthesis in encysted <i>Artemia parthenogenetica</i> embryos during hydrogen peroxide exposure
Nagel-Hassemer, M.E., Carvalho-Pinto, C.R.S., Matias, W.G., Lapolli, F.R.	2011	Removal of coloured compounds from textile industry effluents by UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> advanced oxidation and toxicity evaluation
Kim, B.-M., Rhee, J.-S., Park, G.S., Lee, J., Lee, Y.-M., Lee, J.-S.	2011	Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod <i>Tigriopus japonicus</i> : Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants
Yi, X., Kang, S.-W., Jung, J.	2010	Long-term evaluation of lethal and sublethal toxicity of industrial effluents using <i>Daphnia magna</i> and <i>Moina macrocopa</i>
Robbins, H.M., Van Stappen, G., Sorgeloos, P., Sung, Y.Y., MacRae, T.H., Bossier, P.	2010	Diapause termination and development of encysted <i>Artemia</i> embryos: Roles for nitric oxide and hydrogen peroxide
Lundström, E., Björleinius, B., Brinkmann, M., Hollert, H., Persson, J.-O., Breitholtz, M.	2010	Comparison of six sewage effluents treated with different treatment technologies-Population level responses in the harpacticoid copepod <i>Nitocra spinipes</i>
Pérez-Roa, R.E., Anderson, M.A., Rittschof, D., Hunt, C.G., Noguera, D.R.	2009	Involvement of reactive oxygen species in the electrochemical inhibition of barnacle ( <i>Amphibalanus amphitrite</i> ) settlement
McMaster, D.M., Bennett, S.M., Tang, Y., Finlay, J.A., Kowalke, G.L., Nedved, B., Bright, F.V., Callow, M.E., Callow, J.A., Wendt, D.E., Hadfield, M.G., Detty, M.R.	2009	Antifouling character of 'active' hybrid xerogel coatings with sequestered catalysts for the activation of hydrogen peroxide
Meinertz, J.R., Greseth, S.L., Gaikowski, M.P., Schmidt, L.J.	2008	Chronic toxicity of hydrogen peroxide to <i>Daphnia magna</i> in a continuous exposure, flow-through test system
Smit, M.G.D., Ebbens, E., Jak, R.G., Huijbregts, M.A.J.	2008	Time and concentration dependency in the potentially affected fraction of species: The case of hydrogen peroxide treatment of ballast water

Gavand, M.R., McClintock, J.B., Amsler, C.D., Peters, R.W., Angus, R.A.	2007	Effects of sonication and advanced chemical oxidants on the unicellular green alga <i>Dunaliella tertiolecta</i> and cysts, larvae and adults of the brine shrimp <i>Artemia salina</i> : A prospective treatment to eradicate invasive organisms from ballast water
Seo, J.S., Lee, K.-W., Rhee, J.-S., Hwang, D.-S., Lee, Y.-M., Park, H.G., Ahn, I.-Y., Lee, J.-S.	2006	Environmental stressors (salinity, heavy metals, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod <i>Tigriopus japonicus</i>
Giménez, G., Padrós, F., Roque, A., Estévez, A., Furones, D.	2006	Bacterial load reduction of live prey for fish larval feeding using Ox-Aquaculture©
Melendre, P.M., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Aguilera, A.	2006	Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs ( <i>Pacifastacus leniusculus</i> Dana. Astacidae)
Qiao, R.-P., Li, N., Qi, X.-H., Wang, Q.-S., Zhuang, Y.-Y.	2005	Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide
Hook, S.E., Lee, R.F.	2004	Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp <i>Palaemonetes pugio</i> embryo as measured by the comet assay
Lee, R.F., Steinert, S.	2003	Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals
Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Ceratto, N., Viarengo, A.	2002	Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of <i>Mytilus galloprovincialis</i>
Davison, A.J., Wilson, B.D., Belton, P.	1984	Deterioration of axonal membranes induced by phenolic pro-oxidants. Roles of superoxide radicals and hydrogen peroxide
Leung P.T.Y., Wang Y., Mak S.S.T., Ng W.C., Leung K.M.Y.	2011	Differential proteomic responses in hepatopancreas and adductor muscles of the green-lipped mussel <i>Perna viridis</i> to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide
Jena K.B., Jagtap T.G., Verlecar X.N.	2010	Antioxidative potential of <i>Perna viridis</i> and its protective role against ROS induced lipidperoxidation and protein carbonyl
Chatel A., Hamer B., Talarmin H., Dorange G., Schroder H.C., Muller W.E.G.	2010	Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> as biomarker of environmental pollution
De Lafontaine Y., Despatie S.-P., Veilleux E., Wiley C.	2009	Onboard ship evaluation of the effectiveness and the potential environmental effects of PERACLEAN® Ocean for ballast water treatment in very cold conditions
Stambuk A., Pavlica M., Malovic L., Klobucar G.I.V.	2008	Persistence of DNA damage in the freshwater mussel <i>Unio pictorum</i> upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide
Labieniec M., Gabryelak T.	2007	Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels <i>Unio tumidus</i> caused by selected phenolic compounds in the presence of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> or Cu <sup>2+</sup> ions

