



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magíster en ciencias con mención Oceanografía

**Estudio de compuestos antiparasitarios de uso actual en
salmonicultura: Efectos de Deltametrina, Azametifos y Benzoato
de emamectina sobre comunidades microbianas marinas**

Tesis para optar al grado de Magíster
en ciencias con mención en Oceanografía

CLAUDIA MARGARITA ROJAS PEREZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

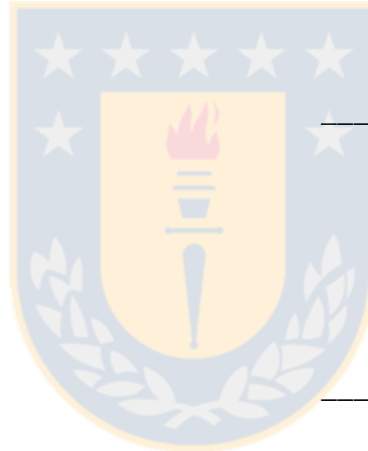
Profesor Guía: Dra. Camila Fernández Ibáñez
Profesor Co-guía: Dr. Renato Quiñones Bergeret
Dpto. de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

La Tesis de “*Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía*” titulada “*Estudio de compuestos antiparasitarios de uso actual en salmonicultura: Efectos de deltametrina, azametifos y benzoato de emamectina sobre comunidades microbianas marinas*”, de la Sta. *Claudia Margarita Rojas Pérez* ha sido realizada en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, y aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dra. Camila Fernández
Profesor Guía
Universidad de Concepción



Dr. Renato Quiñones
Profesor Co-guía
Universidad de Concepción

Dr. Anne-Marie Genèviere
Miembro comisión
Université Paris VI

Dra. Laura Farías
Directora Programa Magister en Oceanografía
Universidad de Concepción

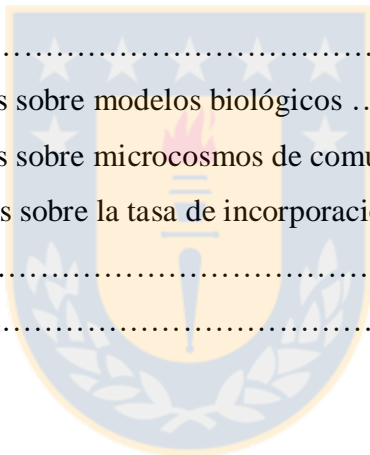
Tabla de contenidos

| | |
|--|----------|
| Índice de figuras | vii |
| Índice de tablas | xi |
| <i>Curriculum vitae</i> | xiv |
| Agradecimientos | xvi |
| Resumen | xvii |
| Abstract | xix |
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1. Antecedentes generales de la acuicultura y su desarrollo en Chile | 1 |
| 1.2. Presencia de <i>Caligus rogercresseyi</i> en cultivos de salmónidos en Chile | 2 |
| 1.3. Uso de antiparasitarios en salmonicultura | 2 |
| 1.4. Ensayos de toxicidad en organismos marinos | 4 |
| 1.5. Hipótesis | 6 |
| 1.6. Objetivo general | 7 |
| 1.7. Objetivos específicos | 7 |
| 2. MATERIALES Y METODOS | 8 |
| 2.1. Zonas de estudio | 8 |
| 2.1.1. Canal Caucahue, Chiloé, Región de Los Lagos | 8 |
| 2.1.2. Canal Puyuhuapi, Región de Aysén | 9 |
| 2.1.3. Golfo de Arauco, Región del Biobío | 11 |
| 2.2. Capítulo 1: Impacto de tres pesticidas utilizados en salmonicultura sobre comunidades microbianas marinas naturales | 12 |
| 2.2.1. Experimentos I y II en el Canal Puyuhuapi | 13 |
| 2.2.2. Experimento III en el Canal Caucahue | 16 |
| 2.2.3. Análisis estadísticos y gráficas..... | 17 |
| 2.3. Capítulo 2: Efecto de la presencia de los pesticidas benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre la tasa de asimilación de carbono | 17 |
| 2.3.1. Tasa de asimilación de carbono <i>in situ</i> | 18 |
| 2.3.2. Tasa de asimilación de carbono de organismos foto y quimioautótrofos | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.3. Análisis de muestras y datos obtenidos..... | 20 |
| 2.3.4. Análisis estadísticos..... | 22 |
| 2.4. Capítulo 3: Ensayos de toxicidad de benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre modelos biológicos | 22 |
| 2.4.1. Ensayos de toxicidad de sobre división temprana y desarrollo larval de los equinodermos <i>Sphaerechinus granularis</i> y <i>Paracentrotus lividus</i> | 22 |
| 2.4.2. Ensayos de toxicidad sobre el desarrollo larval del bivalvo <i>Mytilus chilensis</i> | 25 |
| 3. RESULTADOS | 27 |
| 3.1. CAPÍTULO 1: Impacto de tres pesticidas utilizados en salmonicultura sobre comunidades microbianas marinas naturales | 27 |
| 3.1.1. Condiciones ambientales registradas durante la realización de los experimentos I y II en el Canal Puyuhuapi (14 y 19 de agosto de 2014) | 27 |
| 3.1.2. Experimento I en el Canal Puyuhuapi | 32 |
| 3.1.2.1. Variación de la abundancia de microorganismos | 32 |
| 3.1.2.2. Variación de la concentración de nutrientes | 36 |
| 3.1.3. Experimento II en el Canal Puyuhuapi | 38 |
| 3.1.3.1. Variación de la abundancia de microorganismos | 38 |
| 3.1.3.2. Variación de la concentración de nutrientes | 43 |
| 3.1.4. Condiciones ambientales registradas durante el experimento III en el Canal Cauahue (26 de enero de 2015) | 44 |
| 3.1.5. Experimento III en el Canal Cauahue | 47 |
| 3.1.5.1. Variación de la abundancia de microorganismos | 47 |
| 3.1.5.2. Variación de la concentración de nutrientes | 49 |
| 3.2. CAPÍTULO 2: Efecto de la presencia de los pesticidas benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre la tasa de asimilación de carbono <i>in situ</i> | 51 |
| Resumen | 51 |
| POTENTIAL RESPONSES OF PHOTO AND CHEMOAUTOTROPHIC CARBON UPTAKE UNDER PESTICIDES CURRENTLY USED IN SALMON FARMING IN CHILE | 52 |
| Abstract | 52 |

