



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Ambientales -Programa de Ciencias Ambientales con mención  
en Sistemas Acuáticos Continentales.



**Riesgos ambientales de fármacos antiparasitarios  
aplicados actualmente en cultivos de salmón en el sur de  
Chile.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales mención  
Sistemas Acuáticos Continentales

FELIPE IGNACIO TUCCA DÍAZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2014

Profesor Guía: Ricardo Barra Ríos  
Dpto. de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA-Chile  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

Durante todo este periodo doctoral quisiera agradecer de manera muy especial a todo el equipo de trabajo el cual tuvo un gran compromiso a lo largo de toda esta tesis, compartiendo fin de semanas y largas horas de trabajo en laboratorio. Destaco mucho la participación de Gabriel Cruz, Heriberto Moya, Mauricio Díaz, Francisca Valenzuela, Cesiah Concha y Jesús Vergara que sin ellos los tiempos hubieran sido eternos. También quisiera agradecer a mi guía el Dr. Ricardo Barra y al grupo de laboratorio Biomarcadores por los consejos, recomendaciones y críticas, las cuales permitieron fortalecer el desarrollo de esta investigación.

En cuanto a experiencias internacionales quisiera dar a conocer mi especial agradecimiento al centro EULA-Chile y a la embajada de Chile en Italia por darme la oportunidad de viajar y conocer nuevas vivencias en la Universidad de Siena, donde conocí excelentes personas dentro de las cuales se encuentran el Dr. Silvano Focardi, Dra. Karla Pozo y Dra. Francesca Borghini, quienes me apoyaron en el desarrollo de algunos resultados obtenidos en esta tesis. Por otro lado, agradecer a CONICYT (Becas-Chile) por darme la oportunidad de financiar mi pasantía en Canadá y a Karla Pozo por los contactos de trabajo en Environment Canada junto al Dr. Tom Harner y su grupo de profesionales pertenecientes a *Hazardous Air Pollutants* (HAPs).

Agradecer al laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Concepción por facilitarme su infraestructura, situación que fue fundamental para llevar a cabo los experimentos ecotoxicológicos. A la profesora Jeannette Silva por los consejos transmitidos durante la manipulación de organismos en laboratorio.

Además, quisiera dar las gracias al Dr. Francisco Encina por entregarme herramientas fundamentales en el desarrollo del modelo de fugacidad.

Finalmente un afectuoso agradecimiento a toda mi familia quien me apoyo a la distancia, en especial a mi madre Silvia Díaz por su entrega y señales de fuerza para finalizar este estudio. A Daniela Alarcón quien es mi consejera, confidente y gran compañera.

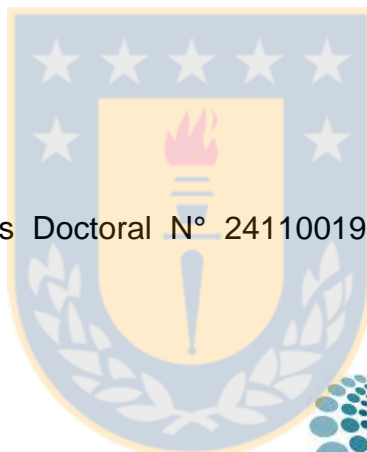
## FINANCIAMIENTOS

Este proyecto fue financiado por:

1. Proyecto Fondecyt N° 1110719, titulado: “Persistent Organic Pollutants and emerging contaminants in salmon farms: Understand the environmental fate and effects”.



2. Beca Apoyo de Tesis Doctoral N° 24110019 (años 2011-2012) otorgado por CONICYT.



3. Proyecto titulado “Determinación del posible impacto de la cipermetrina y deltametrina en el medio marino y su efecto en *Mytilus chilensis*” otorgado por la subsecretaría de pesca (SUBPESCA). Proyecto que permitió el trabajo en terreno.



## ÍNDICE

FIGURAS .....	5
TABLAS .....	7
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	11
Capítulo I: INTRODUCCIÓN .....	13
ANTECEDENTES GENERALES .....	14
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	25
OBJETIVOS .....	26
OBJETIVO GENERAL .....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
Capítulo II: EVALUACIÓN DE EXPOSICIÓN .....	27
Paper N°1: .....	28
Predicting the environmental concentration and persistence of antiparasitic chemicals used in feed additives in salmon farming with a fugacity model .....	28
Paper N°2: .....	66
Ethylene vinyl acetate polymer as a tool for passive sampling monitoring of organic contaminants in the salmon farm industry of Chile .....	66
Capítulo III: EVALUACIÓN DE EFECTOS .....	85
Paper N°3: .....	86
Toxic effects of antiparasitic pesticides used by the salmon industry in the marine amphipod <i>Monocorophium insidiosum</i> .....	86
Capítulo IV: EVALUACIÓN DE RIESGO .....	109
Paper 4: .....	110
Distribución de sensibilidad en crustáceos marinos a fármacos antiparasitarios utilizados por la industria del salmón: Bases para la evaluación de riesgos. ....	110
Capítulo V: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	132
DISCUSIÓN GENERAL .....	133
CONCLUSIONES .....	140
ANEXO: Información suplementaria .....	146
ANEXO I: Supplementary information (Paper N°1) .....	147
ANEXO II: Supplementary Information (Paper N°2) .....	149
ANEXO III: Supplementary Information (Paper N° 4) .....	152

## FIGURAS

### ANTECEDENTES GENERALES

**Figura 1.** Esquema conceptual del procedimiento en una evaluación de riesgo (Newman y Unger, 2003).....19

### PREDICTING THE ENVIRONMENTAL CONCENTRATION AND PERSISTENCE OF ANTIPARASITIC CHEMICALS USED IN FEED ADDITIVES IN SALMON FARMING WITH A FUGACITY MODEL.

**Figure 1.** Conceptual scheme of the important processes considered for the steady-state fugacity model in a salmon farm .....40

**Figure 2.** Intra and inter-media transport processes, concentrations and amounts (right chart) in each compartment for emamectin benzoate (a), diflubenzuron (b) and teflubenzuron (c) after treatment in salmon farm. For this model only was considered one day of application. The *f* symbol shows fugacity of chemicals .....43-45

**Figure 3.** Comparison between modeled (white bars) and measured (gray bars) concentrations in sediment for: Emamectin benzoate (EB), diflubenzuron (DI), and teflubenzuron (TE). Model data report mean  $\pm$  standard deviation based on Monte Carlo simulation.....47

**Figure 4.** Plot showing the persistence (days) of antiparasitic pharmaceuticals concentrations (used in salmon feeding) in water (a) and sediment (b). Emamectin benzoate (EB); diflubenzuron (DI) and teflubenzuron (TE).....48

### PREDICCIÓN AMBIENTAL DE PESTICIDAS PIRETROIDES UTILIZADOS POR LA INDUSTRIA DEL SALMÓN MEDIANTE EL MODELO DE FUGACIDAD NIVEL III.

**Figura 1.** Sitios de muestreo ubicados en Isla de Chiloé, Región de Los Lagos. Derecha: centro con aplicación de cipermetrina; Izquierda: centro con aplicación de deltametrina.....60

**Figura 2.** Comparación entre datos medidos (barras grises) y rango de concentraciones calculadas por el modelo (área roja) para cipermetrina (a) y deltametrina (b).....63

### ETHYLENE VINYL ACETATE POLYMER AS A TOOL FOR PASSIVE SAMPLING MONITORING OF ORGANIC CONTAMINANTS IN THE SALMON FARM INDUSTRY OF CHILE.

**Figure 1.** Study area and deployment of devices in the southern Chile. Red circles show the sites of deployment close to salmon cages and near shore.....78

**Figure 2.** Cypermethrin concentration in water ( $C_w$ = black circles) and EVA samplers ( $C_{EVA}$ =white circles) during calibration of devices.....79

**Figure 3.** Estimated concentration of cypermethrin in EVA passive samplers near shore (n=4) and salmon cage (n=6). The samplers were deployed in field during a treatment period on salmon farm.....80

TOXIC EFFECTS OF ANTIPARASITIC PESTICIDES USED BY THE SALMON INDUSTRY IN THE MARINE AMPHIPOD *MONOCOROPHIUM INSIDIOSUM*.

**Figure 1.** Percentage of lethality ( $LC_{50-10d}$ ) in *M. insidiosum* against pesticide exposure: A, emamectin benzoate; B, cypermethrin and C, deltamethrin.....99

**Figure 2.** Activity values of glutathione S-transferase (a, c and e) and thiobarbituric acid reactive substances (b, d and f) in *M. insidiosum* exposed to antiparasitic pesticides for 2 days. Lower-case letters correspond to significant differences between controls ( $t_0$ , black;  $t_2$ , gray) and the solvent control, while capital letters indicate significant differences between the solvent control and treatments. Different letters show differences ( $p<0.05$ ).....100

**Figure 3.** Activity values of glutathione S-transferase (a, c and e) and thiobarbituric acid reactive substances (b, d and f) in *M. insidiosum* exposed to antiparasitic pesticides for 10 days. Lower-case letters correspond to significant differences between controls ( $t_0$ , black;  $t_{10}$ , gray) and the solvent control, while capital letters indicate significant differences between the solvent control and treatments. Different letters show differences ( $p<0.05$ ).....101

DISTRIBUCIÓN DE SENSIBILIDAD EN CRUSTÁCEOS MARINOS A FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS UTILIZADOS POR LA INDUSTRIA DEL SALMÓN: BASES PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS.

**Figura 1.** Área de estudio situada en la región de Los Lagos (ciudad de Puerto Montt y Chiloé). Puntos rojos indican los sitios muestreados.....123

**Figura 2.** Conteo de número de nauplius eclosionados en *T. longicornis* durante la exposición a piretroides cipermetrina (a) y deltametrina (b).....124

**Figura 3.** Distribución de sensibilidad para crustáceos marino expuestos a: (a) cipermetrina (CP), (b) benzoato de emamectina (EB), (c) deltametrina (DE) y (d) diflubenzuron (DI). La

media de la concentración peligrosa para el 5% de la especies es expresada en cada distribución incluyendo su límite inferior y superior.....126

## TABLAS

### ANTECEDENTES GENERALES

**Tabla 1.** Listado de fármacos antiparasitarios de uso actual en la industria del salmón en Chile.....16

### PREDICTING THE ENVIRONMENTAL CONCENTRATION AND PERSISTENCE OF ANTIPARASITIC CHEMICALS USED IN FEED ADDITIVES IN SALMON FARMING WITH A FUGACITY MODEL.

**Table 1.** Physical and chemical properties of antiparasitic chemicals applied in feed additives in salmon farming.....41

**Table 2.** Input data of the environmental scenario used for the model.....42

**Table 3.** Sensitivity analysis for environmental variables applied in the model.....46

### PREDICCIÓN AMBIENTAL DE PESTICIDAS PIRETROIDES UTILIZADOS POR LA INDUSTRIA DEL SALMÓN MEDIANTE EL MODELO DE FUGACIDAD NIVEL III.

**Tabla 1.** Propiedades físico-químicas críticas de piretroides.....61

**Tabla 2.** Predicción de concentraciones en sedimento y agua para compuestos piretroides. Variabilidad de la modelación se obtuvo mediante el software análisis-riesgo *Crystal ball*.....61

**Tabla 3.** Contribución a la varianza de concentraciones modeladas por el modelo de fugacidad. Las variables consideradas fueron fracción de carbono orgánico (fco), Velocidad de corriente (V) y densidad de salmones por jaula (D).....62

### TOXIC EFFECTS OF ANTIPARASITIC PESTICIDES USED BY THE SALMON INDUSTRY IN THE MARINE AMPHIPOD *MONOCOROPHIUM INSIDIOSUM*.

**Table 1.** Physic-chemical characteristics measured in ecotoxicological tests with marine amphipods.....98

**Table 2.** Nominal concentrations of antiparasitic pesticides used in the acute toxicity test.....98

**Table 3.** Summary results of acute ecotoxicological tests using *M. insidiosum*. LC<sub>50-10d</sub> and

LC<sub>1-10d</sub> are the lethal concentrations 50 and 1% after 10 days of exposure to AP, respectively.....99

**Table 4.** Sediment ecotoxicological studies for emamectin benzoate and cypermethrin in marine invertebrates.....102

DISTRIBUCIÓN DE SENSIBILIDAD EN CRUSTÁCEOS MARINOS A FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS UTILIZADOS POR LA INDUSTRIA DEL SALMÓN: BASES PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS.

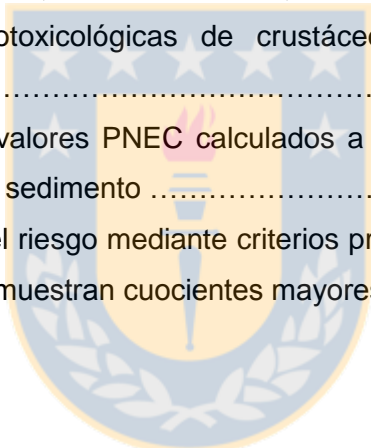
**Tabla 1.** Predicción de concentraciones ambientales de fármacos antiparasitarios en agua utilizando modelo de fugacidad nivel III.....123

**Tabla 2.** Concentración de fármacos antiparasitarios en muestras de sedimento desde diferentes zonas con actividad salmonera en la región de Los Lagos, Chile. EB= benzoato de emamectina; CP= cipermetrina; DE= deltametrina; DI= diflubenzuron.....124

**Tabla 3.** Respuestas ecotoxicológicas de crustáceos locales expuestos a fármacos antiparasitarios.....125

**Tabla 4.** Comparación de valores PNEC calculados a través de métodos probabilísticos y determinísticos para agua y sedimento .....127

**Tabla 5.** Caracterización del riesgo mediante criterios probabilístico y determinístico en agua y sedimento. En negrita se muestran cuocientes mayores a 1000.....127





## RESUMEN

La industria del salmón se ha transformado en la actividad de mayor progreso dentro de la acuicultura en Chile. Sin embargo, la presencia de enfermedades parasitarias ha obligado el uso de fármacos antiparasitarios (FA) para el control y prevención de infecciones en peces. Entre los FA comúnmente utilizados por la industria se encuentran benzoato de emamectina (EB), cipermetrina (CP), deltametrina (DE), diflubenzuron (DI) y teflubenzuron (TE). El objetivo de este estudio fue evaluar el riesgo de FA sobre crustáceos marinos mediante el uso de nuevas herramientas de evaluación tales como modelos predictivos multicompartimentales (fugacity model nivel III) y dispositivos de muestreo pasivo en agua a través del polímero acetato de vinil etileno (EVA). Estas herramientas permitieron predecir y estimar concentraciones ambientales durante un escenario típico de tratamientos en jaulas de salmón en el sur de Chile. A su vez, para la validación de datos modelados y conocimiento de concentraciones ambientalmente relevantes fueron colectadas muestras de sedimentos en áreas con intensa actividad salmonera. Por otro lado, mediante pruebas toxicológicas en laboratorio fue posible evaluar la sensibilidad en crustáceos marinos locales tales como *Tisbe longicornis* (copépodo) y *Monocorophium insidiosum* (anfípodo). En cuanto a la caracterización del riesgo de FA fueron utilizados en este estudio diferentes procedimientos de evaluación tales como métodos determinísticos y probabilísticos. Los resultados muestran que predicciones obtenidas a través del modelo matemático se encontraron en acuerdo con niveles detectados de FA en sedimento, encontrándose en el orden de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , mientras que predicciones en agua reportan concentraciones en el rango de  $\text{ng L}^{-1}$ . En este último caso, dicha predicción en agua fue coincidente con niveles detectados por el muestreador pasivo EVA, el cual registró niveles de CP en el rango de 2 a 4  $\text{ng L}^{-1}$  durante un periodo de tratamientos en jaulas de salmones. Ensayos toxicológicos señalaron efectos agudos y crónicos sobre crustáceos marinos locales, observándose en *T. longicornis* dificultades en el éxito reproductivo de hembras al ser expuestas a los piretroides CP y DE (NOEC= 62.5  $\text{ng L}^{-1}$ ). Para ensayos con el anfípodo *M. insidiosum* en sedimento fueron observadas respuestas letales y subletales con los fármacos EB, CP y DE luego de 10 días de exposición. Estos

anfípodos exhibieron una mayor sensibilidad a DE ( $LC_{50-10} = 7.8 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ,  $IC_{95\%} = 5-11$ ), sin embargo, fue posible observar claras respuestas a nivel bioquímico a través de inducciones en la enzima glutatona S-transferasa (GST) y peroxidación en lípidos (TBARS) después de 2 días de exposición a CP y EB. Los resultados obtenidos muestran que de acuerdo a las diferentes aproximaciones utilizadas en este estudio el método determinístico representó una caracterización que podría sobreestimar el riesgo en el ambiente, por lo que programas regulatorios utilizados en Chile podrían favorecer a la sobreprotección del riesgo sobre el ecosistema. Mientras tanto, métodos probabilísticos mediante la obtención de la concentración peligrosa en el 5 % de las especies ( $HC_5$ ) mostraría un adecuado ajuste a través de distribución de sensibilidad en diferentes especies. De acuerdo a los métodos utilizados para la caracterización de riesgos en las zonas estudiadas en el sur de Chile CP podría manifestar un mayor riesgo para crustáceos marinos de acuerdo a niveles de exposición presentes en las zonas.



## ABSTRACT

The salmon industry has become the activity with more progress in the aquaculture in Chile. However, the occurrence of parasitic diseases has forced to use antiparasitic pharmaceuticals (AP) for control and prevention of fish infections. Within the AP used by the industry are emamectin benzoate (EB), cypermethrin (CP), deltamethrin (DE), diflubenzuron (DI) and teflubenzuron (TE). The aim of this study was to assess the risk of AP on marine crustaceans through the use of new tools such as multicompartimental predictive model (fugacity model Level III) and water passive sampler devices using the polymer ethylene vinyl acetate (EVA). These tools allowed to predict and to estimate environmental concentrations during a typical scenario of treatment on salmon cages in southern Chile. For the validation of modeled data samples of sediment in areas with intensive salmon farm were collected. On the other hand, through toxicological testing in laboratory was possible to assess the sensitivity level of local marine crustaceans such as *Tisbe longicornis* (copepod) and *Monocorophium insidiosum* (amphipod). For risk characterization deterministic and probabilistic methods were used. The results showed that predictions obtained for the mathematical model were in agreement with detected levels of AP in sediment, these were in order of  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Meanwhile, water predictions reported levels in order of  $\text{ng L}^{-1}$  for AP. These water predictions were in according to levels detected by using the water passive sampler EVA, which reported CP concentrations in ranges between 2 to 4  $\text{ng L}^{-1}$  during the treatment period in salmon cages. Ecotoxicological testing showed acute and chronic effects on local marine crustaceans, which were observed for *T. longicornis* reproductive success in females when were exposed to pyrethroids CP and DE (NOEC= 62.5  $\text{ng L}^{-1}$ ). Similarly, through whole sediment test with *M. insidiosum* lethal and sublethal responses were observed when were exposed to EB, CP and DE during 10 days of exposure. The amphipods showed high sensitivity to DE (LC<sub>50-10</sub>= 7.8  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , CI95%= 5-11), while clear biochemical responses through glutathione S-transferase (GST) and lipid peroxidation (TBARS) were observed after 2 days of exposure to CP and EB. According to the different approaches used in this study the deterministic method showed overestimated risk characterization, indicating that the regulatory program used by Chile could give an overprotection of risks in the

ecosystem. While, probabilistic methods through the determination of the hazardous concentration on the 5% of species ( $HC_5$ ) would show an acceptable adjustment using species sensitivity distribution (SSD). In relation to the methods used for characterizing risks in southern Chile, the chemical CP would show a risk on marine crustaceans according to the levels of exposure detected in the study areas.



# Capítulo I: INTRODUCCIÓN



## ANTECEDENTES GENERALES

Un significativo crecimiento ha experimentado la acuicultura en Chile a partir de la década de los noventa. Dentro de esta actividad, la industria del salmón ha alcanzado sobre el 73% de la producción, siendo una de las actividades acuícolas con mayor importancia para el país. Además, este repunte le ha otorgado posicionarse segundo productor a nivel mundial, después de Noruega (FAO, 2010). Productos como *Salmo salar* (salmón del atlántico), *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) y *Oncorhynchus kisutch* (salmón coho) han contribuido principalmente en el crecimiento para las regiones de Los Lagos (X) y Aysén (XI). Sin embargo, la actividad se ha visto afectada por la presencia de enfermedades que han desencadenado pérdidas importantes en su producción (FAO, 2012). Entre los años 2009 - 2010 el cultivo de *S. salar* decayó notablemente (29%) debido a la crisis sanitaria experimentada por la industria (presencia del virus denso dependiente anemia infecciosa del salmón, ISA sigla en inglés), posicionando a *O. mykiss* como la especie con mayor exportación (41%) durante dicho periodo. No obstante, en la actualidad la actividad ha retomado el incremento y estabilidad productiva con salmón del atlántico como principal producto de exportación (SalmonChile, 2013).

El impacto de la acuicultura en el ambiente ha sido ampliamente estudiado (Naylor et al., 2000; Buschmann et al., 2009). Entre estos se destaca: 1) cambios en la biodiversidad y propiedades físico-químicas en sedimentos del fondo marino, consecuencia de desechos orgánicos provenientes desde balsas jaulas (Soto & Norambuena, 2004); 2) aparición de bloom algal, debido al incremento de nutrientes en la columna de agua (Buschmann et al., 2006); 3) escape de salmones cultivados (Volpe et al., 2000); y 4) liberación directa de sustancias químicas al ambiente acuático (Haya et al., 2001). En este último caso, un amplio rango de sustancias químicas son utilizadas por la industria para el tratamiento y prevención de enfermedades en salmones, destacándose antibióticos, pesticidas, anti-fouling, anestésicos y desinfectantes (Burrige et al., 2010). Mucho de estos químicos han sido considerados de preocupación debido a posibles consecuencias adversas sobre el ecosistema y salud humana (Boxall et al., 2003; Sapkota et al., 2008).

La presencia de enfermedades parasitarias en cultivos de salmón ha impactado de manera severa a la industria (Johnson et al., 2004; Bravo et al., 2011), siendo el copépodo de la especie *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) el más importante parásito presente en el sur de Chile (González & Carvajal, 2003; Hamilton-West et al., 2012). Este copépodo, comúnmente llamado “piojo de mar”, presenta un desarrollo de ocho estados dentro de su ciclo de vida, comenzando con tres etapas de vida libre en la columna de agua como nauplius (I y II) y copepodito, posteriormente inicia su ciclo como parásito en peces durante los estados de chalimus (I-IV) y adulto. Durante su etapa parasitaria este copépodo puede generar efectos deletéreos sobre salmones en cultivo entre las que se destacan: erosiones externas, hemorragias sub-epidérmicas, debilitamiento, vulnerabilidad a otras infecciones hasta provocarles su muerte (Costello et al., 2006).

Según recientes diagnósticos de caligidosis realizado por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) en el año 2012 se han reportado una alta densidad de *Caligus* ( $\geq 9$  parásitos adultos) en regiones como Aysén debido a la expansión de la industria luego del brote del virus ISA en la región de Los Lagos durante el año 2007. Actualmente el 60% de la actividad se concentra en la región de Aysén (Sernapesca, 2012).

El uso de fármacos antiparasitarios (FA) es una alternativa que ha permitido mantener a la industria salmonera económicamente viable, permitiendo tratar, mitigar y prevenir las infecciones de agentes biológicos externos (Roth, 2000). FA como la avermectina benzoato de emamectina (EB), las benzoilfenilureas (BPUs) diflubenzuron (DI) y teflubenzuron (TE), además de piretroides sintéticos como cipermetrina (CP) y deltametrina (DE) han sido alternativas quimioterapéuticas utilizadas por la industria salmonera (Tabla 1). Recientemente el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) ha aprobado y registrado el uso de un nuevo producto contra el *Caligus* llamado azametifos (organofosforado). La principal característica de estos FA es presentar una baja solubilidad en agua, alta capacidad de ser adsorbido por material particulado y provocar efectos adversos en invertebrados acuáticos (Hill 1989; Haya et al., 2005). Su aplicación dependerá del mecanismo de acción y estado de desarrollo en que se encuentre el parásito, es decir, para aquellos parásitos adultos, compuestos como avermectina y piretroides mostraran mayor efectividad

que BPU, los cuales actúan de mejor manera en estados juveniles de copépodos parásitos, debido a su acción inhibitoria en la síntesis de quitina de invertebrados (Cunningham, 1986; Casida, 2006).

**Tabla 1.** Listado de fármacos antiparasitarios de uso actual en la industria del salmón en Chile.

<b>Fármaco</b>	<b>Grupo</b>	<b>Mecanismo de Acción</b>	<b>Modo de aplicación</b>	<b>Dosis Terapéutica</b>
Cipermetrina	Piretroide	<i>Modulador de canales de Sodio</i>	Baño (30-60 min)	0.005 mg/L
Deltametrina	Piretroide	Interfiere en canales de sodio de la membrana nerviosa, disrupción en la transferencia de iones y transmisión de impulsos nerviosos entre células nerviosas.	Baño (30 min)	0.003 mg/L
Diflubenzuron	Benzoylphenylurea	<i>Inhibidor de la síntesis de quitina</i>	Aditivo de alimento	10 mg/Kg
Teflubenzuron	Benzoylphenylurea	Inhibe la normal formación de exoesqueleto en insectos.	Aditivo de alimento	10 mg/Kg
Benzoato de emamectina	Avermectina	<i>Activador de canales clorados</i> Interfiere con la transferencia de iones y transmisión de impulsos entre células.	Aditivo de alimento	0.05 mg/kg
Azametifos*	Organofosforado	<i>Inhibidores de la actividad acetilcolinesterasa</i>	Baños (60 min)	0.1 mg/L

\*Recientemente aprobado por el servicio agrícola y ganadero (SAG).

La toxicidad de estos compuestos sobre invertebrados marinos ha sido ampliamente estudiada, siendo particularmente el grupo de crustáceos los más vulnerables a la



acción de estos químicos (Haya et al., 2005; Burridge et al., 2010). Brevemente, reportes previos han señalado efectos adversos sobre crustáceos expuestos a EB (SEPA, 1999; Bright y Dionne, 2005), entre los cuales se ha registrado alteraciones en el desarrollo de langostas (Waddy et al., 2002; Waddy et al., 2007) y efectos reproductivos en copépodos (Willis y Ling, 2003).

Para el caso de las BPU's estudios previos han señalado que organismos marinos muestran susceptibilidad a bajas concentraciones de DI, como fue el caso del camarón *Palaemonetes* sp. y el copépodo *Acartia tonsa*. Para este último se registró una reducción del 50% en la viabilidad de eclosión de sus huevos (Haya et al., 2005). Por otro lado, Wright et al. (1996) determinó que estados naupliares del copépodo *Eurytemora affinis* mostraría alteraciones crecimiento y reproducción al exponerse a DI.

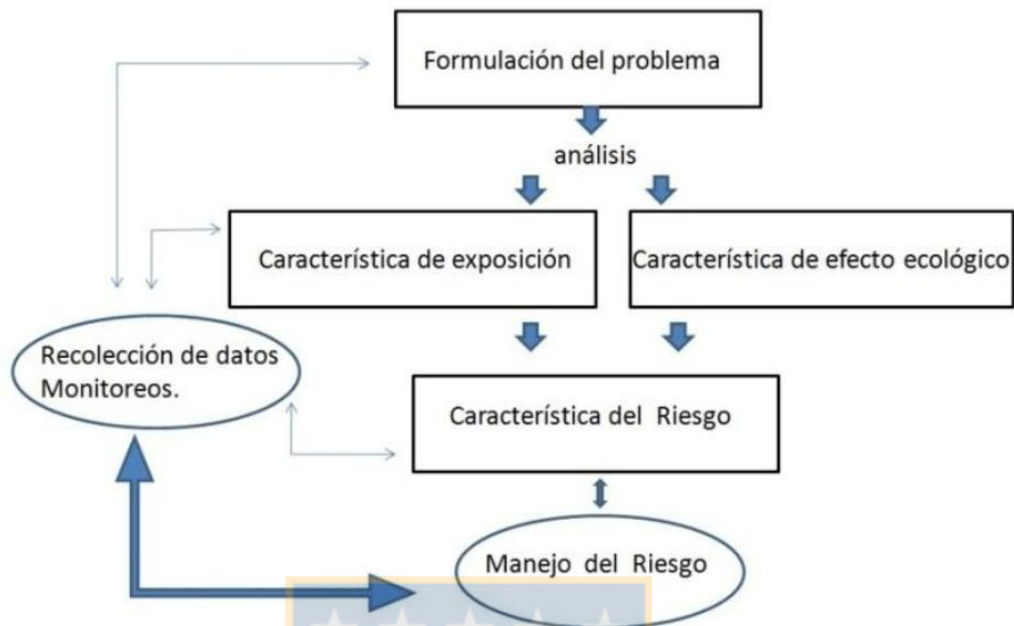
En tanto, tratamientos a través de baños en jaulas utilizando productos piretroides es otra vía directa de ingreso de químicos al sistema marino. Varios estudios han mostrado potentes efectos agudos y crónicos de CP en invertebrados marinos tales como copépodos (Barata et al., 2002a; Barata et al., 2002b; Medina et al., 2002, Medina et al. 2004; Willis y Ling, 2004, Willis et al., 2005), crustáceos bentónicos (Gowlan et al. 2002a) y bivalvos (Gowlan et al. 2002b; Ait et al., 2011; Köprücü et al., 2010).

La evaluación de riesgo (ER) es un proceso por el cual se estima la probabilidad de algún efecto adverso por causa a la exposición a un estresor o químico. Su principal objetivo es caracterizar e identificar los riesgos y eventualmente crear decisiones, bajo cierta incertidumbre, con el propósito de prevenir daños al ambiente y a la diversidad de organismos presentes en el ecosistema (Newman y Unger, 2003). Para evaluar una sustancia química emitida al ambiente, en primer lugar una ER requiere de la formulación del problema, la cual determinará las preguntas que se harán durante el proceso de evaluación. Posteriormente, como parte del análisis, la determinación de los potenciales efectos a la exposición a un químico específico permitirá efectuar una caracterización de los riesgos asociados.

El primer paso dentro de un método determinístico de análisis es realizar una evaluación de exposición, esto permitirá estimar las concentraciones esperadas en el ambiente (Predicted Environmental Concentrations, PEC sigla en inglés). Un PEC

puede ser estimado por medio de datos provenientes de modelos matemáticos predictivos, o bien, a través de mediciones en campo. El segundo paso es identificar y describir efectos a través de datos experimentales o ensayos ecotoxicológicos sobre organismos vivos, los cuales permitirán determinar la concentración esperada sin efecto en el ambiente (Predicted Non Effect Concentration, PNEC sigla en inglés). Para esta parte de la evaluación de efectos es necesario obtener información disponible en literatura que permita contemplar efectos adversos en otras especies ensayadas con el químico de interés. El valor asignado como PNEC puede ser ajustado mediante un factor de evaluación o seguridad (FS). Los valores asignados para un FS son utilizados con el propósito de compensar incertidumbres tales como la diferencia en sensibilidad inter e intra-especies, transferir información de laboratorio a condiciones de campo, o bien, extrapolar ensayos agudos a crónico. Un factor puede variar de acuerdo a la disponibilidad y calidad de información (Chapman et al., 1998; EC, 2003).

La caracterización del riesgo implica el cálculo de un cociente de riesgo (RQ, sigla en inglés) el cual relaciona valores PEC y PNEC. De acuerdo a la razón PEC/PNEC se decidirá si el químico en evaluación presenta o no riesgos en el ambiente. Cuando el valor del cociente es mayor que uno ( $PEC > PNEC$ ) se considera una sustancia química con riesgos ambientales, por el contrario, si el valor RQ es menor que uno ( $PEC < PNEC$ ) se considera que la presencia del agente contaminante no representaría riesgos en el ecosistema. Posterior a la caracterización del riesgo la etapa final en la evaluación corresponden a un plan de manejo hacia la sustancia química de interés (Figura 1). Aquí la recolección de datos, a través de monitoreos es fundamental para un adecuado seguimiento y prevención de posibles perturbaciones en el ambiente.



**Figura 1.** Esquema conceptual del procedimiento en una evaluación de riesgo (Newman y Unger, 2003).

La Cooperación Internacional en Armonización de Técnicas Requeridas para Registro de Productos Medicinales Veterinarios (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, VICH) corresponde al comité de gobiernos organizados el cual tiene como objetivo evaluar el impacto ambiental de medicinas veterinarias en países como Estados Unidos, Japón y aquellos pertenecientes a la Unión Europea. Por medio del desarrollo de dos documentos guías (Fase I y Fase II) estas naciones han establecido un control y registro en el uso de productos medicinales en ecosistemas acuáticos y terrestres.

El documento guía Fase I corresponde a una serie de decisiones dirigidas principalmente a evaluar la exposición de productos de uso veterinarios. Por medio de un árbol de preguntas se requiere de información que permita decidir la continuidad del producto a una siguiente fase de evaluación (VICH, 2000). Es así como aquellos productos veterinarios que requieran de un mayor análisis deberán ser sometidos a una segunda fase, el cual cumple el objetivo de evaluar el potencial

efecto de químicos veterinarios sobre organismos no objetivos en el ambiente, incluyendo especies acuáticas y/o terrestres. Para una Fase II es necesario realizar una detallada evaluación mediante el conocimiento de propiedades físico-químicas, destino y efectos del químico en el ambiente (VICH, 2004). La incorporación de diferentes niveles de evaluación para Fase II permiten iniciar un estudio mayormente simplificado y de bajo costo, en base a la escasa información disponible (Nivel A). Sin embargo, si el riesgo aún continúa es necesario refinar la información (Nivel B).

La regulación de productos veterinarios utilizados por la industria del salmón en Chile se basa principalmente por lo establecido por las normas internacionales VICH. El Servicio Agrícola y Ganadero es el organismo responsable del registro de productos antiparasitarios en la acuicultura, rigiéndose mediante la Resolución N° 665 (SAG 2010). Esta resolución establece parámetros en el uso de productos farmacéuticos con uso exclusivamente veterinarios con el objetivo que no generen daños en el ambiente. A diferencia de normativas internacionales esta resolución propone parámetros mayores a los establecidos por la comisión europea (EC, 2003), asignando valores de RQ entre 0 y 1000. Si el valor de RQ es menor a 100 el químico no presenta riesgo; si RQ se encuentra entre 100 y 1000 es necesario establecer un programa de monitoreo ambiental; y finalmente si RQ es mayor a 1000 el riesgo del químico es evidente.

Potenciales daños ambientales provocados por la industria del salmón no han sido sistemáticamente controladas en Chile (Vester & Timme, 2010), por lo que nuevos métodos de evaluación que puedan contribuir hacia un mayor control de químicos de uso farmacéutico podrían fortalecer ciertas políticas enfocadas en la conservación ambiental. Además, el desarrollo de conocimiento científicos para zonas con intensa actividad acuícola favorecen a la comprensión de escenarios locales de aplicación de productos y elaboración de planes de manejo frente a posibles riesgo en el ambiente marino (Buschmann et al., 2009). Este estudio intenta evaluar los riesgos de FA utilizados por la industria del salmón para el tratamiento de *Caligus rogercesseyi* en sistemas marinos. Para ello serán utilizadas innovadoras herramientas que permitan evaluar niveles de exposición (Capítulo 2) y toxicidad sobre crustáceos marinos (Capítulo 3), para posteriormente caracterizar los posibles riesgos en zonas con actividad salmonera en el sur de Chile (Capítulo 4).

## Referencias

- Ait AM, FM Ait & A Mouabad, 2011. Effects of Cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol. 60(3):462-70.
- Barata C, M Medina, T Telfer & DJ Baird, 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.
- Barata C, DJ Baird, M Medina, A Albalat & AMVM Soares, 2002b. 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.
- Boxall ABA, DW Kolpin, B Halling-Sorensen & J Tolls, 2003. Are Veterinary Medicines causing Environmental Risks? Environmental Science and Technology: 286-294.
- Boxshall GA & S Bravo, 2000. On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen system in southern Chile. Contributions to Zoology. 69: 137–146.
- Bravo S, GA Boxshall & G Conroy, 2011. New cultured host and a significant expansion in the known geographical range of the sea louse *Caligus rogercresseyi*. Bulletin of the european association of fish pathologists 31: 156-160.
- Bright DA & Dionne S, 2005. Use of Emamectin Benzoate in the Canadian finfish aquaculture industry: A review of environmental fate and effects. Environment Canada review, Canada, pp. 74. <http://publications.gc.ca/collections/Collection/En4-51-2005E.pdf>
- Burrige L, JS Weis, F Cabello, J Pizarro & K Bostick, 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 306: 7-23.
- Buschmann AH, F Cabello, K Young, J Carvajal, DA Varela & L Henríquez, 2009. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. Ocean & Coastal Management 52: 243–249.
- Buschmann AH, VA Riquelme, MC Hernández-González, D Varela, JE Jiménez, LA Henríquez, PA Vergara, R Guíñez & L Filún, 2006. A review of the impacts of salmonid farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. ICES Journal of Marine Science 63: 1338-1345.

- Casida JE, 2006. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chem. Res. Toxicol.* 22: 609–619.
- Chapman PM, A Fairbrother & D Brown, 1998. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 99–108.
- Costello MJ, 2006. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology* 22: 475-483.
- Cunningham PA, 1986. A Review of Toxicity Testing and Degradation Studies Used to Predict the Effects of Diflubenzuron (Dimilin®) on Estuarine Crustaceans. *Environmental Pollution* 40:63-86.
- European Commission (EC), 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment Parte II. european commission joint research centre. European Chemicals Bureau. 7-131 pp.
- FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (versión español). Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.htm>
- FAO, 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura (versión español). Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s00.htm>
- González L & J Carvajal, 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* 220: 101-117.
- Gowland BT, CF Moffat, RM Stagg, DF Houlihan & IM Davies, 2002a. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res.* 54(2):169-77.
- Gowland B, L Webster, R Fryer, I Davies, C Moffat & R Stagg, 2002b. Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ Pollut.* 120(3):805-11.
- Hamilton-West C, G Arriagada, T Yatabe, P Valdés, LP Hervé-Claude & S Urcelay, 2012. Epidemiological description of the sea lice (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 104: 341-345.
- Haya K, LE Burrige & BD Chang, 2001. Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry. *ICES Journal of Marine Science* 58: 492-496.
- Haya K., LE. Burrige, IM Davies & A Ervik, 2005. A Review and Assessment of Environmental Risk of Chemicals Used for the Treatment of Sea Lice Infestations of Cultured Salmon. *Hdb Env Chem* 5: 305-340.
- Hill IR, 1989. Aquatic Organisms and Pyrethroids. *Pestic. Sci.* 27: 429-465.
- Johnson SC, JW Treasurer, S Bravo, K Nagasawa & Z Kabata, 2004. A Review of the Impact of Parasitic Copepods on Marine Aquaculture. *Zoological Studies* 43: 229-243.