Waller D.L., Fisher S.W.	1998	Evaluation of several chemical disinfectants for removing zebra mussels from unionid mussels
Les Burrige, Judith S. Weis, Felipe Cabello, Jaime Pizarro, Katherine Bostick,	2010	Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects

### C) Deltamethrin

W. Ernst, K. Doe, A. Cook, L. Burrige, B. Lalonde, P. Jackman, J.G. Aubé, F. Page	2014	Dispersion and toxicity to non-target crustaceans of azamethiphos and deltamethrin after sea lice treatments on farmed salmon, <i>Salmo salar</i>
Héla Toumi, Moncef Boumaiza, Françoise Immel, Bénédicte Sohm, Vincent Felten, Jean-François Féraud	2014	Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on two clones of <i>Daphnia magna</i> (Crustacea: Cladocera): A proteomic investigation
H. Toumi, M. Boumaiza, M. Millet, C.M. Radetski, V. Felten, C. Fouque, J.F. Féraud,	2013	Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of <i>Daphnia magna</i> (Crustacea, Cladocera)
Cristiana Oliveira, Joana Almeida, Lúcia Guilhermino, Amadeu M.V.M. Soares, Carlos Gravato,	2012	Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn <i>Palaemon serratus</i>
Huynh Thi Tu, Frederic Silvestre, Bertrand De Meulder, Jean-Pierre Thome, Nguyen Thanh Phuong, Patrick Kestemont	2012	Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp ( <i>Penaeus monodon</i> )
Héla Toumi, Moncef Boumaiza, Maurice Millet, Claudemir Marcos Radetski, Vincent Felten, Jean François Féraud	2015	Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in <i>Daphnia magna</i> (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure?
Jennifer Dorts, Frédéric Silvestre, Huynh Thi Tu, Anne-Eric Tyberghein, Nguyen Thanh Phuong, Patrick Kestemont	2009	Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, <i>Penaeus monodon</i> , following exposure to endosulfan and deltamethrin,
Olivier Adam, François Degiorgi, Grégorio Crini, Pierre-Marie Badot,	2010	High sensitivity of <i>Gammarus</i> sp. Juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment
T. Eybe, T. Bohn, J.N. Audinot, T. Udelhoven, H.M. Cauchie, H.N. Migeon, L. Hoffmann	2009	Uptake visualization of deltamethrin by NanoSIMS and acute toxicity to the water flea <i>Daphnia magna</i> ,
Thierry Caquet, Eric Thybaud, Suzette Le Bras, Odile Jonot, François Ramade,	1992	Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms,
J.L. Van Geest, L.E. Burrige, K.A. Kidd	2014	Toxicity of two pyrethroid-based anti-sea lice pesticides AAlphaMax® and Excis®, to a marine amphipod in aqueous and sediment exposures