| | |
|--|----|
| 1. Introduction | 53 |
| 2. Materials and Methods | 54 |
| 2.1. Study area and oceanographic survey | 54 |
| 2.2. <i>In situ</i> carbon uptake experiments | 57 |
| 2.3. On deck carbon uptake experiments | 59 |
| 2.4. Carbon uptake estimations | 59 |
| 2.5. Statistical analysis | 60 |
| 3. Results | 60 |
| 3.1. Seasonal environmental variability in central Chile | 60 |
| 3.2. <i>In situ</i> carbon uptake in central Chile | 61 |
| 3.3. Pesticide effect experiments of photoautotrophic and chemoautotrophic carbon uptake | 62 |
| 3.4. Seasonal environmental variability in Caucahue channel, Chiloé | 68 |
| 3.5. Primary production in Caucahue channel | 69 |
| 4. Discussion | 69 |
| 5. Conclusion | 74 |
| 6. References | 74 |
| 7. Figure legends | 81 |
| 3.3. CAPÍTULO 3: Ensayos de toxicidad de benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre modelos biológicos | 94 |
| Resumen | 94 |
| EFFECTS OF THREE PESTICIDES USED IN SALMON FARMING ON THE EARLY DEVELOPMENT OF THREE BIOLOGICAL MODELS: <i>MYTILUS CHILENSIS</i> , <i>SPHAERECHINUS GRANULARIS</i> AND <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i> | 95 |
| Abstract | 95 |
| Resumen | 96 |
| 1. Introduction | 96 |
| 2. Materials and methods | 98 |
| 2.1. Effect of three pesticides on the early stages of mussel's development | 98 |
| 2.2. Spawning induction | 98 |

| | |
|--|------------|
| 2.3. Incubations with added pesticides | 99 |
| 2.4. Statistical analysis | 100 |
| 2.5. Effect of three pesticides on early stages of sea urchin larvae | 100 |
| 2.6. Spawning induction | 100 |
| 2.7. Incubations with added pesticides | 100 |
| 3. Results | 101 |
| 3.1. Effect of pesticides on larvae of <i>M. chilensis</i> | 101 |
| 3.2. Effect of pesticides on sea urchin larvae | 102 |
| 4. Discussion | 103 |
| 5. Conclusions | 106 |
| 6. References | 106 |
| 7. Figure legends | 110 |
| 4. DISCUSIÓN | 120 |
| 4.1. Efecto de los pesticidas sobre modelos biológicos | 120 |
| 4.2. Efecto de los pesticidas sobre microcosmos de comunidades microbianas | 121 |
| 4.3. Efecto de los pesticidas sobre la tasa de incorporación de carbono | 124 |
| 5. CONCLUSIONES | 127 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 128 |



Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1. Ubicación de los puntos muestreados en el Canal Caucahue (línea celeste) (Región de Los Lagos), en las cercanías de la localidad de Quemchi (rojo). Los puntos verdes representan los sitios de instalación de líneas <i>in situ</i> durante los experimentos de producción primaria | 9 |
| Figura 2.2. Ubicación de la estación Amparo (verde), en el Canal Puyuhuapi (línea celeste), Región de Aysén, en las cercanías de la localidad de Puerto Cisnes (rojo) | 10 |
| Figura 2.3. Ubicación de los puntos muestreados en el Golfo de Arauco (Región del Biobío), en las cercanías de la localidad de Llico (rojo). Los puntos verdes representan los sitios de instalación de líneas <i>in situ</i> durante los experimentos de producción primaria | 12 |
| Figura 2.4. Esquema de tratamientos utilizados en los experimentos de impacto de los pesticidas azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina sobre comunidades microbianas marinas provenientes del Canal Puyuhuapi | 14 |
| Figura 2.5. Esquema de tratamientos utilizados en los experimentos de impacto de los pesticidas azametifos y deltametrina sobre comunidades microbianas marinas provenientes del Canal Caucahue | 16 |
| Figura 2.6. Preparación y dilución de soluciones experimentales de los pesticidas deltametrina, azametifos y benzoato de emamectina utilizados en ensayos de toxicidad sobre los equinodermos <i>S. granularis</i> y <i>P. lividus</i> | 23 |
| Figura 2.7. Esquema de distribución de tratamientos de las distintas concentraciones de los pesticidas deltametrina, azametifos y benzoato de emamectina utilizados sobre los equinodermos <i>S. granularis</i> y <i>P. lividus</i> en una microplaca de 96 celdas | 23 |
| Figura 2.8. Esquema de distribución de tratamientos de las distintas concentraciones de los pesticidas deltametrina, azametifos y A+D utilizados sobre el mitílido <i>M. chilensis</i> , en una microplaca de 96 celdas | 26 |
| Figura 3.1. Registro de precipitaciones diarias (mm) en la localidad de Puerto Cisnes y variaciones del caudal medio diario (m^3s^{-1}) en el Río Cisnes, región de Aysén, durante el mes de agosto de 2014 (www.dga.cl). Las flechas rojas indican el inicio de los experimentos I y II | 27 |
| Figura 3.2. Perfiles de temperatura ($^{\circ}C$) y salinidad en función de la profundidad (m), registrados en la estación Amparo Grande, en el Canal Puyuhuapi. a) Experimento I (14 de agosto de 2014). b) Experimento II (19 de agosto de 2014) | 29 |
| Figura 3.3. Perfil de abundancia del bacterioplancton (Bact), <i>Synechococcus sp.</i> (Syn) y picoeucariontes (Picoeu), en la estación Amparo Grande, en el Canal Puyuhuapi. a) Experimento I (14 de agosto de 2014). b) Experimento II (19 de agosto de 2014) | 30 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.4. Perfil de concentraciones de nitrito y nitrato (μM) en el Canal Puyuhuapi. a) Experimento I (14 de agosto de 2014). b) Experimento II (19 de agosto de 2014) | 31 |
| Figura 3.5. Variaciones de la abundancia celular (10^3cel mL^{-1}) registrada durante la ejecución del experimento I. a) Bacterioplancton. b) <i>Synechococcus sp.</i> c) Picoeucarionte..... | 33 |
| Figura 3.6. Variación en la concentración de nutrientes (μM) registrada durante la ejecución del experimento I. a) NO_3^- . b) NO_2^- | 37 |
| Figura 3.7. Variaciones de la abundancia celular (10^3cel mL^{-1}) registrada durante la ejecución del experimento II. a) Bacterioplancton. b) <i>Synechococcus sp.</i> c) Picoeucariontes | 39 |
| Figura 3.8. Variación de producción bacteriana (DPM mL^{-1}) durante la ejecución del experimento II, en el Canal Puyuhuapi | 42 |
| Figura 3.9. Variación en la concentración de nutrientes (μM) registrada durante la ejecución del experimento II. a) NO_3^- . b) NO_2^- | 43 |
| Figura 3.10. Perfil de temperatura ($^\circ\text{C}$) y salinidad en la estación Q2 en el Canal Cauahue, el 26 de enero de 2015 | 45 |
| Figura 3.11. Perfil de la abundancia microbiana (10^3cel mL^{-1}) y la concentración de nutrientes (μM) en la estación Q2, en el Canal Cauahue (experimento III) a) Bacterioplancton, <i>Synechococcus sp.</i> y picoeucariontes. b) NO_2^- y NO_3^- | 46 |
| Figura 3.12. Abundancia celular (10^3cel mL^{-1}) registrada durante la ejecución del experimento III. a) Bacterioplancton. b) <i>Synechococcus sp.</i> c) Picoeucariontes | 48 |
| Figura 3.13. Concentración de nutrientes (μM) registrada durante la ejecución del experimento III. b) NO_3^- . a) NO_2^- | 50 |