- Köprücü K, SM Yonar & E Seker, 2010. Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. *Fish Sci* 76:1007–1013.
- Medina M, C Barata, T Telfer & DJ Baird, 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.
- Medina M, C Barata, T Telfer & DJ Baird, 2004. Effects of cypermethrin on marine plankton communities: a simulated field study using mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 236–245.
- Naylor RL, RJ Goldberg, JH Primavera, N Kautsky, MCM Beveridge, J Clay, C Folke, J Lubchenco, H Mooney & M Troell, 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.
- Newman M & M Unger, 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2nd Edition. Lewis Publisher. Florida, USA. Chapter 13: 279-299.
- Resolución N°665, 2010. Parámetros para determinar que los productos farmacéuticos de uso exclusivamente veterinarios no provoquen daños al ambiente. Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura, SAG. 2 pp.
- Roth M, 2000. The availability and use of chemotherapeutic sea lice control products. *Contribution to Zoology* 69 (1-2): 109-118.
- SalmonChile, 2013. Acuicultura, exportaciones de salmónidos. Revisión bibliográfica: 27 de agosto 2013. Web: [http://www.directorioaqua.com/contenido/dapel\\_esalmonidos.php](http://www.directorioaqua.com/contenido/dapel_esalmonidos.php).
- Sapkota A, AR Sapkota, M Kucharski, J Burke, S McKenzie, P Walker & R Lawrence, 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environment International* 34: 1215-1226.
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), 1999. Emamectin benzoate, an environmental assessment. <http://www.sepa.org.uk/policies/index.htm>, pp 23.
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), 2012. Informe de seguimiento programa sanitario específico de vigilancia y control de caligidosis. Septiembre 2012. 9 pp. Web: [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=976&Itemid=903](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=976&Itemid=903).
- Soto D & F Norambuena, 2004. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *Journal applied Ichthyology* 20: 493-501.
- Vester, H & M Timme, 2010. Call for cooperation to contain damage by Chile's salmon farms. *Nature* 465: 869.

- VICH, 2000. Environmental Impact Assessment (EIAs) For Veterinary Medicinal Products (Vmpps) - Phase I. June 2000. VICH GL6 (Ecotoxicology Phase I), pp 9.
- VICH, 2004. Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II Guidance. October 2004. VICH GL38 (Ecotoxicology Phase II), pp 36.
- Volpe JP, EB Taylor, DW Rimmer & BW Glickman, 2000. Evidence of natural reproduction of aquaculture-escaped Atlantic salmon in a Coastal British Columbia River. *Conservatory Biology* 14: 899-903.
- Waddy SL, LE Burridge, MN Hamilton, SM Mercer, DE Aiken & K Haya, 2002. Emamectin benzoate induces molting in American lobster, *Homarus americanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1069–1077.
- Waddy SL, VA Merritt, MN Hamilton-Gibson, DE Aiken & LE Burridge. 2007. Relationship between dose of emamectin benzoate and molting response of ovigerous American lobsters (*Homarus americanus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 95-99.
- Willis KJ & N Ling, 2003. The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide to planktonic marine copepods. *Aquaculture* 221: 289-297.
- Willis KJ & N Ling, 2004. Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine copepods. *Aquaculture Research* 35: 263-270.
- Willis KJ, PA Gillibrand, CJ Cromey & KD Black, 2005. Sea lice treatments on salmon farms have no adverse effects on zooplankton communities: a case study. *Marine Pollution Bulletin* 50: 806-816.
- Wright DA, JD Savitz, R Dawson, J. Magee & RA Smucker, 1996. Effect of diflubenzuron on the maturation and reproductive success of the copepod *Eurytemora affinis*. *Ecotoxicology* 1: 47-58.



## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Considerando que fármacos antiparasitarios (FA) liberados al ambiente definen su movilidad y afinidad de acumularse en ciertos compartimentos ambientales según propiedades físico-químicas y variables ambientales, entonces se espera que:

*Hipótesis 1:* La afinidad de FA por un compartimento determina su concentración en el ambiente y biodisponibilidad en agua.

*Hipótesis 2:* Bajas concentraciones ( $\mu\text{g L}^{-1}$  o  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de FA pueden sobrepasar umbrales de sensibilidad crónica en organismos bentónicos y/o zooplanctónicos.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial riesgo ambiental en crustáceos marinos de fármacos antiparasitarios (FA) utilizados actualmente para el control del copépodo ectoparásito en el sur de Chile.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la exposición de FA mediante herramientas predictivas como modelos matemáticos de fugacidad (fugacity model Nivel III) bajo un escenario típico de aplicación en balsas jaulas.
2. Cuantificar concentraciones de FA en compartimentos ambientales como agua y sedimento en zonas con intensa actividad salmonera.
3. Estimar concentraciones en agua mediante el uso de muestreadores pasivos durante un periodo de tratamientos en centro de cultivos.
4. Evaluar efectos ecotoxicológicos agudos y crónicos en crustáceos marinos como el copépodo *Tisbe longicornis* y en el anfípodo *Monocorophium insidiosum*.
5. Caracterizar el riesgo de FA utilizados actualmente por la industria del salmón.

## Capítulo II: EVALUACIÓN DE EXPOSICIÓN



## Paper N°1:

# Predicting the environmental concentration and persistence of antiparasitic chemicals used in feed additives in salmon farming with a fugacity model.

Felipe Tucca,<sup>\*a</sup> Karla Pozo,<sup>b,c,d</sup> Francisco Encina,<sup>e</sup> Francesca Borghini<sup>d</sup> and Ricardo Barra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Aquatic Systems Research Unit, EULA-Chile Environmental Science Centre, University of Concepcion, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile.

<sup>b</sup>RECETOX Masaryk University, Kamenice 753/, Pavillon A-29, 625 00 Brno, Czech Republic.

<sup>c</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile.

<sup>d</sup>Department of Environmental Sciences, University of Siena, Via P.A. Mattioli 4, 53100 Siena, Italy.

<sup>e</sup>Environmental Studies Center, Department of Environmental Sciences, Catholic University of Temuco. Campus San Francisco, Manuel Montt 56, Temuco, Chile.

\*Corresponding author at: Fax: +56 41220 7076; Tel: +56 41266 1220.

E-mail address: [f.tuca@udec.cl](mailto:f.tuca@udec.cl) (F. Tucca).

## Environmental impact

The most prominent route of entry of the pollutants into the environment is likely through direct discharge of aquaculture products. Antiparasitic chemicals released can lead to potential negative effects to the environment and harm non-target organisms. The main contribution of our study was to predict the fate and potential concentrations of antiparasitic chemicals, used in fish feed, through environmental analyses in an area with high salmon farming activity. This study helps us develop a better interpretation and understanding of the fate and transport of organic compounds released into the marine environment, which can be an important tool for conducting risk assessment and improving chemical management in salmon farming industry.

## Abstract

The notable growth in aquaculture activity has triggered the need for research concerning the potential environmental impact of chemicals used in the salmon farms industry for treatment and diseases control. In this study, antiparasitic pharmaceuticals such as emamectin benzoate (EB), diflubenzuron (DI) and teflubenzuron (TE), used as feed additives in salmon farming, were evaluated through a steady-state multi-compartmental fugacity-based model to predict their concentrations and persistence under typical application scenarios. Concentrations of target compounds were measured in sediment samples from an area surrounding salmon cages in southern Chile. Model results were in agreement with measured sediment concentrations. Sensitivity analysis was evaluated using the Monte Carlo technique and showed that the organic carbon fraction is one of the most influential variables in predicting concentrations of target compounds in sediments, contributing to 90% of the variance, while water current speed was shown to contribute 60%. The model was used to evaluate the fate of the target chemicals in a typical salmon farm treatment scenario with chemical applications for seven consecutive days. The model was useful in predicting maximum concentrations in sediment and for illustrating relative persistence of target chemicals in affected sediments and the water column. This first application of multi-compartmental fugacity models to salmon farming shows the potential of using such models as risk assessment and risk management tools for guiding salmon farming development in Chile.

## 1. Introduction

The growth of aquaculture in the world and the role it plays as a food source for humans has increased during the past decades. Salmon farming constitutes a growing share in international trade, with Norway and Chile leading the worldwide production with ~36% and ~28% in salmon production, respectively<sup>1</sup>. In Chile, this activity is considered one of the main sources of income for the country. However, recent concerns about the adverse impacts to the ecosystem's health have been voiced<sup>2</sup>. For instance, one such effect is the increase in organic matter deposition in sediments beneath and surrounding the farming cages, which is influencing changes in sediment composition<sup>3</sup>. The increased use of chemicals in salmon farming and their potential effects on the environment has also been identified as a concern<sup>4</sup>.

In recent years, salmon aquaculture production has led to increased occurrence of diseases, which has severely impacted the industry<sup>5,6</sup>. The copepod *Caligus rogercresseyi*<sup>7</sup> is the most important harmful parasite in fish farms in Southern Chile<sup>8-10</sup>. A range of chemicals used as feed additives are used in the salmon farming to treat, prevent and mitigate this infection<sup>11</sup>. For instance, avermectin emamectin benzoate (EB). This is added to salmon feed, interfering with the parasite's ion transfer and transmission of impulses between nerve cells. Other compounds used in salmon farming include benzoylphenylureas (BPUs) teflubenzuron (TE) and diflubenzuron (DI), which also contribute with a secondary effect on non target organisms *i.e.*, with the inhibition of the normal formation of the exoskeleton in invertebrates<sup>12</sup>. The optimum therapeutic doses ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ fish day}^{-1}$ )<sup>13</sup> for seven consecutive days of treatment have been estimated to be 0.05 for EB and 10 for both Di and Te<sup>14</sup>. The release of these chemicals into the marine environment can lead to potential negative effects on the environment and non target organisms when the water hydrodynamic characteristics are not able to facilitate the complete dispersion and/or degradation of the applied compounds<sup>15</sup>.

Under field conditions, the sampling and analysis of chemicals is challenging which is why it is advantageous to be able to describe chemical fate and estimate chemical concentrations in different environmental compartments using simple models, such as the multi-compartmental fugacity-based model<sup>16,17</sup>. The fugacity models have been

widely applied to simulate the fate and transport of organic contaminants released into aquatic systems in an attempt to understand the distribution of chemicals in different environmental compartments of interest<sup>18-21</sup>.

Fugacity is defined as the chemical activity of a gas, in terms of the escaping or flux tendency from one compartment to another, expressed in units of pressure (Pascal, Pa). The fugacity models can distinguish different levels of complexity depending on the availability and quality of input data on the chemicals and on the system. The level III fugacity model gives information on the mass transfer processes in environmental compartments such as air, water, soil and sediment, assuming a non-equilibrium (e.i. without net transfer of mass between compartments) and steady-state condition (e.i. constancy with time). Using this approach each bulk compartment is considered to be homogeneous in composition and properties. The model includes mathematical expressions for inter- and intra- media transport/loss by diffusion, advection and degradation processes.

To use the model, it is important to know basic information regarding the environmental conditions (e.g. hydrodynamics), physical and chemical properties of chemicals, half-lives of the target compounds in the different environmental compartments and emission rates into the environment. The physical and chemical properties of the compounds will define the potential mobility and reactivity of the target compounds, whereas the environmental conditions will determine the extent to which these potentials will be manifested.

The main objective of this study was to predict the fate and potential concentrations of antiparasitic chemicals used in fish feed and applied to salmon farms, using a modified level III fugacity model in a typical fish farm scenario. The model was designed to simulate a salmon cage scenario where chemicals are applied over consecutive days and the concentrations of the chemicals are predicted in the sediments beneath the cage following the treatment. In order to validate the model, predicted sediment concentrations will be compared with measured concentrations of the target chemicals. This approach will allow us to understand and estimate the potential behaviour profile of chemicals used as salmon farming feed additives in local areas where little information is available. The study will also provide new

information and tools for guiding the future development of the intensive salmon farm activities in Southern Chile.

## 2. Experimental

### 2.1 Model Description

The fugacity model was used to evaluate the fate, distribution, and predicted compartment concentrations of three antiparasitic chemicals added to salmon feed, in a typical application scenario. As a first step, a modified fugacity-based model was developed on an excel spreadsheet, where the total volume for environmental compartments were defined. This model considers a homogeneous system, which includes water, sediment, particles and fish compartments. The model required both physical and chemical and environmental data as inputs for the calculation of concentration predicted. Environmental data were obtained from the Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) for a salmon farming area close to Puerto Montt city in southern Chile<sup>22</sup>.

The partitioning of chemicals between compartments was described by the equilibrium criterion of fugacity  $f$  (Pa). Fugacity is related to the concentration  $C_i$  ( $\text{mol m}^{-3}$ ) by the expression  $C_i = f \times Z_i$ , where  $Z_i$  is the fugacity capacity ( $\text{mol m}^{-3} \text{Pa}^{-1}$ ) for each phase ( $i =$  water, sediment, biota or fish, particles). In addition, properties such as solubility ( $S$ ,  $\text{mol m}^{-3}$ ), vapour pressure ( $VP$ , Pa) and octanol-water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) of antiparasitic chemicals were used (Table 1). Environmental data such as the organic carbon fraction ( $f_{oc}$ ) was estimated through an approximation factor of 1.7 from the organic matter data<sup>23</sup>. For organic carbon partition coefficient ( $K_{oc}$ ) is assumed a coefficient of 0.41 calculated by Karickhoff<sup>24</sup>, which suggests that  $K_{oc}$  is correlated as  $0.41 \times K_{ow}$ . Furthermore, amounts (mol) for each antiparasitic chemical according to compartment volume were calculated.

Chemical movements between phases by both diffusive (advective transport, adsorption of chemical by sediment from water) and non-diffusive (inter-compartment transport and reaction) processes were described by  $D$  value ( $\text{mol Pa}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), which can be related to chemical transfer flux. The antiparasitic pharmaceutical fate processes in the model are illustrated in Figure 1. In order to determine the



environmental flow, the current speed was considered as the variable for the model. However, the reaction rate was calculated according to the expression  $VZk$ , where  $V$  is the volume of the phase ( $m^3$ ) and  $k$  is the first-order rate constant with units of reciprocal time ( $h^{-1}$ ). The rate constants  $k$  ( $h^{-1}$ ) was calculated through half-lives ( $t_{1/2}$ ) obtained by each targeted chemical through the equation  $k = \ln 2/t_{1/2}$ .

Environmental persistence for pharmaceutical chemicals in water and sediment compartments was estimated during seven consecutive days of treatment in salmon cages. The iterative simulation was performed by equation decay rate which included processes such as feed loss, excretion, advection transport and degradation rate processes.

## *2.2 Description of the Environmental Scenario*

The environmental scenario for the salmon farm model is shown in Table 2. A conceptual drawing with dimensions of the model is shown in the supplementary information (Figure S1†). The environmental data available for a salmon farm in Southern Chile located between  $41^{\circ}33'S$  and  $73^{\circ}00'W$  was obtained through a literature survey. This model was applied to an evaluative environment that integrated 10 salmon cages with dimensions of 20 m x 20 m x 16 m. The depth of the water column was 50 m, with a homogeneous average flow of 4 to 8  $cm\ s^{-1}$ . Suspended water particles are included in the calculation of chemical transports (advection) and persistence in sediment (e.g. sedimentation) as suggested by Mackay<sup>17</sup>.

The emission rate for antiparasitic chemicals in each treatment was done according to the doses added in feed registered in literature, recommended by the suppliers. Doses in salmon feed of  $0.05\ mg\ kg^{-1}$  for EB and  $10\ mg\ kg^{-1}$  for DI and TE were used.

## *2.3 Sediment Sampling*

Sediment samples were collected one week after the antiparasitic treatment. The superficial sediment samples were obtained using a Van Veen grab ( $0.3\ m^2$ ) around salmon cages. Samples were collected at distances ranging from 10 to 400 m from the salmon cages, according to the dominant current (south-west direction) and tidal influence. The average water column depth at the site was 64 m. Samples were then

stored in the dark to avoid contamination and transported to the laboratory in an ice cooler where they were weighed and freeze dried at -50°C and 0.2 millibars. Concentrations of antiparasitic pharmaceuticals detected in sediment were compared with model calculations carried out under the steady state assumption.

#### *2.4 Chemical Analysis*

Sediment samples (5-10 g) were homogenised with anhydrous sodium sulphate and extracted three times with 50 ml n-hexane in an ultrasonic bath for 20 min and centrifuged at 1500 rpm to separate sediment from solvent extract. Final solvent extracts (150 ml) were concentrated to 5 ml in a rotary evaporator and exchanged into 1 ml of methanol. The above procedure was checked for recovery and reproducibility. Procedural blanks and surrogate recovery tests were conducted for quality assurance and quality control (QA/QC) purposes. The recovery method consisted of analyzing 5 g of sodium sulphate (n=3 replicates) with a known spiked concentration (500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) of the target compounds, and treated as field samples. Recovery standards were satisfactory, accounting ~70% for DI, 75% for TE and ~72% for EB. The final extracts were analyzed by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry with an Electro Spray Ionization source (ESI LC-MS/MS) for DI and TE whereas an Atmospheric Pressure Chemical Ionization source (APCI) was used for EB determination. A reversed phase column (Spherisorb ODS2 Hypersil, 150 x 2.1 mm ID, 5 mm particle size) was used and the solvent flow rates were applied according to Barnes et al.<sup>27</sup> for DI, TE and EB with modifications (a flow rate of 300  $\mu\text{l min}^{-1}$  and 5  $\mu\text{M}$  ammonium acetate in methanol) according to Krogh et al.<sup>28</sup>. LC-MS analysis was performed using a Thermo system with a Finnigan surveyor autosampler, an MS pump, and a Finnigan LTQ. Following preliminary evaluation by direct infusion of standard solutions, ESI LC-MS analysis was performed in negative ion mode for DI and TE. For EB determination was performed in positive APCI mode. Peaks were identified by their absorption and characteristic  $\text{MH}^+$  and  $\text{MS}^2$  spectra. Their concentrations were determined by comparing peak areas with those of standard solutions prepared using commercially available purified pesticides from Sigma-Aldrich (Pestanal St Louis, USA).

Data quality was checked for every six samples by analyzing blanks (acetonitrile and methanol), which were always below the detection limit ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The analysis of replicate samples showed relative standard deviations of less than 20%.

### *2.5 Sensitivity and Uncertainty Analysis*

Sensitivity analysis is an important methodology used to test the sensitivity of the model to changes of parameters and identify the most influential parameters for the model output. In this study, sensitivity analysis was performed for the inputs parameters such as current speed, organic carbon fraction and biomass of fish by cage, which the contribution to variance for water and sediment was calculated.

For this model, water, sediment and salmon concentration were the outputs in the model. In this study, Monte Carlo simulation was performed to assess the uncertainty of predictions based on the probability distributions of input parameters. Monte Carlo simulation was run 1,000 times repeatedly using Crystal Ball 11.1.1<sup>30</sup> to get the distribution of the output.

## **3. Results and Discussion**

### *3.1. Emamectin benzoate (EB)*

The concentrations and mass flux of EB are shown in Figure 2a. The concentrations predicted in water, sediment and fish were in the range of  $1.9$  to  $4.6 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $1.6$  to  $18.8 \mu\text{g kg}^{-1}$  and  $463$ - $916 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. The calculated degradation rate between water and sediment were similar, while that in fish the degradation rate was higher. For each compartment high amount of EB in biota (81%), particles (13%) and sediment (4.4%) were calculated. Additionally, the results suggest that advective transport and sedimentation processes were important fluxes in the model.

The fugacity-based model also calculated that EB has a high persistence in sediment  $\sim 100$  days. These results are consistent with information found by other authors in anaerobic sediment conditions beneath the salmon cages<sup>15, 31, 32</sup>. For instance, the Scottish Environment Protection Agency (SEPA) has reported a degradation time for EB to be between 164 to 175 days in marine sediment<sup>31</sup>. However, a later study determined that the half-life of EB could be higher than 175 days<sup>32</sup>.

Figure 3 shows the modeled and measured concentrations for EB in sediments from a salmon farm area in Southern Chile. The modeled and measured concentrations are presented in the supplementary information (Table S1-S2†). The results show that the average predicted EB concentrations ( $6.82 \pm 3.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) were similar to the measured concentrations ( $8.41 \pm 3.74 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in sediment samples. These results were in agreement with EB levels reported by SEPA in 2007 ( $0.04 - 5.38 \mu\text{g kg}^{-1}$ )<sup>33</sup> and SEPA in 2011 ( $0.16$  to  $44.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ )<sup>34</sup> for salmon farming areas in Scotland. Levels of EB have also been reported in other salmon farming areas in Canada, with levels ranging from  $0.6$  to  $2.7 \mu\text{g kg}^{-1}$  (measured within 10-100 m of the salmon farming activity)<sup>35, 36</sup>.

Recently, Ikonomou and Surridge<sup>37</sup>, reported EB concentrations in sediment and water samples, using ultra trace determinations. In sediment the levels were within the same order of magnitude of the concentrations detected in Southern Chile, ranging from  $0.051$  to  $35 \mu\text{g kg}^{-1}$  (within a radius of 50 to 100 m of the salmon farm). However, in the water samples the concentrations ranged from  $3$  to  $209 \text{pg L}^{-1}$ , which is substantially lower than water concentration calculated by the model (between  $1.9$  to  $4.6 \text{ng L}^{-1}$ ).

The contribution of organic carbon fraction, current speed and salmon biomass (expressed as density) to the variance are showed in Table 3. It is suggested that organic carbon fraction contributes 92% of the observed variance in sediment; while the current speed (advective transport) contributes 63% to the distribution of EB in water. The salmon density in salmon cages contributed 36% of the variability of EB in water.

The predicted persistence (days) of the antiparasitic pharmaceuticals concentrations are showed in Figure 4. The predicted maximum concentration for EB in water and sediment was reached after 7 days of treatment. According to the model the decrease in EB concentrations can be explained by two factors, namely i) the transport and ii) degradation processes, which determine the distribution and environmental fate of EB in water (see Figure 2a). Degradation processes (such as photolysis, hydrolysis and biodegradation) incorporated in the half-life variable of EB was critical for determining EB occurrence in water. Transport by advective process is also important in removing/dispersing chemicals from the water column surrounding the salmon farm.

Therefore, EB concentrations in the water column are expected to decrease rapidly to trace levels, following the application period<sup>4</sup>. In the case of sediments, the estimated persistence for EB could be explained by considering both processes *i.e.*, its slow degradation rate in sediment and the high sedimentation rate. The EB partitions to suspended particles can occur in the water column, mainly, due to its high log  $K_{ow}$ , which results in a transport to sediments and later persistence.

### 3.2 Benzoylphenylureas

Modeled concentrations and mass fluxes for the benzoylphenylureas (BPUs), DI and TE, are shown in Figure 2b and 2c, respectively. The model predicts high concentrations in water, sediment and fish for BPUs. For water degradation rate and advection was reported as most important loss fluxes for these chemicals in the water column. This predicted concentrations in water ranged from 411 to 1030 ng L<sup>-1</sup> and 410 to 898 ng L<sup>-1</sup> for DI and TE, respectively. However, previous studies have shown that the initial concentration of BPUs can decrease quickly in the time, due to processes such as photolysis, which causes the dissipation of the chemical in the aquatic environment<sup>38</sup>. Other authors have also determined low persistence of BPUs in freshwater<sup>39, 40</sup>. Predicted concentrations of BPUs in sediments ranged from 0.3 to 2.9 µg kg<sup>-1</sup> and 9.1 to 104 µg kg<sup>-1</sup> for DI and TE, respectively. The moderate hydrophobic nature and low water solubility of the BPUs allows them to remain bound to organic matter and sediment<sup>4</sup>. On the other hand, modeled concentrations in fish ranged between 6.9-14.4 mg kg<sup>-1</sup> for DI and 18.2-34.2 mg kg<sup>-1</sup> for TE, after a treatment period. A previous study has indicated that BPUs such as TE has low absorption efficiency in salmon, given that about 90% of the ingested parent compound is released through feces and uneaten feed, allowing its presence in the environment<sup>39</sup>. However, modeled values of excretion in fish suggest low calculated excretion rates, which were between 0.05 and 0.1 g h<sup>-1</sup> for DI and TE, respectively. BPUs showed high amount in fish (75%) and water (24%) for DI, while that representative amount in fish (86%), water (10%) and particles (3%) were calculated for TE. The occurrence of BPUs in water suggests advective transport both as dissolved chemical and adsorbed in particles.

For measured concentrations in sediment samples was possible to detect ranges from 0.13 to 1.22  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 0.82 to 7.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for DI and TE, respectively (Figure 3). These results are in agreement with other field measurement studies in Scotland<sup>34</sup> and Norway<sup>41</sup>. Nevertheless, high concentrations from 5.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  have been detected for DI in a close area, with a depth of 45m, after a treatment in Norway<sup>42</sup>. The predicted and measured concentrations of DI in sediment were in agreement for a typical treatment scenario. However, modeled concentrations for TE were overestimated in comparison with measured data in field which were 10 fold higher. The results of the model sensitivity analysis (Table 3) indicate that the organic carbon fraction (>90%) and current speed (60%) were the two most important variables that contributed to the variance in the sediment and water concentrations of the BPU. Similar to EB, the salmon density in the salmon farm contributed almost 40% of the predicted variance in water.

Water column concentrations for the BPU were predicted to reach higher levels compared to EB (*i.e.* about 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) as shown in Figure 4a. Water column concentrations decline more quickly for DI compared to TE, following application, due to the lower persistence of DI in water. For DI also shows the lowest predicted concentration in sediment than TE (Figure 4b), which then declines quickly post application. Sediment concentrations are considerably higher for TE, due to greater partitioning to sediment, and it persists longer, consequence of its longer half-life in sediment (Table 1). However, Marsella et al.<sup>38</sup> had postulated that TE would have a quick degradation by photolysis.

On the other hand, the estimated persistence in sediment was 13 days for DI and 63 days for TE. Previous field and microcosm studies have shown that DI has a shorter half-life than TE<sup>15</sup>, which was confirmed by this study. However, anoxic conditions in sediments could favor the persistence of DI for a longer period of time<sup>41</sup>.

#### **4. Conclusions**

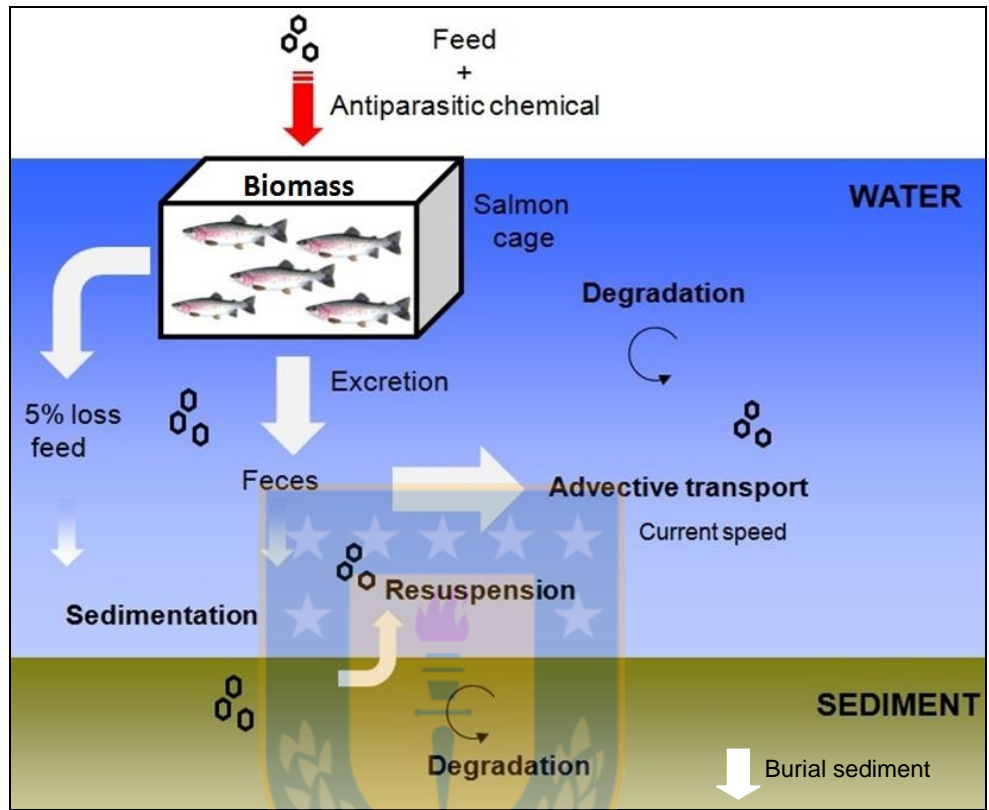
This study presented the first application of a multi-compartmental fugacity-based model (LEVEL III) approach to predict the environmental fate of antiparasitic chemicals used as feed additives in a salmon farm scenario in Southern Chile. The

results showed that predicted and measured concentrations in sediment were in agreement for EB, DI; however, for TE the predictions were overestimated. The field measurements of sediment concentrations in this study from Southern Chile were shown to be of a similar order of magnitude to other salmon farm studies conducted in areas of Scotland and Canada. The model demonstrated that EB was the most persistent of the target chemicals in sediment. Instead, for BPU's the water and fish would be an important sink.

A sensitivity analysis of the model showed that the organic carbon fraction is one of the most influential variables in sediment concentrations followed by current speed and salmon density. This analysis helps us to develop a better interpretation and understanding of the fate and transport of organic compounds released into the marine environment.

The fugacity model approach as applied in this salmon farming study demonstrates the potential of this approach as an important tool for conducting risk assessment and improved chemical management for this important industry in Chile and elsewhere.

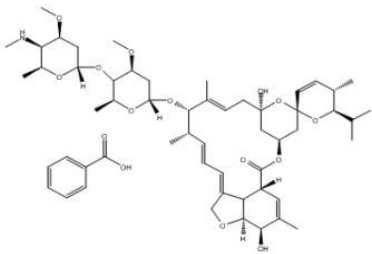
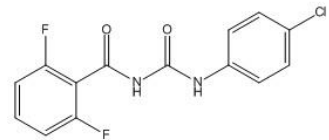
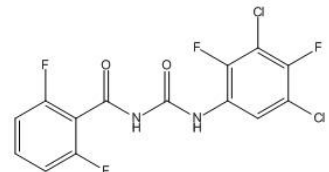




**Figure 1.** Conceptual scheme of the important processes considered for the steady-state fugacity model in a salmon farm.



**Table 1.** Physical and chemical properties of antiparasitic chemicals applied in feed additives in salmon farming.

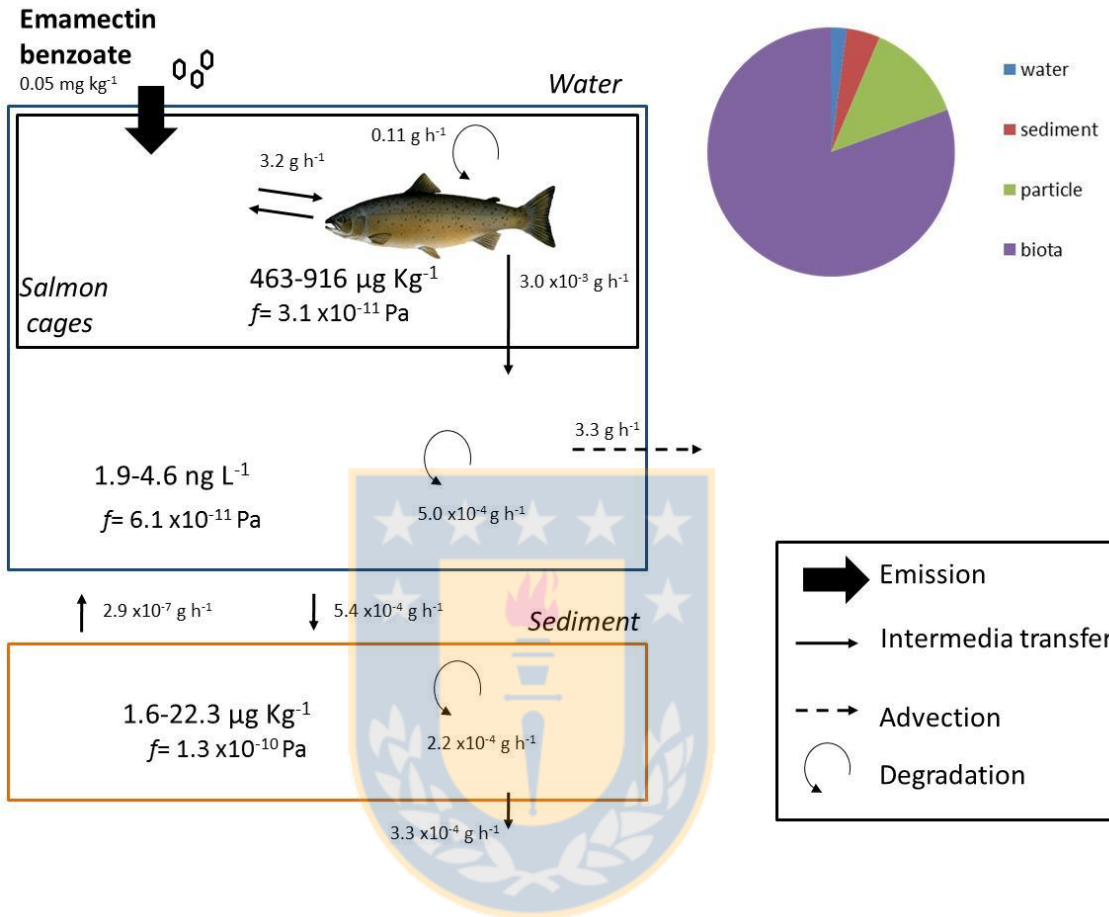
Compounds	Molecular Weight (g mol <sup>-1</sup> ) <sup>a,b</sup>	Solubility in water (g m <sup>-3</sup> ) <sup>a,b</sup>	Vapour Pressure (Pa) <sup>a,b</sup>	Log K <sub>ow</sub>	Half-lives (days) <sup>a,c</sup>		Chemical structure
					Water	Sediment	
Emamectin benzoate	873.09	0.01	2.0x10 <sup>-7</sup>	5.0	35.4	174	
Diflubenzuron	310.68	0.08	1.2x10 <sup>-7</sup>	3.89	<4	10	
Teflubenzuron	381.11	0.019	7.9x10 <sup>-10</sup> (20°C)	4.30	30	70	

<sup>a</sup>Tomlin<sup>25</sup>; <sup>b</sup> Mackay et al.<sup>26</sup>; <sup>c</sup> SPAH<sup>12</sup>.

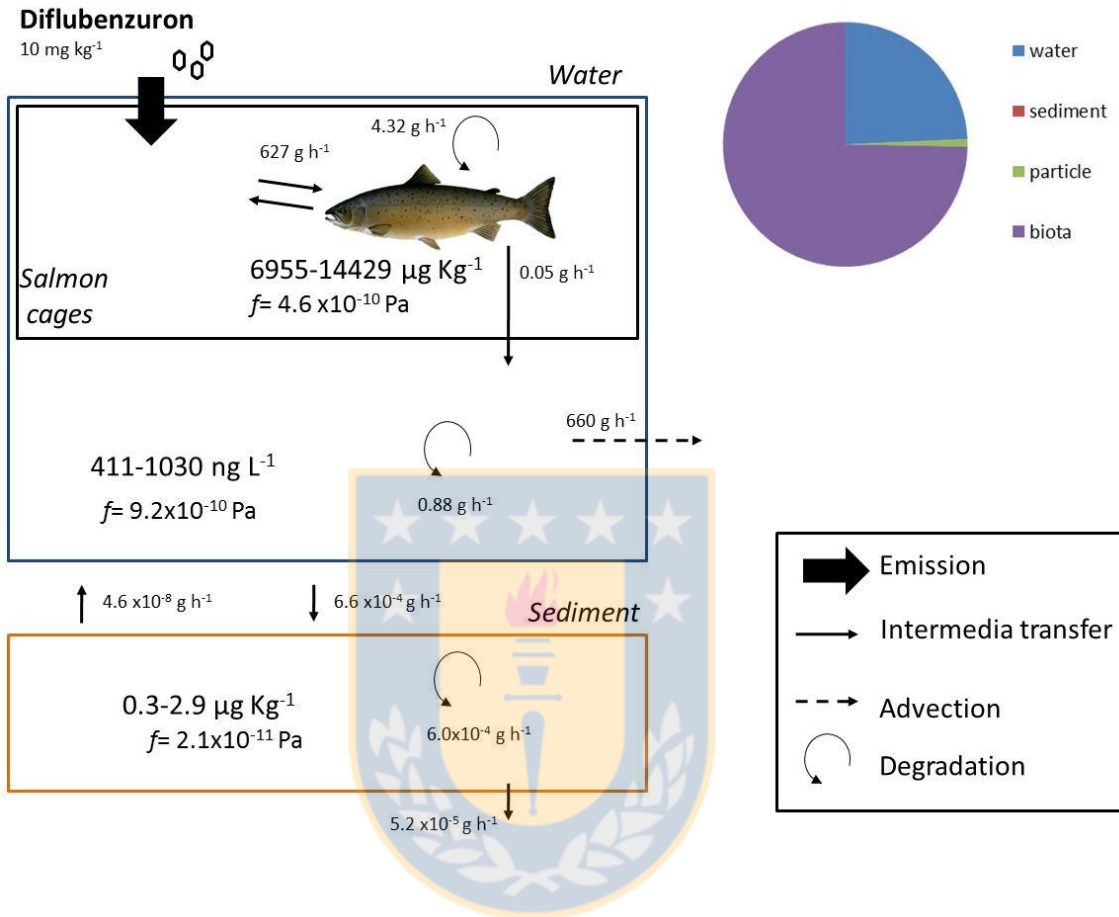
**Table 2.** Input data of the environmental scenario used for the model.