Jordana L. Van Geest, Les E. Burr ridge, Frederick J. Fife, Karen A. Kidd,	2014	Feeding response in marine copepods as a measure of acute toxicity of four anti-sea lice pesticides, Marine
J.L. Van Geest, L.E. Burr ridge, K.A. Kidd,	2014	The toxicity of the anti-sea lice pesticide AlphaMax® to the polychaete worm <i>Nereis virens</i>
L.E. Burr ridge, M.C. Lyons, D.K.H. Wong, K. MacKeigan, J.L. VanGeest,	2014	The acute lethality of three anti-sea lice formulations: AlphaMax®, Salmosan®, and Interlox®Paramove™50 to lobster and shrimp
C.M. Bajet, A. Kumar, M.N. Calingacion, T.C. Narvacan	2012	Toxicological assessment of pesticide used in the Pagsanjan-Lumban catchment to selected non-target aquatic organisms in Laguna Lake, Philippines
M.L. Feo, C. Corcellas, C. Barata, A. Ginebreda, E. Eljarrat, D. Barceló	2013	Organic carbon content effects on bioavailability of pyrethroid insecticide and validation of Solid Phase Extraction with Poly (2,6-diphenyl-p-phenylene oxide) Polymer by <i>Daphnia magna</i> toxicity tests,
Alison E. Chalmers, Michael P. Osborne	1986	The crayfish stretch receptor organ: A useful model system for investigating the effects of neuroactive substances: I. The effect of DDT and pyrethroids.
J. Martins, L. Oliva Teles, V. Vasconcelos	2007	Assays with <i>Daphnia magna</i> and <i>Danio rerio</i> as alert systems in aquatic toxicology
Les Burr ridge, Judith S. Weis, Felipe Cabello, Jaime Pizarro, Katherine Bostick	2010	Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects,
Xue Chen, Yibing Zhou, Dazuo Yang, Huan Zhao, Lili Wang, Xiutang Yuan	2012	CYP4 mRNA expression in marine polychaete <i>Perinereis aibuhitensis</i> in response to petroleum hydrocarbon and deltamethrin
Huynh Thi Tu, Frederic Silvestre, Marie-Louise Scippo, Jean-Pierre Thome, Nguyen Thanh Phuong, Patrick Kestemont	2009	Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp ( <i>Penaeus mondon</i> )
H. Lutnicka	2003	, 643 The influence of type 1 pyrethroids: Cypermethrin and deltamethrin on algae, crustaceans and rotifer
J.L. Van Geest, L.E. Burr ridge, K.A. Kidd	2014	The toxicity of the anti-sea lice pesticide AlphaMax® to the polychaete worm <i>Nereis virens</i>
D. Hernández-Moreno, F. Soler, M.P. Míguez, M. Pérez-López	2010	Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, <i>Tinca tinca</i> , to carbofuran or deltamethrin
Mei-Fang Shen, Anupama Kumar, Shu-Yan Ding, Sonia Grocke,	2012	Comparative study on the toxicity of pyrethroids, $\alpha$ -cypermethrin and deltamethrin to <i>Ceriodaphnia dubia</i> ,