POTENTIAL RESPONSES OF PHOTO AND CHEMOAUTOTROPHIC CARBON UPTAKE UNDER PESTICIDES CURRENTLY USED IN SALMON FARMING IN CHILE

Figure 1. Study areas and sampling stations in situ primary production experiments. A) Llico Bay (south of Golfo de Arauco in central Chile). Llico point represents the site of on deck experiments. B) Cauahue channel in the inner sea of Chiloé Island, Northern Patagonia. Red circles indicate points of in situ primary production experiments

Figure 2. Hydrographic structure of Llico Bay. Profiles of temperature ($^\circ\text{C}$) and salinity (PSU) at BLL1, BLL2 and BLL3 stations during research campaigns. A, F) spring 2014. B, G) winter 2015. C, H) spring 2015. D, I) summer 2016. E, J) autumn 2016

Figure 3. Profiles of nitrate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), phosphate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), N/P ratio and Chl-a (mg m^{-3}) at Llico Bay stations from spring 2014 to autumn 2015. A, B, C, D) BLL1. E, F, G, H) BLL2. I, J, K, L) BLL385

Figure 4. Profiles of bacterioplankton and *Synechococcus sp.* abundance ($10^3 \text{ cell mL}^{-1}$) at BLL1, BLL2 and BLL3 stations during research campaigns. A, F) spring 2014. B, G) winter 2015. C, H) spring 2015. D, I) summer 2016. E, J) autumn 201686

Figure 5. Carbon uptake rates ($\text{mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) per depth with and without the addition of pesticides at BLL1, BLL2 and BLL3 stations during oceanographic campaigns at Llico Bay. A, F, K) spring 2014. B, G, L) winter 2015. C, H, M) spring 2015. D, I, N) summer 2016. E, J, O) autumn 2016. Error bars represented standard deviation (duplicate)87

Figure 6. On deck experiments under light and dark conditions with the addition of ^{13}C and pesticides. Experiments were performed with samples of station BLL2 at Llico Bay during four field campaigns. Boxplot of PAR radiation (Wm^{-2}), chemoautotrophic and photoautotrophic carbon uptakes ($\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$). A, E, I) winter 2015. B, F, J) spring 2015. C, G, K) summer 2016. D, H, L) autumn 2016. Bars represent mean of duplicate vales. Error bars show standard deviation88

Figure 7. Hydrographic structure of Caucahue Channel. Temperature ($^{\circ}\text{C}$) and salinity (PSU) profiles for winter 2014 (A, B) and summer 2015 (C, D)89

Figure 8. Nitrate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), phosphate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), N/P ratio and Chl-a (mg m^{-3}) profiles for station at Caucahue Channel. Vertical profiles for winter 2014 of A) NO_3^- , B) PO_4^{3+} , C) N/P ratio and D) Chl-a. Vertical profiles for summer 2015 of E) NO_3^- , F) PO_4^{3+} , G) N/P ratio and D) Chl-a90

Figure 9. Spatial distribution and vertical profiles of bacterioplankton abundance ($10^3 \text{ cell mL}^{-1}$) at Caucahue channel. A, B) winter 2014. C, D) summer 201591

Figure 10. Spatial distribution and vertical profiles of *Synechococcus sp.* abundance ($10^3 \text{ cell mL}^{-1}$) at Caucahue channel. A, B) winter 2014. C, D) summer 201592

Figure 11. Carbon uptake rates ($\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) with the addition of pesticides during winter 2014. A) Q2, B) Q5, C) Q6, D) Q9 and E) Qc. Error bars represent standard deviation (duplicate)93

Figure 12. Carbon uptake rates ($\text{mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) with the addition of pesticides during summer 2015. A) Q2, B) Q3, C) Q5, D) Q9 and E) Qc. Error bars represent standard deviation (duplicate)93

EFFECTS OF THREE PESTICIDES USED IN SALMON FARMING ON THE EARLY DEVELOPMENT OF THREE BIOLOGICAL MODELS: *MYTILUS CHILENSIS*, *SPHAERECHINUS GRANULARIS* AND *PARACENTROTUS LIVIDUS*

Figure 1. Distribution of pesticides concentration treatments (1 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) and controls in each 96-wells microplate for (a) *M. chilensis* bioassay and (b) sea urchin bioassay. FSW: Filtered Sea Water (0.2 μm)112

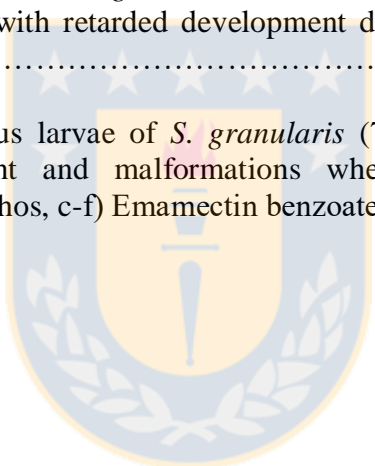
Figure 2. Larval development of *M. chilensis* during the experiment. Left side, larvae in normal state in seawater control. Right side, larvae in delayed state in acetone control and pesticides treatments. T0 (a - b), T5 (c - d) and T22 (e - f). Scale: 40X113

Figure 3. Percentage of embryos of *M. chilensis* with normal, retarded, busted and undivided development, exposed to AZA a) T0 b) T5 and c) T22, DELTA d) T0 e) T5 and f) T22 and the combination AZA/DELTA g) T0, h) T5 and i) T22114