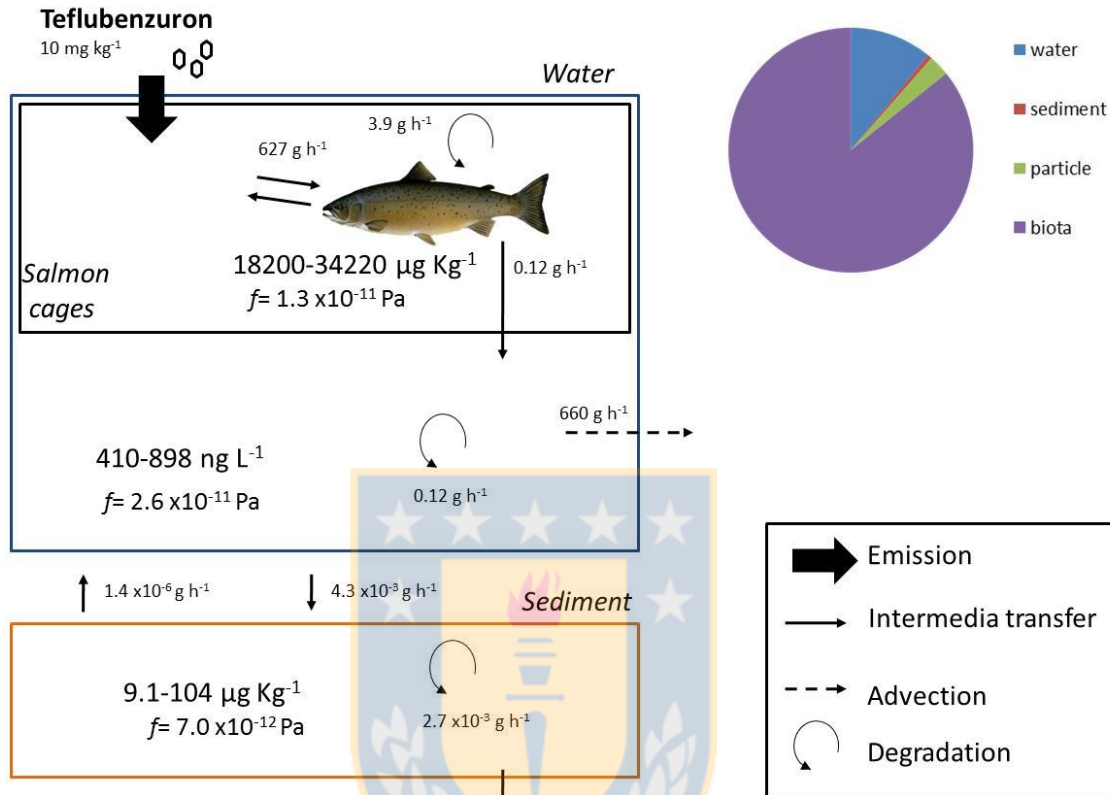
<i>Salmon farm characteristics</i>		
Salmon density (kg m <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>	20-30	
Salmon weight (kg)	2.3	
Volume of each cage (m <sup>3</sup> )	6400	
Number of cages	10	
Water column depth (m)	50	
Organic carbon fraction (%) <sup>a</sup>	1-3	
Lipid percentage in fish (%) <sup>b</sup>	10	
Current speed (cm s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	4.0-8.2	
Suspended particle concentration (g m <sup>-3</sup> )	10	
Sediment depth (m)	0.05	
<i>Environmental data</i>		
Parameter	Compartments	
	Water	Sediment
Volume (m <sup>3</sup> )	200000	200
Density (kg m <sup>-3</sup> )	1025	1500 <sup>b</sup>
<i>Transport parameters</i>		
Molecular diffusivity in water (m <sup>2</sup> h <sup>-1</sup> )	4.0x10 <sup>-6</sup>	
Sediment deposition rate (m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	4.6x10 <sup>-8</sup>	
Sediment resuspension rate (m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	1.1x10 <sup>-8</sup>	

<sup>a</sup> Sernapesca<sup>22</sup>; <sup>b</sup> Hamilton et al.<sup>29</sup>.



(a)



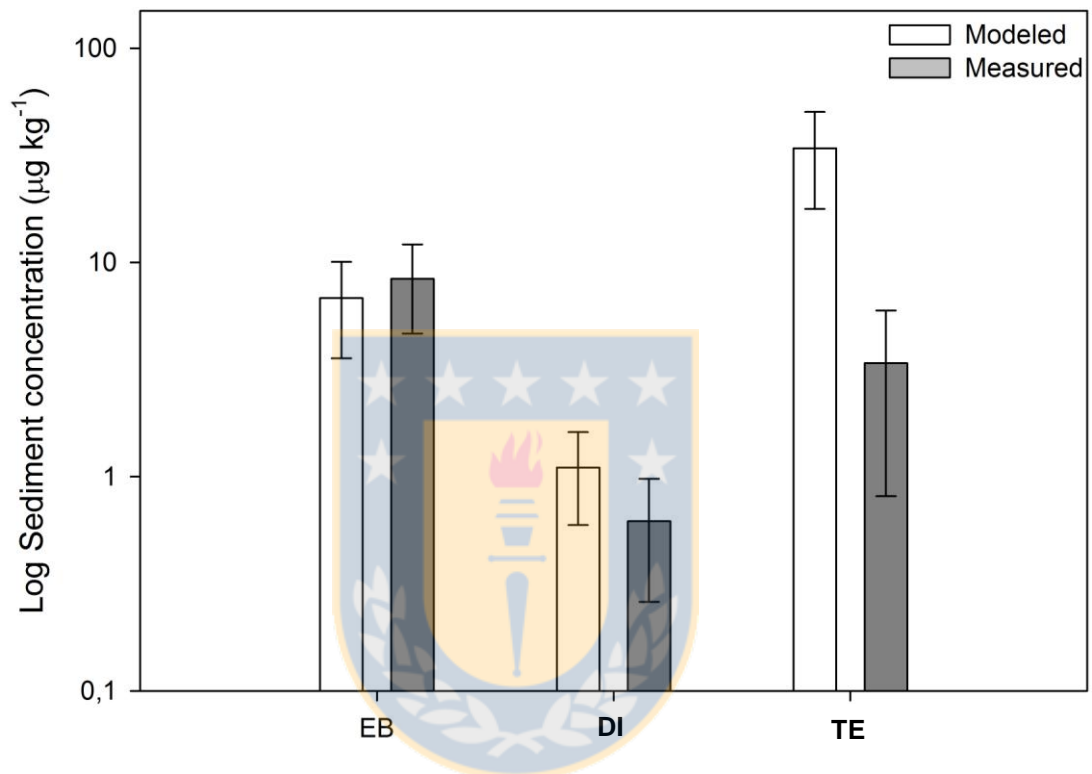


(c)

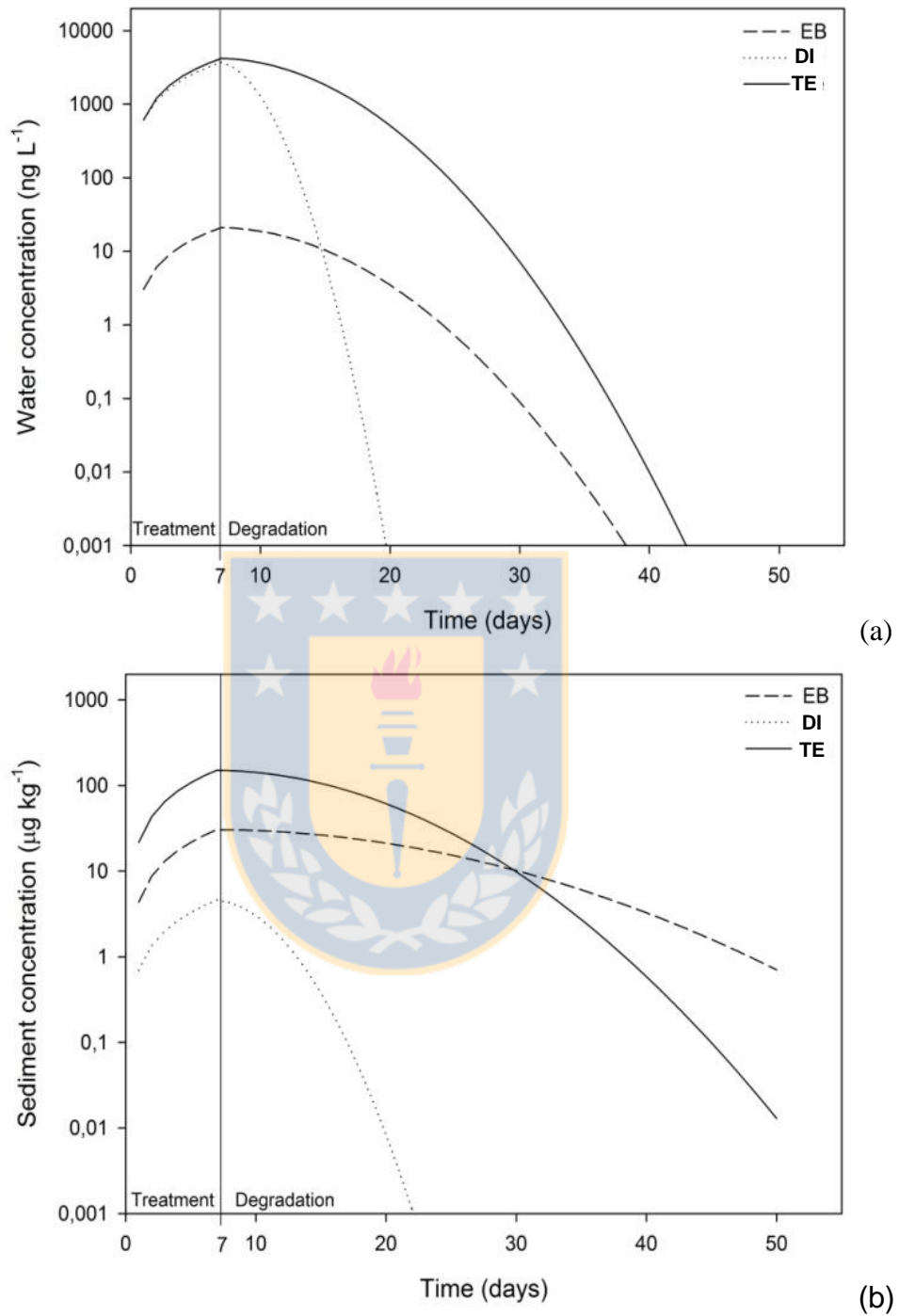
**Figure 2.** Intra and inter-media transport processes, concentrations and amounts (right chart) in each compartment for emamectin benzoate (a), diflubenzuron (b) and teflubenzuron (c) after treatment in salmon farm. For this model only was considered one day of application. The  $f$  symbol shows fugacity of chemicals.

**Table 3.** Sensitivity analysis for environmental variables applied in the model.

Sediment							
Variable	Emamectin benzoate		Diflubenzuron		Teflubenzuron		
	Contribution to variance (%)	Correlation	Contribution to variance (%)	Correlation	Contribution to variance (%)	Correlation	
Organic carbon fraction (%)	92.80	0.96	91.60	0.96	94.00	0.96	
Current speed (cm s <sup>-1</sup> )	4.00	-0.20	5.20	-0.23	4.50	-0.21	
Salmon density (kg m <sup>-3</sup> )	3.30	0.18	3.20	0.18	1.50	0.12	
Water							
Current speed (cm s <sup>-1</sup> )	63.40	-0.78	63.2	-0.79	59.00	-0.78	
Salmon density (kg m <sup>-3</sup> )	36.60	0.59	36.8	0.60	40.80	0.65	
Organic carbon fraction (%)	0	0	0	0	0.20	-0.05	



**Figure 3.** Comparison between modeled (white bars) and measured (gray bars) concentrations in sediment for: Emamectin benzoate (EB), diflubenzuron (DI), and teflubenzuron (TE). Model data report mean  $\pm$  standard deviation based on Monte Carlo simulation.



**Figure 4.** Plot showing the persistence (days) of antiparasitic pharmaceutical concentrations (used in salmon feeding) in water (a) and sediment (b). Emamectin benzoate (EB); diflubenzuron (DI) and teflubenzuron (TE).



## Acknowledgements

This work was supported for FONDECYT N°1110719 project, Doctorate Thesis Support Fellowship N° 24110019 CONICYT and scholarship of doctoral student. Furthermore, we thank to University of Siena for the chromatographic analysis of sediment samples and use of laboratories.

## †Supplementary Information. (Anexo I)

### 5. References

- 1 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The State of World Fisheries and Aquaculture, 2012, Accessed April 2, 2013. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>.
- 2 A. H. Buschmann, F. Cabello, K. Young, J. Carvajal, D.A. Varela and L. Henríquez, *Ocean & Coastal Management*, 2009, 52, 243–249.
- 3 D. Soto and F. Norambuena, *J. Appl. Ichthyol.*, 2004, 20, 493-501.
- 4 L. BurrIDGE, J. Weis, F. Cabello, J. Pizarro and K. Bostick, *Aquaculture*, 2010, 306, 7-23.
- 5 S. Johnson, J. Treasurer, S. Bravo, K. Nagasawa and Z. Kabata, *Zoological Studies*, 2004, 43, 229-243.
- 6 S. Bravo, G. A. Boxshall and G. Conroy, *Bulletin of the european association of fish pathologists*, 2011, 31, 156-160.
- 7 G.A. Boxshall and S. Bravo, *Contrib. Zool.*, 2000, 69, 137-146.
- 8 J. Carvajal, L. González and M. George-Nascimento, *Aquaculture*, 1998, 166, 241-246.
- 9 L. González and J. Carvajal, *Aquaculture*, 2003, 220, 101-117.
- 10 C. Hamilton-West, G. Arriagada, T. Yatabe, P. Valdés, L. P. Hervé-Claude and S. Urcelay, *Prev Vet Med.*, 2012, 104, 341-345.
- 11 M. Roth, *Contrib. Zool.*, 2000, 69, 109-118.
- 12 Schering-Plough Animal Health (SPA), *Potential environmental impacts of emamectin benzoate, formulated as Slice®, for salmonids*. Technical Report., 2002.
- 13 J. Stone, I. H. Sutherland, C. S. Sommerville, R. H. Richards and K. J. Varma. *J. Fish Dis.*, 1999, 22, 261-270.
- 14 E. Branson, S. Ronsberg and G. Ritchie, *Aqua. Res.*, 2000, 31, 861-867.
- 15 K. Haya, L. E. BurrIDGE, I. M. Davies and A. Ervik, *Env. Chem.*, 2005, 5, 305–340.
- 16 D. Mackay and S. Paterson, *Environ Sci Techol.*, 1991, 25, 427-436.

- 17 D. Mackay, *Multimedia environmental models. The fugacity approach*, ed. Lewis publishers, U.S., Chelsea, 2nd edn, 2001, pp. 272.
- 18 L. Hughes, D. Mackay, D. E. Powell and J. Kim, *Chemosphere*, 2012, 87, 118–124.
- 19 D. Mackay and J. A. Arnot, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2011, 56, 1348–1355.
- 20 T. Gouin and T. Harner, *Environment International*, 2003, 29, 717–724.
- 21 R. Barra, M. Vighi, G. Maffioli, A. Di Guardo and P. Ferrario, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34, 4425-4433.
- 22 Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). Información ambiental, INFA. Ex: [www.sernapesca.cl](http://www.sernapesca.cl), 2012.
- 23 G. VanLoon and S. Duffy, in *Organic Matter in Water*, ed. OUP Oxford, 2010, 2nd edn, 2005, ch. 12, pp. 254-272.
- 24 S. W. Karickhoff, *Chemosphere*, 1981, 10, 833-846.
- 25 C. Tomlin, in *The Pesticide Manual (A World Compendium)*, ed. C. R. Worthing, Cambridge, U.K., 10th edn., 1994, pp. 1341.
- 26 D. Mackay, W. Shui, K. Ma and S. Lee, in *Insecticides*, ed. Lewis Publishers, U.S., Taylor & Francis Group, 2nd edn., 2006, Vol. IV, ch 8, pp. 3715-3992.
- 27 K. Barnes, J. Startin, S. Thorpe, S. Reynolds and R. Fussell, *Journal of Chromatography A*, 1995, 712, 85-93.
- 28 K. Krogh, K. Björklund, D. Loeffler, G. Fink, B. Halling-Sørensen and T. A. Ternes, *Journal of Chromatography A*, 2008, 1211, 60–69.
- 29 C.M. Hamilton, R.A. Hites, S.J. Schwager, J.A. Foran, B.A. Knuth and D.O. Carpenter, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 8622-8629.
- 30 Gentry, B., 2008. Blankinship D, Wainwright E. Oracle crystal ball user manual. 11.1.1 ed. Denver, USA: Oracle, Inc.
- 31 Scottish Environment Protection Agency (SEPA), *Emamectin benzoate, an environmental assessment*, pp. 1 – 23, 1999a.
- 32 Scottish Environment Protection Agency (SEPA), in *Regulation and Monitoring of Marine Cage Fish Farming in Scotland*, Guidance on the use of emamectin benzoate at Marine Cage Fish Farms, 2004.
- 33 Scottish Environment Protection Agency (SEPA), in *The Occurrence of Chemicals used in Sea Louse Treatments In Sediments*, Report TR-070807\_JBT, 2007.
- 34 Scottish Environment Protection Agency (SEPA), in *The Occurrence of Chemical Residues in Sediments in Loch Linnhe, Loch Ewe and Loch Nevis: 2009*, Report: JT000811\_JT, 2011.

- 35 J.G. McHenery and C.M. Mackie, *Revised expert report on the potential environmental impacts of emamectin benzoate*, Cordah Report No SCH001R5, 1999.
- 36 D. A. Bright and S. Dionne, *Emamectin benzoate data*, Environment Canada review, Canada, 2005, pp. 74. Accessed April 2, 2013.  
<http://publications.gc.ca/collections/Collection/En4-51-2005E.pdf>
- 37 M.G. Ikonomou and B.D. Surridge, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2013, 93, 183-198.  
<http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2012.673222>.
- 38 A. Marsella, M. Jaskolka, and S.Mabury, *Pest Management Science*, 2000, 56, 789-794.
- 39 Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), in *Calicide (teflubenzuron)*, Policy No 29, 1999b.
- 40 R. Eisler, *Contam. Hazard Rev.*, 1992, 25, 4-36.
- 41 A. Selvik, P. Kupka Hansen, A. Ervik and O. Bent Samuelsen, *The Science of The Total Environment.*, 2002, 285, 237-245.
- 42 Norwegian Institute for Water Research (NIVA), *Environmental Screening of Veterinary Medicines Used in Aquaculture-diflubenzuron and teflubenzuron*. Report 1086, 2011.



## **Predicción ambiental de pesticidas piretroides utilizados por la industria del salmón mediante el modelo de fugacidad Nivel III.**

### **Resumen**

Conceptos basados en el modelo de fugacidad fueron aplicados para predecir el destino final y concentraciones en sedimento de piretroides sintéticos (PS) utilizados por la industria del salmón en el sur de Chile, tales como cipermetrina (CP) y deltametrina (DE). Muestras de sedimento fueron obtenidas alrededor de centros de cultivos con CP y DE como tratamientos quimioterapéuticos. Los resultados del modelo muestran un acuerdo con la más alta concentraciones detectada para CP ( $1324 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), mientras que para DE los resultados en campo estuvieron bajo el límite de detección ( $<10.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), demostrando cierta sobre estimación del modelo. Esta aproximación permitió simular escenarios de aplicación de PS en sistemas marinos siendo una herramienta útil para procesos de evaluación de riesgo en la industria.

### **1. Introducción**

Los compuestos piretroides son pesticidas sintéticos creados a comienzo de 1960 como reemplazo de piretrinas naturales, las cuales eran extraídas desde la planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*. El desarrollo de estos piretroides sintéticos (PS) permitió alcanzar una mayor persistencia y efectividad que piretrinas naturales (Davis, 1985). PS tales como cipermetrina (CP) y deltametrina (DE) han sido ampliamente utilizados para el control de plagas en cultivos de animales (Boxall et al., 2004). Estos compuestos se caracterizan por ser sustancias químicas de muy baja solubilidad en agua, baja volatilidad y altamente hidrofóbicos ( $\log K_{ow} >6$ ), lo cual le otorga mayor afinidad por la fracción orgánica disponible en sistemas acuáticos (Hazardous Substances Data Bank, 1999). La exposición a PS puede generar efectos tóxicos deletéreos principalmente en invertebrados debido a su rápida y efectiva acción a bajas concentraciones (Fairchild et al., 2010). El mecanismo de acción de estos PS es interferir en el normal funcionamiento de

células nerviosas, actuando sobre canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ) (Miller & Adams, 1982; Soderlund *et al.*, 2002).

La industria del salmón ha utilizado PS debido a infestaciones ectoparasitarias provocadas por el “piojo de mar” *Caligus rogercresseyi* durante etapa de engorda en cultivos (González & Carvajal, 2003; Hamilton-West *et al.*, 2012). Sus aplicaciones son a través de tratamientos por baños, utilizando faldones impermeables en el interior de balsas jaulas. La exposición de salmones cultivados a PS (CP ó DE) es alrededor de 30 a 60 minutos para posteriormente ser retirado el faldón y liberar el producto al sistema marino.

El modelo de fugacidad ha sido una herramienta que permite predecir el destino ambiental de químicos (Mackay, 2001). El concepto de fugacidad ha sido reconocido por la comunidad científica y propósitos regulatorios con el objetivo de evaluar el riesgo de compuestos orgánicos específicos. Fugacidad se define como la tendencia al escape de sustancias químicas expresadas en unidades de presión (Pa). Este modelo puede ser basado en múltiples compartimentos (ej. aire, agua, suelo) el cual permite predecir el comportamiento y destino final de químicos para una variedad de condiciones y ecosistemas (Barra *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo es predecir las concentraciones de dos PS tales como CP y DE frente a un escenario típico de tratamientos en jaulas de salmón. Esta aproximación permitirá estimar las posibles concentraciones en un ambiente marino con actividad salmonera. Concentraciones estimadas serán validadas en orden de comparar resultados medidos y modelados en el ambiente.

## **2. Materiales y Métodos**

### *2.1. Modelo*

En base a la disponibilidad de información sobre propiedades físico-químicas de compuestos piretroides (Tabla 1) y un típico escenario ambiental para una centro de cultivo en el sur de Chile (ver paper 1) se desarrollo el cálculo de las concentraciones de PS dentro de una planilla Excel. Esta predicción contempló dimensiones y variabilidad en el ambiente de acuerdo a lo propuesto en paper N° 1, frente a un escenario de aplicación de CP y DE. Las emisiones consideradas en el modelo

corresponden a las dosis administradas por centros de cultivo durante tratamientos contra piojo de mar. Estas concentraciones fueron  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  para CP y  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  para DE. Las dimensiones de las jaulas fueron de 20m x 20m y velocidad de corriente promedio de  $6 \text{ cm s}^{-1}$ . La profundidad de faldón utilizada para calcular la cantidad de PS emitido (mol) fue de 8 metros.

### *2.2. Análisis de sensibilidad e incertidumbre*

Con el propósito de evaluar la sensibilidad del modelo se realizó un análisis de sensibilidad mediante cambios de parámetros de ingreso (inputs) e identificar la mayor contribución a la varianza de los resultados (output). Para este estudio fueron incorporados variables tales como velocidad de corriente (V), fracción de carbono orgánico (fco) y biomasa de peces en jaula (D) de acuerdo a información disponible (Sernapesca, 2012; ver paper 1). Se calculó la contribución a la varianza para cada uno de los compartimentos de interés (agua y sedimento). La simulación de Monte Carlo fue realizada para evaluar la incertidumbre en las predicciones basado en distribuciones de probabilidad para parámetros ingresados. Para obtener la distribución de los resultados la simulación de Monte Carlo fue ejecutado 1,000 veces usando el software Crystal Ball 11.1.1 (Gentry, 2008).

### *2.3. Sitio de muestreo*

Muestras de agua y sedimento fueron colectadas en dos zonas diferentes situadas en Isla de Chiloé. Las zonas se caracterizaron por utilizar específicos PS. Para el sector de bahía Manao ( $41^{\circ}51'S$ ,  $73^{\circ}29'O$ ) el antiparasitario utilizado fue CP, por otro lado, un sector cercano a la comuna de Dalcahue ( $42^{\circ}25'S$ ,  $73^{\circ}37'O$ ) fue DE (Figura 1). Muestras de agua fueron colectadas mediante botella Niskin (10L), mientras que para la toma de sedimento fue usada una draga Van Veen ( $0.3 \text{ m}^2$  y 5 cm de profundidad). Las muestras ambientales fueron colectadas a una distancia máxima de 100 m alrededor de balsas jaulas siendo posteriormente las muestras guardadas en oscuridad y transportadas a laboratorio en un cooler de hielo.

#### 2.4. Extracción

*Agua:* En de tubos de vidrio fueron incorporado 30 mL de agua, los cuales se mezclaron con n-hexano. Mediante agitación durante pocos minuto fue recuperado el analíto presente en la fase orgánica y trasvasijado a balones de 100 ml. Este procedimiento fue repetido 3 veces. Los extractos fueron concentrados en rotavapor y trasvasijado a viales de vidrio para luego ser reconstituidos a su volumen final en tolueno (1.5 ml).

*Sedimento:* Para 1 g de sedimento húmedo fueron adicionados 20 ml de n-hexano: diclorometano (2:1), a continuación fueron colocadas en ultrasonido por 15 minutos. Un clean up previo con lana de vidrio y sulfato anhidro fue realizado antes de ser trasvasijado a balones de 100 ml. Estos primeros pasos fueron repetidos 3 veces. Posteriormente, los extractos fueron concentrados en rotavapor (5 ml). Un nuevo clean up fue realizado con sulfato dio/florisil (2g). Los extractos de las muestras fueron acondicionados a través de columna con etil acetato y diclorometano (2:1), luego fueron elusionadas con 50 ml de etil acetato, concentradas en rotavapor y finalmente reconstituidas en tolueno (1.5 ml). El porcentaje de recuperación durante la extracción en agua y sedimento fue mayor al 90%.

#### 2.5. Análisis de muestras

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de gas con detector captura de electrones (CG-DCE) basada en emisiones de electrones partícula  $\beta$ , el cual entrega mayor selectividad sobre compuestos halogenados. La temperatura de inyector y detector fue de 240°C y 370°C, respectivamente. Una columna PTE-5 de 30m x 0.25  $\mu$ m x i.d. 0.25 mm fue usada para el análisis. El programa de temperatura en CG-DCE fue inicialmente de 50°C por 1 minuto y un gradiente de 30°C a 300°C por 12 minutos. Para el análisis en agua el límite de cuantificación (LC) y detección (LD) en CP estuvo en 74.8 y 12  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectivamente. En tanto, para sedimento el LC fue de 112 y LD de 18  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>. Por otro lado, para el producto DE el LC y LD fue de 13.1 y 6.9  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que en sedimento el LC fue de 19.6  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> y el LD de 10.4  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>.

Para la confirmación de resultados obtenidos en GC-ECD las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases Agilent 7890A triple cuadruple con detector

masa (GC-MS). Esto permitió generar un respaldo fragmentando y comparativo en la identificación de compuestos piretroides. El fraccionamiento de los compuestos fue realizado a través de una columna capilar HP-5ms de 30m de largo, 250µm diámetro interno y 0.25 µm de espesor (5% fenil metil polisiloxano). La columna tuvo una presión constante de 30 psi, mientras que la inyección de la muestra fue de 3 µl. El programa de temperatura inicial fue de 70°C/minuto, luego se incrementó 25°C/minuto hasta alcanzar 150°C, finalmente la temperatura fue programada hasta una temperatura final de 280°C por 10 minutos. La energía de colisión en el análisis fue de 5 eV a 9.5 ciclos por segundo. A través del modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM) fueron identificados los piretroides, en el que DE fue identificada con una transición de iones de 253; 172 y 253; 174 (*m/z*), mientras que para CP fue de 163; 127 y 163; 91 (*m/z*).

### 3. Resultados

Las predicciones realizadas a través del modelo para un típico escenario de tratamientos en cultivo de salmón con PS son mostrados en Tabla 2. Estos cálculos realizados a través del modelo sugieren concentraciones de CP en el rango de 4.54-8.81 ng L<sup>-1</sup> en agua, mientras que en sedimento fueron calculadas concentraciones entre 713-7313 µg kg<sup>-1</sup>. De igual manera, la predicción en agua para DE sugiere concentraciones en el rango de 2.47-5.96 ng L<sup>-1</sup>, en cambio, para sedimento fue calculada concentraciones en el rango de 62.9 a 628.3 µg kg<sup>-1</sup>.

De acuerdo a las variables ingresadas en el modelo se observa mediante un análisis de sensibilidad que velocidad de corriente (V) contribuye entre un 90-99% a la varianza de PS en agua para CP y DE, respectivamente. Mientras tanto, para sedimento la fracción de carbono orgánico (fco) explicaría la variabilidad de PS, contribuyendo en la varianza entre 95-97% para CP y DE, respectivamente. En tanto, la variable densidad de salmones en balsas jaulas (D) contribuyó de menor manera en los distintos compartimentos (Tabla 3).

En razón de validar los resultados obtenidos a través del modelo predictivo los datos fueron comparadas con muestras ambientales. En agua no fue posible detectar PS para las diferentes zonas muestreadas, encontrándose todas las muestras bajo el



límite de detección analítico (CP  $<12.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; DE  $<6.9 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Sin embargo, para sedimentos obtenidos en la zona con aplicación de CP fue posible detectar el producto, encontrándose en el rango de 17.1 a  $1323.7 \mu\text{g kg}^{-1}$  alrededor de balsas jaulas. Únicamente para la mayor concentración de CP detectada en sedimento se encontró dentro del rango estimado por el modelo (Figura 2a). En muestras de sedimentos colectadas en la zona de Dalcahue no fue posible detectar DE (Figura 2b), encontrándose bajo el límite de detección analítico ( $<10.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

#### 4. Discusión

Predicciones realizadas a través de este modelo matemático permitieron prever posibles concentraciones ambientales en zonas con activa acuicultura, siendo esta una primera aproximación utilizando modelos basados en el concepto de fugacidad dentro de la industria del salmón. La incorporación de datos como propiedades físico químicas y definición de condiciones ambientales han permitido desarrollar una idea en cuanto al destino ambiental y posible concentraciones de PS en el sistema marino, así como también otros autores han puesto a prueba esta herramienta en diferentes escenarios ambientales para otros compuestos orgánicos (Gouin & Harner, 2003 ; Mackay & Arnot, 2011).

Predicciones del modelo para PS en agua estuvieron en el rango de  $\text{ng L}^{-1}$ . A pesar de que no fue posible cuantificar concentraciones de PS en agua dentro de las zonas en estudio (bajo límite de detección), concentraciones predichas por el modelo estuvieron cercanas a otros estudios donde se analizaron muestras ambientales en áreas con actividad salmonera. Hunter y Fraser (1995) identificaron luego de un tratamiento con CP concentraciones en el orden de 74 y  $13 \text{ng L}^{-1}$  después de 30 a 50 minutos liberado el producto, respectivamente. Posterior estudio, Ernst et al. (2001) señalaron que el producto CP presentaría una baja persistencia en el ambiente, cuantificándose hasta 5 horas después de su liberación a una concentración de  $20 \text{ng L}^{-1}$ . La explicación a la rápida degradación de compuestos como CP puede deberse a procesos de hidrólisis bajo condiciones alcalinas, por lo que bajas concentraciones pueden ser esperadas en el agua luego de su liberación (SEPA, 2007).

Modelo predictivo establecido por la Agencia de Protección Ambiental en Escocia (SEPA, sigla en inglés) pudo estimar concentraciones de CP simulando una situación de doble aplicación del producto y baja velocidad de corriente ( $0.03 \text{ m s}^{-1}$ ) luego de un tratamiento por baño (SEPA, 2008). Dicha predicción se encontró en el rango de  $1.4$  a  $8.1 \text{ ng L}^{-1}$ , estando en acuerdo con los resultados obtenidos para CP en este estudio. Para el mismo modelo fue considerado un análogo comportamiento para el producto DE, simulándose similares concentraciones.

DE es un piretroide de rápida degradación en ambientes acuáticos (Muir et al., 1985; Thybaud, 1990). Actualmente no se han encontrado estudios para DE que permitan conocer niveles ambientales luego de un tratamiento en balsas jaulas. Sin embargo, mediante el uso agrícola de este PS para el control de plagas ha sido posible detectarlo en zonas del estuario Río Ebro (España) en el rango de  $2$ - $58.8 \text{ ng L}^{-1}$  (Feo et al., 2010).

Para PS en sedimento se muestra una mayor aproximación a niveles detectados en campo, para el caso de CP. Muestras colectadas en el sector de Dalcahue para el estudio de DE estuvieron bajo el límite de detección analíticos. Esto último demuestra que cálculos realizados por el modelo estarían sobreestimando concentraciones de DE en sedimento. Probablemente, un ajuste al escenario ambiental donde fue aplicado el producto podría ser necesario dentro del modelo, simulando condiciones sitio-específicas de la zona.

En tanto, para CP en sedimento el modelo mostró aproximación para aquellas concentraciones detectadas en campo, apreciándose la concentración más alta dentro del rango modelado (Figura 2a). De acuerdo a niveles medidos en Escocia para el producto CP se han encontrado concentraciones mucho menores a las detectadas en Chile, siendo estas de  $0.49 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  (SEPA, 2007). Posiblemente, condiciones de sedimento en la zona estudiada podrían favorecer una mayor persistencia y/o lenta degradación del producto (SEPA, 1998).

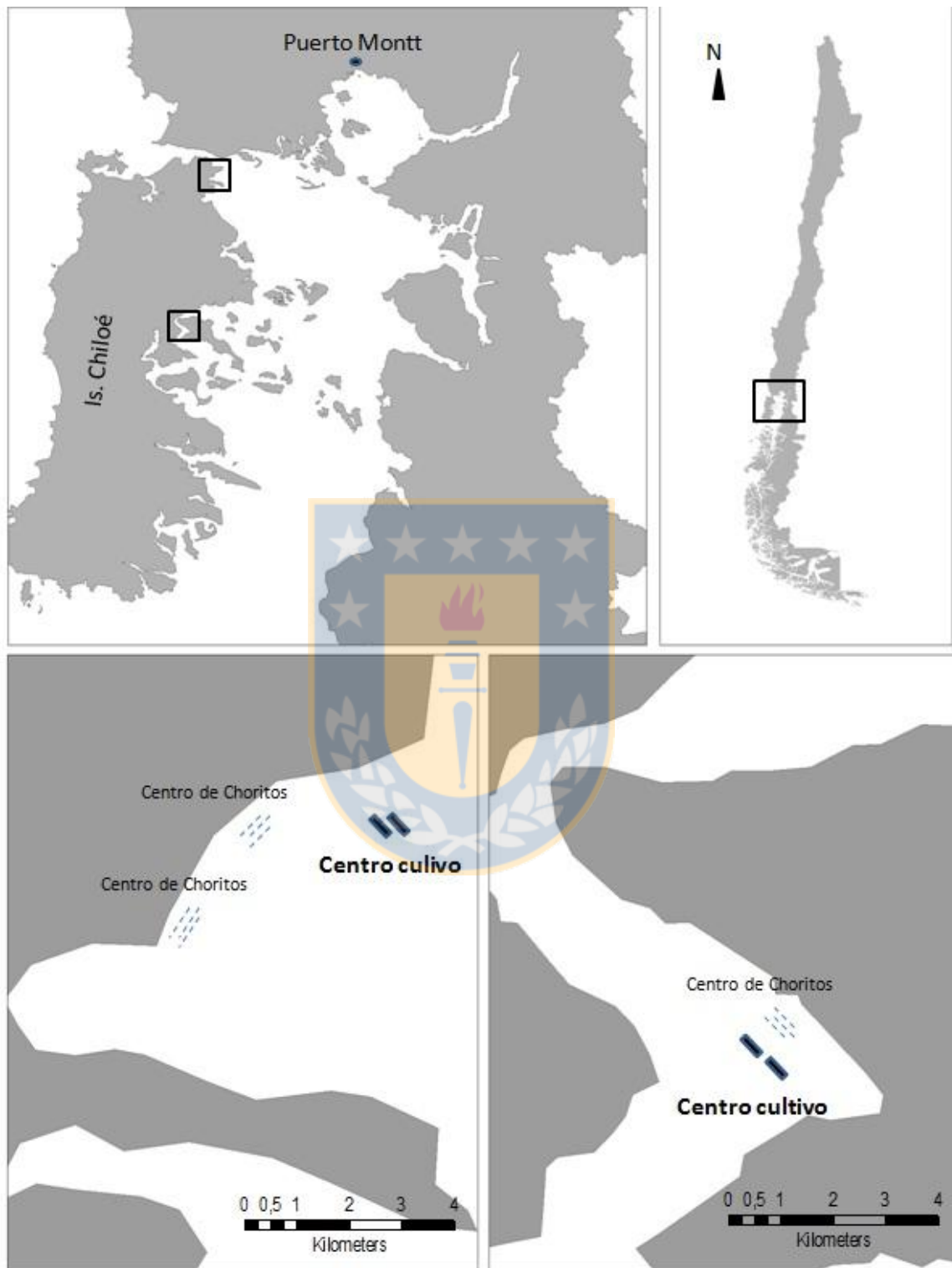
La variabilidad entregada por el modelo demuestra la contribución de factores ambientales como velocidad de corriente en agua ( $4$ - $8 \text{ cm s}^{-1}$ ), la cual podría otorgar la pérdida del químico en el ambiente acuático (Tabla 3). Esto podría explicar la importancia de procesos advectivos por acción de la hidrodinámica en la zona que aportan a la distribución de PS en agua. Estudios han determinado que luego de la

liberación de compuestos como CP este podría cubrir distancias de hasta 1 km<sup>2</sup> (Ernst et al., 2001).

Por otro lado, la adsorción de PS a la fracción orgánica debido a su hidrofobicidad demuestra la directa relación en la variabilidad de estos químicos en el sistema marino, principalmente en sedimento (Pérez-Fernández et al., 2010). La disponibilidad de materia orgánica en el sistema (1-3%) es fundamental en la determinación de elevada concentración registrada a través del modelo. La persistencia de productos como CP en sedimento va en directa relación a la carga orgánica, alcanzando periodos de hasta 80 días cuando la carga orgánica es elevada (Haya et al., 2005). Por lo demás, condiciones anaeróbicas pueden determinar una lenta degradación de CP en sedimento (SEPA, 1998).