#### d) Cipermetrima

J.L. Van Geest, L.E. Burridge, K.A. Kidd	2014	Toxicity of two pyrethroid-based anti-sea lice pesticides AAlphaMax® and Excis®, to a marine amphipod in aqueous and sediment exposures
Hernán Mugni, Ariel Paracampo, Natalia Marrochi, Carlos Bonetto	2013	Acute toxicity of cypermethrin to the non target organism <i>Hyalella curvispina</i>
L.E Burridge, K Haya, F.H Page, S.L Waddy, V Zitko, J Wade	2000	The lethality of the cypermethrin formulation Excis® to larval and post-larval stages of the American lobster ( <i>Homarus americanus</i> )
A. Kumar, R. Correll, S. Grocke, C. Bajet	2010	Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, <i>Paratya australiensis</i> (Decapoda: Atyidae): Use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality
Shivaiah Shashikumar, P.S. Rajini,	2010	Cypermethrin elicited responses in heat shock protein and feeding in <i>Caenorhabditis elegans</i>
D.J. Mayor, M. Solan, I. Martinez, L. Murray, H. McMillan, G.I. Paton, K. Killham	2008	Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture industry to <i>Corophium volutator</i> and <i>Hediste diversicolor</i> : Whole sediment bioassay test.
Olivier Adam, Pierre-Marie Badot, François Degiorgi, Grégorio Crini	2009	Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod <i>Gammarus pulex</i> (L.),
S.W. Shires, D. Bennett,	1985	Contamination and effects in freshwater ditches resulting from an aerial application of cypermethrin
C.M. Bajet, A. Kumar, M.N. Calingacion, T.C. Narvacan	2012	Toxicological assessment of pesticide used in the Pagsanjan-Lumban catchment to selected non-target aquatic organisms in Laguna Lake, Philippines
Keqiang Wei, Junxian Yang	2015	Oxidative damage of hepatopancreas induced by pollution depresses humoral immunity response in the freshwater crayfish <i>Procambarus clarkii</i> ,
S. Sánchez-Fortún, M.V. Barahona,	2005	Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms
S. Bollmohr, J.A. Day, R. Schulz,	2007	Temporal variability in particle-associated pesticide exposure in a temporarily open estuary, Western Cape, South Africa
Abdelhafidh Khazri, Badreddine Sellami, Mohamed Dellali, Cayo Corcellas, Ethel Eljarrat, Damià Barceló, Ezzeddine Mahmoudi	2015	Acute toxicity of cypermethrin on the freshwater mussel <i>Unio gibbus</i>
Keqiang Wei, Junxian Yang	2015	, Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish <i>Procambarus clarkii</i>
Xiong Li, Xie Ping, Sheng Xiumei, Wu Zhenbin, Xie Liqiang	2005	Toxicity of cypermethrin on growth, pigments, and superoxide dismutase of <i>Scenedesmus obliquus</i>
L. Suvetha, M. Ramesh, M. Saravanan	2010	Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase activity of a freshwater teleost fish <i>Cyprinus carpio</i>
Andreas Kretschmann, Michele Gottardi, Kristoffer Dalhoff, Nina Cedergreen,	2015	The synergistic potential of the azole fungicides prochloraz and propiconazole toward a short $\alpha$ -