Figure 4. Stages of pluteus larvae of *P. lividus* after 48h of incubation with pesticides. a) Normal larvae b)- c) larvae with retarded development d)- i) larvae with malformations. Scale: 10X 115

Figure 5. Type of pluteus larvae of *S. granularis* after 96h of incubation with pesticides. a) Normal larvae b) - c) larvae with retarded development d) - f) larvae with malformations. Scale: 10X116

Figure 6. Percentage of pluteus larvae of *S. granularis* (72 h) and *P. lividus* (48 h) with normal, retarded development and malformations when exposed to pesticides. a-d) Deltamethrine, b-e) Azamethiphos, c-f) Emamectin benzoate117



Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 2.1. Concentración final de pesticidas en el microcosmos de 15 L de agua de mar, durante los experimentos I y II | 15 |
| Tabla 2.2. Dosis de soluciones de pesticidas utilizadas para inocular 15 L de agua de mar, en cada uno de los tratamientos, durante el experimento III | 16 |
| Tabla 2.3. Ubicación geográfica de las estaciones oceanográficas y profundidades muestreadas durante las campañas Llico y Caucahue. Los valores destacados en negro corresponden a las profundidades en las cuales se realizaron incubaciones <i>in situ</i> . * Estación con PP <i>in situ</i> solo en la campaña Caucahue 2 (verano). ** Estación con PP <i>in situ</i> solo en la campaña Caucahue 1 (invierno) | 18 |
| Tabla 2.4. Estaciones de muestreo en el Canal Caucahue y la Bahía de Llico | 19 |
| Tabla 2.5. Tratamientos utilizados en incubaciones de laboratorio en la localidad de Llico, en experimentos de producción primaria foto y quimioautotrófica, todos los tratamientos fueron aplicados en duplicado. *No tuvo tratamientos combinados | 20 |
| Tabla 2.6. Volumen de solución de pesticidas aplicada según tratamiento | 24 |
| Tabla 3.1. Precipitaciones diarias en la localidad de Puerto Cisnes y caudal medio diario del Río Cisnes, registrado entre el 13 y 19 de agosto de 2014 (www.dga.cl) | 28 |
| Tabla 3.2. Promedios y desviaciones estándar de la abundancia celular de bacterioplancton, <i>Synechococcus sp.</i> y picoeucariontes registrada en la estación Amparo Grande, el 14 de agosto de 2014 | 30 |
| Tabla 3.3. Promedios y desviaciones estándar de la abundancia celular del bacterioplancton, <i>Synechococcus sp.</i> y picoeucariontes registrada en la estación Amparo Grande, el 19 de agosto de 2014 | 31 |
| Tabla 3.4. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de bacterioplancton registrados entre tratamientos durante el experimento I. Valores en negrita indica diferencias significativas | 34 |
| Tabla 3.5. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de <i>Synechococcus sp.</i> registrados entre tratamientos, durante el experimento I. Valores en negrita indica diferencias significativas | 35 |
| Tabla 3.6. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de picoeucariontes registrados entre tratamientos durante el experimento I. Valores en negrita indica diferencias significativas | 36 |

Tabla 3.7. Valores calculados y valores p obtenidos al aplicar un análisis de distribución de probabilidad, t de Student (t) o U de Mann-Whitney (T), entre las concentraciones de nitrato de los distintos tratamientos y el control, durante el experimento I. Valores en negrita indican diferencias significativas38

Tabla 3.8. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia bacteriana registrados entre tratamientos durante el experimento II. Valores en negrita indican diferencias significativas40

Tabla 3.9. Análisis de varianza realizado en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de *Synechococcus sp.* registrados entre tratamientos, durante el experimento II. Valores en negrita indican diferencias significativas41

Tabla 3.10. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia picoeucariontes registrados entre tratamientos, durante el experimento II. Valores con negrita indican diferencias significativas41

Tabla 3.11. Análisis de varianza realizado sobre los valores de producción bacteriana registrados durante el experimento II. Valores en negrita indican diferencias significativas42

Tabla 3.12. Promedios y desviaciones estándar de la abundancia del bacterioplancton, *Synechococcus sp.* y picoeucariontes, en la estación Q2 durante el experimento III46

Tabla 3.13. Promedios y desviaciones estándar de la concentración de nitrito y nitrato registrados a distintas profundidades en la estación Q2, el 26 de enero de 201547

POTENTIAL RESPONSES OF PHOTO AND CHEMOAUTOTROPHIC CARBON UPTAKE UNDER PESTICIDES CURRENTLY USED IN SALMON FARMING IN CHILE

Table 1. Geographical location of the sampled stations in Llico Bay and Caucahue Channel. * *In situ* Primary production experiment only in Caucahue summer 2015. ** *In situ* Primary production experiment only in Caucahue winter 201456

Table 2. Summary of *in situ* incubations of primary production during the Llico and Caucahue cruise78

Table 3. Results from 2-way ANOVA examining the effect of pesticides and the time of incubation on the rates of carbon uptake under dark and light conditions in Llico Bay. Significant values are presented in bold64

Table 4. Results from pairwise t-test for the on deck carbon fixation experiments performed in Llico Bay65

Table 5. Comparison of Integrated Primary Production estimations in this study with other published values for the same places73

EFFECTS OF THREE PESTICIDES USED IN SALMON FARMING ON THE EARLY DEVELOPMENT OF THREE BIOLOGICAL MODELS: *MYTILUS CHILENSIS*, *SPHAERECHINUS GRANULARIS* AND *PARACENTROTUS LIVIDUS*

Table 1. Pesticide concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) per well in each treatment and control used in mussels bioassay. FSW: Filtered seawater, AZA: Azamethiphos, DELTA: Deltamethrin, EM: embryos in FSW118

Table 2. Pesticide concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) per well in each treatment and control used in sea-urchin bioassay. FSW: Filtered seawater, AZA: Azamethiphos, DELTA: Deltamethrin, EM: embryos in FSW118

Table 3. One-way analysis of variance (ANOVA) between treatments for each pesticide concentration used. df: Degrees of freedom, Pr: Significance probability value119



Curriculum Vitae

Claudia Margarita Rojas Pérez

Nacida el 9 de octubre, 1986, en Osorno, Chile

2012: Licenciado en Biología Marina, Universidad de Los Lagos, Chile.