La densidad de salmones (20-30 kg m<sup>-3</sup>) en balsas jaulas no fue relevante en la variabilidad del modelo, debido a que no se encontró una relación directa a la cantidad emitida en el sistema, siendo la emisión determinada por el volumen correspondiente al faldón en el cual los salmones fueron bañados. Sin embargo, existe una alta probabilidad de que PS sean adsorbidos por el tejido graso de salmones como resultado de su afinidad a la fracción lipídica (log Kow=4.6-6.6) (Mackay et al., 2006).

En conclusión, a pesar de no poder cuantificar concentraciones de PS en agua para las zonas en estudio, los límites detectados podrían señalar que probablemente los niveles de PS se encontrarían dentro de los rangos predichos por el modelo (ng L<sup>-1</sup>). Por otro lado, la falta de información para el producto DE en el ambiente marino pone como foco de atención la necesidad de generar mayores detalles frente a escenarios de exposición que permitan establecer potenciales riesgos durante periodos de tratamientos. Finalmente, esta herramienta puede ser una alternativa dentro de procesos evaluativos que permitan predecir niveles de CP en sedimento dentro de un típico escenario de aplicación de productos quimioterapéuticos en cultivos de salmón, siendo una primera aproximación que permita establecer condiciones locales del sur de Chile.

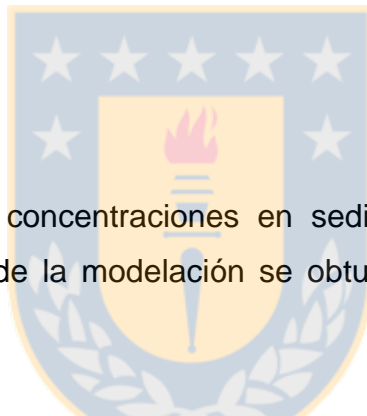


**Figura 1.** Sitios de muestreo ubicados en Isla de Chiloé, Región de Los Lagos. Derecha: centro con aplicación de cipermetrina; Izquierda: centro con aplicación de deltametrina.

**Tabla 1.** Propiedades físico-químicas críticas de piretroides.

Compuestos	Peso		Presión de Vapor (Pa)	Log Kow	Vida media (días)	
	Molecular (g/mol)	Solubilidad agua (g/m <sup>3</sup> )			Agua	Sedimento
Deltametrina	505.19	0.002	2.0x10 <sup>-6</sup>	6.2	4	23

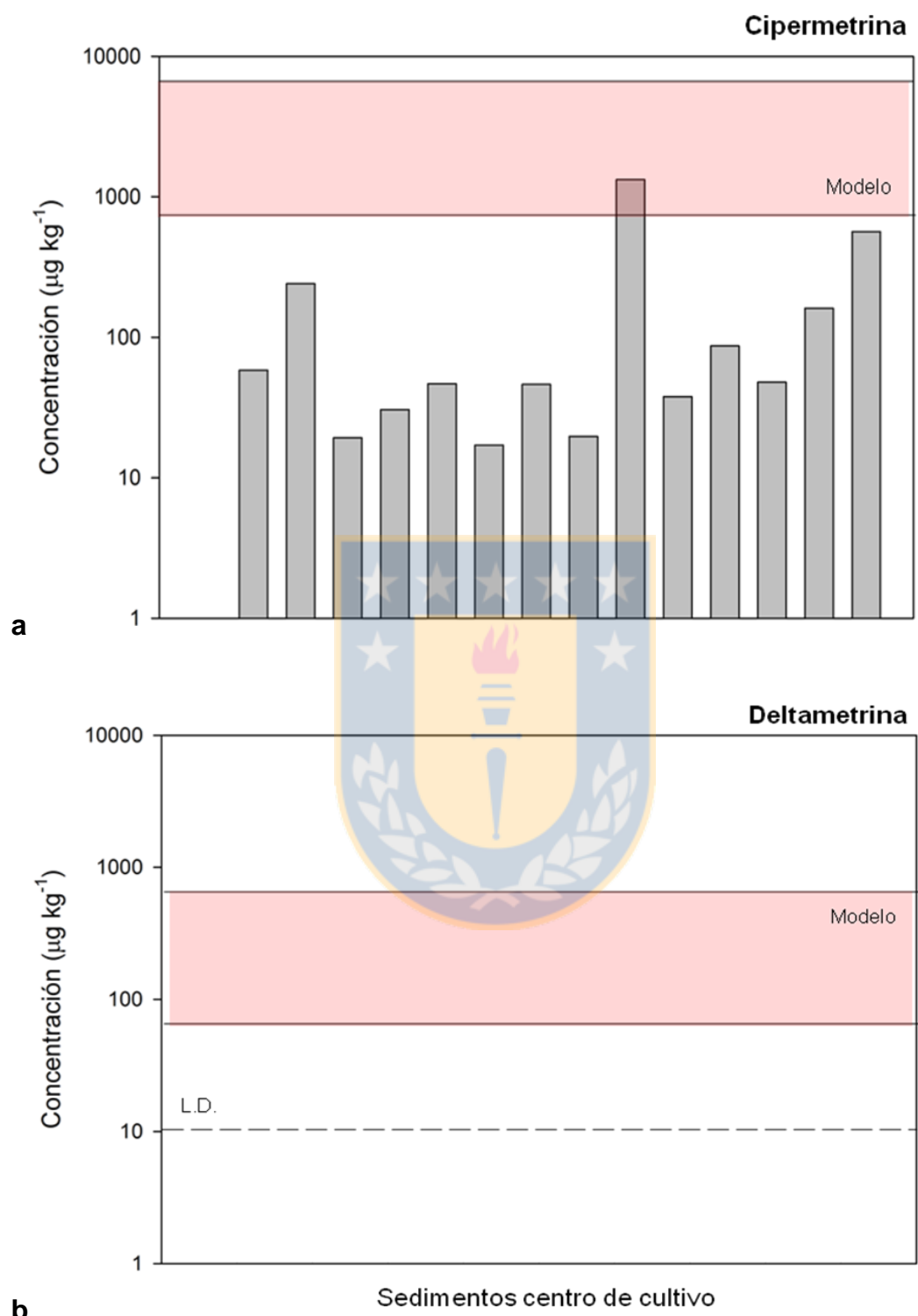
Ex. Mackay et al., 2006. Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals.

**Tabla 2.** Predicción de concentraciones en sedimento y agua para compuestos piretroides. Variabilidad de la modelación se obtuvo mediante el software análisis-riesgo *Crystal ball*.

Compuesto	Matriz	Unidad	Promedio	Mínimo	Máximo
Cipermetrina	Agua	ng L <sup>-1</sup>	6.03	4.54	8.81
	Sedimento	µg kg <sup>-1</sup>	2574	713	7313
Deltametrina	Agua	ng L <sup>-1</sup>	3.64	2.47	5.96
	Sedimento	µg kg <sup>-1</sup>	222	62.9	628.3

**Tabla 3.** Contribución a la varianza de concentraciones modeladas por el modelo de fugacidad. Las variables consideradas fueron fracción de carbono orgánico (fco), Velocidad de corriente (V) y densidad de salmones por jaula (D).

Compuesto	Matriz	Variable	Varianza (%)	Correlación
Cipermetrina	Agua	V	99.97	-0.980
		D	0.03	0.016
		Fco	0	-0.003
Deltametrina	Sedimento	Fco	95.3	0.972
		V	4.6	-0.213
		D	0.1	-0.026
	Agua	V	99.1	-0.980
		D	0.7	0.086
		Fco	0.1	-0.034
Sedimento	Fco	96.6	0.970	
	V	3.3	-0.179	
	D	0.1	0.023	



**Figura 2.** Comparación entre datos medidos (barras grises) y rango de concentraciones calculadas por el modelo (área roja) para cipermetrina (a) y deltametrina (b).

## Referencias

- Barra R., M Vighi, G Maffioli, A Di Guardo & P Ferrario, 2000. Coupling SoilFug Model and GIS for predicting pesticides pollution of surface water at watershed level. *Environm Sci Technol* 34: 4425-4433.
- Boxall AB, LA Fogg, PA Blackwell, P Kay, EJ Pemberton, A Croxford, 2004. Veterinary medicines in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180: 1–91.
- Davis JH, 1985. The pyrethroids: An historical introduction. In: Leahey JP, editor. *The Pyrethroid Insecticides*. London and Philadelphia: Taylor and Francis Ltd.; p 1-41.
- Ernst W, P Jackman, K Doe, F Page, G Julien, K MacKay & T Sutherland, 2001. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon farms in net pen enclosures. *Marine Pollution Bulletin* 42: 433-444.
- Fairchild WL, KG Doe, PM Jackman, JT Arsenault, JG Aubé, M Losier & AM Cook, 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, pp 34. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/Library/339939.pdf>. Accessed 25 August 2013.
- Feo ML, A Ginebreda, E Eljarrat & D Barceló, 2010. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *Journal of Hydrology* 393: 156-162.
- Gentry, B., 2008. Blankinship D, Wainwright E. Oracle crystal ball user manual. 11.1.1 ed. Denver, USA: Oracle, Inc.
- González L & J Carvajal, 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220 (1-4): 101-117.
- Gouin T & T Harner, 2003. Modelling the environmental fate of the polybrominated diphenyl ethers. *Environment International* 29: 717– 724.
- Hamilton-West C, G Arriagada, T Yatabe, P Valdés, LP Hervé-Claude & S Urcelay, 2012. Epidemiological description of the sea lice (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Prev Vet Med* 104(3-4):341-345.
- Haya K, LE Burridge, IM Davies & A Ervik, 2005. A Review and Assessment of Environmental Risk of Chemicals Used for the Treatment of Sea Lice Infestations of Cultured Salmon. *Env Chem* 5 Part M: 305–340.
- Hazardous Substances Data Bank (HSDB), 1999. Visto: 20 Octubre 2012, disponible: <http://sis.nlm.nih.gov/enviro/hsdbchemicalslist.html>.
- Hughes L, D Mackay, DE Powell & J Kim, 2012. An updated state of the science EQC model for evaluating chemical fate in the environment: Application to D5 (decamethylcyclopentasiloxane). *Chemosphere* 87: 118–124.



- Hunter RP & N Fraser. 1995. Field monitoring of the effects of cypermethrin as GPRD01. Report of Grampian Pharmaceuticals Limited, Research Division. Ref GP95033.
- Mackay D & JA Arnot, 2011. The Application of Fugacity and Activity to Simulating the Environmental Fate of Organic Contaminants. *Journal of Chemical & Engineering Data* 56: 1348–1355.
- Mackay D, WY Shiu, K-C Ma & SC Lee, 2006. Physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Second edition. Volume I-IV. Taylor & Francis, CRC press. Boca Raton London. 4161pp.
- Mackay D, 2001. Multimedia environmental models. The fugacity approach. Lewis Publishers, Chelsea, USA.
- Miller TA & ME Adams, 1982. Mode of action of pyrethroids. In: Coats JR, editor. *Insecticide Mode of Action*. New York: Academic Press; p 3-27.
- Muir DCG, GP Rawn & NP Grift, 1985. Fate of the pyrethroid insecticide deltamethrin in small ponds. A mass balance study. *J. agric. Food Chem.* 33. 603–609.
- Pérez-Fernández V, MA García & ML Marina, 2010. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *Journal of Chromatography A*, 1217: 968–989.
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA), 2007. The Occurrence of Chemicals used in Sea Louse Treatments in Sediments Adjacent to Marine Fish Farms: Results of Screening Surveys During 2006. Report: TR-070807\_JBT August 2007. 21 pp.
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA), 2008. Models for assessing the use of medicines in bath treatments (Anexo G). Escocia [21 Marzo 2013] Desde página web:[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).
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), 1998. Policy on the use of cypermethrin in marine fish farming risk assessment, EQS and recommendations. Policy No. 30.
- Soderlund DM, JM Clark, LP Sheets, LS Mullin, VJ Piccirillo, D Sargent, J Stevens, & ML Weiner, 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Teratology* 171: 3–59.
- Thybaud E, 1990. Ecotoxicology of lindane and deltamethrin in aquatic environments. *Revue des Sciences de l'eau* 3: 195–210.

**Paper N°2:**

**Ethylene vinyl acetate polymer as a tool for passive sampling monitoring of organic contaminants in the salmon farm industry of Chile.**

Felipe Tucca<sup>a\*</sup>, Heriberto Moya<sup>a</sup> and Ricardo Barra<sup>a</sup>

Departamento de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA-Chile, Universidad de Concepción, Concepción.

\*P.O. Box 160-C, Concepción, Chile. Fax:+56 41 2207076; [Tel:+56 41 2661220](tel:+56412661220);  
E-mail address: [ftuca@udec.cl](mailto:ftuca@udec.cl) (F. Tucca).



## Abstract

Current monitoring programs are focused on hydrophobic chemicals detection in aquatic systems, which require the collection of high volumes of water samples at a given time. The present study documents the use of the polymer ethylene vinyl acetate (EVA) as a passive sampler for the capture of a hydrophobic chemical used by salmon industries such as cypermethrin. The EVA samplers were deployed during treatment period for salmon cages in southern Chile. Initially, an experimental calibration in laboratory with cypermethrin was performed to determine the equilibrium between sampler and aquatic medium. Equilibrium was reached to 7 days of exposure, using an EVA thickness of  $\sim 7 \mu\text{m}$ . A logarithm of partition coefficient EVA-water ( $\text{Log } K_{\text{EVA-W}}$ ) of 5.6 was reported. Field deployment of EVA samplers demonstrated average concentrations of cypermethrin in water to be  $2.07 \pm 0.7 \text{ ng L}^{-1}$  close to salmon cages, while near-shore was  $4.39 \pm 0.8 \text{ ng L}^{-1}$ . The hydrodynamic characteristic in the study area was determinants to the occurrence of cypermethrin levels. This was a first approach for assess EVA samplers as tool of monitoring in water for area with salmon farm activity. The environmental implications were discussed.

**Key word:** Salmon farm, Cypermethrin, Ethylene vinyl acetate, Passive sampler, Monitoring.

## 1. Introduction

During the last decade, the salmon industry has shown an important growth in aquaculture. However, the susceptibility of farmed salmon to diseases outbreaks has led to decline in production and has led to economic losses by the industry (Johnson et al., 2004). The occurrence of parasitic diseases in salmon farming in southern Chile has intervened in the growth of the salmon industry (Gonzalez & Carvajal, 2003; Hamilton-West et al., 2012; FAO, 2012), being the parasitic copepod *Caligus rogercresseyi* the main parasite in the marine culture in Chile (Boxshall & Bravo, 2000). Therefore, for effective mitigation, management and control of the parasitic diseases, the salmon industry requires the use of chemotherapeutic treatment such as antiparasitic pesticides (Roth, 2000).

Synthetic pyrethroid has been used for parasite control in salmon farm, with high efficiency at low concentrations (Hill, 1989). These veterinary products are applied through bath treatments at a concentration of 3 to 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  during 60 minutes, after which they are released into the marine environment. The pyrethroid application frequency will depend of parasite occurrence in salmon. Cypermethrin is a pesticide pyrethroid with low solubility in water and volatility. However, its hydrophobic properties ( $\log K_{ow} > 5$ ) allows for it to be absorbed onto the organic fraction available in the environment, and being transported over long distances with potential to affect non-target aquatic organisms (Ernst et al., 2001). Its mechanism of action is to interfere with the central nervous system function of invertebrates, by action on the sodium canals of the nerve cells (Soderlund et al., 2002). The toxicity by cypermethrin is dependent upon the isomerization of the chemical, *cis* or *trans*, the *cis* isomer shows a toxic potential 10 times higher (Ray, 2004). Several studies have shown a potent acute and chronic effects on marine invertebrates such as copepods (Barata et al., 2002a; Barata et al., 2002b; Medina et al., 2002, Medina et al., 2004; Willis & Ling, 2004, Willis et al., 2005), benthonic crustaceans (Gowland et al., 2002a) and mussels (Gowland et al., 2002b; Ait et al., 2010; Köprücü et al., 2010).

In Chile, vigilance and/or monitoring programs are based in the collection of high volumes of water samples at a specific time; however, sampling may be affected during pollution events. Lately, passive monitoring methods have been developed

with the aim to capture the dissolved or bioavailable fraction of organic contaminants in water (Vrana et al., 2005). Some examples of devices used as passive samplers in water are semi-permeable membranes (SPMDs) (Huckins et al., 1990), polar organic chemical integrative sampler (POCIS) (Alvarez et al., 2004), polyethylene (PE) (Choi et al., 2013), low-density polyethylene (LDPE) (Lohmann, 2012), silica rubber (Rusina et al., 2010), ethylene vinyl acetate (EVA) (St George et al., 2011), among others. These have been proven to be efficient tools for measuring dissolved chemical concentrations for a large range of hydrophobic organic pollutants, such as polychlorinated biphenyl (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), new generation pesticides, pharmaceuticals and personal care products have been detected.

A passive sampler is defined as a sampling technique based on the free flow of the analyte or chemical from a sampled environment to the sampler, as a result of the difference in the chemical potentials of the two environments. The total flow of the chemical between different mediums continues until equilibrium is achieved. The kinetics of exchange between a passive sampler and the polluted aquatic medium can be expressed through the first-order equation (1),

$$C_s(t) = C_w \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (1)$$

where  $C_s$  is the chemical concentration in the sampler as a function of time ( $t$ ),  $C_w$  is the concentration in the aquatic environment, whereas  $k_1$  and  $k_2$  are the constant rates of uptake and offload, respectively. At the equilibrium phase, the partition coefficient between the passive sampler and the water phase must be known. When equilibrium is reached, the concentration in water can be determined by the following equation (2),

$$C_w = C_s / K_{sw} \quad (2)$$

where  $K_{sw}$  is the partition coefficient between the sampler and the environment sampled (Mayer et al., 2003).

Ethylene vinyl acetate polymer (EVA) has been used as a sampler for several environmental compartments, such as air (Harner et al., 2003, Farrar et al., 2005), sediments (Golding et al., 2007; Meloche et al., 2009) and water (St George et al., 2011). EVA is a flexible polymer which can be easily processed and adapted to different substrates. In addition, it is resistant to high pressures, temperatures, UV radiation and it is also water proof, make it an effective polymer for the purpose of capturing hydrophobic chemicals in the water environment (Adams et al., 2007; St George et al., 2011).

This study aims first to establish the equilibrium time and partition coefficient between the cypermethrin pesticide and the EVA polymer through the laboratory calibration test. Then, the EVA polymer will be used as a passive monitoring tool during a cypermethrin treatment period in salmon cages located in southern Chile. This approach would allow sampling for the concentrations of pesticides in the water column which would provide valuable information related to the potential effects of cypermethrin on non-target crustaceans.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. EVA sampler preparations*

Ethylene vinyl acetate pellets (EVA, Elvax 40W, DuPont Canada) were cleaned with organic solvent methanol and stored in glass jar at room temperature until use. An EVA coating solution was prepared by dissolving 2 g of EVA pellets in 100 mL of dichloromethane (DCM). The solution was magnetically stirred for approximately 2 hours until there were no visible signs of EVA pellets. Whatman<sup>TM</sup> glass fiber filters (GF/F, GE Healthcare, Little Chalfont UK), of 70 mm diameter, were used as adhesion substrate of the polymer. The filters were baked at 420°C for 6 hours, cooled, weighed and stored prior to use. Each weighed GF/F was coated with EVA solution through an immersion time of five seconds. The filters were then dried in a dessicator and bell until complete evaporation of DCM solvent. Further, the dessicator allowed avoiding contamination and moisture absorption. Each coated filter was weighed again to calculate EVA mass (supplementary information, Table S1).

The average weight of EVA added to each filter and the EVA density ( $\rho = 0.93 \text{ g cm}^{-3}$ ) was used to calculate the volume of EVA for each sampler. The average volume was estimated in  $\sim 0.058 \text{ cm}^3$  for each sampler. With the estimated volume ( $\text{cm}^3$ ) and the total exposed area of the EVA sampler ( $76.9 \text{ cm}^2$ ) the average thickness was calculated to be  $\sim 7 \text{ }\mu\text{m}$  (see supplementary information).

## *2.2. Calibration design*

Three solutions were prepared in glass jars with 1.5 L of milli-Q water. Each jar had a known concentration of  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$  cypermethrin (CAS number 52315-07-8; 94.3 % purity, mixture of isomers, Pestanal) purchased at Sigma-Aldrich (St. Louis USA). One jar without cypermethrin was used as the calibration blank. During the experimental calibration, the solutions were kept under constant stirring for fifteen days at room temperature between  $13^\circ\text{C}$  and  $15^\circ\text{C}$ . The jars with solutions and blank were covered in aluminum foil to avoid photolytic degradation. For each solution, one filter was placed within. Water samples were collected every day (for 15 days) to detect changes of cypermethrin concentration over time. The concentration in the EVA sampler was estimated indirectly according to the water concentration measured. However, after fifteen days the samplers were analyzed to confirm the cypermethrin final concentration.

## *2.3. Deployment of EVA sampler*

The EVA samplers were deployed into Manao Bay located in the north of Chiloe Island, Chile (Figure 1). This study area is characterized by active mussel and salmon farms, predominant currents with southwest-northeast direction and strong tidal influences (see supplementary information). According to the hydrodynamic in the area, devices with EVA samplers were deployed in the marine water into cylindrical stainless steel baskets at a depth between 2 and 5 m (supplementary information, Figure S1, Figure S2). During a treatment in salmon cages with cypermethrin formulation (BETAMAX<sup>®</sup>), the devices were deployed in the water. The samplers were positioned near treated salmon cage and close to shore for a total period of eight days. After the sampling period was over, each sampler was removed

and rinsed with milli-Q water for the debris removal. The samples were finally stored at -4°C in aluminum foil envelopes until analysis in the laboratory.

#### *2.4. Extraction*

Extraction of cypermethrin from water samples were carried out by liquid-liquid chromatography method. A volume of 30 mL of water was extracted with 10 mL of organic solvent n-hexane. The solutions were agitated for 1 minute with a vortex and cleaned through sodium sulfate and glass fiber wool columns. This extraction procedure was repeated three times. On the other hand, filter coated with EVA were rinsed and placed in 100 mL of methanol for 48 hours. The solutions were cleaned through sodium sulfate and glass fiber wool columns.

Later, the extracts were reduced by rotary evaporation until reaching a volume ~2 mL. The final volume was transferred into a GC vial and evaporated under flow of nitrogen. The solvent was exchanged into toluene to final volume of 1.5 mL for analysis.

#### *2.5. Analysis*

Cypermethrin concentrations were determined using a gas chromatography equipped with an electron capture detector (GC-ECD), which provides more selectivity to halogenated compounds. Injector and detector temperatures were kept at 240°C and 370°C, respectively. A 30m PTE-5 column with film thickness of 0.25 µm and 0.25 mm i.d. was used. In GC-ECD a temperature program initial of 50°C minute<sup>-1</sup> and a gradient from 30 °C to 300°C for 12 minutes was considered. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 12.0 and 74.8 µg L<sup>-1</sup>, respectively.

In order to complement and support the GC-ECD detection, GC-MS analysis was performed on an Agilent 7890A, gas chromatograph coupled to Agilent 7000 triple Quadruple mass spectrometer (Santa Clara California, USA). An Agilent HP-5ms capillary column 5% phenyl methyl polysiloxane (30 m x 250 µm i.d., 0.25 µm film thickness) was used for the fractioning of the compounds. The temperature program was from 70 °C (held for 1 minute) to 150 °C at 25 °C minute<sup>-1</sup>, then from 150 °C (held for 1 minute) to 200 °C at 3 °C minute<sup>-1</sup> and finally from 200 °C to 280 °C at 8 °C minute<sup>-1</sup> (held for 10 minutes), using the splitless injection mode during 0.1 minutes.



Inject volume was 3  $\mu\text{L}$ . Transfer line temperature GC-MS was set at 280  $^{\circ}\text{C}$ . The adapted detector was temperature optimized and used in MMR (Monitoring of Multiple Reaction) mode with a solvent delay of three minutes. The collision energy (CE) was from 5 eV to 9.5 cycle second<sup>-1</sup>, with a dwell time of 20 msec. The detector resolution was set at unit mass when working in MS mode, while for the MS-MS experiments, resolution of the precursor and the product ions were set in wide mode in order to increase the sensitivity. The peak retention times for cypermethrin were 30.77 minutes, 30.91 minutes, 31.02 minutes and 31.07 minutes. To identify by MS, a 163 fragment was used, and as a second identification ion a 127 (m/z) was used, while the transition ions for MS-MS were 163; 127 and 163; 91 (m/z) (Feo et al., 2011).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Calibration test with EVA samplers

Results of calibration test showed that using this experimental system, the samplers reached equilibrium for cypermethrin in water within 7 to 8 days (Figure 2). The calibration in laboratory using a closed system may have indicated that EVA sampler could be deployed in the environment. The equilibrium would be reached in a period of time equivalent to if the EVA thickness of 7  $\mu\text{m}$  on the filters is considered. Therefore, the ability to adjust the film thickness, and hence the sorption capacity and performance may allow EVA samplers to be used under varying sampling conditions with a shorter time of deployment, i.e. the reached equilibrium depends of the polymer thickness (Genualdi & Harner, 2012). Previous studies have shown that EVA is versatile under different conditions, e.g. the polymer was able to reach equilibrium for other pesticides and PCBs after 12 days of exposure in marine water using 18  $\mu\text{m}$  of film thickness in samplers (St George et. al. 2011).

The partition coefficient between water and EVA sampler for cypermethrin was estimated through the equation (2) using data from the water and sampler concentrations obtained during the laboratory calibration. Therefore, the amount of chemical sequestered by the EVA sampler is directly related to the partition coefficient ( $K_{\text{EVA-W}}$ ), which the amount of cypermethrin sequestered by passive

sampling medium (according to EVA volume in the sampler) is divided by amount of cypermethrin in the water at equilibrium. This estimated value of  $\log K_{EVA-W}$  was 5.6 for cypermethrin. If the partition coefficient is known, the concentration of a chemical in the water can be easily calculated. The partition values designated for cypermethrin was consistent with other organic phases using the partition coefficient of octanol-water ( $K_{OW}$ ), which have shown ranges close to our study. The  $\log K_{OW}$  for cypermethrin is reported between 4 to 6 (Mackay et al., 2006) suggesting that the comparison with octanol could be a good surrogate for EVA when the equilibrium is reached. Equivalently, other studies have shown the linear relationship between the  $K_{EVA-W}$  to  $K_{OW}$  and  $K_{OA}$  (partition coefficient octanol-air) in hydrophobic organic compounds (Wu et al., 2008; St George et al., 2011).

Several authors have highlighted the incorporation of field conditions (e.i. turbulence, temperature, salinity and biofouling) for the uptake kinetic estimation in passive sampler exposed to chemicals. Natural conditions could have a role that influences the estimation of partition coefficient between the sampler and the aquatic medium (Booij et al., 1998; Vrana et al., 2005). Our laboratory experiment considered conditions such as room temperature (13-15°C) and turbulence (constant stir) to simulate a real situation in field. Factors such as salinity and biofouling were not included, but in future research should be considered in the  $K_{EVA-W}$  calculation. Thus, studies with other polymer such as polyethylene (PE), Adams et al. (2007) reported that hydrophobic compounds depend on variables such as temperature and salinity. However, a later research showed that the effect of salinity is relatively insignificant for hydrophobic compounds such as PAH and PCBs for partition coefficient estimation in water (Choi et al., 2013). On the other hand, the presence of biofouling in the aquatic system (bacterial biofilm and/or algal) could be critical in the environment. The biofouling could interrupt the uptake kinetics of organic compounds to passive samplers due to: (1) increased resistance in the mass transfer; (2) increased thickness; or (3) damage on surface of passive samplers.

### *3.2. Water concentration in field*

During treatment period with cypermethrin in salmon farms in southern Chile, samplers were deployed. Experimental values of  $K_{eva-w}$  obtained through calibration

tests in laboratory were used to estimate the environmental concentrations of cypermethrin in water ( $C_w$ ). Through the deployment period in field, the samplers were found with minimum incidence of biofouling; hence for this study the variable biofouling by calibration was not relevant due to the short time deployed in the marine water.

The estimated concentrations of the dissolved fraction for cypermethrin during treatment in salmon cages were in the range of  $\text{ng L}^{-1}$ , being 1000 fold lower to the daily dose administrated for the parasite treatments in salmon cages ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). In field, detected cypermethrin concentration was higher near shore than around salmon cages, which reported  $4.4 \pm 0.7$  and  $2.1 \pm 0.8 \text{ ng L}^{-1}$ , respectively (Figure 3). These cypermethrin concentrations were lower to levels reported in Scotland, which obtained concentrations between 13 to  $74 \text{ ng L}^{-1}$  after 50 minutes of being released from treated salmon cages (Hunter & Fraser, 1995). Similarly, in Canada cypermethrin concentrations detected were between 20 to  $40 \text{ ng L}^{-1}$ , after five hours of release (Ernst et al., 2001).

Long distance and quick dispersion was determined for cypermethrin in the study area after release. According to hydrodynamic characteristics in the Manao Bay, the average current speed measured was  $10 \text{ cm s}^{-1}$  (maximum of  $63 \text{ cm s}^{-1}$ ) predominantly in the SW-NE direction. These characteristics could establish a distributional pattern for the antiparasitic pesticides used and a possible explanation to higher concentration near shore. Therefore, human mistakes in the deployment of samplers close to salmon cages could not be disregarded.

### 3.3. Environmental implications

Passive sampling has been a technology widely used for environmental monitoring, and is interpreted according to the complexity of the area being studied. For this study, the dynamic and bioavailable concentration of the commercial product BETAMAX<sup>®</sup> was used for salmon treatment and cypermethrin was evaluated as active ingredient (a.i.). In this product, cypermethrin is represented with a proportion of *cis* 80: *trans* 20 isomerization in the formulation, being pharmacologically considered more active than other commercial products such as EXIS<sup>®</sup> (*cis* 40: *trans* 60). In general, the *cis* isomer is more toxic than the *trans* one (Pérez-Fernández et

a., 2010). The detectable levels of cypermethrin in the marine environment might give an estimation of potential risks on non-target aquatic organisms. Also, the rapid dispersion of cypermethrin in the water could indicate negative implications on crustaceans such as zooplankton (Willis & Ling, 2004; Medina et al., 2004).

Risk assessments through ecotoxicology data comparisons for marine species indicated that concentrations detected in Manao Bay during the treatment period were close to the threshold of toxicity. For non-target organism such as shrimp *Mysidopsis bahia* has been reported a lethal concentration in 50% of tested organisms (LC<sub>50</sub>) at 5 ng a.i. cypermethrin per liter of water, after 96 hrs of exposure (Hill, 1985). Other studies have determined short-term toxicity in larval stages of the American lobster *Homarus americanus* and reported ranges of LC<sub>50s</sub> between 6 to 120 ng L<sup>-1</sup> (Burrige et al., 2000). However, marine copepods in early stage of development have shown to be most susceptible to the cypermethrin action. For the specie *Acartia tonsa*, the naupliar stages were more sensitive to cypermethrin than adult stages, with LC<sub>50s</sub> between 4.2 to 5 ng L<sup>-1</sup> (96 hours) probably due to the susceptibility of acute effects during molting process (Medina et al., 2002). Additionally, chronic studies on adults of *A. tonsa* have shown reduced feeding rate at 7.4-22 ng L<sup>-1</sup> of cypermethrin (Barata et al., 2002a). Similar magnitudes were reported for the copepod *Tisbe battagliai*, which revealed reproductive difficulties at concentration ranges of 9.3 and 22 ng L<sup>-1</sup> (Barata et al., 2002b).

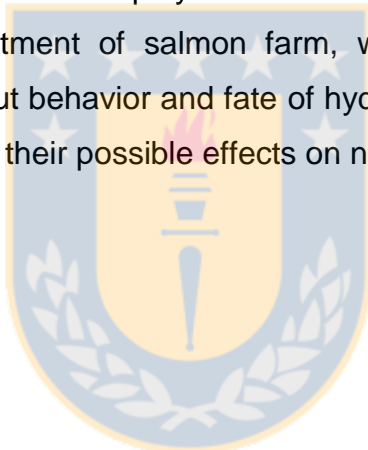
Monitoring program on antiparasitic pesticides in the water column could provide valuable exposure information for mussel aquaculture close to salmon farm areas, where bivalves could be in direct contact with chemotherapeutics treatment of pyrethroids and to induce toxic effects (Gowland et al., 2002b; Ait et al., 2010).

Thus, despite lower levels estimated for cypermethrin, our research allowed to determine environmental concentrations using techniques with low cost, easy handling and minimal effort in the sampling. This approach can be considered fundamental for a successful development of preliminary assessment phases of environmental risks for organic chemicals released from salmon farm activity, such as antibiotics, disinfectants, among others (Burrige et al., 2010).

#### 4. Conclusions

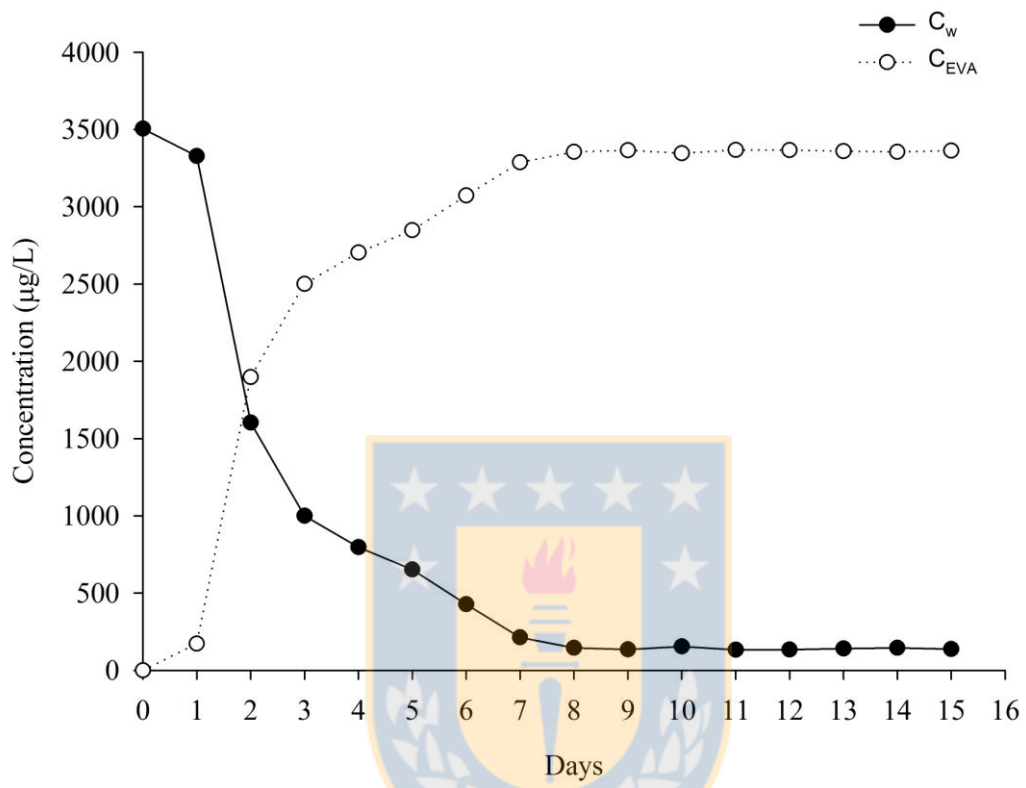
EVA samplers showed to be a useful tool for exposure assessment of cypermethrin in water. The use of glass fiber filters coated with EVA polymer allowed us to make samplers with specific characteristics (e.g. thickness), where quick equilibrium between EVA and aquatic medium was reached. On the other hand, the sorption capacity of EVA polymer allowed us to design a useful tool for detection of cypermethrin, which could also be used for other hydrophobic compounds in water. This advantage is due to molecular structure (non-polar: polar) that permits interaction with a wide range of organic chemicals (St George et al., 2010).

During field work, the hydrodynamic conditions play an important role in the dispersion of cypermethrin and deployment of samplers. Thus, monitoring programs are required during treatment of salmon farm, with an aim of providing spatial-temporal information about behavior and fate of hydrophobic organic chemicals in the aquatic environment, and their possible effects on non-target organisms.

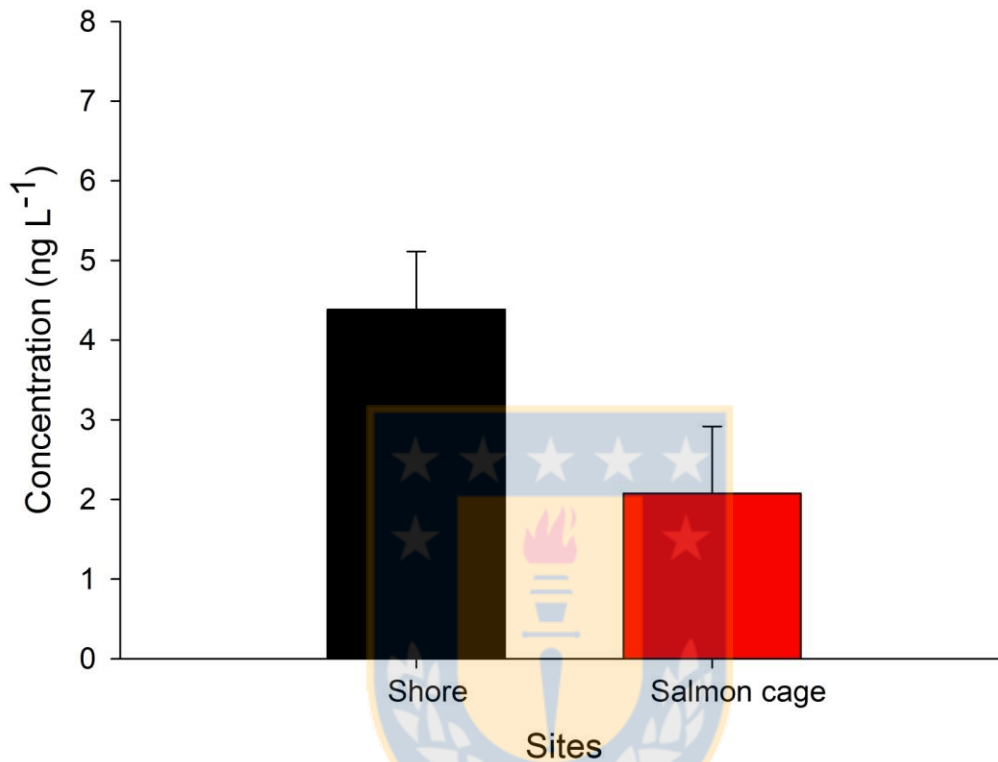




**Figure 1.** Study area and deployment of devices in the southern Chile. Red circles show the sites of deployment close to salmon cages and near shore.