		cypermethrin pulse increases over time in <i>Daphnia magna</i>
Ursula Friberg-Jensen, Lina Wendt-Rasch, Per Woin, Kirsten Christoffersen	2003	Effect of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different levels
Zhao-Hui Wang, Yu-feng Yang, Wen-Jie Yue, Wei Kang, Wen-Jun Liang, Li Wei-Jie,	2010	The growth behavior of three marine phytoplankton species in the presence of commercial cypermethrin,
H. Lutnicka	2003	, 643 The influence of type 1 pyrethroids: Cypermethrin and deltamethrin on algae, crustaceans and rotifer
L Wendt-Rasch, P Pirzadeh, P Woin,	2003	Effects of metsulfuron methyl and cypermethrin exposure on freshwater model ecosystems
Olivier Adam, Pierre-Marie Badot, François Degiorgi, Grégoire Crini	2009	Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod <i>Gammarus pulex</i> (L.),
Jordana L. Van Geest, Les E. Burrige, Frederick J. Fife, Karen A. Kidd,	2014	Feeding response in marine copepods as a measure of acute toxicity of four anti-sea lice pesticides, Marine
M.L. Feo, C. Corcellas, C. Barata, A. Ginebreda, E. Eljarrat, D. Barceló	2013	Organic carbon content effects on bioavailability of pyrethroid insecticide and validation of Solid Phase Extraction with Poly (2,6-diphenyl-p-phenylene oxide) Polymer by <i>Daphnia magna</i> toxicity tests,
K.J. Willis, P.A. Gillibrand, C.J. Cromey, K.D. Black	2005	Sea lice treatments on salmon farms have no adverse effects on zooplankton communities: a case study
Jes Jessen Rasmussen, Rikke Juul Monberg, Annette Baattrup-Pedersen, Nina Cedergreen, Peter Wiberg-Larsen, Bjarne Strobel, Brian Kronvang	2012	Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders
Mei-Fang Shen, Anupama Kumar, Shu-Yan Ding, Sonia Grocke,	2012	Comparative study on the toxicity of pyrethroids, $\alpha$ -cypermethrin and deltamethrin to <i>Ceriodaphnia dubia</i> ,
Ernst W., Jackman P., Doe K., Page F., Julien G., MacKay K., Sutherland T.	2001	Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures
Burrige L.E., Haya K., Waddy S.L., Wade J.	2000	The lethality of anti-sea lice formulations Salmosan® (Azamethiphos) and Excis® (Cypermethrin) to stage IV and adult lobsters ( <i>Homarus americanus</i> ) during repeated short-term exposures
Muniswamy David, Shambanagouda R. Marigoudar, Vineetkumar K. Patil, Ramesh Halappa,	2012	Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on tadpoles of <i>D. melanostictus</i> (Schneider, 1799)

e) Expertos a agregar al analisis

Clark, J.R., Goodman, L.R., Borthwick, P.W., Patrick Jr., J.M., Cripe, G.M., Moody, P.M., Moore, J.C., Lores, E.M.,	1989	Toxicity of pyrethroids to marine invertebrates and fish: a literature review and test results with sediment-sorbed chemicals.
Fairchild, W., Doe, K.G., Jackman, P.M., Arsenault, J.T., Aube, J.G., Losier, M., Cook, A.M.,	2010	Acute and chronic toxicity of two formulations of the pyrethroid pesticide deltamethrin to an amphipod, sand shrimp and lobster larvae.
McLeese, D.W., Metcalfe, C.D., Zitko, V.,	1980	Lethality of permethrin, cypermethrin, and fenvalerate to salmon, lobster and shrimp.
Muir, D.C., Rawn, G.P., Grift, N.P.,	1985	Fate of the pyrethroid insecticide deltamethrin in small ponds: a mass balance study.
Mian, LS, and Mulla, MS.	1992	Effects of pyrethroid insecticides on non-target invertebrates in aquatic ecosystems
Crossland, MO.	1982	Aquatic toxicology of cypermethrin II fate and biological effects in pond experiments

Tabla II. Información sobre los productos utilizados en el presente trabajo. Incluye nombre comercial, presentación, fabricante y distribuidor en Chile, recomendaciones de aplicación.

Compuesto	:	Deltametrina
Nombre comercial	:	Alpha Max®
Fabricante	:	Fabricado por Intervet S.A.- bajo licencia de PHARMAQ AS Noruega-Importado y distribuido por PHARMAQ AS Chile.
Presentación	:	Deltametrina 1% solución externa para el tratamiento de Caligus en peces. Frascos de aluminio de 250ml a una concentración de 10mg de Deltametrina/ml.
Recomendaciones de uso del fabricante	:	<p>Producto antiparasitario para uso en peces vía baño, indicado para el tratamiento y control del Caligus (<i>Caligus rogercresseyi</i>), adulto y pre-adulto a temperatura del agua superiores a 8°C.</p> <p><u>Dosis de tratamiento:</u> 0,2 a 0,3 ml de Alpha Max ® por m<sup>3</sup> (1000 l) de agua de mar en la unidad de tratamiento, dependiendo del procedimiento de tratamiento a utilizar. Esto corresponde a 2 ug -3 ug de Deltametrina/ litro de agua de mar.</p> <p><u>Tiempo de tratamiento:</u> 30 minutos</p>