2012: Biólogo Marino, Universidad de Los Lagos

2017: Magíster en Ciencias (c) con mención en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

PUBLICACIONES

- Neira-Osses K., **C. Rojas**, A. M. Genevière, C. Fernandez. 2017. Effects of three pesticides used in salmon farming on the early development of three biological models: *Mytilus chilensis*, *Sphaerechinus granularis* and *Paracentrotus lividus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*. (en revisión)
- Fernández, C., A. Rain, **C. Rojas**, V. Molina. 2017. Ammonium release via dissolution and photodegradation of food pellets used in salmon farming. *Aquaculture*. (en revisión)
- Rain-Franco, A., **C. Rojas**, C. Fernandez. 2017. Potential responses of photo and chemoautotrophic carbon uptake under pesticides currently used in salmon farming in Chile. *Aquaculture*. (en preparación)
- Pérez, M., **C. Rojas**, Ciclo reproductivo de la ascidia *Pyura chilensis* (Urochordata: Ascidiacea) procedente de líneas de cultivo de mitílidos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. (en revisión)

EXPERIENCIA LABORAL

2012: Asistente técnico en el Proyecto “Estudio biológico y bioquímico para el aprovechamiento integral del piure (*Piura chilensis* 1782)” DI08/11, Universidad de Los Lagos.

2012: Profesora de Biología en el Liceo Eleuterio Ramírez, Osorno.

2012: Profesora de Ciencias Naturales y Biología en el Colegio Andalué, Osorno.

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía Biológica

Secundaria: Oceanografía Química

Otras: Ecología marina, desarrollo larval.

EXPERIENCIA DOCENTE

- Ayudante en el laboratorio de Cultivos Marinos de la Universidad de Los Lagos, 2006.
- Ayudante de Química general, Universidad de los Lagos, 2007.
- Ayudante de Introducción a la Biología Marina, Universidad de los Lagos, 2007-2011.
- Ayudante de Fisiología Comparada, Universidad de los Lagos, 2008-2011.
- Ayudante de Reproducción y desarrollo larval, Universidad de los Lagos, 2008-2011.
- Instructora de Zoología General II, Universidad de Concepción, 2013.

CAMPAÑAS DE INVESTIGACIÓN

- Proyecto FONDEF D05 I 10323, “Desarrollo del cultivo de *Robsonella fontaniana* (pulpito) orientado a la elaboración de productos gourmet”, 2008.
- Proyecto FONDEF D05 I 10272, “Cultivo de la almeja *Venus antiqua* tipo baby clam, en la zona intermareal del mar interior de la X región”, 2011.
- Campaña FONDAP-INCAR “Caucahue” 2014. Línea de investigación 4, julio 2014.
- Campaña FONDAP-INCAR “Llico 1”. Línea de investigación 4, diciembre 2014.
- Campaña FONDAP-INCAR “Llico 2”. Línea de investigación 4, julio 2015.
- Campaña FONDAP-INCAR “Llico 3”. Línea de investigación 4, octubre 2015.
- Campaña FONDAP-INCAR “Llico 4”. Línea de investigación 4, enero 2016.
- Campaña FONDAP-INCAR “Llico 5”. Línea de investigación 4, abril 2016.
- Campaña COPAS Sur-Austral “Patagonian Spring Bloom Experiment”, agosto 2014.

ESTADIAS DE INVESTIGACION

- Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, Dr. Fabien Joux, Francia. 2015.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a todas las personas que hicieron posible este estudio, especialmente a “Don” Ángel Rain por su incansable ayuda, energía, palabras de aliento y gratas conversaciones durante el desarrollo de esta tesis.

A mi profesora guía la Dra. Camila Fernández, por su constante apoyo e invaluable ayuda durante este proceso.

A mi madre Margarita por su infinito apoyo y paciencia durante toda mi vida (¡solo una más mami!).

A mi hermana Adriana, mi tía Rosi y mi abuela Javiera por su compañía y apoyo incondicional y durante estos años.

A mi hermano Miguel, mis amigas y hermanas del alma Eloisa Moreno, Bárbara Labbé Y Vanessa Monje por estar siempre presente apoyando a su manera en el desarrollo de esta tesis.

A mis amigas y compañeras en estos años Diana Garcés, Sonia Yáñez, Cristina Stuardo, Valentina Valdés, Valentina Manríquez, Jeanett Vera y Ana María Jara.

Y a mis compañeros y amigos Oliver Alarcón, Alejandro Ávila, Jaime Gutiérrez, David Aguirre, Luis Montecinos, Luis Figueroa y Jonathan Cedeño.

Y la señorita Claudia Muñoz por la entrega de sus conocimientos al inicio de este proceso.

Al Laboratorio Internacional Asociado LIA-MORFUN (CNRS LIA 1035) y su gente por facilitar los materiales, medios y espacios para la realización de este estudio.

Al proyecto FONDECYT N° 1150891, Centro Fondap INCAR (15110027), COPAS Sur-Austral CONICYT PIA PFB31 y LIA-MORFUN (CNRS LIA 1035) por financiar esta tesis.

Y a la Université Pierre et Marie Curie (Francia), por la beca de pasantía otorgada.

Resumen

“Estudio de compuestos antiparasitarios de uso actual en salmonicultura: Efectos de Deltametrina, Azametifos y Benzoato de emamectina sobre comunidades microbianas marinas”,

Claudia Margarita Rojas Pérez

Magíster en Ciencias Mención en Oceanografía

Universidad de Concepción, 2017

En Chile, la industria del salmón se ha convertido en una de las principales actividades productivas de la región sur-austral. Sin embargo, la presencia del copépodo parásito *Caligus rogercresseyi* en gran parte de los cultivos ha generado importantes pérdidas económicas debido a la disminución de calidad del producto final, aumentando el uso de antiparasitarios agrícolas como estrategia para el control del ectoparásito. El efecto de estos productos químicos sobre la estructura y abundancia de comunidades no objetivo es, sin embargo, poco conocido.

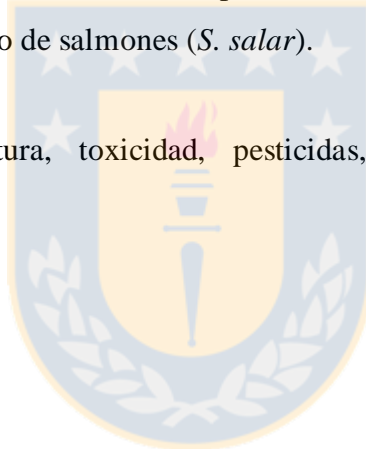
Este estudio plantea como objetivo evaluar el efecto de tres antiparasitarios utilizados en salmonicultura para el control de *C. rogercresseyi* (Benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos). Se estudiaron los efectos de estos compuestos sobre la abundancia de microorganismos marinos de comunidades naturales y cultivados, así como sobre los flujos biogeoquímicos en zonas de actividad acuícola. Para ello se realizaron tres tipos de experimentos: 1) Incubación de microcosmos en los Canales Puyuhuapi y Caucahue. 2) Incubaciones *in situ* y en laboratorio en el Canal Caucahue y la Bahía Llico para evaluar el efecto sobre la incorporación de carbono foto y quimioautótrofo. 3) Ensayos de toxicidad sobre modelos de metazoos (estados larvarios de mitílidos y equinodermos).