**Figure 2.** Cypermethrin concentration in water ( $C_w$ = black circles) and EVA samplers ( $C_{EVA}$ =white circles) during calibration of devices.



**Figure 3.** Estimated concentration of cypermethrin in EVA passive samplers near shore (n=4) and salmon cage (n=6). The samplers were deployed in field during a treatment period on salmon farm.



## Acknowledgements

Thanks to FONDECYT 1110719 granted to R. Barra for his support in this research. Thanks also to Doctorate Thesis Support Fellowship N° 24110019 CONICYT, Foreign Stay Support (CONICYT, BECAS Chile) granted to F. Tucca. MUSSELS Project NC 130086 is also acknowledged. Finally, the author would like to thanks Dr. Tom Harner and Karla Pozo for their valuable comments and help.

## Supplementary Information (Anexo II)

### References

- Adams R.G., R. Lohmann, L.A. Fernandez, J.K. Macfarlane and P.M. Gschwend (2007) Polyethylene devices: Passive samplers for measuring dissolved hydrophobic organic compounds in aquatic environments. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 41: 1317-1323.
- Ait, A. M., Ait, F.M., Mouabad, A. (2011) Effects of Cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol.* Vol. 60(3):462-70. DOI 10.1007/s00244-010-9549-7.
- Alvarez D.A., J.D. Petty, J.N. Huckins, TL. Jones-Lepp, D.T. Getting, J.P. Goddard and S.E. Manahan (2004) Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23(7): 1640–1648.
- Barata, C., M. Medina, T. Telfer, D. J. Baird (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.
- Barata C., Baird D. J., Medina M., Albalat A., and Soares A.M.V.M. (2002b) Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Mar Ecol Prog Ser.* Vol. 230: 183–194.
- Booij K., H.M. Sleiderink and F. Smedes (1998) Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices using exposure standards. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 17 (7): 1236–1245.
- Boxshall GA, S Bravo. (2000). The identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonids net pen systems in southern Chile. *Contrib. Zool.* 69: 137-146.

- Burrige, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J. & K. Bostick, 2010, Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306: 7-23.
- Burrige L.E., K. Haya, S.L. Waddy, J. Wade (2000) 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.
- Choi Y., Y.M. Cho and R.G. Luthy (2013) Polyethylene–Water Partitioning Coefficients for Parent- and Alkylated-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 47: 6943–6950.
- Ernst W., P. Jackman, K. Doe, F. Page, G. Julien, K. Mackay & T. Sutherland. 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*. Vol. 42 (6): 433-444. doi:[10.1016/S0025-326X\(00\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00177-6).
- Farrar N.J. T. Harner, M. Shoeib, A. Sweetman and K.C. Jones, 2005. Field deployment of thin film passive air samplers for persistent organic pollutants: A study in the urban atmospheric boundary layer. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 39: 42-48.
- Feo ML., E. Eljarrat and D. Barceló, 2011. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Vol. 25: 869-876. doi: 10.1002/rcm.4936.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The State of World Fisheries and Aquaculture, 2012, Accessed April 2, 2013. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>.
- Genualdi S and T. Harner (2012) Rapidly Equilibrating Micrometer Film Sampler for Priority Pollutants in Air. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 46: 7661–7668.
- Golding C.J., F.A.P.C. Gobas and G.F. Birch (2007) Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon bioavailability in estuarine sediments using thin-film extraction. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 26 (5): 829–836.
- González L & Carvajal J, 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* 220: 101– 117.
- Gowland, BT, Moffat CF, Stagg RM, Houlihan DF, Davies IM. (2002a) Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res*. Vol. 54(2):169-77.
- Gowland, B., Webster, L., Fryer, R., Davies, I., Moffat, C., Stagg, R. (2002b) Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ Pollut*. Vol. 120(3):805-11.

- Hamilton-West C, Arriagada G, Yatabe T, Valdés P, Hervé-Claude LP & Urcelay S, 2012. Epidemiological description of the sea lice (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 104: 341– 345.
- Harner T., N.J. Farrar, M. Shoeib, K.C. Jones and F.A.P.C. Gobas (2003) Characterization of polymer-coated glass as a passive air sampler for persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 37: 2486-2493.
- Hill I.A. (1985) Effects on non-target organisms in terrestrial and aquatic environments. In J. P. Leahy, ed., *The Pyrethroid Insecticides*. Taylor and Francis, London, U.K., pp. 151-262.
- Huckins, J.N., M.W. Tubergen and G.K. Manuweera (1990) Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* Vol. 20: 533–552.
- Hunter R.P. & Fraser N. (1995) Field monitoring of the effects of cypermethrin as GPRD01. Report of Grampian Pharmaceuticals Limited, Research Division. Ref GP95033.
- Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., 2004. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool. Stud.* 43, 229–243.
- Köprücü K., Yonar S.M., and Seker E. (2010) Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. *Fish Sci* 76:1007–1013. DOI 10.1007/s12562-010-0293-8.
- Lohmann R. (2012) Critical review of low-density polyethylene's partitioning and diffusion coefficients for trace organic contaminants and implications for its use as a passive sampler. *Environ. Sci. Technol.*, 46: 606–618.
- Mackay, D., Shui W., Ma K. and Lee S. (2006). *Handbook of Physical- Chemical properties and environmental fate for organic chemicals*. Second edition. Taylor & Francis Group. Vol. IV, Chapter 8: 3715-3992.
- Mayer P., J. Tolls, J.L.M. Hermens and D. Mackay (2003) Equilibrium sampling devices. *Environmental Science & Technology*: 185-191.
- Medina, M., Barata, C., Telfer, T. and Baird, D. J. (2004) Effects of cypermethrin on marine plankton communities: a simulated field study using mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 236–245.
- Medina, M., Barata, C., Telfer, T. and 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.

- Meloche L.M., A.M.H. deBruyn, S.V. Otton, M.G. Ikonou and F.A.P.C. Gobas (2009) Assessing exposure of sediment biota to organic contaminants by thin-film solid phase extraction. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 28 (2): 247–253.
- Pérez-Fernández V, MA García & ML Marina, 2010. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *Journal of Chromatography A*, 1217: 968-989.
- Ray, D. (2004). Toxicology of Pyrethrins and Synthetic Pyrethroids (Chapter 4). En: Timothy C. Marrs and Bryan Ballantyne. *Pesticide Toxicology and International Regulation*. John Wiley & Sons, Ltd. 129-158 pp. ISBN: 0-471-49644-8.
- Roth, M. (2000) The availability and use of chemotherapeutic sea lice control products. *Contributions to Zoology*. Vol. 69 (1-2): 109-118.
- Rusina T.P., F. Smedes, M. Koblizcova and J. Klanova (2010) Calibration of silicone rubber passive samplers: Experimental and modeled relations between sampling rate and compound properties. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 44: 362-367.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., and Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Teratology* 171: 3–59 pp.
- St George T., P. Vlahos, T. Harner, P. Helm, B. Wilford (2011) A rapidly equilibrating, thin film, passive water sampler for organic contaminants; characterization and field testing. *Environmental Pollution* 159: 481-486.
- Vrana, B., G.A. Mills, I.J. Allan, E. Dominiak, K. Svensson, J. Knutsson, G. Morrison, R. Greenwood (2005) Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry* Vol. 24 (10): 845-868.
- Willis, K. J., P.A., Gillibrand, C.J., Cromey and K.D., Black. (2005) Sea lice treatments on salmon farms have no adverse effects on zooplankton communities: a case study. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 50: 806-816.
- Willis, K.J. and Ling, N. (2004) Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine copepods. *Aquaculture Research* 35: 263-270.
- Wu R., T. Harner, M.L. Diamond and B. Wilford, 2008. Partitioning characteristics of PCBs in urban surface films. *Atmospheric Environment*. 42: 5696-5705

## Capítulo III: EVALUACIÓN DE EFECTOS



**Paper N°3:**

**Toxic effects of antiparasitic pesticides used by the salmon industry in the marine amphipod *Monocorophium insidiosum*.**

Felipe Tucca\*<sup>1</sup>, Mauricio Díaz-Jaramillo<sup>2</sup>, Gabriel Cruz<sup>3</sup>, Jeannette Silva<sup>3</sup>, Enrique Bay-Schmith<sup>3</sup>, Gustavo Chiang<sup>1</sup> and Ricardo Barra<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA-Chile, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Ambiental ECoA, IIMyC-CONICET, Universidad de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

<sup>3</sup>Laboratorio de Bioensayos, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile.



Accepted: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.

DOI 10.1007/s00244-014-0008-8

\*Corresponding autor: Tel: +56 41 2661220; Fax: +56 41 2207076

E-mail address: [ftuca@udec.cl](mailto:ftuca@udec.cl) (F. Tucca)

## Abstract

The use of antiparasitic pesticides (AP) has been widely required by the salmon industry to treat diseases. The direct emission of chemicals in the seawater has produced uncertainty about the potential effects on non-target organisms, such as crustaceans. The aim of this study was to assess the toxicity of three AP used by the salmon farm industry, such as emamectin benzoate (EB), cypermethrin (CP) and deltamethrin (DE), over the amphipod *Monocorophium insidiosum* during 10 days, through whole sediment bioassay tests. Lethal concentration by 50% ( $LC_{50-10d}$ ) and biochemical responses such as glutathione S-transferase (GST) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured as exposure and effects endpoints, respectively. Acute assays for DE ( $7.8 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ,  $CI_{95\%}= 5-11$ ) and CP ( $57 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ,  $CI_{95\%}= 41-77$ ) showed more mortality than EB ( $890 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ,  $CI_{95\%}= 672-1171$ ). In this study, it was possible to observe sublethal responses in amphipods after 2 days of exposure to AP. Significant induction in GST and TBARS ( $p<0.05$ ) were measured for CP and EB. Lower DE concentrations showed no significant biochemical responses. *M. insidiosum* was sensitive to AP concentrations at  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in sediments. This information would allow considering possible consequences of detected concentrations for AP in areas with intensive salmon farming activity.

**Key words:** Salmon farm, GST, TBARS, Amphipod, Pyrethroids, Emamectin benzoate.

## 1. Introduction

During the last decade, the salmon industry has shown remarkable growth within aquaculture. However, in recent years, the susceptibility of salmon farms to ectoparasitic disease outbreaks has resulted in significant economic losses due to the decline in production (Johnson et al. 2004; Costello et al. 2006; Torrissen et al. 2013). For an effective mitigation, management and control of parasites, the industry has required a wide range of antiparasitic pesticides (AP) such as chemotherapeutic treatments. Pesticides such as emamectin benzoate (EB) avermectin and synthetic pyrethroids, cypermethrin (CP) and deltamethrin (DE) have been used to combat parasitic diseases (BurrIDGE et al. 2010). These compounds are mainly characterized by presenting low solubility in water and high octanol-water partitioning coefficient (Log  $K_{ow}$  between 5 and 6), so that the probability of being absorbed by suspended organic matter and being bioavailable in sediment is high (SEPA 1998; Bright and Dionne 2005).

Therefore, the potential exposure and bioavailability to sediment-associated organisms such as benthic invertebrates may lead to deleterious effects (Ernst et al. 2001; Waddy et al. 2007; Crane et al. 2011). Likewise, the low capacity of invertebrates to detoxify or purify the quick action of compounds such as pyrethroids on nerve cells, compared to other organisms (e.g. mammals and birds), allows inferring the selective toxicity to non-target organisms such as benthic crustaceans vulnerable to low concentrations of these pesticides (Pérez-Fernández et al. 2010).

Marine amphipods have been successfully used as ecotoxicological test organisms in sediment, due to their sensitivity to a wide variety of contaminants, abundance, easy collection and laboratory manipulation, discrete motility, besides being an important ecological component within the benthic community (Long et al. 2001; Mayor et al. 2008; Ré et al. 2009; Prato et al. 2010). *Monocorophium insidiosum* (Crawford 1937) is a tube-forming amphipod with an extensive distribution in coasts of Europe (Mediterranean) and east coasts of the Pacific Ocean (Kevrekidis 2004; González et al. 2008). These amphipods inhabit primarily estuarine and brackish waters from infralittoral zones with a basic supply of suspended particles, microfauna, diatoms, phytoplankton and zooplankton (Macdonald et al. 2010). Ecotoxicological tests with



these amphipods have shown effective results in tests with contaminated sediments and low-sensitivity external factors, so their responses have been considered as a good toxicity indicator (Prato and Biandolino 2006).

Toxicological assessments through the use of bioassays, combined with appropriate biomarkers on marine organisms, can result in a satisfactory method for monitoring AP (Davies et al. 2001). Biomarkers allow assessing responses at the biochemical level, providing an early warning of the potential effects of a chemical product on living organisms (Payne et al. 1987), being an assessment tool for contaminated areas (Chiang et al. 2011; Diaz-Jaramillo et al. 2013b).

The antioxidant defense system plays an important role in homeostasis as well as in the detoxification of chemicals, preventing oxidative cell damage caused by reactive oxygen species (ROS) such as superoxide free radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ). Many pesticides have the production of free radicals as toxicity mechanisms, which in turn have the ability to induce lipid peroxidation or alter the antioxidant capacity in aquatic organisms (Livingstone 2001). Oxidative stress responses such as the activity of glutathione S-transferase enzymes (GST) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) have been used as biomarkers in marine crustaceans (Schvezov and Amin 2011; Diaz-Jaramillo et al. 2013a). GST enzymes act as catalysts for oxidizing agents through the combination of xenobiotic compounds, preventing the oxidative damage and interaction of ROS with biological macromolecules such as DNA and lipids. Lipid peroxidation of unsaturated fatty acids in phospholipids triggers further damaging effect on cell membranes, so assessments of biomarkers such as TBARS have been considered good indicators of membrane peroxidation (Oakes and Van Der Kraak 2003; Gorbi et al. 2008; Hellou et al. 2012).

The aim of this study was to assess the sensitivity of the marine amphipod *M. insidiosum* to AP through ecotoxicological tests in sediment by measuring acute (lethal concentration over 50% of the population,  $LC_{50}$ ) and sublethal (GST and TBRAS) endpoints at different exposure times (2 and 10 days). This study corresponds to a first ecotoxicological registration at different levels of biological organization for this amphipod.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Chemical standards

Commercial standards of emamectin benzoate (CAS: 155569-91-8; 99.4% purity, Pestanal), cypermethrin (CAS: 52315-07-8; 94.3 % purity; mixture of isomers, Pestanal) and deltamethrin (CAS: 52918-63-5; 99.7% purity, Pestanal) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) for toxicological testing. Analytical standards were kept at room temperature for later use.

### 2.2 Sampling

Amphipods and native sediment were collected in the intertidal zone of Cocholgüe Beach, Bay of Concepcion, Chile (36°35'S - 72°58'W). A low anthropogenic pressure characterizes this locality. Amphipods (*Monocorophium insidiosum*) were collected over 4 cm of the surface sediment with a sieve size of 500 µm, transferred to containers with seawater and fresh native sediment, stored and transported to the laboratory. In the laboratory, the amphipods were carefully transferred to trays with fresh seawater and kept with continuous aeration until their use in toxicity tests.

The collected sediment was used as substrate in toxicity testing, which was first sieved using a mesh size of 1000 µm, repeatedly washed to eliminate macrofauna and larger organic particles and finally dried for 24 h at 140°C. The fine suspended particles (FSP) washed out by the cleaning process was left to settle and suctioned with a pipette to be added back for sediment structure reconstitution at sediment spiking time.

### 2.3 Sediment bioassays preparation

Each standard solution corresponding to AP was diluted in acetone organic solvent due to the feasible dissolution of the active ingredient. The solvent control contained the maximum volume of acetone in the standard solution used for assessing pesticides. Containers with 20 g of sediment were prepared and independently spiked with AP standard. Containers were mixed to achieve homogeneity and volatilization of the solvent. Treatment concentrations are reported as µg active ingredient per Kg of dry sediment (µg kg<sup>-1</sup>). Subsequently, 150 ml of oxygen saturated fresh seawater, 3

ml of FSP and microalgae *Dunaliella sp* (2 mL,  $\sim 1.5 \times 10^5$  cell mL<sup>-1</sup>) were added. FSP were provided as structural substrate for amphipod tube building and microalgae as suspended food source. Amphipods were not further fed nor received continuous aeration during the bioassay. For each test, a number of 10 to 12 individuals were incorporated with sizes between 3-4 mm.

The sedimentological characterization in the tests was conducted by determining the average particle size according to the size scale proposed by Gray (1981). Coarse and fine fractions in sediment were determined by a digital decanting tube (Emery Type) and microparticle analyzer (ELZONE® 282 PC), respectively. The total organic matter content was determined by the ash free dry weight method (AFDW), incinerating the sample in an oven for 4 h at 550°C. Test conditions related to the main physical and chemical parameters of water and sediment are shown in Table 1.

#### 2.4 Bioassay procedures

*2.4.1. Acute test:* To assess the lethality in amphipods, five nominal concentrations were considered, which allowed determining LC<sub>50</sub> in amphipods for 10 days of exposure (USEPA 1994). Previously, a preliminary test was conducted through a wide range of concentrations to determine the definitive test. The nominal concentrations for each AP are shown in Table 2. Dead and immobile amphipods were registered.

*2.4.2. Sublethal test:* Biochemical responses were made from the results obtained in acute tests, in which lethal concentration in 1% of the species tested was defined. Each test consisted of three different concentrations (5 replications each) under the lethality threshold through a dilution factor of 0.5 (EB= 25, 50, 100 µg kg<sup>-1</sup>; CP= 2, 4, 8 µg kg<sup>-1</sup>; DE= 0.025, 0.05, 0.1 µg kg<sup>-1</sup>). Exposure times considered for each test were: initial time (t<sub>0</sub>), 2 days (t<sub>2</sub>) and 10 days (t<sub>10</sub>).

Amphipods (n=10-12) were pooled to obtain a reasonable amount of tissue for the biochemical analyses. The GST enzyme activity was determined following Habig and Jakoby (1981) protocol and proteins were analyzed according to Bradford (1976). Briefly, the tissue was weighed and homogenized (1:10 w/v) in cold sucrose buffer (20 mM Tris-base, 1 mM EDTA, 1 mM DL-dithiothreitol, 500 mM sucrose and 150 mM

KCl) with a pH adjusted to 7.6 (Geracitano et al. 2002). As a protease inhibitor, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) solution was used in the ratio 5 ml of sucrose buffer: 5  $\mu$ L PMSF. Homogenates were centrifuged at 10000 rpm for 30 minutes (4°C) and the supernatant was collected and stored at -80°C for later use. GST activity (nmol/min/mg protein) was measured through the combination of 1mM of glutathione and 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm.

For the TBARS analysis, amphipod pools were homogenized in 1.15% KCl solution, which contained 35  $\mu$ M of butylated hydroxytoluene (BHT), in the ratio of 0.01 g of tissue: 90  $\mu$ L of homogenization solution. Homogenates were stored at -80°C for later analysis. Measurements were performed by fluorometric analysis ( $\lambda$  excitation=515nm and  $\lambda$  emission=553nm) for determining TBARS using tetramethoxypropane (TMP) as standard (Oakes and Van Der Kraak 2003).

### 2.5 Statistical analysis

Lethal toxicity calculations ( $LC_{50-10d}$ ) were analyzed using the PROBIT regression model (USEPA 1988) and Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977). The latter analysis was used when the data showed no normal distribution and a non-parametric analysis was required.

For biochemical responses, significant differences were evaluated through the analysis of variance among treatments using the Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ). Differences between solvent control and treatments were considered. Previously, the assumption of normality and homogeneity of data was analyzed; however, those data that showed no normal distribution were analyzed using the Kruskal-Wallis non-parametric test (Di Rienzo et al. 2010).

## 3. Results

### 3.1 Acute tests

Mortality percentage in *M. insidiosum* during exposure to AP is shown in Figure 1. Less than 10% mortality was observed in controls, with a range between 4-8% lethality for the solvent control. AP testing showed that EB had the highest  $LC_{50}$  at a concentration of 890  $\mu$ g  $kg^{-1}$  ( $CI_{95\%} = 672-1171$ ), contrary to what happened with CP

and DE pyrethroid compounds, in which there was a greater lethality in tested amphipods, with  $57 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $\text{CI}_{95\%}=41-77$ ) and  $7.8 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $\text{CI}_{95\%}= 5-11$ ), respectively (Table 3). The average percentage in the variation coefficient obtained in acute tests ( $n=3$ ) indicates values below 33%, which is considered acceptable for ecotoxicological tests (USEPA 1991). Considering a threshold of lethality in 1% of the test organisms, it was possible to define the concentrations for sublethal responses in amphipods (Table 3).

### 3.2 Sublethal tests

Biochemical responses were observed in *M. insidiosum* after 2 days of exposure to pesticides (Figure 2a-f). No significant differences were found between controls for GST activity in each of the tests with AP. However, a significant difference was observed between controls for TBARS with the CP pesticide, with a higher level detected in the initial control ( $p<0.05$ ; Figure 2d). For the biochemical analysis between the solvent control and treatments, a significant induction can be distinguished in the GST activity for  $100 \mu\text{g}$  of EB per  $\text{kg}^{-1}$  of sediment ( $p<0.05$ ; Figure 2a). Likewise, a significant increase of TBARS was observed at  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  in the amphipods tested ( $p<0.05$ ; Figure 2b). Moreover, tests with CP showed significant differences between the solvent control and GST activity at  $8 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $p<0.05$ ; Figure 2c), with a progressive increase at higher concentrations. Similarly, a TBARS increase was observed in amphipods after two days of exposure to CP ( $p<0.05$ ; Figure 2d). On the other hand, DE registered a slight increase in GST activity at the lowest exposure concentration ( $0.025 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) compared to other treatments, but showed no significant differences with the solvent control. Equivalently, TBARS showed no differences between treatments and control (Figure 2e-f).

From 10 days exposed to AP in *M. insidiosum*, significant differences were observed between controls and treatments for measurements in GST activity and TBARS ( $p<0.05$ ; Figure 3a-f). Amphipods exposed to EB exhibited a significant induction of GST at  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  compared to the solvent control ( $p<0.05$ ; Figure 3a). Similarly, a significant increase in TBARS was reported ( $p<0.05$ ; Figure 3b). In contrast, tests with CP and DE pyrethroid registered no differences for GST and TBARS activity with respect to solvent control (Figure 3e-f).

#### 4. Discussion

The sensitivity of *M. insidiosum* to AP varies according to the active element to which it is exposed, with pyrethroid compounds such as CP and DE having more effects on *M. insidiosum* than EB avermectin. Table 4 shows a summary of sediment ecotoxicological studies for different species of marine benthic invertebrates exposed to pesticides.

Toxicity data for EB organic compound ( $LC_{50} = 890 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtained in this study suggests an  $LC_{50}$  greater than that reported in the literature for other marine amphipods. Authors like Mayor et al. (2008) reported an  $LC_{50-10d}$  of  $153 \mu\text{g kg}^{-1}$  for the marine amphipod *Corophium volutator*, through ecotoxicological tests with the commercial formulation SLICE<sup>®</sup> (antiparasitic). Similarly, SEPA (1999) found an  $LC_{50}$  of  $193 \mu\text{g kg}^{-1}$  for the same species. On the other hand, other marine invertebrates such as polychaete worms have exhibited different sensitivities to EB during toxicity testing with sediment. Reports for the species *Hediste diversicolor* indicate an  $LC_{50}$  greater than  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ; however, lethality in the order of  $110 \mu\text{g}$  of EB per  $\text{kg}^{-1}$  sediment was determined for the polychaete *Arenicola marina*, showing a wide variability among species. However, SEPA (1999) has shown *A. marina* to be highly sensitive compared to other organisms tested in sediment with EB.

On the other hand, an  $LC_{50}$  of  $57 \mu\text{g kg}^{-1}$  was reported for CP, which is similar to the results of other studies with the amphipod *C. volutator*, in which an  $LC_{50}$  of  $42 \mu\text{g kg}^{-1}$  was found (Milson 1999). Tests conducted in other crustaceans such as the shrimp *Palaemonetes pugio* have shown greater sensitivity (Clarke et al. 1987). Through acute tests conducted in amphipod *C. volutator* with antiparasitic commercial product EXIS<sup>®</sup>, Mayor et al. (2008) showed that CP, as an active ingredient in its formulation, is eleven times more toxic than those observed in this study (Table 3). The difference obtained in results of this study for CP and EB compared to other toxicological studies with amphipods could be explained due to uneven loads of organic matter in the sediment, or to a poor homogenization of pesticides in this substrate, which would prevent a proper distribution and bioavailability for amphipods (Maud et al. 2002; Allen et al. 2007).

Greater sensitivity was observed with the DE pyrethroid compound on the amphipods tested after 10 days, where an LC<sub>50</sub> of 7.8 µg kg<sup>-1</sup> was reported. Several studies have reported acute toxicity of DE on marine invertebrates in water, showing lethal levels in the order of ng L<sup>-1</sup> (Ferrero et al. 2001; Adams et al. 2010; Oliveira et al. 2012). However, no information could be found on sediment toxicological tests to compare the results obtained in this study. Meanwhile, the high mortality of amphipods against DE can be explained by the significant toxic selectivity of this pesticide on invertebrates, mainly by the rapid and effective action exerted on the central nervous system and other tissues, affecting cell transmission of organisms exposed to very low doses.

AP assessment through responses at the biochemical level can be a tool to measure the effects at a lower level of organization on non-target organisms, which may respond to chemotherapies conducted by the salmon industry (Davies et al. 2001). In our study, the role played by the GST enzyme activity in the detoxifying process of the species *M. insidiosum* shows significant increases in the antioxidant defense against EB pesticide during 2 and 10 days of exposure (Figure 2 and 3). TBARS increases were observed even during GST enzyme action. This increase in lipid peroxidation on the tested organisms could be due to a failed antioxidant defense by GST enzymes when being exposed to 100 µg of EB per kg<sup>-1</sup> of sediment. On the other hand, the prolonged antioxidant response in amphipods can be due to properties such as the high persistency of EB in sediment (>175 days) and high adsorption capacity to the particulate material, so that its presence after 10 days could manifest the measured behavior (SEPA 1999). Few studies of oxidative stress in invertebrates have been reported for the EB pesticide. However, significant inductions in GST activity have been reported in marine organisms such as *Salmo salar* (Olsvik, et al. 2008), the main product of cultivation in the salmon industry.

Pyrethroid compounds have been considered as a group of pesticides with a high capacity to produce free radicals, lipid peroxidation and generate alterations in the antioxidant capacity (Abdollahi et al. 2004). Authors such as Davies et al. (2001) have indicated that GST enzymes may act as a suitable indicator of exposure to CP within an enzyme detoxification system. Increases in GST enzyme activity and effects on lipids at 8 µg of CP per kg<sup>-1</sup> of sediment have been observed in this study after the

amphipods were exposed for 2 days. However, measurements at 10 days showed no significant responses. Results may indicate that short-term exposures can provide greater reliability of the data obtained. Similarly, in a study conducted by Gowland et al. (2002), it was concluded that GST inductions on the crab *Carcinus maenas* required short exposure times (24 h) in order to assess possible effects against exposure to CP.

According to the results obtained with DE, no significant detoxifying activity was observed by *M. insidiosum* against tested nominal concentrations; however, a slight increase in GST at  $0.025 \mu\text{g kg}^{-1}$  was observed, possibly due to a disruption of the homeostatic compensatory mechanisms under the toxicological threshold before achieving the equilibrium. These behaviors have been mentioned within the field of ecotoxicology with the concept of hormesis (Calabrese and Baldwin 2001; Calabrese, 2008). The reasons why there were no significant responses with the DE pyrethroid are not clear; however, the use of nominal concentrations, in addition to the small volume applied in sediment, may overestimate the concentrations assessed. Against the result obtained for DE studies, a failed antioxidant protection by GST enzymes in marine crustaceans has been observed when DE concentrations increase, triggering high levels of lipid peroxidation (Oliveira et al. 2012), as well as short-term oxidative damages (Dorts et al. 2009). It is mentioned that many invertebrate responses to toxic compounds are determined by environmental factors such as pH, temperature and salinity, among others, which could affect acute responses at the biochemical level (Allen et al. 2007; Tu et al. 2012). However, this is primarily discarded due to minimal variation of measured laboratory conditions.

Davies et al. (2001) has discussed the ineffectiveness of small crustaceans as assessment organisms at the biochemical level for chemotherapeutic compounds used by the salmon industry. However, in our study, antioxidant processes were measured for the amphipod *M. insidiosum*, and biochemical responses to sediments contaminated with metals have been reported in other amphipods as well (Schvezov and Amin 2011).

From the point of view of risk assessment and environmental relevance, AP levels found in sediment, within a radius of 100 m around net pens, have reflected concentrations in the range of 14 to  $44 \mu\text{g kg}^{-1}$  for EB, and  $0.49 \mu\text{g kg}^{-1}$  for CP (SEPA



2007; SEPA 2011; F. Tucça personal communication). Other researchers have identified concentrations of CP between 8.27 at 71.9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in sediment of marine-estuarine areas in NE Spain (Feo et al. 2010). No studies have found detectable DE concentrations in sediment. Consequently, EB measured concentrations are under an order of magnitude according to the levels of acute and sublethal toxicity reported for *M. insidiosum* in our study. However, the EB potential to persist and accumulate in the sediment, considering periods of consecutive treatments in salmon, can present a worst case scenario that may result in higher levels that generate toxic side effects. On the other hand, sediment values reported for CP could trigger potential environmental risks, or be mostly susceptible to the action on amphipods or other marine benthic invertebrates. The lack of ecotoxicological information and environmental studies for DE in marine sediment needs higher focus of attention in order to generate more data that allow a proper risk assessment of this pesticide on benthic marine invertebrates (Fairchild et al. 2010).

## 5. Conclusions

Sediment bioassays conducted with the amphipod *Monocorophium insidiosum* showed responses at different levels of the biological organization and appear to be a candidate for ecotoxicological studies. Through the experimental method, it was possible to obtain contrasting results in relation to other marine organisms exposed to AP, which showed higher sensitivity to pyrethroid pesticides such as CP and DE.

Sublethal responses such as induction in GST activity and lipid peroxidation were affected by EB and CP in the short term exposures, while concentrations tested with DE showed no significant antioxidant activity. Thus, biochemical responses may be unclear after a longer exposure time.

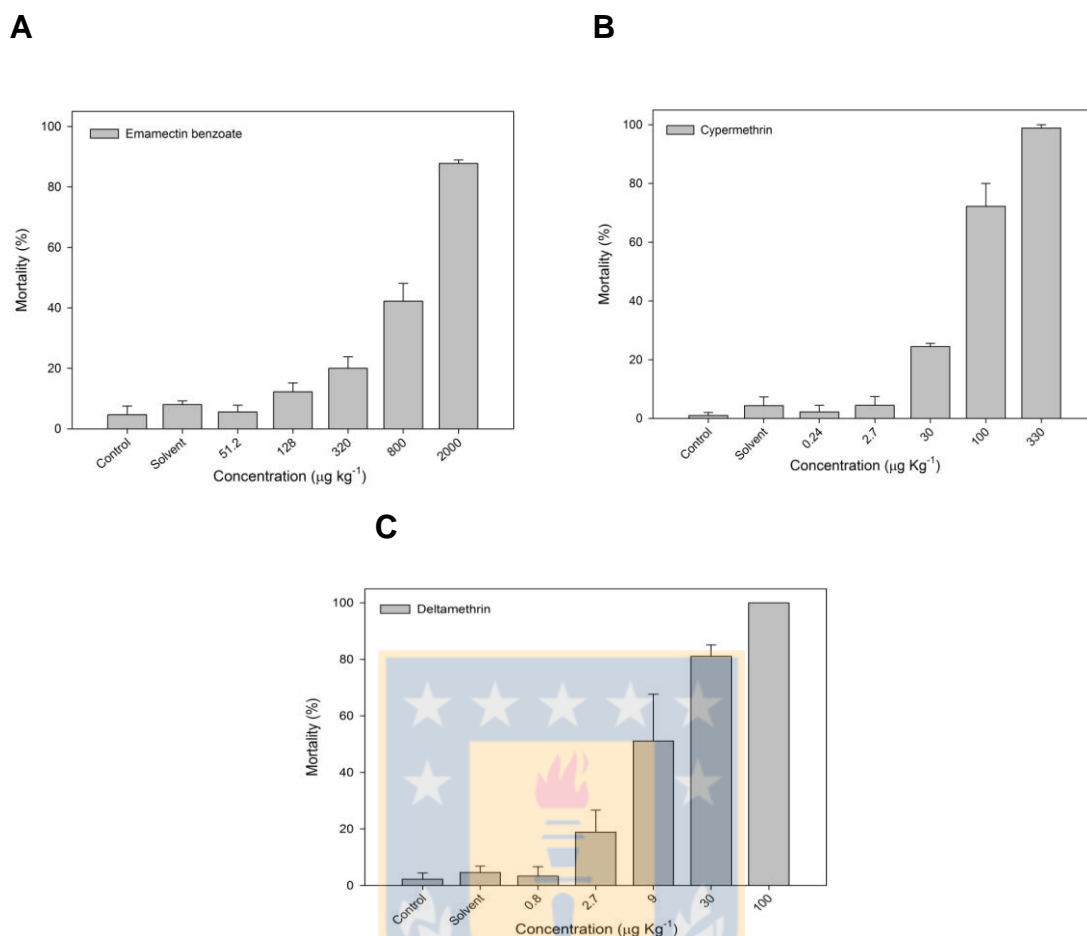
In relation to concentrations measured in marine sediment, data showed that AP could cause a potential risk against the scenario of the intensive application of pesticides, in which low levels, mainly pyrethroids, would generate adverse consequences on *M. insidiosum* or other non-target organisms in areas with aquaculture activity. Future studies in sediment require greater attention on highly toxic pesticides such as DE.

**Table 1.** Physic-chemical characteristics measured in ecotoxicological tests with marine amphipods.

Parameters (Unit)	Average $\pm$ Standard deviation
Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	8.23 $\pm$ 0.36
Sediment organic matter (%)	5.54 $\pm$ 0.74
Salinity (PSU)	33.0 $\pm$ 1.6
pH	7.8 $\pm$ 0.03
Temperature (°C)	12.5 $\pm$ 1.26
Photoperiod (day:night)	12h:12h
Grain size	Coarse sand

**Table 2.** Nominal concentrations of antiparasitic pesticides used in the acute toxicity test.

Treatment	Antiparasitic pesticide ( $\mu$ g active ingredient/Kg sediment)		
	Emamectin benzoate	Cypermethrin	Deltamethrin
Control	0	0	0
1	51.2	0.24	0.8
2	128	2.7	2.7
3	320	30	9
4	800	100	30
5	2000	330	100

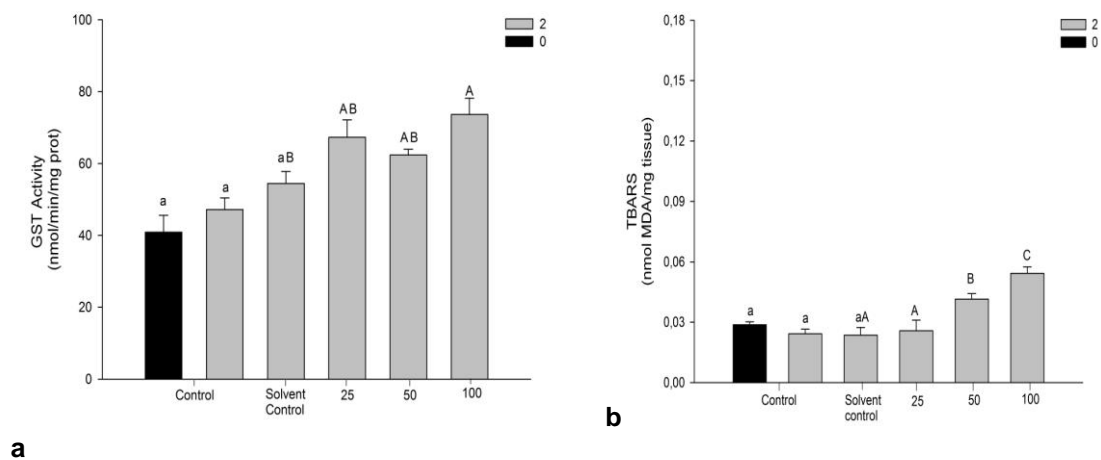


**Figure 1.** Percentage of lethality ( $LC_{50-10d}$ ) in *M. insidiosum* against pesticide exposure: A, emamectin benzoate; B, cypermethrin and C, deltamethrin.

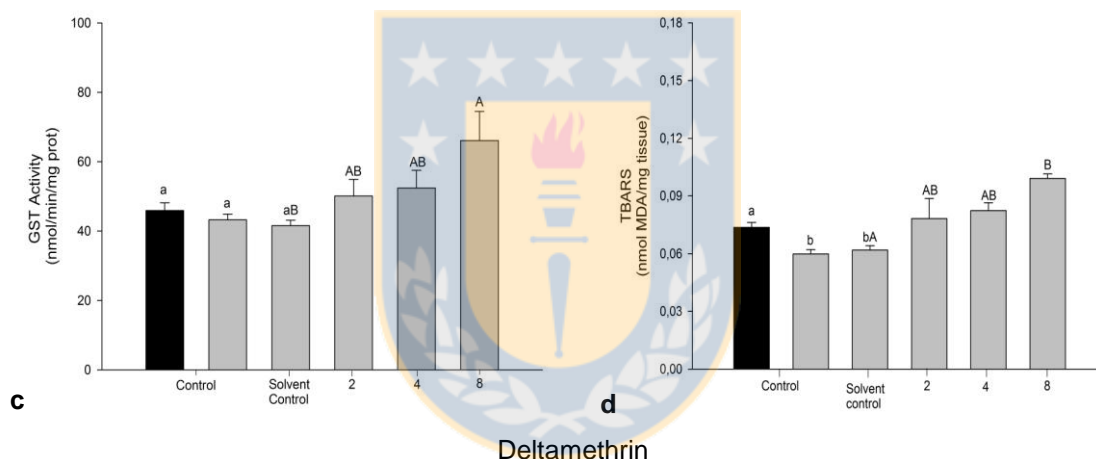
**Table 3.** Summary results of acute ecotoxicological tests using *M. insidiosum*.  $LC_{50-10d}$  and  $LC_{1-10d}$  are the lethal concentrations 50 and 1% after 10 days of exposure to AP, respectively.