Compuesto	:	Cipermetrina
Nombre comercial	:	Betamax®
Fabricante	:	Vericore Ltd.- Importado y Distribuido en Chile por NOVARTIS CHILE S.A.
Presentación	:	Cipermetrina 5% solución externa. Envase con 200 cc de producto al 5 % p/v. Cada ml de solución contiene: Cipermetrina 50 mg Excipientes c.s.p 1 ml
Recomendaciones de uso del fabricante	:	Tratamiento y control de Caligus ( <i>Caligus rogercresseyi</i> ). Betamax® se utiliza en dilución en agua de mar. <u>Dosis de tratamiento:</u> 15µg/litro equivalente a 15 mg de Cipermetrina en 1000 litros de agua (0,015 ppm). <u>Tiempo de tratamiento:</u> 30 minutos

Compuesto	:	Azametifos
Nombre comercial	:	Calfree®
Fabricante	:	Farmacologia en Acuicultura Veterinaria FAV SA
Presentación	:	Polvo para solución externa Cada 100 g de polvo contiene: Azametifos 50 g Excipientes c.s.p. 100 g
Recomendaciones de uso del fabricante	:	Antiparasitario externo para el control y tratamiento de los estadios adultos de Caligus ( <i>Caligus rogercresseyi</i> ) en salmónidos. <u>Dosis de tratamiento:</u> 0,2 ppm (mg/L) de CalFree® por litro de agua de mar (equivalente a 0,1 ppm de Azametifos), <u>Tiempo de tratamiento:</u> 30 minutos a partir del momento en que se concluye el suministro del producto.

Compuesto	:	Peróxido de hidrogeno
Fabricante	:	DuPont Soluciones en Salud Animal USA - distribuido en Chile por Europharma
Nombre comercial	:	Hyperox®
Presentación	:	solución acuosa al 50%
Recomendaciones de uso del fabricante	:	Tratamiento y control de Caligus ( <i>Caligus rogercresseyi</i> ). Hyperox® se utiliza en dilución en agua de mar. <u>Dosis de tratamiento:</u> 1500 mg/litro (1500 ppm). <u>Tiempo de tratamiento:</u> 20 minutos

## ANEXO II

Personal participante por objetivo

Objetivos

1.1 Revisar la literatura nacional e internacional disponible a la fecha sobre los efectos de los organofosforados, con especial énfasis en azametifos y peróxido de hidrógeno sobre organismos acuáticos.

Dra. Paulina Gebauer, Universidad de Los Lagos

Dr. Mauricio Urbina, Universidad de Exeter

Dr.(c). Juan Pablo Cumillaf, Universidad Austral de Chile UACH

1.2 Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina, deltametrina, azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval en jaiba marmola (*Cancer edwardsii*), bajo condiciones controladas

Dr. Luis Miguel Pardo, UACH

Biol Mar. Marcela Riveros, UACH

Biol Mar. Jorge López, UACH

Dra. Paulina Gebauer ULA

Ing. Ac. Claudia Vera, UACH

Ing. Ac. Miguel Herrera, UACH

Ing. Ac. Roberto Retamal, ULA

Dr. Kurt Paschke, UACH

1.3 Determinar la toxicidad aguda y crónica de azametifos y peróxido de hidrógeno en la etapa adulta y larval de chorito (*Mytilus chilensis*) y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas

Dr. Jorge Toro, UACH

Dr.(c). Pablo Oyarzún, UACH

Carmen Baeza, UACH

Alex Illesca, UACH

1.4 Determinar la concentración que alcanza el azametifos en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas

Dr.(c). Juan Pablo Cumillaf, UACH

Dr. Kurt Paschke, UACH

1.5 Determinar la concentración que alcanza el peróxido de hidrogeno en condiciones de campo y compararla con los resultados obtenidos bajo condiciones controladas

Dr.(c). Juan Pablo Cumillaf, UACH

Dr. Kurt Paschke, UACH