Se observó que en Puyuhuapi la abundancia del bacterioplancton y *Synechococcus sp.* sufrió variaciones al aplicar los distintos pesticidas. De manera opuesta, en Caucahue, no se observaron cambios en la abundancia de organismos picofitoplanctónicos tras la adición de pesticidas. Durante las incubaciones en la Bahía Llico, se observó una disminución de la tasa de asimilación de carbono de organismos foto y quimioautotróficos al aplicar benzoato de emamectina. En las incubaciones *in situ* se observaron efectos diferentes en la bahía de Llico

(benzoato de emamectina y deltametrina) y en el canal Caucahue (azametifos). En todos los casos, los tratamientos combinados no presentaron un impacto importante sobre la producción primaria. Además, se observó que la aplicación de pesticidas sobre larvas de *M. chilensis* fue inocua, mientras que se observó una elevada toxicidad en larvas de equinodermos (*P. lividus* y *S. granularis*).

Este primer estudio nos permite concluir que la aplicación de pesticidas en sistemas costeros puede producir diversas respuestas sobre la estructura de la comunidad picofitoplanctónica. Sin embargo, no es posible especificar de manera general si estas son positivas o negativas, ya que dependen de la composición de la comunidad microbiana. Los diferentes efectos observados al aplicar pesticidas sobre las comunidades no objetivo ponen en evidencia la necesidad de estudios futuros para conocer los factores ambientales que determinan los efectos directos de los distintos pesticidas sobre las comunidades microbianas naturales en las zonas de cultivo de salmónes (*S. salar*).

Palabras clave: salmonicultura, toxicidad, pesticidas, producción primaria, modelos biológicos.



Abstract

“Antiparasitic compounds study of currently used in salmon farming: Effect of deltamethrin, azamethiphos and emamectin benzoate on marine microbial communities”

Claudia Margarita Rojas Pérez

Master of Sciences in Oceanography

Universidad de Concepción, 2017

In Chile, the salmon farming industry has become one of the main productive activities in the southern region. However, the presence of copepod *Caligus rogercresseyi* has generated significant economic losses, due to the decrease in quality of the final product, and causing an increase in the use of agricultural pesticides as a control strategy for ectoparasites. The effect of these chemicals on the structure and abundance of non-target communities is, however, still poorly understood.

This study aims to evaluate the effect of three pesticides used for the control of *C. rogercresseyi* (emamectin benzoate, deltamethrin and azamethiphos) on natural microbial communities.

The effects of these compounds on the abundance of natural marine microorganisms and cultivated communities were studied, as well as the impact on biogeochemical fluxes in areas with aquaculture activity. Three experiments types were performed: 1) Microcosms incubations in the Puyuhuapi and Cauahue Channels. 2) In situ and laboratory incubations in Cauahue Channel and Llico Bay to evaluate the effect on photo and chemoautotrophic carbon uptake 3) Toxicity tests on metazoan models (larval stages).

In Puyuhuapi, bacterioplankton and *Synechococcus sp.* abundances showed variations after two different pesticides application. On the contrary, in Cauahue, no changes were observed in phytoplanktonic organism abundance. During the Llico Bay incubations, a decrease in photo and chemoautotrophic carbon uptake was observed when emamectin benzoate was applied. Different effects were observed in Llico Bay (emamectin benzoate and deltamethrin) and Cauahue Channel (azamethiphos) during *in situ* incubations. In all cases, the combined treatments did not have a significant impact on primary production. In addition,

the application of pesticides on *M. chilensis* larvae was innocuous, while high toxicity was observed on echinoderms larvae (*P. lividus* and *S. granularis*).

This first study allows us to conclude that pesticide application in coastal systems can produce diverse responses on picophytoplanktonic community structure. However, is not possible to specify in a general way if these are positive or negative since microbial community composition is a key component of the potential outcome.

Different effects were observed when applying pesticides on non-target communities, evidencing the need for further studies dedicated to identify the environmental factors that determine the potential effects of different pesticides on the natural microbial communities in areas affected by salmon farming.

Key words: salmon farming, toxicity, pesticides, primary production, biological models.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales de la acuicultura y su desarrollo en Chile

A nivel mundial, el desarrollo de la acuicultura ha crecido de forma sostenida, constituyéndose como una importante fuente de producción de alimentos y como una alternativa para reducir la presión sobre los recursos pesqueros (Duarte et al., 2007; FAO, 2016).

Así, el potencial de la acuicultura a nivel mundial y sus posibilidades de expansión, continúa generando cuestionamientos de tipo ambiental (Buschmann and Fortt, 2005), los cuales se encuentran principalmente relacionados con la composición del alimento y su tasa de conversión, los métodos de crianza, el uso excesivo de compuestos químicos, así como las características y tamaño de la zona de cultivo (Asir and Pulatsü, 2008). Todos estos factores tienen un impacto en la columna de agua y el sedimento, directamente bajo y alrededor del sitio de cultivo (Buschmann et al., 1997), y sus efectos pueden ser físicos (variaciones en la turbidez y penetración de luz), químicos (disminución de los niveles de oxígeno y aumento de compuestos nitrogenados) o biológicos, como cambios en las estructuras de comunidades naturales (Cao et al., 2007).

En el caso de Chile, la acuicultura se ha transformado en un componente importante de la economía nacional (Medina and Ramos-Jiliberto, 2009), siendo uno de los sectores de mayor dinamismo (O’Ryan and Pereira, 2015). En la región sur-austral del país, la industria del salmón es una de las principales actividades económicas (Bravo et al., 2013), e incluso durante el periodo de la crisis del 2007-2008, esta presentó una expansión de sus concesiones (Estay and Chávez, 2015) y una producción constante respecto a años anteriores (www.sernapesca.cl).

En la actualidad, los productos químicos son esenciales para garantizar la producción de peces, aumentando la eficiencia alimentaria, mejorando las tasas de supervivencia, y controlando el desarrollo de patógenos y parásitos (Fernandes et al., 2000; Hernando et al., 2007; Carballeira et al., 2012).