Pesticides	$LC_{50-10d}$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	95% confidence intervals		% Coefficient of variation (n=3)	$LC_{1-10d}$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
		Lower	Upper		
		Emamectin benzoate	890		
Cypermethrin	57	41	77	7	11
Deltamethrin	7.8	5	11	2	0.4

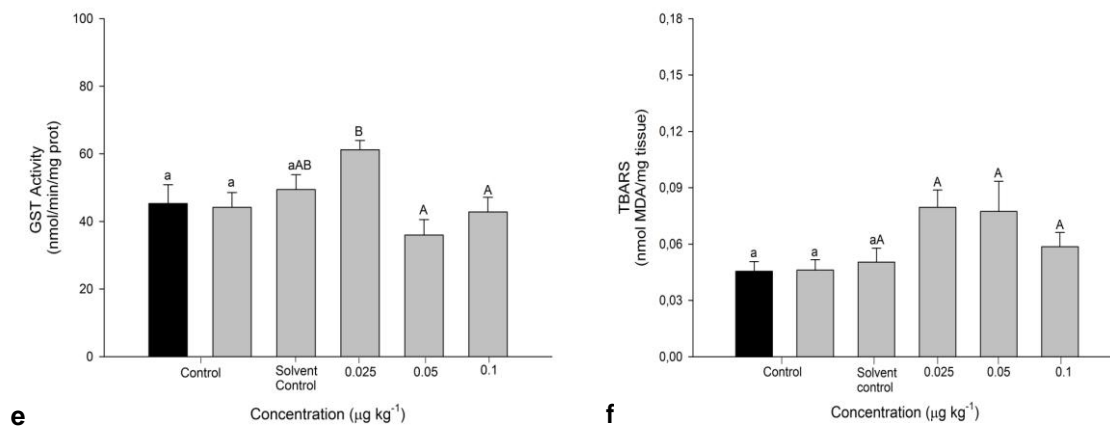
### Emamectin benzoate



### Cypermethrin



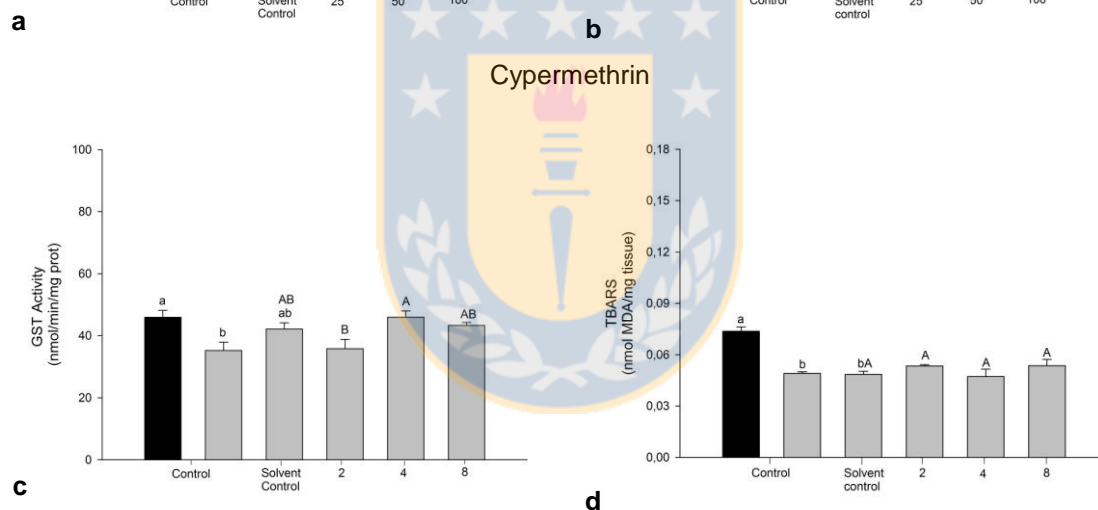
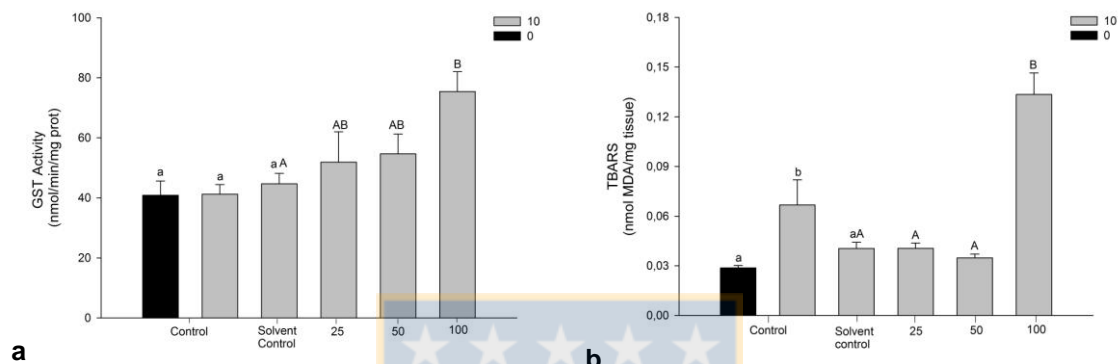
### Deltamethrin



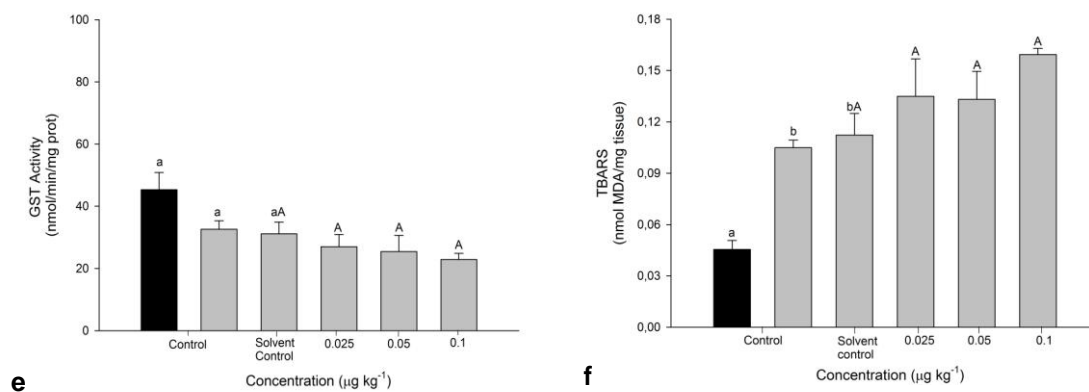
**Figure 2.** Activity values of glutathione S-transferase (a, c and e) and thiobarbituric acid reactive substances (b, d and f) in *M. insidiosum* exposed to antiparasitic

pesticides for 2 days. Lower-case letters correspond to significant differences between controls ( $t_0$ , black;  $t_2$ , gray) and the solvent control, while capital letters indicate significant differences between the solvent control and treatments. Different letters show differences ( $p < 0.05$ ).

### Emamectin benzoate



### Deltamethrin



**Figure 3.** Activity values of glutathione S-transferase (a, c and e) and thiobarbituric acid reactive substances (b, d and f) in *M. insidiosum* exposed to antiparasitic pesticides for 10 days. Lower-case letters correspond to significant differences between controls ( $t_0$ , black;  $t_{10}$ , gray) and the solvent control, while capital letters indicate significant differences between the solvent control and treatments. Different letters show differences ( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Sediment ecotoxicological studies for emamectin benzoate and cypermethrin in marine invertebrates.

Pesticide	Species	Type	Concentrations	Observations	References
Emamectin benzoate	<i>Corophium volutator</i>	Amphipod	153 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	Mayor et al., 2008
			193 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	SEPA 1999
	<i>Hediste diversicolor</i>	Polychaete	1368 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	Mayor et al., 2008
	<i>Arenicola marina</i>	Polychaete	110 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	SEPA 1999
	<i>Monicorophium insidiosum</i>	Amphipod	890 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	This study
Cypermethrin	<i>Corophium volutator</i>	Amphipod	5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	Mayor et al., 2008
			42 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	Milson 1999
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Shrimp	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	Clarke et al., 1987
	<i>Monicorophium insidiosum</i>	Amphipod	57 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LC <sub>50-10d</sub>	This study

## Acknowledgements

This study was supported by Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) N°1110719 project, Doctorate Thesis Support Fellowship N° 24110019 Comisión Nacional de Investigación Ciencia y Tecnología (CONICYT) and doctoral student scholarship. This work is part of the PhD thesis of Felipe Tucca supervised by Ricardo Barra. Furthermore, we would like to thank the Bioassay Laboratory of the Universidad de Concepción for allowing us to use their facilities. We are also grateful to Jesús Vergara and Domingo Galdame for their support in the laboratory and field sampling.

## References

- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10:141-147. ISSN: 1234-1010
- Adam O, Degiorgi F, Crini G, Badot PM (2010) High sensitivity of *Gammarus sp.* juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1402-1407. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.02.011
- Allen YT, Thain JE, Haworth S, Barry J (2007) Development and application of long-term sublethal whole sediment tests with *Arenicola marina* and *Corophium volutator* using Ivermectin as the test compound. *Environ Pollut* 146:92-99. doi:10.1016/j.envpol.2006.06.007
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bright DA, Dionne S (2005) Use of emamectin benzoate in the canadian finfish aquaculture industry: a review of environmental fate and effects. *Environment Canada review, Canada* pp 74. <http://publications.gc.ca/collections/Collection/En4-51-2005E.pdf>. Accessed 15 January 2014
- Burrige L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, K. Bostick (2010) Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306:7-23. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.05.020
- Calabrese EJ (2008) Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem* 27:1451-1474
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2001) Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends Pharmacol Sci* 22:285-291. PII: S0165-6147(00)01719-3

- Chiang G, Mc Master ME, Urrutia R, Saavedra MF, Gavilán F, Tucca F, Barra R, Munkittrick KR (2011) Health status of native fish (*Percilia gillissi* and *Trichomycterus areolatus*) downstream of the discharge of effluent from a tertiary-treated elemental chlorine-free pulp mill in Chile. *Environ Toxicol Chem* 30:1793-1809. doi: 10.1002/etc.573
- Clark JR, Patrick JM, Moore Jr JC, Lores EM (1987) Water-borne and sediment-source toxicities of six organic chemicals to grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and amphioxus (*Brachiostoma caribaeu*). *Arc Environ Contam Toxicol* 16: 401-407
- Costello MJ (2006) Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends Parasitol* 22: 47-483. doi:10.1016/j.pt.2006.08.006
- Crane M, Gross M, Maycock DS, Grant A, Fossum BH (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. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02665.x
- Crawford GI (1937) A review of the amphipod genus *Corophium* with notes on the British species. *J Mar Biol Ass UK* 21: 589- 630
- Davies IM, Rodger GK, Redshaw J, Stagg RM (2001) Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. *ICES J Mar Sci* 58:477-485. doi:10.1006/jmsc.2000.1040
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2010. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba; <http://www.infostat.com.ar>. Accessed 15 August 2011
- Díaz-Jaramillo M, Socowsky R, Pardo LM, Monserrat JM, Barra R (2013a) Biochemical responses and physiological status in the crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea, Varunidae) from high anthropogenically-impacted estuary (Lenga, south-central Chile). *Mar Environ Res* 83:73-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.10.012>
- Díaz-Jaramillo M, Martins da Rocha A, Chiang G, Buchwalter D, Monserrat JM, Barra R (2013b) Biochemical and behavioral responses in the estuarine polychaete *Perinereis gualpensis* (Nereididae) after in situ exposure to polluted sediments. *Ecotoxicol Environ Saf* 89:182-188. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.11.026
- Dorts J, Silvestre F, Tu HT, Tyberghein AE, Phuong NT, Kestemont P (2009) Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environ Toxicol Pharmacol* 28:302-310. doi:10.1016/j.etap.2009.05.006
- 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. *Mar Pollut Bull* 42:433-444. doi:[10.1016/S0025-326X\(00\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00177-6)
- Fairchild WL, Doe KG, Jackman PM, Arsenault JT, Aubé JG, Losier M, Cook AM (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, pp 34. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/Library/339939.pdf>. Accessed 25 August 2013
- Feo ML, Ginebreda A, Eljarrat E, Barceló D (2010) Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J Hydrol* 393:156–162. doi:10.1016/j.jhydrol.2010.08.012
- Ferrero AA, Gutiérrez MM, Cervellini PM (2001) Laboratory evaluation of the acute toxicity of malathion and deltamethrin in *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Investig Mar* 29:107-111
- Geracitano L, Monserrat JM, Bianchini A (2002) Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *J Exp Mar Biol Ecol* 277:145-156
- González ER, Haye PA, Balanda MJ, Thiel M (2008) Systematic list of species of peracarids from Chile (crustacea, eumalacostraca). *Gayana* 72:157-177. ISSN 0717-652X
- Gorbi S, Virno Lamberti C, Notti A, Benedetti M, Fattorini D, Moltedo G, Regoli F (2008) An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Mar Environ Res* 65:34-49
- Gowland BTG, CF Moffat, RM Stagg, DF Houlihan, IM Davies (2002) Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res* 54:169-177
- Gray J (1981) *The Ecology of Marine Sediments*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 77:398-405
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV (1977) Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol* 11:714-719
- Hellou J, Ross NW, Moon TW (2012) Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environ Sci Pollut Res* 19:2007-2023. doi 10.1007/s11356-012-0909-x

- Johnson SC, Treasurer JW, Bravo S, Nagasawa K, Kabata Z (2004) A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool Stud* 43:229-243
- Kevrekidis T (2004) Population dynamics, growth and reproduction of *Corophium insidiosum* (Crustacea: Amphipoda) at low salinities in Monolimni lagoon (Evros Delta, North Aegean Sea). *Hydrobiol* 522:117-132
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42:656-666
- Long ER, Hong CB, Severn CG (2001) Relationships between acute sediment toxicity in laboratory tests and abundance and diversity of benthic in fauna in marine sediments: a review. *Environ Toxicol Chem* 20:46-60
- Macdonald TA, Burd BJ, Macdonald VI, van Roodselaar A (2010) Taxonomic and Feeding Guild Classification for the Marine Benthic Macroinvertebrates of the Strait of Georgia, British Columbia. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2874 pp 69
- Maund SJ, Hamer MJ, Lane MCG, Farrelly E, Rapley JH, Goggin UM, Gentle WE (2002) Partitioning, bioavailability and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environ Toxicol Chem* 21:9-15
- Mayor DJ, Solan M, Martinez I, Murray L, McMillan H, Paton GJ, Killham K (2008) Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture industry to *Corophium volutator* and *Hediste diversicolor*: Whole sediment bioassay tests. *Aquaculture* 285:102-108. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.008
- Milson TL (1999) The effects of BETAMAX® on the marine amphipod *Corophium volutator*, in a 10 day static exposure in seawater. Vericore Limited Report N°:VC99028 (after McHenery, 2000)
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63:447-463. doi:10.1016/S0166-445X(02)00204-7
- Oliveira C, Almeida J, Guilhermino L, Soares AMVM, Gravato C (2012) Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquat Toxicol* 124-125:209-216. doi:10.1016/j.aquatox.2012.08.010
- Olsvik PA, Lie KK, Mykkeltvedt E, Samuelsen OB, Petersen K, Stavrum AK, Lunestad BT (2008) Pharmacokinetics and transcriptional effects of the anti-salmon lice drug emamectin benzoate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *BMC Pharmacol* 8:16. doi:10.1186/1471-2210-8-16

- Payne JF, Fancey LL, Rahimtula AD, Porter EL (1987) Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp Biochem Physiol* 86C:233-245
- Pérez-Fernández V, García MA, Marina ML (2010) Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *J Chromatogr A* 1217: 968-989. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.069
- Prato E, Biandolino F (2006) *Monocorophium insidiosum* (Crustacea, Amphipoda) as a candidate species in sediment toxicity testing. *Bull Environ Contam Toxicol* 77:1-8. doi:10.1007/s00128-006-1024-9
- Prato E, Bigongiari N, Barghigiani C, Biandolino F (2010) Comparison of amphipods *Corophium insidiosum* and *C. orientale* (Crustacea: Amphipoda) in sediment toxicity testing. *J Environ Sci Health Part A* 45:1461-1467. doi: 10.1080/10934529.2010.500941
- Ré A, Freitas R, Sampaio R, Rodriguez AM, Quintino V (2009) Estuarine sediment acute toxicity testing with the European amphipod *Corophium multisetosum* Stock, 1952. *Chemosphere* 76:1323-1333. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.041
- Schvezov N, Amin O (2011) Biochemical response of amphipods (Gammarid: Paramorea) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 394-402. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.12.007
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA) (1998) SEPA policy on the use of cypermethrin in marine fish farming risk assessment, EQS and recommendations, Policy No 30. <http://www.sepa.org.uk/aquaculture/policies/index.htm>. Accessed 15 July 2013
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA) (1999) Emamectin benzoate, an environmental assessment, pp 1-23. <http://www.sepa.org.uk/policies/index.htm>. Accessed 3 August 2013
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA) (2007) in The Occurrence of Chemicals used in Sea Louse Treatments In Sediments, Report TR-070807\_JBT
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA) (2011) in The Occurrence of Chemical Residues in Sediments in Loch Linnhe, Loch Ewe and Loch Nevis: 2009, Report: JT000811\_JT
- Torrissen O, Jones S, Asche F, Guttormsen A, Skilbrei OT, Nilsen F, Horsberg TE, Jackson D (2013) Salmon lice-impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *J Fish Dis* 36:171-194. doi:10.1111/jfd.12061
- Tu HT, Silvestre F, De Meulder B, Thome JP, Phuong NT, 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. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.09.022

- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (1988) Users guide for a computer program for Probit analysis of data from acute and short-term chronic toxicity test with aquatic organisms. Biological Methods, Environmental Monitoring and Support Lab
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (1991) Technical support document for water quality-based toxic control. EPA-505/2-Y0/001, Washington, DC
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (1994) Methods for Assessing the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Estuarine and Marine Amphipods. EPA 600/R-94/025, Washington, DC
- Waddy SL, Merritt VA, Hamilton-Gibson MN, Aiken DE, Burridge LE (2007) Relationship between dose of emamectin benzoate and molting response of ovigerous American lobsters (*Homarus americanus*). Ecotoxicol Environ Saf 67:95-99. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.05.002



## Capítulo IV: EVALUACIÓN DE RIESGO



#### **Paper 4:**

### **Distribución de sensibilidad en crustáceos marinos a fármacos antiparasitarios utilizados por la industria del salmón: Bases para la evaluación de riesgos.**

Felipe Tucca<sup>a</sup>, Francisca Valenzuela<sup>b</sup>, Jeannette Silva<sup>b</sup>, Enrique Bay-Schmith<sup>b</sup>, Francisco Encina<sup>c</sup> & Ricardo Barra<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA-Chile, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>b</sup>Laboratorio de ecotoxicología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>c</sup>Escuela de Ciencias Ambientales, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.



#### **Resumen**

Mediante un modelo probabilístico de distribución de sensibilidad en especies (Species Sensivity Distribution, SSD) fue evaluado el riesgo ecológico de fármacos antiparasitarios utilizados actualmente por la industria del salmón en el sur de Chile. Estudios previos de datos ecotoxicológicos sobre crustáceos, además de concentraciones ambientales medidas y modeladas fueron necesarios para la estimación de la concentración de peligro para el 5% de los organismos de una comunidad (HC<sub>5</sub>). Finalmente, los resultados obtenidos son discutidos y comparados con lo observado a través del método del cociente o método determinísticos utilizados por la regulación en Chile.

## 1. Introducción

Tradicionalmente, la evaluación de riesgos de sustancias químicas en el ambiente acuático ha sido desarrollada por aproximaciones de tipo determinístico o probabilístico. Normalmente lo que determina la definición de alguno de estos enfoques es la disponibilidad de información sobre el destino ambiental y las concentraciones esperables en el ambiente (PEC), además de las concentraciones de no efecto esperado en especies (PNEC) (EC, 2003).

Comúnmente, el riesgo ha sido expresado determinísticamente como la razón entre PEC y PNEC, conocido como el método del cociente o cociente de riesgo (RQ). De esta manera es como actualmente se rige la regulación en Chile para productos químicos de uso veterinarios (Resolución N° 665, SAG, 2010). En esta regulación considera criterios de caracterización del riesgo con valores que van desde menor a 100 y mayor a 1000, siendo reconocidos como sin y con riesgo, respectivamente. Para aquellos valores de RQ entre 100 y 1000 se señala la necesidad de un programa de vigilancia para el producto químico.

Los métodos probabilísticos son basados en el principio de distribución de sensibilidad en especies (Species Sensivity Distribution, SSD) el cual ha sido una herramienta ampliamente utilizada para propósitos de establecer la concentración de peligro (HC) de un contaminante en el ecosistema (Kooijman, 1987; van Straalen, 2002). La estimación de HC es una manera probabilística de obtener el valor PNEC, siendo utilizada como umbral para la protección de especies frente a efectos adversos que podría generar un tóxico. HC se calcula asumiendo una distribución log-normal de sensibilidad en especies, a través de valores agudos ( $LC_{50}$ ) o crónicos (NOEC) en la distribución, para luego desarrollar una expresión analítica de la concentración asociada a un percentil. Un percentil del 5% ( $HC_5$ ) es frecuentemente usado para obtener PNEC, garantizando el resguardo del 95% de las especies (van Straalen & Denneman, 1989; Aldenberg & Slob, 1993; Aldenberg & Jaworska, 2000). Estudios de campo han validado este percentil para la protección de especies (Posthuma et al., 2002), no obstante, aún persisten críticas en cuanto a su representatividad en el ecosistema (Forbes & Forbes, 1993).

En los últimos años la industria del salmón ha sido un rubro con notable crecimiento. Sin embargo, este desarrollo se ha visto afectado por la presencia de enfermedades que han desencadenado pérdidas económicas en la industria (Johnson et al., 2004; Costello et al., 2006; Torrissen et al., 2013). Durante la etapa de cultivo en mar, los salmones se han visto afectados por la presencia de enfermedades ectoparasitarias (Boxshall & Bravo, 2000). Para ello, la industria ha requerido de tratamientos quimioterapéuticos efectivos para la mitigación, manejo y control de estos parásitos (Roth, 2000). Fármacos antiparasitarios (FA) como la avermectina benzoato de emamectina (EB), piretroides sintéticos como cipermetrina (CP) y deltametrina (DE), y la benzoilphenilurea diflubenzuron (DI) han sido alternativa para combatir este tipo de enfermedades. Estos fármacos antiparasitarios se caracterizan principalmente por ser de baja solubilidad en agua y elevada afinidad por la fracción orgánica, además de ser potencialmente tóxicos para invertebrados marinos, principalmente crustáceos (Ernst et al., 2001; Haya et al., 2005; Burridge et al., 2010; Crane et al., 2011).

La avermectina EB ( $PM= 873.09 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\log K_{ow}= 5.0$ ) ha sido efectiva para el control de parásitos en salmones (Stone et al., 1999; Roy et al., 2000). Esta avermectina actúa interrumpiendo la transmisión de señales nerviosas de invertebrados debido a la interacción con otras moléculas como glutamato o ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) que generan un aumento en la permeabilidad de cloruros hacia el interior de células, interrumpiendo las señales nerviosas. Por otro lado, piretroides como CP ( $PM= 416.29 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\log K_{ow}=6.6$ ) y DE ( $PM= 505.19 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\log K_{ow}= 6.3$ ) son pesticidas altamente efectivos y de rápida acción sobre invertebrados ya que interfieren en canales de sodio de la membrana nerviosa, desencadenando una disrupción en la transferencia de iones y posterior problema en la transmisión de impulsos nerviosos. A diferencia de los anteriores químicos, DI ( $PM= 310.68 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\log K_{ow}=3.89$ ) es un pesticida que actúa específicamente en procesos de muda sobre artrópodos, afectando la síntesis de quitina.

El objetivo de este estudio fue realizar una evaluación de riesgo para cuatro FA utilizados actualmente por la industria del salmón en el sur de Chile. Para ello, mediante datos de exposición modelados y medidos (PEC) e información ecotoxicológica disponible se desarrolló una evaluación de tipo probabilística mediante la derivación de SSD y posterior estimación de  $HC_5$  para cada uno de los



FA en crustáceos marinos. Pruebas ecotoxicológicas en crustáceos marinos locales tales como copépodos (*Tisbe longicornis*) y anfípodos (*Monocorophium insidiosum*) fueron desarrollados para la evaluación. Criterios determinísticos y probabilísticos fueron comparados y discutidos.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Concentraciones ambientales esperadas (PEC)

**2.1.1. Datos modelados.** En base a la disponibilidad de información sobre propiedades físico-químicas de FA y un escenario ambiental típico para un centro de cultivo en el sur de Chile fue determinada la PEC en agua. El modelo predictivo utilizado está basado en criterios planteados por Tucca et al. (Capítulo 2). Con el propósito de estimar la incertidumbre y variabilidad a los datos ingresados en el modelo fue utilizada la técnica de Monte Carlo. Esta predicción fue basada en la distribución de probabilidades al incorporar variables como velocidad de corriente, biomasa por jaula de salmón y fracción de carbono orgánico. Para la simulación de Monte Carlo fue utilizado el software Crystal Ball 11.1.1 (Gentry et al., 2008).

**2.1.2. Datos medidos.** Para diferentes zonas con actividad salmonera ubicadas en la región de Los Lagos (X región) fueron colectadas muestras de sedimento superficial alrededor de balsas jaulas mediante el uso de una draga Van Veen (0,3 m<sup>2</sup>). Las diferentes zonas en estudio son mostradas en la Figura 1. Cada zona se caracterizó por presentar centro de cultivo con aplicación de específicos fármacos: S1: EB y DI; S2 y S3: CP; S4: DE.

### 2.2. Análisis químico

Para la detección de EB y DI 5 g de muestras de sedimento fueron homogenizadas en sulfato de sodio anhidro y extraídas 3 veces con 50 ml de n-hexano en un baño de ultrasonido por 20 minutos, posteriormente centrifugada a 1500 rpm. Los extractos del solvente final fueron concentrados a 5 ml por rotavapor y luego reconstituidos a 1 ml de solvente metanol. El análisis fue realizado a través de Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masa con una Fuente de Ionización Electro

Spray (ESI LC-MS/MS) para DI, mientras que para la determinación de EB se realizó mediante una Fuente de Ionización Química de Presión Atmosférica (APCI). Se utilizó una columna de fase reversa Spherisorb ODS2 Hypersil con dimensiones 150 mm x 2.1 mm i.d. y 5 mm. La tasa de flujo para DI fueron aplicadas de acuerdo a Barnes et al. (1995), mientras que para EB según (Krogh et al. (2008). El análisis LC-MS fue realizado utilizando un Thermo system con un Finnigan surveyor autosample. Para determinación de DI por ESI LC-MS fue utilizado un modo ion negativo, mientras que para EB en modo APCI positivo. Los peaks fueron identificados por su absorción y característica espectral  $MH^+$  Y  $MS^2$ .

Para determinación de piretroides (CP y DE) en sedimento se realizó mediante la mezcla de 1 g de sedimento con 20 ml de solvente n-hexano: diclorometano (2:1) y puesto en ultrasonido por 15 minutos. A la fase orgánica se le efectuó un clean-up con sulfato anhidro y lana de vidrio para posteriormente es trasvasijados a balones de vidrio de 100 ml. Este procedimiento fue repetido 2 veces por cada muestra. El extracto obtenido fue concentrado en rotavapor hasta obtener un volumen final de 5 ml, para después ser limpiado con 2 g de sulfato/florisil. El extracto fue acondicionado en columna con etil acetato:diclorometano (2:1), siendo concentrado y reconstituido en tolueno a un volumen final de 1.5 ml.

El análisis de piretroides fue realizado mediante cromatografía de gas con detector de captura de electrones (GC-ECD). La temperatura del inyector y detector fueron de 240°C y 370°C, respectivamente. Para el análisis se utilizó una columna capilar PTE-5 con dimensiones 30 m x 0.25  $\mu$ m x i.d. 0.25 mm. En el equipo se acondicionó un programa de temperatura inicial de 50°C/minuto y posteriormente un gradiente de 30°C a 300°C por 12 minutos.

Para la confirmación de resultados obtenidos en GC-ECD las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases Agilent 7890A triple cuadruple con detector masa (GC-MS). Esto permitió generar un respaldo fragmentando y comparativo en la identificación de compuestos piretroides. El fraccionamiento de los compuestos fue realizado a través de una columna capilar HP-5ms de 30m de largo, 250 $\mu$ m diámetro interno y 0.25  $\mu$ m de espesor (5% fenil metil polisiloxano). La columna tuvo una presión constante de 30 psi, mientras que la inyección de la muestra fue de 3  $\mu$ l. El programa de temperatura inicial fue de 70°C/minuto, luego se incrementó

25°C/minuto hasta alcanzar 150°C, finalmente la temperatura fue programada hasta una temperatura final de 280°C por 10 minutos. La energía de colisión en el análisis fue de 5 eV a 9.5 ciclos por segundo. A través del modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM) fueron identificados los piretroides, en el que DE fue identificada con una transición de iones de 253; 172 y 253; 174 ( $m/z$ ), mientras que para CP fue de 163; 127 y 163; 91 ( $m/z$ ).

### 2.3. Revisión ecotoxicológica

La información ecotoxicológica de compuestos antiparasitarios fue obtenida desde la base de datos ECOTOX (USEPA) y desde publicaciones científicas de literatura abierta. Se efectuó una búsqueda detallada de información ecotoxicológica aguda ( $LC_{50}$ , Concentración letal en el 50% de los organismos ensayados) y crónica (NOEC, concentración sin efecto observado) en invertebrados marinos expuestos a los fármacos EB, CP, DE y DI. Para la selección de información toxicológica fueron considerados ensayos realizados en agua y sedimento con los distintos compuestos. Se seleccionaron diversos tipos de crustáceos marinos los cuales fueron clasificados como: copépodos (Cop), camarones (Cam), langostas (Lan), cangrejos (Can), anfípodos (Anf), cirripedios (Cir) y branquiopodos (Bran).

### 2.4. Toxicidad en organismos locales

**2.4.1. Anfípodo.** Se realizaron ensayos con la especie *Monocorophium insidiosum* a través de pruebas ecotoxicológicas a corto plazo ( $LC_{50-10d}$ ) y respuestas bioquímicas (subletales). Estos datos han sido reportados previamente por Tucca et al. (2014) (ver Capítulo 3).

**2.4.2. Copépodo.** Bioensayos agudos ( $LC_{50-48h}$ ) con *Tisbe longicornis* fueron realizados a través de concentraciones nominales (2.05, 5.12, 12.8, 32 y 80  $\mu g L^{-1}$ ) con estándares analíticos de piretroides CP y DE. Los individuos muertos y/o inmobilizados en cada ensayo fueron contabilizadas. Ensayos preliminares con DI y EB mostraron  $LC_{50}$ s mayores a 1  $mg L^{-1}$  (no detectado en el ambiente), por lo que fueron considerados únicamente compuestos piretroides. Las condiciones experimentales fueron controladas, manteniendo una temperatura de 15°C, oxígeno

disuelto de  $>7 \text{ mg L}^{-1}$  y pH de 8.1. Los individuos no fueron alimentados en el transcurso del ensayo.

Para ensayos crónicos en copépodos se evaluó el éxito reproductivo en hembras ovígeras, evaluando la capacidad de expulsión de huevos. Los individuos fueron expuestos durante un ciclo completo en desarrollo (desde estado naupliar hasta adulto ovígero). Las concentraciones nominales utilizadas para el ensayo con CP y DE fueron: 1.0, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 y  $0.03 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Primeramente, fueron extraídas entre 30 a 40 hembras ovígeras desde un recipiente de cultivo para ser puestas en recipientes con agua de mar filtrada, esperando la expulsión de la nueva generación. Luego de 24 horas aquellos nauplius libres fueron extraídos, colocando un número aproximado de 80 a 100 nauplius en cada recipiente correspondiente a una concentración nominal. Se realizaron en forma periódica recambios de agua y alimentación. El alimento utilizado fue microalgas *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis galbana* ( $\sim 6.8 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Transcurrido 10 días un número de 10 hembras ovígeras presentes en cada concentración nominal fueron extraídas y puestas de manera individual en pequeños recipientes (50 ml), representando las replicas para cada concentración del ensayo. Finalmente, luego de 10 días (20 días de ensayo aproximadamente) las muestra fueron fijada en alcohol (90%) y contabilizadas a través de una lupa el número total de nauplius eclosionados.

Para el cálculo de la toxicidad aguda ( $\text{LC}_{50-10\text{d}}$ ) se utilizó el modelo estadístico de regresión PROBIT (USEPA, 1988) y Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977), este último fue requerido como análisis no-paramétrico. Mientras que resultados en ensayos crónicos (NOEC) fueron determinados mediante el paquete estadístico TOXSTAT (USEPA, 1994).

### 2.5. Distribución de sensibilidad en especies

De acuerdo al método de Aldenberg y Jaworska (2002) fue derivada la SSD y estimación de  $\text{HC}_5$  para cada uno de los fármacos antiparasitarios mediante el software ETX 2.0 (Van Vlaardingen, 2004). Fue utilizada una distribución log-normal para datos ecotoxicológicos obtenidos desde literatura y ensayos con especies locales. Las distribuciones fueron testeadas mediante los criterios estadísticos

Anderson-Darling, Cramér-von Mises y Kolmogorov-Smirnov. Desde la distribución se estimó la media de HC<sub>5</sub> con intervalo de confianza del 90%.

### *2.6. Comparación entre criterios probabilísticos y determinísticos*

Para el valor estimado de HC<sub>5</sub> en cada uno de los FA se consideró como valor de corte o PNEC dentro de la distribución probabilística (PNEC<sub>prob</sub>). Un valor máximo de PEC fue relacionado con el PNEC<sub>prob</sub> para la determinación de un cociente de riesgo (RQ<sub>prob</sub>). En cambio, para la estimación del valor PNEC mediante criterios determinísticos (PNEC<sub>determ</sub>) fue seleccionada la especie más sensible dentro de los datos ecotoxicológicos y aplicado un factor de seguridad según las normas establecidas por VICH fase II (2004), después fue calculado un cociente de riesgo (RQ<sub>determ</sub>).

## **3. Resultados**

### *3.1. Predicción de concentraciones ambientales en agua*

Predicciones de concentraciones en agua después de un tratamiento con fármacos antiparasitarios son mostradas en la Tabla 1. Se estimaron bajas concentraciones para los fármacos EB, CP y DE, encontrándose en el orden de 1.9 a 8.8 ng L<sup>-1</sup>. Sin embargo, para el fármacos DI fueron estimadas concentraciones mayores en agua, calculando niveles entre 420 y 1000 ng L<sup>-1</sup>.

### *3.2. Medición de concentraciones ambientales en sedimento*

Concentraciones de fármacos antiparasitarios detectadas en sedimento para diferentes centros de cultivo en estudio son mostradas en Tabla 2. La ocurrencia de EB y DI fueron reportadas para el centro localizado cerca a la ciudad de Puerto Montt (S1). EB mostró rangos entre 2.2 a 14.6 µg kg<sup>-1</sup>, mientras que DI registró concentraciones más bajas con valores entre 0.13 a 1.2 µg kg<sup>-1</sup>. En tanto, para los centros de cultivo localizados en Bahía Manao (S2 y S3) fueron detectados niveles de CP en el rango de 17 a 1300 µg kg<sup>-1</sup>. Para el centro cercano al poblado de Dalcahue (S4), no se reportaron concentraciones de DE en el sedimento, encontrándose bajo el límite de detección (<10.4 µg kg<sup>-1</sup>).

### 3.3. Datos bibliográficos de toxicidad

Datos de toxicidad agudos ( $LC_{50}$ ) y crónicos (NOEC) de un total de 29 especies representantes de crustáceos marinos fueron utilizadas para el análisis SSD. En este estudio fueron incorporadas la información de especies locales alcanzando un total de 31 especies. De acuerdo al total, la proporción de crustáceos marinos fue la siguiente: 26% Copépodos (Cop), 19% anfípodos (Anf), 19% cangrejos (Can), 16% camarones (Cam), 10% cirripedios (Cir), 6% langostas (Lan), 3% branquiópodos (Bran). Mayoritariamente el 81% de las especies correspondió a ensayos en agua, mientras que el 19% restante fueron ensayos en sedimento.

CP mostró ser el fármaco con mayor cantidad de información disponible para ensayos de toxicidad, alcanzando un total de 20 especies (41%), siendo mayormente representada por 7 especies de Cop (35%), 5 Anf (25%) y 5 Cam (25%). En tanto, DE reportó una menor cantidad de ensayos en crustáceos marinos, conformando un total de 5 especies ensayadas (10%), siendo Cop (40%) el mayor número.

De un total de 12 especies ensayadas con EB (24%) el 42% correspondió a Cop y un 25% a Cam. Por el contrario, en DI de un total de 12 especies ensayadas (24%) el grupo más representativo fue Can (42%).

### 3.4. Toxicidad especies locales

La toxicidad de fármacos antiparasitarios sobre especies locales es mostrada en la Tabla 3. El copépodo *T. longicornis* mostró una alta sensibilidad a los fármacos CP y DE, reportando un  $LC_{50-48h}$  de 4.6 ( $IC_{95\%}=1.8-7.5$ ;  $n=3$ ) y 7.7 ( $IC_{95\%}=4.4-10.8$ ;  $n=4$ )  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Por otro lado, en relación a efectos reproductivos en hembras la exposición a piretroides sintéticos mostró significativas diferencias con respecto al control ( $p<0.05$ ). Una concentración nominal de 0.125  $\mu\text{g L}^{-1}$  mostró ser la concentración más baja donde se observó efecto (LOEC), mientras que la concentración más alta donde no se observó efecto en la eclosión de huevos (NOEC) fue de 0.0625  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 2).

De igual modo para *M. insidiosum* se observó una mayor sensibilidad a CP y DE que a EB y DI (Tabla 3). El fármaco DI no reportó efecto agudo durante las concentraciones nominales ensayadas ( $LC_{50} >1\text{mg L}^{-1}$ ). En tanto, respuestas

bioquímicas señalan clara inducción en GST y altos niveles en TBARS durante 48 horas de exposición a EB y CP (Tucca et al., 2014).