En general, los organismos patógenos son parte del ecosistema natural y no causan brotes patológicos a menos que se produzcan cambios ambientales de importancia (House et al., 2006). Por ello, su aparición suele ocurrir más frecuentemente en organismos en cautiverio debido principalmente a que el manejo inadecuado de los centros de cultivo

(densidades elevadas, exceso de alimento o dieta inadecuada) puede producir estrés en los organismos (Martínez, 2013), generando una mayor susceptibilidad a epidemias parasitarias (Burridge et al., 2010).

1.2. Presencia de *Caligus rogercresseyi* en cultivos de salmónidos en Chile

El crustáceo *C. rogercresseyi*, perteneciente a la subclase Copépoda, familia Caligidae, (Boxshall y Bravo, 2000), es el organismo parásito más importante que actualmente afecta los cultivos del salmón en Chile (Bravo et al., 2013), encontrándose presente en un 99% de los centros de cultivo en jaula especialmente en la zona sur (Osorio, 2006; Villarroel, 2010). Según lo descrito por González and Carvajal (2003), el ciclo de vida de *C. rogercresseyi* consta de ocho etapas de desarrollo: tres estadios de vida planctónicos (dos nauplius y un copepodito) y cinco estadios parasitarios (chalimus I, II, III y IV, y adulto). Este parásito de desarrollo directo posee un estadio infestante, llamado copepodito, el cual tiene la capacidad de adherirse al hospedador, para posteriormente mudar al estadio chalimus I desarrollando un filamento frontal el cual le permite mantenerse adherido al organismo hospedero hasta su etapa adulta (Farías 2005; Villarroel, 2010).

La presencia de este ectoparásito ha afectado considerablemente a la industria del cultivo de salmónidos (Grant, 2002), siendo responsable de grandes pérdidas económicas (Buschmann et al, 2006) como consecuencia de la disminución de calidad del producto, mayores tiempos de desarrollo de los peces infestados, aumento de la susceptibilidad a otros patógenos y el incremento general de los costos asociados a la aplicación de tratamientos (Bravo, 2003; Bravo et al., 2015).

1.3. Uso de antiparasitarios en salmonicultura

Los tratamientos aplicados por la industria acuícola en Chile, se basan principalmente en la aplicación de antiparasitarios como estrategia para el control de *C. rogercresseyi* (Barrientos, 2009). A la fecha se ha registrado una larga lista de tratamientos contra este parásito, siendo uno de los primeros el benzoato de emamectina, cuyo uso fue autorizado a partir del año 2000 (Bravo et al., 2015). Este derivado semi-sintético de avermectina, producido por *Streptomyces avermitilis* (Stone et al., 2000; Bravo et al., 2008;

Cárcamo et al., 2011), es un antiparasitario administrado oralmente, como aditivo en el alimento de los salmones (Sevatdal et al., 2005). Es uno de los compuestos más utilizados, debido a su eficacia eliminando todos los estados parasíticos del piojo de mar (Stone et al., 2000). El benzoato de emamectina comercial, conocido como Slice®, es administrado durante siete días consecutivos, en una dosis recomendada de 50 $\mu\text{g kg de pez}^{-1} \text{ día}^{-1}$, brindando una protección superior a 3 meses en zonas abiertas, disminuyendo en un 90% la población de cáligus (Bravo et al., 2012).

Pero el año 2007 se presentó evidencia del desarrollo de resistencia de *C. rogercresseyi* al benzoato de emamectina (Velásquez, 2010), por lo cual se autorizó el uso de un nuevo antiparasitario, el piretroide sintético deltametrina (Bhanu et al., 2011; Leboulanger et al., 2009; Pavan et al., 1999). Este compuesto, conocido comercialmente como Alphamax®, es una formulación líquida aplicada como tratamiento de baño (Burrige et al., 2010), en una dosis recomendada de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 30 a 60 minutos (Siwicki et al., 2010), la cual actúa sobre los estados móviles y juveniles de Cáligus (Soderlund and Bloomquist, 1989) interfiriendo la transmisión del impulso nervioso, produciendo parálisis y posteriormente la muerte del parásito (Burka et al., 2012).

Posteriormente, el año 2013, se aprobó el uso del organofosforado Azametifos (Burrige et al., 2010; Bravo et al., 2015). Este compuesto, cuya versión comercial es conocida con el nombre de Byelice®, es administra a través de baños en una dosis de 0,2 mg L^{-1} durante 30-60 minutos (Davies et al., 2001; Canty et al., 2007; Burrige et al., 2010) y actúa mediante la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (Kazemi et al., 2012).

La mayoría de los productos utilizados para el control de Cáligus corresponden a pesticidas que fueron desarrollados inicialmente para el control de parásitos en la industria agrícola y ganadera, por lo cual podrían ocasionar efectos adversos sobre el ambiente acuático (Nash, 2003; Burrige et al., 2010), como resultado de la generación y liberación de residuos (Softeland et al., 2014). Por lo tanto, se conoce poco del potencial efecto que ejercen estas sustancias sobre especies no objetivo y, en general, sobre la estructura y funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Silva et al., 2003; Buschmann et al., 2006; Burrige et al., 2010).

1.4. Ensayos de toxicidad en organismos marinos

Si bien se han registrado varios estudios sobre efectos generales de algunos de estos productos sobre organismos de la macrofauna, el fitoplancton y algunas especies de importancia económica (Ait et al., 2011, Wang et al., 2011, Shen et al., 2012, Samuelson et al., 2015), estos datos a menudo corresponden únicamente a resultados obtenidos mediante ensayos de laboratorio sobre una única especie (Burrige et al., 2010). Entre los organismos más utilizados como modelos biológicos en bioensayos se encuentran las larvas y embriones, debido a que las primeras etapas de desarrollo tienden a ser más sensibles a los contaminantes que los adultos, además de ser un método rápido y económico para evaluar el desarrollo normal en etapas tempranas (Stebbing et al., 1980). Los mitílidos/mejillones y los erizos de mar han sido los modelos biológicos más exitosos para evaluar la calidad del agua y los efectos de la contaminación en ambientes marinos (Liu and Lee 1975, Dermeche et al., 2012).