### 3.5. Distribución de sensibilidad en especies y método del cociente

La derivación de SSD sobre crustáceos marinos y estimación de HC<sub>5</sub> con su respectivo intervalo de confianza para agua y sedimento son mostrados en la Figura 3. En el análisis de SSD para crustáceos en agua se estimaron valores HC<sub>5</sub> de 0.13 ng L<sup>-1</sup> (0.01, 0.7) y 5.3 ng L<sup>-1</sup> (0.003, 193), con datos NOEC para CP y EB, respectivamente. En tanto, bioensayos agudos (LC<sub>50</sub>) incorporados en la distribución para DE y DI mostraron estimaciones de HC<sub>5</sub> iguales a 7.4 ng L<sup>-1</sup> (2.8, 12.5) y 341 ng L<sup>-1</sup> (140, 600), respectivamente (Figura 3A). Por otra parte, para la derivación de SSD en sedimento se dispuso solamente de datos ecotoxicológicos para CP y EB (Figura 3B). Así, datos agudos estiman para CP un HC<sub>5</sub> de 2.2 µg kg<sup>-1</sup> (0.05, 7.9), mientras que para EB a través de datos crónicos se reportó un valor de 92 µg kg<sup>-1</sup> (55, 103). Para el cálculo PNEC se observan valores mayormente conservadores de PNEC<sub>determ</sub> con respecto a PNEC<sub>prob</sub> (Tabla 4). Por ejemplo, para evaluación de CP en agua el uso de un factor de 10 sobre el valor NOEC en *A. tonsa* proporcionó un PNEC igual a 0.016 ng L<sup>-1</sup>, mientras que para el mismo producto en sedimento un factor de 1000 sobre el valor LC<sub>50</sub> en *C. volutator* reportó un PNEC de 0.005 µg kg<sup>-1</sup>, encontrándose 8 y 440 veces más bajas al valor HC<sub>5</sub> para agua y sedimento, respectivamente.

La caracterización del riesgo mediante el cálculo de RQ son mostrados en la Tabla 5. Diferencias superiores a 1000 veces el valor máximo de PEC fueron observados para RQ<sub>determ</sub> en los fármacos DI y CP. En cambio, criterios probabilísticos muestran RQ<sub>prob</sub> menores a 1000.

## 4. Discusión

En el presente estudio fue posible cuantificar y predecir concentraciones ambientales de FA utilizados actualmente por la industria del salmón en Chile. Dichas concentraciones permitieron conocer niveles de exposición en zonas sin información previa, a diferencia de otros países como Noruega y Escocia donde se han

establecido programas de monitoreo, en los cuales se informa públicamente concentraciones de FA en zonas con activa acuicultura (NIVA, 2011; SEPA, 2011). Resultados obtenidos mediante pruebas de toxicidad en especies locales sugieren una mayor sensibilidad a piretroides que ha EB y DI (Tabla 3). Ensayos agudos con *Tisbe longicornis* fueron consistentes a otros umbrales de toxicidad observados en copépodos marinos. Por ejemplo, para la especie *Acartia clausi* en ensayos con CP fue posible observar inmovilidad en la especie a 2.67 (1.76-4.14)  $\mu\text{g L}^{-1}$  después de 48 horas de exposición (Willis & Ling, 2004). Sin embargo, estos copépodos mostraron ser menos susceptible a la acción de DE, en comparación a otros resultados. Una idea de esto, podrían ser las pruebas realizadas con *Tisbe battagliai*, las cuales reportaron  $\text{LC}_{50}$  de 10.6 (7.2-14.0)  $\text{ng L}^{-1}$  luego de 144h de exposición (Barata et al., 2002). Efectos en el éxito reproductivo de hembras en *T. longicornis* estuvieron en el mismo rango de exposición para los piretroides CP y DE, determinándose un NOEC de 0.0625  $\mu\text{g L}^{-1}$ . De igual manera, dichos efectos reproductivos fueron observados en *Tisbe battagliai* a la concentración de 0.037 (0.011-0.064)  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 0.022 (0.016-0.028)  $\mu\text{g L}^{-1}$  para CP y DE, respectivamente (Barata et al., 2002).

Ensayos en sedimento con el anfípodo *Monocorophium insidiosum* fueron altamente sensibles a la acción de piretroides (Tucca et al., 2014). Para fármacos como EB y DI su acción fue menos severa. En el caso de DI se reportó una toxicidad aguda superior a 1  $\text{mg kg}^{-1}$ , sugiriendo que pruebas toxicológicas con benzoilfenilureas (BPUs) deben considerar organismos en estado temprano de desarrollo para una efectiva acción en la inhibición de quitina.

De acuerdo a una distribución probabilística de datos ecotoxicológicos en crustáceos marinos fue posible estimar  $\text{HC}_5$  como valor de la concentración sin efectos esperado (PNEC) para cada uno de los FA. Sin embargo, debido a la limitada información en algunos FA fueron estimados los  $\text{HC}_5$  mediante el uso de datos agudos. Esta alternativa ha sido discutida y propuesta para efecto de evaluación probabilística cuando la información de datos crónicos son escasos (Posthuma et al., 2002; Mochida et al., 2012). Por otro lado, el uso de datos toxicológicos con especies representantes de otras regiones geográficas e información generada a través de pruebas en laboratorio también ha sido cuestionada para la derivación de SSD,



siendo calificadas como poco representativas de ecosistema natural (Davies et al., 1994; Dyes et al., 1997). Sin embargo, estudios previos han señalado que estas contradicciones no representan diferencias significativas dentro de una evaluación (Van den Brink et al., 2002; Maltby et al., 2005), por lo que esto podría justificar la variedad de datos ecotoxicológicos colectados para este estudio.

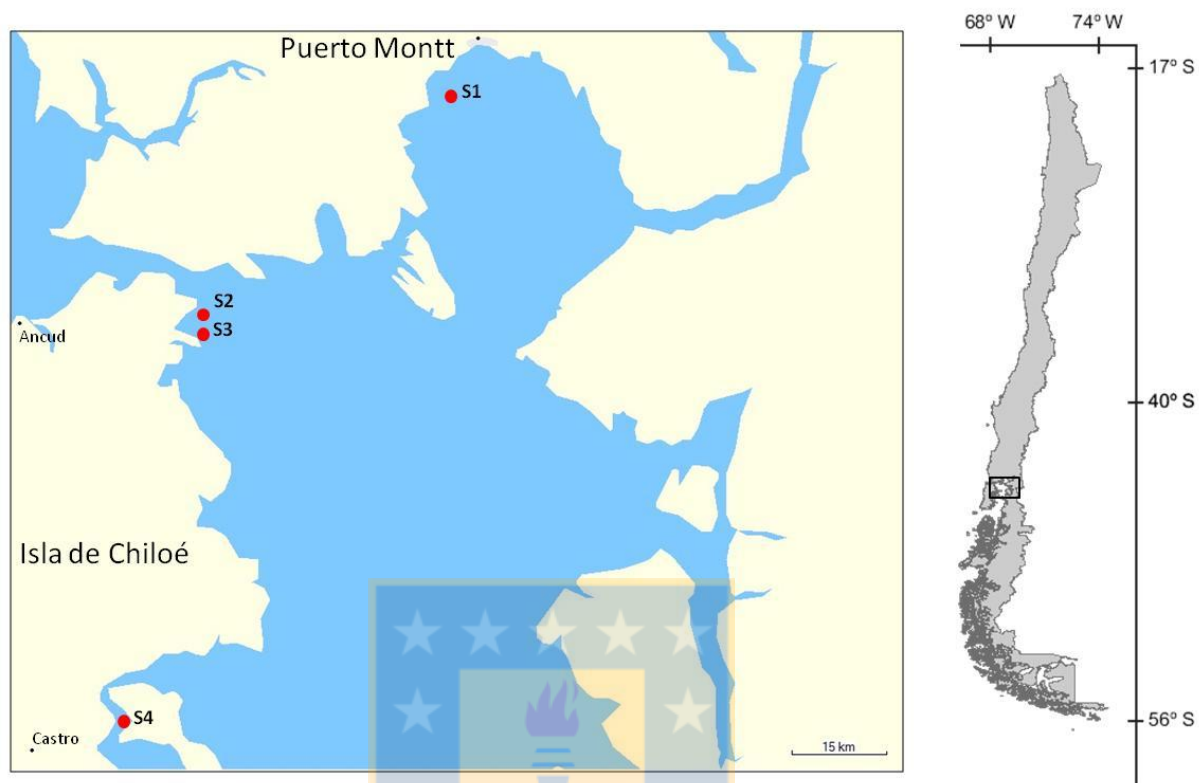
Para el análisis con CP la media estimada en agua y sedimento proporcionó la protección de especies con mayor sensibilidad dentro de la distribución, como fue el caso del copépodo *Acartia tonsa* ( $0.16 \text{ ng L}^{-1}$ ) y el anfípodo *Corophium volutator* ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), respectivamente. Del mismo modo en estimaciones de EB permitieron resguardar especies como el camarón *Mysidopsis bahia* ( $18 \text{ ng L}^{-1}$ ) y el anfípodo *Monocorophium insidiosum* (Tucca et al., 2014). Sin embargo, para cálculos de  $\text{HC}_5$  en sedimento con EB se observaron límites cercanos a umbrales subletales en anfípodos, por lo que la alternativa podría ser la utilización de valores correspondientes al límite inferior de  $\text{HC}_5$ , otorgando una mayor protección de especies en situación de múltiples aplicaciones (Maltby et al., 2005), como sucede en tratamientos quimioterapéuticos con salmones. Para DE y DI valores  $\text{HC}_5$  mostraron protección para especies sensibles presentes en la distribución como *Tisbe battagliai* ( $10.6 \text{ ng L}^{-1}$ ) y el branquiopodo *Artemia salina* ( $370 \text{ ng L}^{-1}$ ), respectivamente. De acuerdo al uso de datos agudos para la derivación de SSD, la probabilidad de corregir la escasa información crónica en el análisis podría ser compensada con el uso del límite inferior ( $\text{HC}_5$ ), o bien, a la aplicación de un factor de seguridad o incertidumbre (entre 1 y 5) que permita la protección de especies mayormente sensibles (Chapman et al., 1998; EC, 2003).

Al utilizar los criterios de la regulación vigente para productos de uso veterinario en Chile en cada centros de cultivo en evaluación se observa que estimaciones probabilísticas de FA en agua no registran riesgo sobre crustáceos marinos durante periodos de tratamientos debido a que  $\text{RQ}_{\text{prob}}$  calculados se encontraría bajo un a valor de 100. No obstante, criterios determinísticos sitúan al producto DI de alto riesgo ( $\text{RQ}_{\text{determ}}=2718$ ) en el sistema marino y a fármacos como CP y DE dentro de planes de vigilancia y monitoreo por presentar RQ entre 100-1000 (SAG, 2010). Del mismo modo para sedimento  $\text{RQ}_{\text{prob}}$  no mostraron riesgo sobre crustáceos marinos, los cuales mostraron cuocientes inferiores a 1000. En cambio, mediante el enfoque

determinístico se señala que CP presentaría un alto riesgo en crustáceos marinos para la zona de Bahía Manoa.

En conclusión, existen diferencias en los resultados de la aplicación de enfoques determinísticos y probabilísticos cuando se trata de evaluar los riesgos para crustáceos marinos. Nuestros resultados indican que con el actual procedimiento regulatorio se sobreprotege el ambiente en comparación a utilizar un método más robusto de análisis probabilístico. Se debe profundizar en la obtención de data ecotoxicológica con especies locales para mejorar las estimaciones de las concentraciones de riesgo en ecosistemas locales.





**Figura 1.** Área de estudio situada en la región de Los Lagos (ciudad de Puerto Montt y Chiloé). Puntos rojos indican los sitios muestreados.

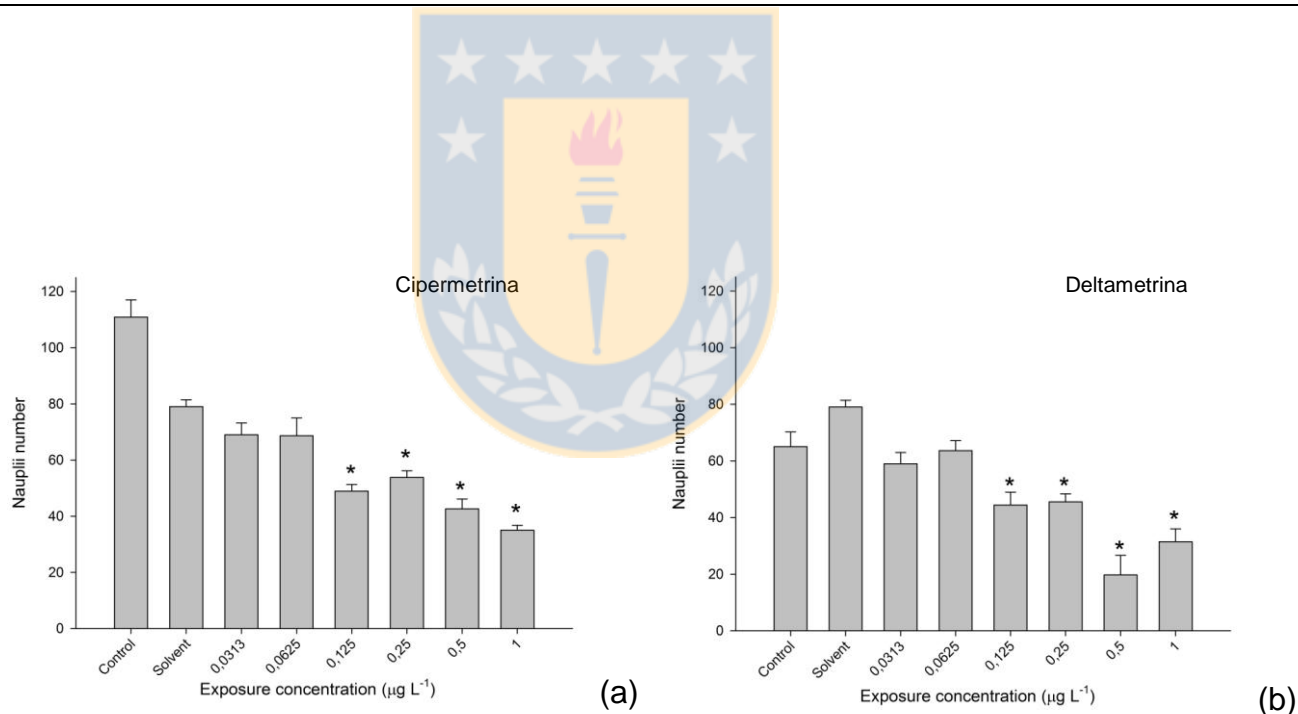
**Tabla 1.** Predicción de concentraciones ambientales de fármacos antiparasitarios en agua utilizando modelo de fugacidad nivel III.

Fármacos antiparasitarios	Promedio (ng L <sup>-1</sup> )	Mínimo (ng L <sup>-1</sup> )	Máximo (ng L <sup>-1</sup> )
Benzoato de emamectina	3.1	1.9	4.6
Cipermetrina*	6.0	4.5	8.8
Deltametrina*	3.64	2.5	6.0
Diflubenzuron	611	420	1006

\*Capítulo 2: modelación de piretroides

**Tabla 2.** Concentración de fármacos antiparasitarios en muestras de sedimento desde diferentes zonas con actividad salmonera en la región de Los Lagos, Chile. EB= benzoato de emamectina; CP= cipermetrina; DE= deltametrina; DI= diflubenzuron.

Sitio	Zona	Coordenadas		Concentración promedio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) $\pm$ DS			
		Latitud	Longitud	EB	CP	DE	DI
S1	Puerto Montt	41°33'22.29"S	73°00'36.39"O	8.4 $\pm$ 1.4			0.62 $\pm$ 0.1
S2	Bahía Manao	41°51'23.14"S	73°29'09.45"O		193 $\pm$ 95		
S3	Bahía Manao	41°52'30.74"S	73°29'56.24"O		203 $\pm$ 91		
S4	Dalcahue	41°25'53.98"S	73°37'19.07"O			<10.4	



**Figura 2.** Conteo de número de nauplius eclosionados en *T. longicornis* durante la exposición a piretroides cipermetrina (a) y deltametrina (b).

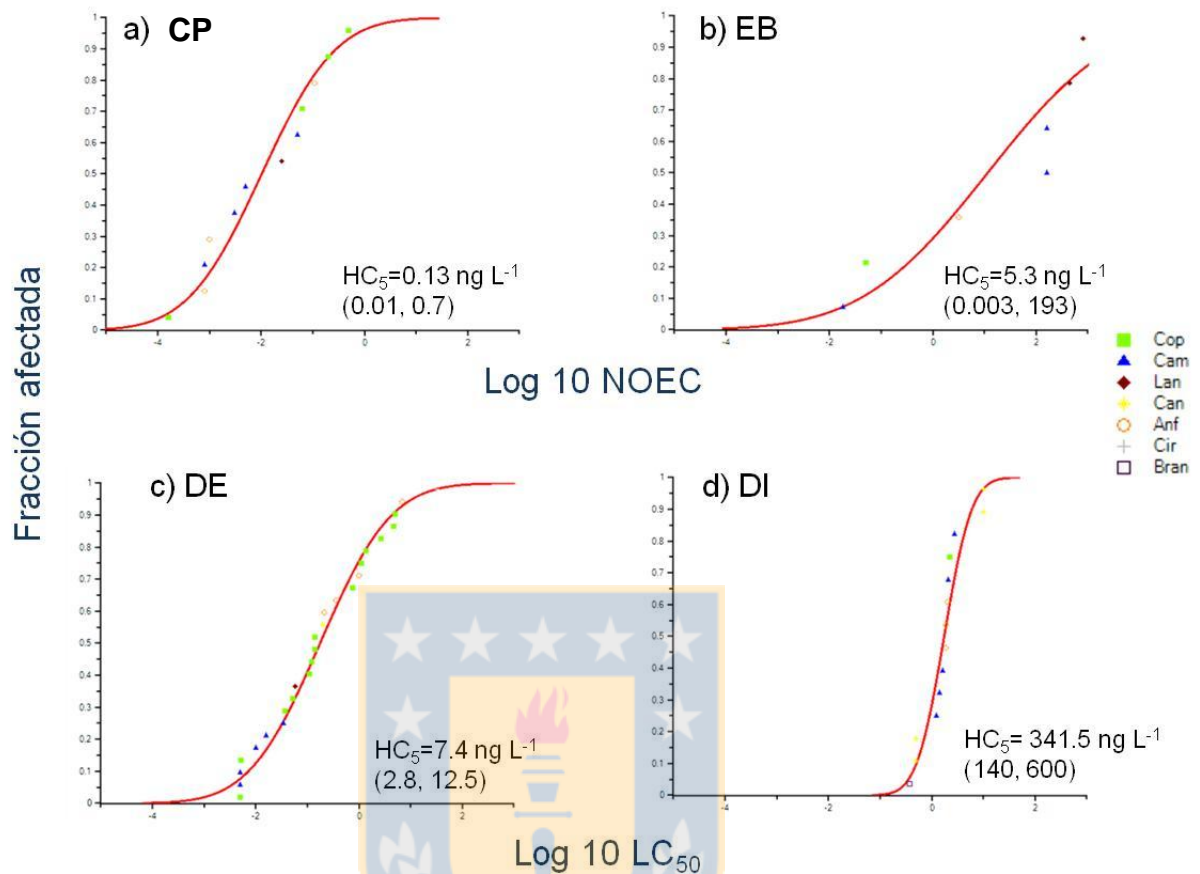
**Tabla 3.** Respuestas ecotoxicológicas de crustáceos locales expuestos a fármacos antiparasitarios.

Especie	Respuesta	Concentración	Fármacos antiparasitarios		
			EB	CP	DE
<i>Tisbe longicornis</i>	LC <sub>50-48h</sub>	µg L <sup>-1</sup>		4.6 (1.8-7.5)	7.7 (4.4-11)
	Reproducción (Éxito reproductivo)	µg L <sup>-1</sup>		0.063	0.063
<i>Monocorophium insidiosum</i> *	LC <sub>50-10días</sub>	µg kg <sup>-1</sup>	890 (672-1171)	57 (41-77)	7.8 (5-11)
	Subletal bioquímica GST/TBARS (48h)	µg kg <sup>-1</sup>	100	8.0	

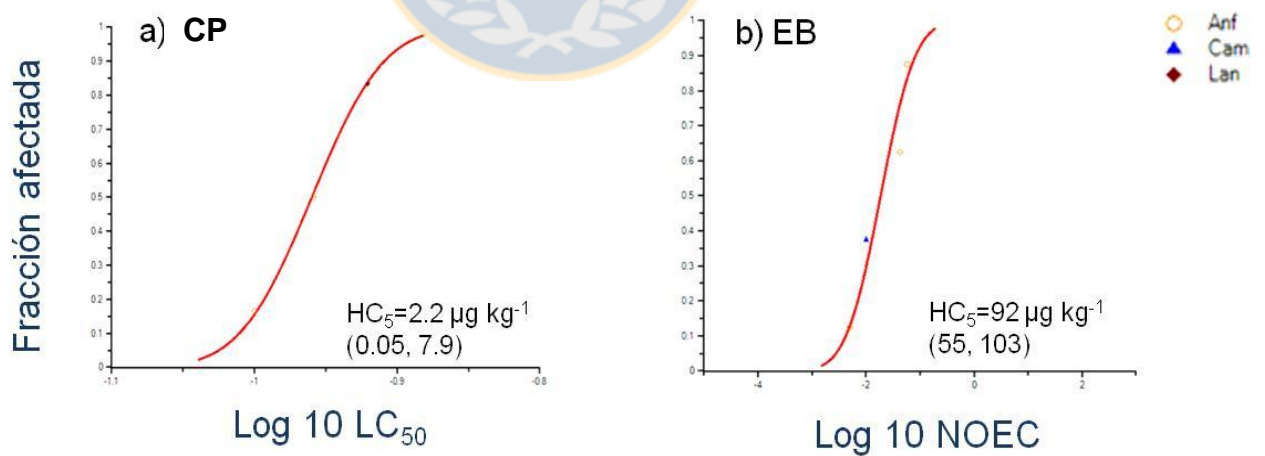
\* Tucca et al., 2014



## A. Agua



## B. Sedimento



**Figura 3.** Distribución de sensibilidad para crustáceos marino expuestos a: (a) cipermetrina (CP), (b) benzoato de emamectina (EB), (c) deltametrina (DE) y (d) diflubenzuron (DI). La media de la concentración peligrosa para el 5% de la especies es expresada en cada distribución incluyendo su límite inferior y superior.

**Tabla 4.** Comparación de valores PNEC calculados a través de métodos probabilísticos y determinísticos para agua y sedimento.

Fármacos	Agua (ng L <sup>-1</sup> )		Sedimento (µg kg <sup>-1</sup> )	
	PNEC <sub>prob</sub>	PNEC <sub>determ</sub>	PNEC <sub>prob</sub>	PNEC <sub>determ</sub>
Cipermetrina	0.13	0.016 <sup>a</sup>	2.2	0.005 <sup>e</sup>
Deltametrina	7.4	0.011 <sup>b</sup>	ND	0.008 <sup>f</sup>
Benzoato de emamectina	5.3	1.8 <sup>c</sup>	92	10 <sup>g</sup>
Diflubenzuron	341.5	0.37 <sup>d</sup>	ND	ND

Nota: cada letra corresponde a la especie más sensible y al factor de seguridad utilizado: a) *Acartia tonsa* (Factor de 10); b) *Balanus Amphititre* (Factor de 1000); c) *Mysidopsis bahia* (Factor de 10); d) *Artemia salina* (Factor de 1000); e) *Corophium volutator* (Factor de 1000); f y g) *Monocorophium insidiosum* (Factor de 10 y 1000, respectivamente). ND: sin datos.

**Tabla 5.** Caracterización del riesgo mediante criterios probabilístico y determinístico en agua y sedimento. En negrita se muestran cuocientes mayores a 1000.

Compuesto	PEC máximo		Caracterización riesgo			
	Agua (ng /L)	sedimento (µg/kg)	agua		sedimento	
			RQprob	RQdeterm	RQprob	RQdeterm
Cipermetrina	8.8	1300	67	550	590	<b>260000</b>
Deltametrina	6.0	ND	0.8	545	-	-
Benzoato de emamectina	4.6	14	0.8	2.5	0.2	1.4
Diflubenzuron	1006	1.2	2.9	<b>2718</b>	-	150

### Información suplementaria (Anexo III)

## Referencias

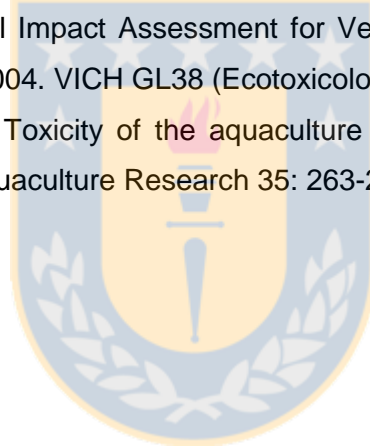
- Aldenberg T & JS Jaworska, 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46: 1-18.
- Aldenberg T & W Slob, 1993. Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25: 48-63.
- Barata C, DJ Baird, M Medina, A Albalat & AMVM Soares, 2002. 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.
- Barnes KA, JR Startin, SA Thorpe, SL Reynolds & RJ Fussell, 1995. Determination of the pesticide diflubenzuron in mushrooms by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 712: 85-93.
- Boxshall GA & S Bravo, 2000. The identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonids net pen systems in southern Chile. *Contrib. Zool* 69: 137-146.
- Burrige L, JS Weis, F Cabello, J Pizarro & K Bostick, 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306: 7-23.
- Chapman PM, A Fairbrother & D Brown, 1998. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 99–108.
- Costello MJ, 2006. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, 22: 47–483.
- Crane M, M Gross, DS Maycock, A Grant & BH Fossum, 2011. Environmental quality standards for a deltamethrin sea louse treatment in marine finfish aquaculture based on survival time analyses and species sensitivity distributions. *Aquaculture Research* 42: 68-72.
- Davies PE, LSJ Cook & D Goenarso, 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 13:1341-1354.



- Dyer SD, SE Belanger & GJ Carr, 1997. An initial evaluation of the use of Euro/North American fish species for tropical effects assessment. *Chemosphere* 35: 2767–2781.
- Ernst W, P Jackman, K Doe, F Page, G Julien, K Mackay & T Sutherland, 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: 433-444.
- European Commission (EC), 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment Parte II. european commission joint research centre. European Chemicals Bureau. 7-131 pp.
- Forbes TL & VE Forbes, 1993. A Critique of the Use of Distribution-Based Extrapolation Models in Ecotoxicology. *Functional Ecology* 7: 249-254.
- Gentry B, 2008. Blankinship D, Wainwright E. Oracle crystal ball usermanual. 11.1.1 ed. Denver, USA: Oracle, Inc.
- Hamilton MA, RC Russo & RV Thurston, 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science & Technology* 11: 714-719.
- Haya K, LE Burrige, IM Davies & A Ervik, 2005. A Review and Assessment of Environmental Risk of Chemicals Used for the Treatment of Sea Lice Infestations of Cultured Salmon. *Hdb Env Chem* 5: 305–340.
- Johnson SC, JW Treasurer, S Bravo, K Nagasawa & Z Kabata, 2004. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool. Stud.* 43, 229–243.
- Kooijman SALM, 1987. A safety factor for LC<sub>50</sub> values allowing for differences in sensitivity among species. *Water Research* 21: 269-276.
- Krogh KA, E Björklund, D Loeffler, G Fink, B Halling-Sørensen & TA Ternes, 2008. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1211: 60–69.
- Maltby L, N Blake, TCM Brock & PJ Van Den Brink, 2005. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 379–388.
- Mochida K, T Onduka, H Amano, M Ito, K Ito, H Tanaka & K Fujii, 2012. Use of species sensitivity distributions to predict no-effect concentrations of an antifouling biocide, pyridine triphenylborane, for marine organisms. *Marine Pollution Bulletin* 64: 2807-2814.
- Norwegian Institute for Water Research (NIVA). 2011, Environmental Screening of Veterinary Medicines Used in Aquaculture - diflubenzuron and teflubenzuron. Report: 6133/2011. pp 51.

- Posthuma L, GWI Suter, TP Traas (eds), 2002. Species-Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. Lewis, Boca Raton, FL, USA.
- Roth M, 2000. The availability and use of chemotherapeutic sea lice control products. Contributions to Zoology 69: 109-118.
- Roy WJ, IH Sutherland, HDM Rodger & KJ Varma, 2000. Tolerance of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to emamectin benzoate, a new orally administered treatment for sea lice. Aquaculture 184: 19-29.
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA). 2011, in The Occurrence of Chemical Residues in Sediments in Loch Linnhe, Loch Ewe and Loch Nevis: 2009, Report: JT000811\_JT.
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2010. Resolución N°665. Parámetros para determinar que los productos farmacéuticos de uso exclusivamente veterinarios no provoquen daños al ambiente, pp 2.
- Stone J, IH Sutherland, CS Sommerville, RH Richards & KJ Varma, 1999. The efficacy of emamectin benzoate as an oral treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (krøyer), infestations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases 22: 261–270.
- Torrissen O, S Jones, F Asche, A Guttormsen, O Skilbrei, F Nilsen, TE Horsberg & D Jackson, 2013. Salmon lice-impact on wild salmonids and salmon aquaculture. Journal of Fish Diseases 36: 171-194.
- Tucca F., K. Pozo, F. Encina, F. Borghini & R. Barra, Predicting the environmental concentration and persistence of antiparasitic chemicals used in feed additives in salmon farming with a fugacity model. Environmental Science Processes & Impact. (en revisión).
- Tucca F., M. Díaz-Jaramillo, G. Cruz, J. Silva, G. Chiang, E. Bay-Schmith, & R. Barra. 2014. Acute ecotoxicological assessment and biochemical responses in the marine amphipod *Monocorophium insidiosum* exposed to antiparasitic pesticides used by the salmon industry. Arch Environ Contam Toxicol. DOI 10.1007/s00244-014-0008-8.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 1988. Users guide for a computer program for Probit analysis of data from acute and short-term chronic toxicity test with aquatic organisms. Biological Methods, Environmental Monitoring and Support Lab.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 1994. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fresh water organisms. EPA/600/4-91/003. Washington, D.C.

- Van den Brink PJ, TCM Brock & L Posthuma, 2002. The value of the species sensitivity distribution concept for predicting field effects: (Non-) confirmation of the concept using semifield experiments. In Posthuma L, Suter GWI, Traas TP, eds, *Species-Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 155–193.
- Van Straalen NM & CAJ Denneman, 1989. Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 18: 241-251.
- Van Straalen NM, 2002. Threshold models for species sensitivity distributions applied to aquatic risk assessment for zinc. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 167–172.
- Van Vlaardingen PLA, Traas TP, Wintersen AM, Aldenberg T. 2004. *ETX 2.0*. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. Bilthoven, the Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Report no. 601501028/2004, 68 pp.
- VICH, 2004. Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II Guidance. October 2004. VICH GL38 (Ecotoxicology Phase II), 1-36.
- Willis KJ & Ling N, 2004. Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine copepods. *Aquaculture Research* 35: 263-270.



## **Capítulo V: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**



## DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio fueron realizadas diversas aproximaciones que permitieron revelar el riesgo ambiental de fármacos antiparasitarios (FA) utilizados por la industria del salmón en el sur de Chile. Para ello, la determinación de métodos predictivos a través del uso de modelos matemáticos multicompartimentales otorgaron una mayor comprensión en cuanto a la dinámica individual de compuestos orgánicos, entregando una alternativa viable y de uso práctico frente a escenarios químicamente complejos (Mackay & Arnot, 2011; Hughes et al., 2012). El modelo utilizado se basó en el balance químico de FA liberados al ambiente, definiendo su presencia y biodisponibilidad según propiedades físico-químicas y variables ambientales (Bacci, 1994; Mackay et al., 2001).

Importantes procesos y flujos permitieron comprender el destino final de FA administrados en alimentos y baños como tratamientos en jaulas con salmones (Capítulo 2). Las predicciones estuvieron en acuerdo con información medida en campo, por lo que permitió validar aquellos resultados obtenidos a través del modelo. Ciertamente algunas aproximaciones, como fue el caso del fármaco TE, mostró sobreestimación en comparación a datos medidos, estimándose concentraciones en sedimento 3 veces mayor. Sin embargo, las condiciones ilustradas en el modelo pudieron representar un escenario típico de tratamientos, poniendo en evidencia el peor caso lo que podría explicar la diferencia estimada con respecto a la situación de campo.

En cuanto a la variabilidad proporcionada por factores ambientales incorporados en el modelo fue posible descifrar la dinámica de cada uno de los FA, mostrando procesos de pérdidas en el sistema a través de la velocidad de corriente ( $4-8 \text{ cm s}^{-1}$ ) y una mayor disponibilidad en sedimento, entregada por la fracción de carbono orgánico (1-3%). La dispersión de estos fármacos a través de procesos de adsorción a la fracción orgánica y posterior transporte por acción hidrodinámica en la zona, podrían potenciar el movimiento de FA por largas distancias luego de su liberación. Por otro lado, la variable densidad de peces en jaulas contribuyó mayormente en la presencia de fármacos aplicados por alimento en agua, dejando de manifiesto la relación entre la cantidad emitida y densidad de peces por jaula.

Las predicciones de concentración de piretroides en sedimento estuvieron en acuerdo a niveles detectados en centros de cultivos localizados en el sur de Chile, como fue el caso de CP. Además, concentraciones estimadas en agua coincidieron en orden de magnitud con otros estudios, encontrándose a nivel de  $\text{ng L}^{-1}$  (Hunter & Fraser, 1995; Ernst et al., 2005). Para DE no fue posible validar la información obtenida, siendo importante enfocar posteriores estudios en la detección de este piretroide en zonas donde sea aplicado.

En relación a la persistencia de FA en el ambiente, se estimó para EB un mayor tiempo de residencia en sedimento, de igual modo como se ha señalado en otros estudios, los cuales reportarían una lenta degradación de este fármaco bajo condiciones de anoxia, el cual es un común escenario bajo jaulas de cultivo de salmón (SEPA 1999; SEPA 2004). En condiciones ambientales reales, esta baja concentración de oxígeno se asocia a la elevada carga orgánica depositada en el fondo marino producto de excreciones, fecas y alimentos no ingeridos por los peces, cómo también la pobre circulación de las aguas que favorecen el enriquecimiento orgánico en sedimento (Carroll et al., 2003; Soto & Norambuena, 2004). Contrariamente, DI fue el fármaco con menor persistencia en el ambiente, reportando rápida degradación. Estudios de campo han sugerido que DI muestra una baja persistencia en comparación a otra benzoilfenilurea (BPU) como TE (Haya, et al., 2005). No obstante, bajo condiciones de laboratorio se ha demostrado que DI presenta una elevada estabilidad y persistencia en sedimentos anóxicos (Selvik et al., 2002). En cuanto a la persistencia de piretroides en agua, estos dependerían de las condiciones alcalinas del mar, las cuales acelerarían su degradación por hidrólisis (SEPA, 2007), mientras que en sedimento también puede ocurrir una lenta degradación debido a la presencia de materia orgánica en el sistema (SEPA, 1998). El uso de muestreadores pasivos ha sido una tecnología de un amplio uso en monitoreo ambiental mostrando resultados que pueden ser interpretados de acuerdo a la complejidad de la zona evaluada (ej. hidrodinámica). Por medio del polímero acetato de vinil etileno (EVA) fue posible estimar concentraciones ambientales en agua del fármaco CP durante un periodo de tratamientos en jaulas de salmón. Previas calibraciones en laboratorio permitieron establecer la versatilidad y rápido equilibrio entre el muestreador y el medio acuoso, producto del menor espesor

diseñado en los dispositivos (St. George et al., 2011; Genualdi et al., 2012). Esto permitió el despliegue de dispositivos en campo (Bahía Manao, Chiloé) durante un corto periodo de tiempo (7 a 8 días). Concentraciones estimadas en agua a través del polímero EVA cercanas a las predicciones realizadas a través del modelo matemático para el compuesto CP, reportándose concentraciones en el orden de 2 a 4 ng L<sup>-1</sup>. Además, una rápida dispersión fue registrada en la zona relacionándose de manera directa con la hidrodinámica del lugar. La mayor concentración fue detectada cerca de la costa (~1 km de distancia desde balsas jaulas) con 4 ng L<sup>-1</sup>, encontrándose en acuerdo con otros estudios donde se indica la rápida dispersión y dilución de CP luego de su liberación durante tratamientos en salmones (Hunter & Fraser, 1995; Ernst et al., 2001).

Al comparar estas concentraciones estimadas de CP con datos ecotoxicológicos de especies marinas se aprecia que niveles detectados en la zona de estudio podrían aproximarse a umbrales de toxicidad de organismos no objetivos como camarones (Hill, 1985), langostas (Burrige et al., 2000) y copépodos (Barata et al., 2002a; Barata et al., 2002b; Medina et al., 2002), reportándose para estos últimos una mayor vulnerabilidad durante un periodo de tratamiento (Willis & Ling, 2004; Medina *et al.*, 2004). Esta herramienta de monitoreo permitió aproximarse y ser de ayuda para la determinación de concentraciones ambientales esperadas (PEC) en agua, siendo una vía preliminar de evaluación ambiental de fármacos aplicados durante periodos de tratamiento.

En cuanto a los efectos de FA, estos químicos han mostrado ser altamente tóxicos sobre invertebrados marinos, principalmente crustáceos (Ernst et al., 2001; Haya et al., 2005). Los piretroides CP y DE fueron altamente efectivos en su toxicidad durante periodos cortos de exposición en copépodos y anfípodos, corroborando el alto potencial tóxico bajo condiciones de laboratorio (Hill et al., 1989). Estos químicos son potentes insecticidas con rápida acción sobre el sistema nervioso central de invertebrados, generando despolarización en células nerviosas debido al permanente ingreso de iones sodio, situación que afecta la transmisión de impulsos nerviosos (Narahashi, 2001). Así, dicha toxicidad dependerá de la acción de los isómeros presentes en su formulación (Pérez-Fernández et al., 2010). CP es un piretroide con dos isómeros activos en su formulación en el cual la potente acción insecticida está

dada por el isómero *cis* con 10 veces más potencia tóxica que su isómero *trans* (Ray, 2004). En cambio la presencia de un isómero activo en DE le otorga una mayor efectividad en su toxicidad, viéndose reflejado durante ensayos agudos en especies locales (Tucca et al., 2014).

Ensayos en sedimento con el anfípodo *M. insidiosum* registraron alta sensibilidad a piretroides. Pruebas con EB sugieren que anfípodos ensayados presentarían menor sensibilidad que otro anfípodo marino como *Corophium volutator* (Mayor et al., 2008; SEPA 1999). Posiblemente, la diferencia podría deberse a la homogenización del principio activo en el sedimento, encontrándose poco biodisponible para los anfípodos.

Por otro lado, niveles preliminares ensayados con BPU reportaron toxicidad aguda a concentraciones nominales mayores a 1 mg kg<sup>-1</sup>. Estas concentraciones podría representar baja probabilidad de detección en sedimentos cercano a zonas de cultivos de salmón, por lo que ensayos agudos no fueron realizados en anfípodos. El mecanismo de acción generado por BPU sobre invertebrados es principalmente inhibir la síntesis de quitina durante cambios de muda de invertebrados juveniles (Mulder & Gijswijt, 1973; Post et al., 1974). Es importante replantear un diseño experimental el cual utilice estados tempranos de desarrollo durante los ensayos (Cunningham, 1986; Savitz et al., 1994).

Respuestas subletales evidencian actividad antioxidante y peroxidación en lípidos para *M. insidiosum*, bajo umbrales de letalidad en ensayos con CP y EB. El uso de anfípodos permitió demostrar repuestas a menores niveles de organización biológica (Schvezov & Amin, 2011), logrando comprender patrones que podrían sugerir comportamientos en periodos de tratamientos quimioterapéuticos sobre jaulas de salmón (Davies et al., 2001). En ensayos realizados con CP se observó una clara inducción en la actividad GST y peroxidación en lípidos a 48 horas de exposición, posteriormente luego de 240 horas estas respuestas mostraron mucha variabilidad. Dicha situación también ha sido señalada por otros autores en cangrejos (*Carcinus maenas*), sugiriéndose que inducciones en la actividad GST por acción de CP puede ser medida en periodos cortos de tiempo (Gowland et al., 2002). Probablemente, el comportamiento medido en crustáceos podría deberse a la rápida degradación y poca persistencia de CP (Ernst et al., 2001; Pérez-Fernández et al., 2010), lo que



permitiría a los anfípodos alcanzar un equilibrio en el tiempo. Contrariamente, para el caso de EB se reportaron significativas inducciones en GST y TBARS luego de 2 y 10 días, situación que podría dejar en evidencia la prolongada acción y lenta degradación de EB durante los ensayos. Respuestas bioquímicas con el piretroide DE fueron poco claras, probablemente concentraciones nominales no reflejarían el nivel de exposición en anfípodos. No obstante, fue observado un ligero incremento a la concentración más baja después de 2 días de exposición, manifestando algún comportamiento hormético en los organismos ensayados (Calabrese, 2008).

Para adultos de *Tisbe longicornis* expuestos a piretroides sintéticos se reportó una baja LC<sub>50</sub>. Esto estuvo consistente a otros umbrales de toxicidad en copépodos marinos. Willis y Ling (2004) determinó la toxicidad de CP para diferentes especies de copépodos, midiendo su inmovilidad durante 48 horas de exposición. En este estudio las especies *Temora longicornis* y *Oithona similis* mostraron efectos a concentraciones nominales de 0.74 (0.44-1.23) µg L<sup>-1</sup> y 0.24 (0.12-0.47) µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. En tanto, la especie *Acartia clausi* registró efectos agudos a 2.67 (1.76-4.14) µg L<sup>-1</sup>, aproximándose a lo obtenido en este estudio. En otras especies, Medina et al. (2002) observó para *Acartia tonsa* letalidad en el orden de 0.142 µg L<sup>-1</sup> durante 96 horas de exposición, a su vez se observó una alta mortalidad en machos durante las primeras 24 horas, como también estados naupliares. Esto deja en evidencia la diferenciada sensibilidad intra-especie, la cual debe ser considerada durante evaluaciones toxicológicas.

Ensayos con DE en *T. longicornis* mostraron menor sensibilidad en comparación a otros crustáceos. Pruebas toxicológicas con *Tisbe battagliai* reportaron una LC<sub>50</sub> igual a 10.6 (7.2-14.0) ng L<sup>-1</sup> luego de exponerse por 144h (Barata et al., 2002b). Igualmente, otros organismos marinos como decápodos y anfípodos han reportado umbrales de toxicidad aguda (96h) a niveles de ng L<sup>-1</sup> (Fairchild et al., 2010).

Mediciones en el éxito reproductivo en hembras de *T. longicornis* mostraron respuestas crónicas similares para ambos test con piretroides, determinándose un NOEC de 0.0625 µg L<sup>-1</sup>. Equivalentemente, efectos reproductivos en *T. battagliai* fueron observados dificultad reproductiva en hembras a concentraciones nominales de 0.037 (0.011-0.064) µg L<sup>-1</sup> y 0.022 (0.016-0.028) µg L<sup>-1</sup> para CP y DE, respectivamente (Barata et al., 2002b). Probablemente el diseño experimental

utilizado en este estudio permitió que hembras durante su ciclo de vida desarrollara mecanismos de defensa que le permitieron la leve resistencia a la acción de piretroides.

De acuerdo a una distribución probabilística de datos ecotoxicológicos en crustáceos marinos fue posible estimar la media de la concentración peligrosa para el 5% de las especies ( $HC_5$ ) como valor de la concentración sin efectos esperado (PNEC) en cada uno de los FA. Sin duda el uso de datos NOEC permitió la derivación de la distribución de sensibilidad en especies (SSD) para CP y EB, siendo considerado estos datos crónicos mayormente representativos en condiciones de campo (Van Straaleen & Denneman, 1989). Sin embargo, debido a la limitada información en DE y DI únicamente se obtuvieron valores  $HC_5$  a través de datos agudos. Esta alternativa ha sido discutida como una buena opción de evaluación cuando la información toxicológica es escasa (Posthuma et al., 2002; Mochida et al., 2012). Además, críticas formuladas por el uso de especies representantes de otras regiones geográficas (Davies et al., 1994; Dyes et al., 1997) y uso de datos ecotoxicológicos realizados en laboratorio han sido consideradas poco representativas para la evaluación de ecosistemas naturales. No obstante, Maltby et al. (2005) señala que no se han encontrado significativas diferencias en el uso de organismos presentes en otros hemisferios, ni diferencias en sensibilidad con aquellos organismos ensayados en terreno (Van den Brink et al., 2002).

A través del método probabilístico fue posible entregar un mayor resguardo para aquellas especies mayormente sensibles dentro de la distribución, encontrándose los valores  $HC_5$  bajo umbrales de toxicidad para los distintos FA. En algunos casos la proximidad al valor medio de  $HC_5$  podría otorgar un límite poco apropiado para especies sensibles, por lo que criterios en el uso del límite inferior en  $HC_5$  podría ser una alternativa para compuestos que son emitidos de manera consecutiva (Maltby et al., 2005), o bien, utilizar un factor de seguridad en casos donde la información puede ser escasa (Chapman et al., 1998).

Según criterios determinísticos de evaluación de riesgo utilizados en Chile (SAG, 2010) la estimación de un valor PNEC a través de datos agudos y/o crónicos de las especies más sensibles, junto a un factor de seguridad establecidos por normas VICH Fase II (VICH, 2004), podrían incurrir en escenarios mayormente conservativos

de evaluación en los cuales se podrían sobreestimar umbrales de protección en ecosistemas naturales.

La nula existencia de información pública sobre niveles de exposición de FA en el ambiente ha sido una falencia ambiental para una actividad altamente productiva en Chile. Distintamente, países como Noruega y Escocia han desarrollado programas ambientales de monitoreo que permiten conocer públicamente concentraciones ambientales de FA utilizados por la industria del salmón (ej. SEPA 2011; NIVA, 2011), dejando en evidencia el interés de estas naciones por llevar a cabo una actividad mayormente sustentable con el ambiente. Así, concentraciones en sedimento fueron detectadas para diferentes localidades con actividad salmonera en el sur de Chile, principalmente en la Región de Los Lagos (X Región). Para el centro de cultivo cercano a la ciudad de Puerto Montt fueron detectados niveles de EB, DI y TE de los cuales mediante una caracterización de riesgo o cálculo de cociente de riesgo (RQ) no se encontró riesgos en el ambiente, encontrándose estas concentraciones bajo valores PNEC determinados por métodos probabilístico y determinísticos. De igual modo, para el centro de cultivo con aplicación de DE en la localidad de Dalcahue no se encontró riesgo según la caracterización del riesgo en la zona. En cambio, para los centros de cultivo presentes en Bahía Manao se detectaron altas concentraciones de CP en sedimento determinado un riesgo ambiental en la zona. Probablemente, condiciones oceanográficas y características del sedimento (alta carga de materia orgánica) podrían favorecer la presencia de este piretroide.

Este estudio fue un primer paso que permitió comprender el riesgo ambiental de FA sobre crustáceos marinos, entregando nuevas herramientas que permitan evaluar la exposición a compuestos orgánicos y sus potenciales efectos a diferentes niveles de organización biológica (bioquímico-individuo). Sin embargo, es necesario proyectar dicha evaluación hacia mayores niveles organización (Medina & Ramos-Jiliberto, 2009), o bien, poder identificar aquellas especies claves dentro de una estructura comunitaria. Frente a esto existen estudios que han tratado de llevar a cabo criterios cualitativos y cuantitativos de identificación de especies ecológicamente relevantes (Ramos-Jiliberto et al., 2013).

## CONCLUSIONES

De acuerdo a las hipótesis de trabajo planteadas:

*Hipótesis 1:* La afinidad de fármacos antiparasitarios (FA) por un compartimento determina su concentración en el ambiente, y biodisponibilidad en agua.

El uso de herramientas como modelos matemáticos predictivos, además de mediciones y estimaciones en campo (uso de polímero EVA) permitió cuantificar la ocurrencia de concentraciones en diferentes compartimentos ambientales para FA. La modelación de escenarios típicos de tratamientos en balsas jaulas permitió comprender la dinámica y destino final de pesticidas siendo coincidente, en orden de magnitud, a niveles detectados en sedimento ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y estimados en agua ( $\text{ng L}^{-1}$ ) a través de el muestreador acetato de vinil etileno (EVA). Para esto último, la posibilidad de FA para alcanzar largas distancias y encontrarse biodisponible en la columna de agua dependerá de las características hidrodinámicas de la zona donde se encuentre desplegada la concesión, además de la persistencia del FA. Caso que fue observado con el piretroide CP.

Por otro lado, la presencia de compuestos como EB sugiere una prolongada persistencia en sedimento por lo que su estabilidad y persistencia podrían indicar situaciones de exposición a largo plazo. Por el contrario, para benzoilfenilureas (BPU) condiciones ambientales podrían determinar su persistencia en el ambiente, sin embargo, su rápida degradación y baja concentraciones podría sugerir ocurrencia en el ambiente durante un corto tiempo.

El límite de detección reportado para DE no permitió registros de este fármaco en el ambiente, por lo que sería fundamental tener un seguimiento mayormente acabado de su presencia en el sistema marino.

La incorporación de nuevos métodos de evaluación de exposición ha permitido elaborar un diseño de análisis de FA en el ambiente entregando alternativas viables para la estimación de concentraciones esperadas en el ambiente (PEC), incorporando escenarios locales de aplicación de químicos.

*Hipótesis 2:* Bajas concentraciones (ppb) de fármacos antiparasitarios (FA) pueden sobrepasar umbrales de sensibilidad crónica en organismos bentónicos y/o zooplanctónicos.

Bajas concentraciones de FA evidenciaron efectos letales, subletales y crónicos sobre crustáceos marinos. Mediante ensayos en sedimento fármacos como CP, DE y EB reportaron efectos letales y subletales sobre el anfípodos marinos *M. insidiosum*. No obstante, pruebas con el copépodo *T. longicornis* se registró una mayor sensibilidad a la acción de piretroides sintéticos CP y DE reportando dificultades reproductivas en hembras.

De acuerdo a la determinación de concentraciones sin efecto esperado en el ambiente (PNEC) metodologías utilizadas por la regulación en Chile (determinístico) evidencian valores de sobreprotección sobre crustáceos marinos expuestos a FA en comparación a estimaciones entregadas por métodos probabilísticos. Sin embargo, la caracterización del riesgo a través de los dos métodos de evaluación del fármaco CP evidenció riesgos ambientales sobre crustáceos marinos en zonas con tratamientos en balsas jaulas en el sur de Chile. Este escenario clasifica a los centros localizados en Bahía Manao (Isla de Chiloé) como un área con riesgo ambiental cuando el producto CP es utilizado en tratamiento sobre salmones.

## Referencias

- Bacci E, 1994. Ecotoxicology of organic contaminants. Lewis CRC Press eds. Florida, USA.
- Barata C, M Medina, T Telfer & DJ Baird, 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.
- Barata C, DJ Baird, M Medina, A Albalat & AMVM Soares, 2002b. 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.
- Burrige LE, K Haya, SL Waddy & J Wade, 2000. 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.

- Calabrese EJ, 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem* 27:1451-1474.
- Carroll ML, S Cochrane, R Fieler, R Velvin & P White, 2003. Organic enrichment of sediments from salmon farming in Norway: environmental factors, management practices, and monitoring techniques. *Aquaculture* 226: 165–180.
- Chapman PM, A Fairbrother & D Brown, 1998. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 99–108.
- Cunningham PA, 1986. A Review of Toxicity Testing and Degradation Studies Used to Predict the Effects of Diflubenzuron (Dimilin ®) on Estuarine Crustaceans. *Environmental Pollution* 40: 63-86.
- Davies IM, GK Rodger, J Redshaw & RM Stagg, 2001. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. *ICES Journal of Marine Science* 58: 477–485.
- Davies PE, LSJ Cook & D Goenarso, 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 13:1341-1354.
- Dyer SD, SE Belanger & GJ Carr, 1997. An initial evaluation of the use of Euro/North American fish species for tropical effects assessment. *Chemosphere* 35: 2767–2781.
- Ernst W, P Jackman, K Doe, F Page, G Julien, K Mackay & T Sutherland, 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: 433-444.
- Fairchild WL, KG Doe, PM Jackman, JT Arsenault, JG Aubé, M Losier & AM Cook, 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. pp 34.
- Genualdi S & T Harner (2012) Rapidly Equilibrating Micrometer Film Sampler for Priority Pollutants in Air. *Environ. Sci. Technol* 46: 7661–7668.
- Gowland BT, CF Moffat, RM Stagg, DF Houlihan & Davies IM, 2002. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res* 54: 169-77.
- Haya K, LE Burrige, IM Davies & A Ervik, 2005. A Review and Assessment of Environmental Risk of Chemicals Used for the Treatment of Sea Lice Infestations of Cultured Salmon. *Hdb Env Chem* 5: 305–340.
- Hill I, 1989. Aquatic Organisms and Pyrethroids. *Pestic. Sci.* 27: 429-465.

- Hughes L, D Mackay, DE Powell & J Kim, 2012. An updated state of the science EQC model for evaluating chemical fate in the environment: Application to D5 (decamethylcyclopentasiloxane). *Chemosphere* 87: 118–124.
- Hunter RP & N Fraser, 1995. Field monitoring of the effects of cypermethrin as GPRD01. Report of Grampian Pharmaceuticals Limited, Research Division. Ref GP95033.
- Mackay D, 2001. Multimedia environmental models. The fugacity approach. Lewis Publishers, Chelsea, USA.
- Mackay D & JA Arnot, 2011. The Application of Fugacity and Activity to Simulating the Environmental Fate of Organic Contaminants. *Journal of Chemical & Engineering Data* 56: 1348–1355.
- Maltby L, N Blake, TCM Brock & PJ Van Den Brink, 2005. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 379–388.
- Mayor DJ, M Solan, I Martinez, L Murray, H McMillan, GJ Paton & K. Killham, 2008. Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture industry to *Corophium volutator* and *Hediste diversicolor*: Whole sediment bioassay tests. *Aquaculture* 285: 102-108.
- Medina M & R Ramos-Jiliberto, 2009. Direcciones futuras de la ecotoxicología en Chile: implicancias para la evaluación de riesgo ambiental de productos veterinarios utilizados en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 443-457.
- Medina M, C Barata, T Telfer & DJ Baird, 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.
- Mochida K, T Onduka, H Amano, M Ito, K Ito, H Tanaka & K Fujii, 2012. Use of species sensitivity distributions to predict no-effect concentrations of an antifouling biocide, pyridine triphenylborane, for marine organisms. *Marine Pollution Bulletin* 64: 2807-2814.
- Mulder R & MJ Gijswijt, 1973. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. *Pestic Sci* 4:737-745.
- Narahashi T, 2001. Neurophysiological Effects of Insecticides (Chapter 31). In: Krieger R (ed) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, 3rd edn. Vol. 1, Elsevier Inc. 2010. pp 799-817.
- Norwegian Institute for Water Research (NIVA). 2011, Environmental Screening of Veterinary Medicines Used in Aquaculture - diflubenzuron and teflubenzuron. Report: 6133/2011. pp 51.

- Pérez-Fernández V, MA García & ML Marina, 2010. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *Journal of Chromatography A*, 1217: 968-989.
- Post LC, BJ De Jong & WR Vincent, 1974. 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea in insecticides: Inhibitors of chitin synthesis. *Pest Biochem Physiol* 4:473-483.
- Posthuma L, GWI Suter, TP Traas (eds), 2002. *Species-Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis, Boca Raton, FL, USA.
- Ramos-Jiliberto R, P Urbani, L Garay-Narváez, P Razeto-Barry, F Encina-Montoya & MH Medina, 2013. Identificación de especies ecológicamente relevantes para la Evaluación de Riesgo Ecológico: Una propuesta desde la ecología teórica. *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 21-31.
- Ray D, 2004. Toxicology of Pyrethrins and Synthetic Pyrethroids (Chapter 4). En: Timothy C. Marrs and Bryan Ballantyne. *Pesticide Toxicology and International Regulation*. John Wiley & Sons, Ltd. 129-158 pp. ISBN: 0-471-49644-8.
- Savitz JD, DA Wright & RA Smucker, 1994. Toxic Effects of the Insecticide Diflubenzuron (Dimilin ®) on Survival and Development of Nauplii of the Estuarine Copepod, *Eurytemora affinis*. *Marine Environmental Research* 37: 297-312.
- Schvezov N & O Amin. 2011. Biochemical response of amphipods (Gammarid: Paramorea) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 394–402.
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), 1998. Policy on the use of cypermethrin in marine fish farming risk assessment, EQS and recommendations. Policy No. 30.
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), 1999. Emamectin benzoate, an environmental assessment. <http://www.sepa.org.uk/policies/index.htm>, pp 23.
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA), 2004. The Occurrence of Chemicals used in Sea Louse Treatments In Sediments Adjacent to Marine Fish Farms: Results of Screening Surveys During 2003. Report TR-040430JBT, pp 20.
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA), 2007. The Occurrence of Chemicals used in Sea Louse Treatments in Sediments Adjacent to Marine Fish Farms: Results of Screening Surveys During 2006. Report: TR-070807\_JBT August 2007. 21 pp.
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA). 2011, in The Occurrence of Chemical Residues in Sediments in Loch Linnhe, Loch Ewe and Loch Nevis: 2009, Report: JT000811\_JT.
- Selvik A, PK Hansen, A Ervik & OB Samuelsen, 2002. The stability and persistence of diflubenzuron in marine sediments studied under laboratory conditions and the



- dispersion to the sediment under a fish farm following medication. *The Science of the Total Environment* 285: 237-245.
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2010. Resolución N°665. Parámetros para determinar que los productos farmacéuticos de uso exclusivamente veterinarios no provoquen daños al ambiente, pp 2.
- Soto D & F Norambuena, 2004. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *Journal applied Ichthyology* 20: 493-501.
- St George T, P Vlahos, T Harner, P Helm, B Wilford, 2011. A rapidly equilibrating, thin film, passive water sampler for organic contaminants; characterization and field testing. *Environmental Pollution* 159: 481-486.
- Tucca F., M. Díaz-Jaramillo, G. Cruz, J. Silva, G. Chiang, E. Bay-Schmith & R. Barra. 2014. Acute ecotoxicological assessment and biochemical responses in the marine amphipod *Monocorophium insidiosum* exposed to antiparasitic pesticides used by the salmon industry. *Arch Environ Contam Toxicol*. DOI 10.1007/s00244-014-0008-8
- Van den Brink PJ, TCM Brock & L Posthuma, 2002. The value of the species sensitivity distribution concept for predicting field effects: (Non-) confirmation of the concept using semifield experiments. In Posthuma L, Suter GWI, Traas TP, eds, *Species-Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 155–193.
- Van Straalen NM & CAJ Denneman, 1989. Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 18: 241-251.
- VICH, 2004. Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II Guidance. October 2004. VICH GL38 (Ecotoxicology Phase II), 1-36.
- Willis KJ & Ling N, 2004. Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine copepods. *Aquaculture Research* 35: 263-270.

## **ANEXO: Información suplementaria**



## ANEXO I: Supplementary information (Paper N°1)

Predicting the environmental concentration and persistence of antiparasitic chemicals used in feed additives in salmon farming with a fugacity model.

### SECTION A: DESCRIPTION OF THE ENVIRONMENTAL SCENARIO.

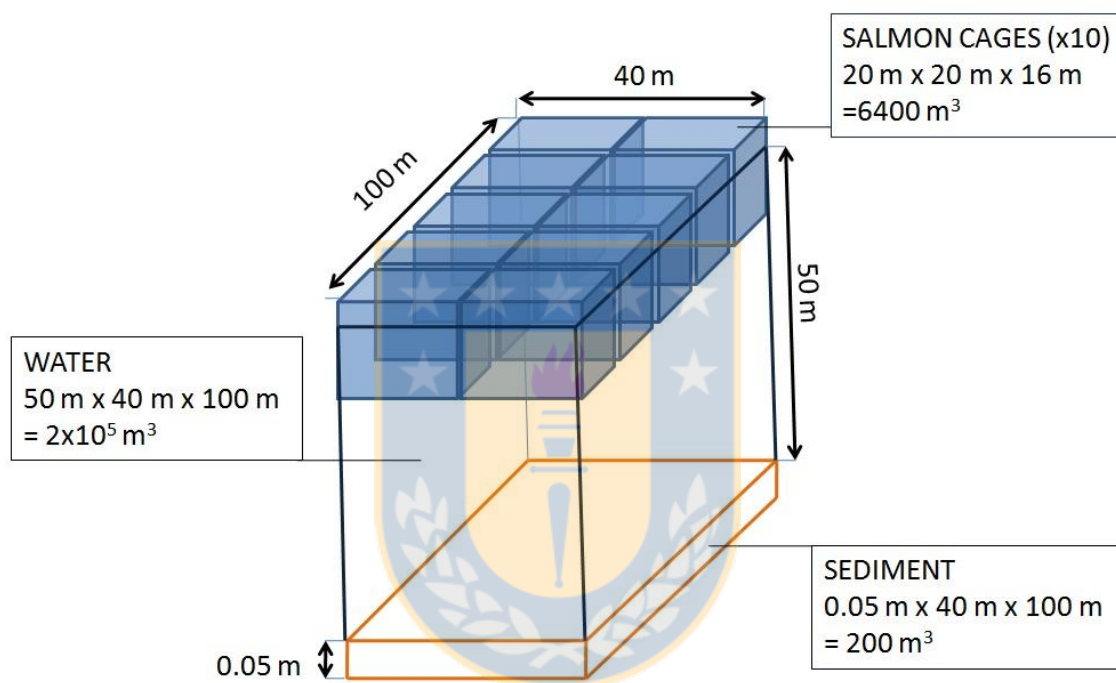


Figure S1. Scheme of environmental dimensions used for the model.

**SECTION B: MEASURED AND MODELLED CONCENTRATIONS OF ANTIPARASITIC CHEMICALS.**

Table S1: Antiparasitic chemicals detected in sediment by salmon farming close Puerto Montt city, Los Lagos Region. Chile.

Concentrations measured in sediment ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		
Emamectin benzoate	Diflubenzuron	Teflubenzuron
14.57	1.08	0.95
10.50	0.76	0.82
2.21	0.74	0.94
ND	0.45	1.68
8.38	0.13	7.00
ND	0.35	5.70
8.38	0.44	4.19
6.68	0.40	ND
8.12	1.22	5.85

Table S2: Variability of concentrations modeled in sediment through fugacity model Level III. The variability was performed with Monte Carlo Method (software Risk-Analysis Crystal ball).

Concentrations modeled in sediment ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )			
	Emamectin benzoate	Diflubenzuron	Teflubenzuron
Maximun	18,8	3,2	97,8
Minimun	1,6	0,3	8,4
Mediana	6	1	31,3
Average	<b>7,28</b>	<b>1,15</b>	<b>37,38</b>
Standard Error	1,44	0,24	7,43

## ANEXO II: Supplementary Information (Paper N°2)

### Ethylene vinyl acetate polymer as a tool for passive sampling monitoring of organic contaminants in the salmon farm industry of Chile.

#### Sampler characteristics

Calculation of the total mass of filters was performed according to the weight difference between the filters without and coated with EVA (Table S1).

**Table S1. EVA mass calculation in filters used for calibration experiment.**

Filter number	Filter mass 1 (g)	Filter mass 2 (g)	EVA mass (g)
1	0.2804	0.3265	<b>0.0461</b>
2	0.2840	0.3406	<b>0.0566</b>
3	0.2792	0.3637	<b>0.0845</b>
4	0.2797	0.3317	<b>0.0520</b>
5	0.2810	0.3303	<b>0.0493</b>
6	0.2821	0.3363	<b>0.0542</b>
7	0.2807	0.3351	<b>0.0544</b>
8	0.2803	0.3371	<b>0.0568</b>
9	0.2785	0.3790	<b>0.1005</b>
10	0.2840	0.3406	<b>0.0566</b>
11	0.2797	0.3317	<b>0.0520</b>
12	0.2810	0.3303	<b>0.0493</b>
13	0.2821	0.3363	<b>0.0542</b>
14	0.2807	0.3351	<b>0.0544</b>
		Average weight	<b>0.0587</b>

The calculation of volume ( $Vol_{EVA}$ ), area ( $A_f$ ) and thickness of the ethylene vinyl acetate polymer in the glass fiber filter are show here:

$$Vol_{EVA} = Mass_{EVA} (g) / 0.93 (g/cm^3)$$

where  $0.93 g/cm^3$  is the EVA density.

Considering a filter of 7 cm of diameter, the filter area was calculated with the equation,

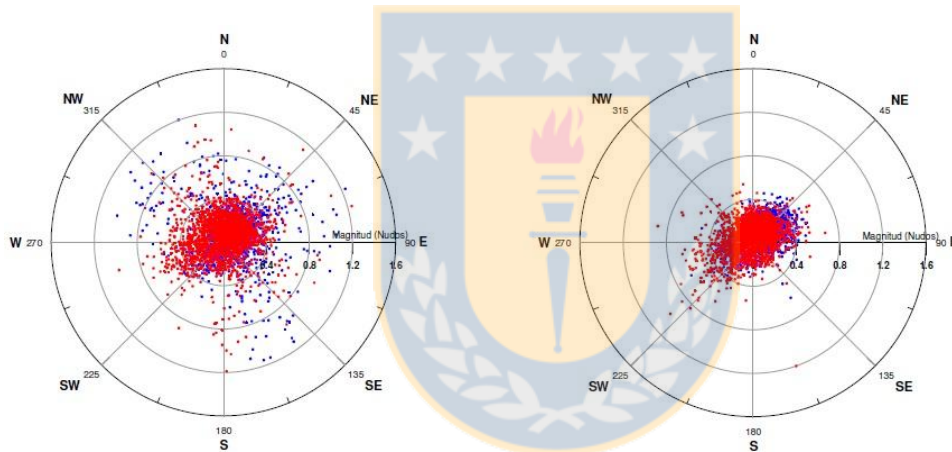
$$A_f = (\pi r^2) \times 2, \text{ where the double filter phases was considered.}$$

With the information obtained from  $Vol_{EVA}$  and  $A_f$ , was estimated the EVA thickness average in each filter, through the equation,

$$\text{Thickness } (\mu\text{m}) = [Vol_{EVA} (\text{cm}^3) / A_f (\text{cm}^2)] \times 10000$$

### Current direction

According to hydrodynamic information provided by the salmon farming, the direction predominant in the area is NORTHEAST. However, measured current flows in the study area were SOTHWEST-NORTHEAST direction (Figure S1).



**Figure S1. Plotting of current direction in surface layers (2.0m, left; 5m, right) of the study area. Both ebb tide (red) and fulling tide (blue) phases were represented.**

## Passive sampling devices

In field 3 stainless steel baskets were deployed in the marine water. Each basket presented dimensions of 30 cm long and 15 cm diameter (Figure S2). Three filters coated in EVA were putted in for evaluation of cypermethrin pesticide during treatment on salmon cages.



(a)



(b)

**Figure S2. Picture of baskets and EVA filter support (a); and deployment of passive samplers in the study area (b).**

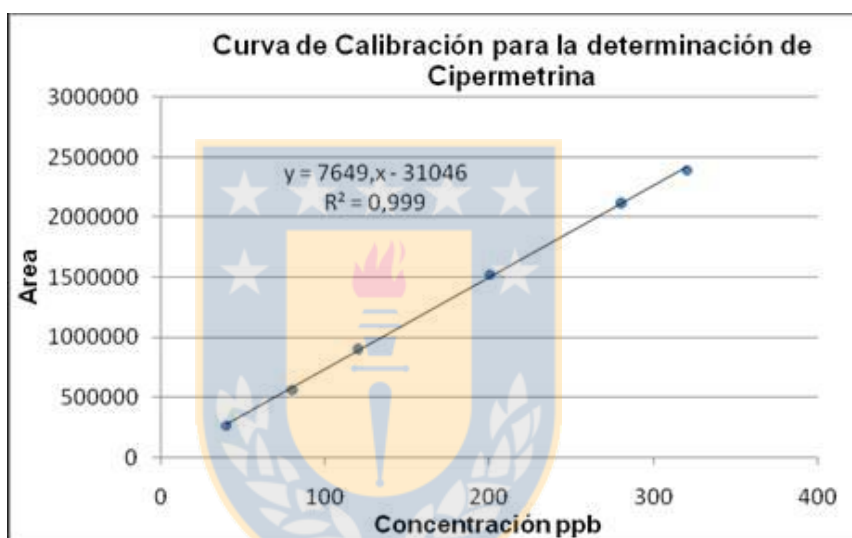
## ANEXO III: Supplementary Information (Paper N° 4).

### Distribución de sensibilidad en crustáceos marinos a fármacos antiparasitarios utilizados por la industria del salmón: Bases para la evaluación de riesgos.

#### Análisis de muestras

##### Curva de calibración

##### A. Cipermetrina



#### Limites de detección y cuantificación en agua

Límite de detección	12.0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Límite de cuantificación	74.8 $\mu\text{g L}^{-1}$

El límite de detección (LD) en sedimento fue estimado mediante la siguiente ecuación:

$$(A \times V_f)/P$$

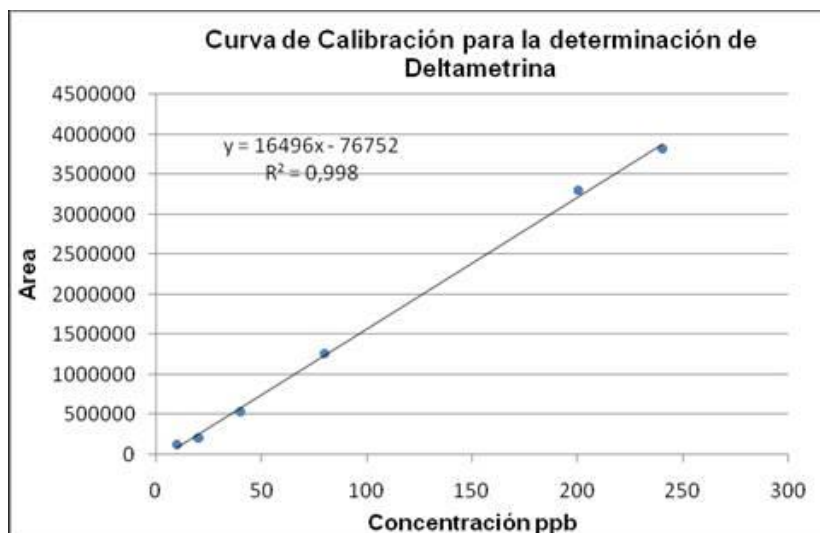
donde A es LD en  $\mu\text{g L}^{-1}$  multiplicada por el volumen final en el vial (1.5 ml) y P corresponde a la pesada analizada de sedimento (1g).

#### Limites de detección y cuantificación en sedimento

Límite de detección	18.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Límite de cuantificación	112.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$



## B. Deltametrina



### Limites de detección y cuantificación en agua

Límite de detección 6.9 µg L<sup>-1</sup>

Límite de cuantificación 13.1 µg L<sup>-1</sup>

El límite de detección (LD) en sedimento fue estimado mediante la siguiente ecuación:

$$(A \times V_f)/P$$

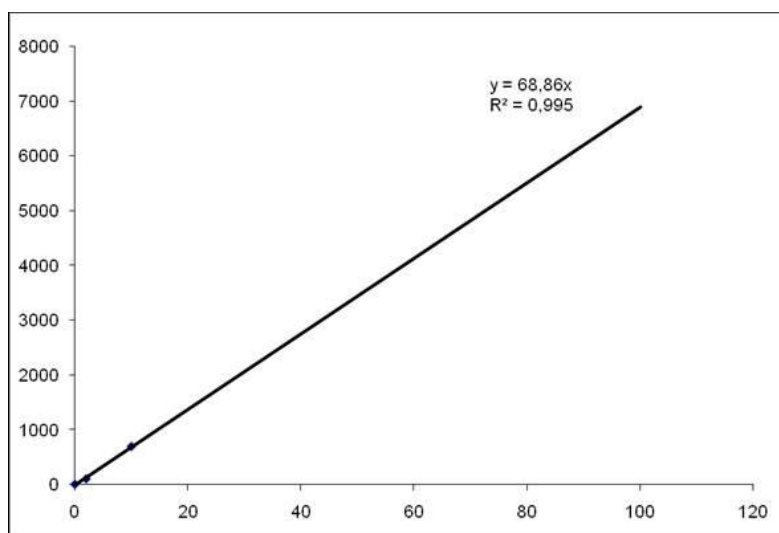
donde A es LD en µg L<sup>-1</sup> multiplicada por el volumen final en el vial (1.5 ml) y P corresponde a la pesada analizada de sedimento (1g).

### Limites de detección y cuantificación en sedimento

Límite de detección 10.4 µg kg<sup>-1</sup>

Límite de cuantificación 19.6 µg kg<sup>-1</sup>

### C. Benzoato de emamectina



El límite de detección (LD) para EB, DI y TE en sedimento fueron estimados mediante la siguiente ecuación:

$$(A \times V_f)/P$$

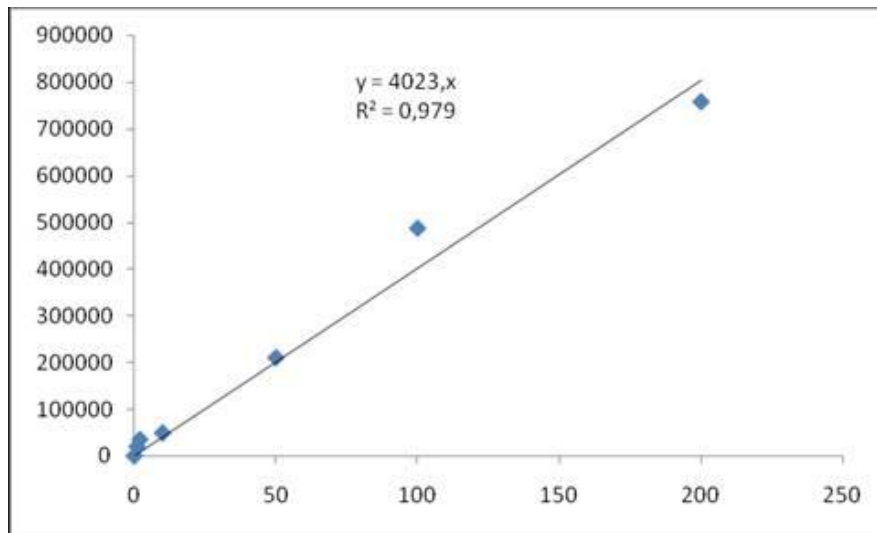
donde A es LD en  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) multiplicada por el volumen final en el vial (1.0 ml) y P corresponde a la pesada analizada de sedimento (10g).

#### Limites de detección en sedimento

Límite de detección

$0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$

D. Diflubenzuron

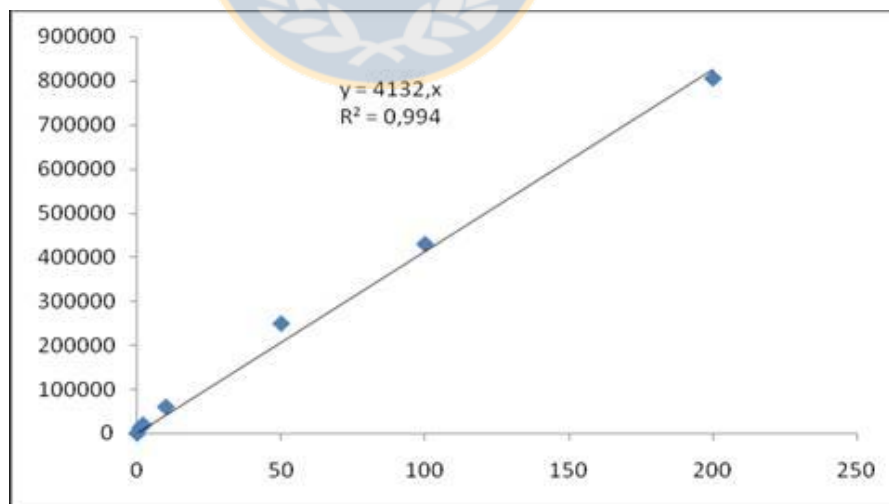


**Limites de detección en sedimento**

Límite de detección

$0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$

E. Teflubenzuron



**Limites de detección en sedimento**

Límite de detección

$0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$