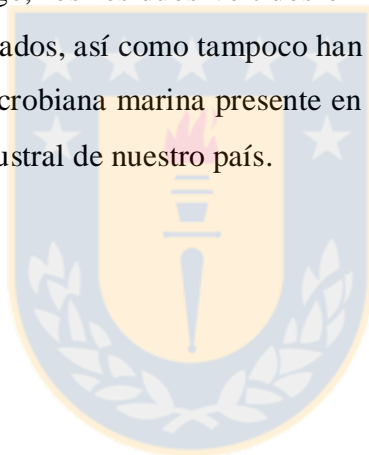
Sin embargo, Medina et al (2004) sugiere que la realización de ensayos utilizando micro y mesocosmos permitiría una mejor observación de los efectos generados por la aplicación de compuestos químicos en el ambiente sobre las comunidades expuestas. Asimismo, Burrige et al (2010) expone que los cultivos de salmón no son independientes dentro del sistema y que muchos de los tratamientos empleados coinciden, pudiendo registrarse tratamientos múltiples dentro de una misma área, generando efectos significativamente diferentes a los resultantes de la exposición a un solo tratamiento, esto tanto para los salmones como para los organismos no objetivo.

Uno de los métodos más utilizados para evaluar los efectos tóxicos de sustancias de origen antropogénico son los bioensayos. Estos ensayos consideran la utilización de organismos vivos de diversos niveles tróficos para cuantificar el impacto de los distintos contaminantes (Alaya and Iannacone, 2002). Respecto a los ensayos de toxicidad en organismos acuáticos estos han sido ampliamente discutidos y reconocidos por la comunidad científica como un mecanismo de monitoreo y control de la contaminación en ambientes acuático (Tucca, 2014).

En lo que respecta al fitoplancton, este representa el primer eslabón de la trama trófica marina (Abarzua et al., 1995), y junto a las bacterias que habitan en condiciones de oscuridad (Boschker et al., 2014) son los organismos encargados de la incorporación del

carbono en la materia orgánica, elemento esencial para el mantenimiento de los ecosistemas (Field et al., 1998). La productividad primaria en el ambiente marino se encuentra regulada por múltiples factores, los cuales limitan su crecimiento a sistemas oceánicos y costeros, entre los cuales se encuentran la concentración de nutrientes y la intensidad de la luz (Iriarte et al., 2007). Sin embargo, el aumento de las actividades agrícolas y acuícolas, así como el derretimiento de glaciares en la Patagonia chilena (Pantoja et al., 2011), podría generar nuevos aportes de nutrientes a los sistemas acuáticos, provocando cambios en las concentraciones de nutrientes, alterando la estructura del fitoplancton (Beman et al., 2005; Iriarte et al., 2010; Olsen et al., 2014; Labbé-Ibañez et al., 2015).

Como se ha expuesto arriba, en la actualidad el uso de pesticidas agrícolas en salmonicultura, como antiparasitarios para el control de *Caligus rogercresseyi* se hace cada vez más frecuente. Sin embargo, los residuos vertidos en el ambiente marino durante los tratamientos no han sido estudiados, así como tampoco han sido profundizados sus posibles efectos sobre la comunidad microbiana marina presente en las zonas de cultivos intensivos de salmónidos en la zona sur-austral de nuestro país.

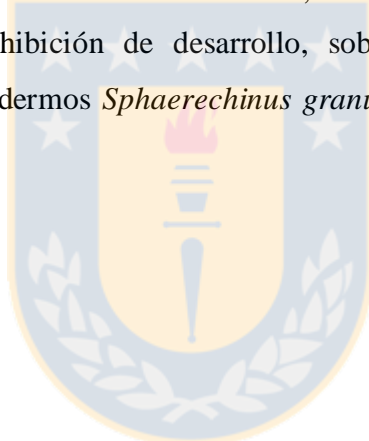


1.5. Hipótesis

Hipótesis 1: Los compuestos benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos causan cambios en la abundancia celular de los microorganismos marinos presentes en los canales Caucahue y Puyuhuapi, produciendo una disminución en inversa proporción a la concentración de pesticida en el agua de mar.

Hipótesis 2: Los compuestos deltametrina y azametifos producen un efecto sobre la producción primaria en el Golfo de Arauco (región del Biobío) y el Canal Caucahue (región de Los Lagos), disminuyendo la tasa de asimilación de carbono (^{13}C).

Hipótesis 3: Los compuestos benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos producen retraso, malformaciones o inhibición de desarrollo, sobre la división temprana y el desarrollo larval de los equinodermos *Sphaerechinus granularis* y *Paracentrotus lividus* y el mitílido *Mytilus chilensis*.



1.6. Objetivo general

Evaluar el efecto de los compuestos antiparasitarios benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre la abundancia y actividad de microorganismos marinos naturales y cultivados y flujos biogeoquímicos en zonas de alta actividad acuícola.

1.7. Objetivos específicos

- 1) Evaluar, de forma experimental, el efecto de benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre microorganismos marinos utilizando comunidades naturales presentes en los canales Caucahue y Puyuhuapi.
- 2) Determinar variaciones en las tasas de consumo de carbono (^{13}C) de comunidades microbianas marinas en presencia de los pesticidas deltametrina y azametifos en el Golfo de Arauco y el Canal Caucahue.
- 3) Determinar variaciones en la producción primaria fotoautotrófica y quimioautotrófica en presencia de los pesticidas benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos en la bahía de Llico.
- 4) Determinar el efecto de benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre la división temprana y el desarrollo larval de los equinodermos *Sphaerechinus granularis* y *Paracentrotus lividus* y el mitílido *Mytilus chilensis*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis se desarrolló en tres localidades ubicadas en la zona centro-sur y Patagonia Norte de Chile e incluyó tres componentes, la primera correspondiente a evaluar el efecto de dos pesticidas (azametifos y deltametrina) sobre la captación de carbono por productores primarios mediante la incubación de muestras de agua del Canal Caucahue (Región de Los Lagos) y del Golfo de Arauco (Región del Biobío). La segunda componente correspondió a ensayos para evaluar el impacto de los pesticidas azametifos (A), deltametrina (D) y benzoato de emamectina (B) sobre comunidades microbianas del Canal Puyuhuapi, en la localidad de Puerto Cisnes (Región de Aysén) y del Canal Caucahue (Región de Los Lagos). Mientras que la tercera componente se realizó en laboratorio, y consistió en la aplicación de pruebas de toxicidad de azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina sobre modelos de metazoos (estados larvarios).

2.1. Zonas de estudio

2.1.1. Canal Caucahue, Chiloé, Región de Los Lagos

En el marco de la campaña de investigación Caucahue, organizadas por el Centro Fondap INCAR (Interdisciplinary Center for Aquaculture Research), se realizaron dos cruceros oceanográficos, en junio 2014 y enero 2015 en el Canal Caucahue (42°8'42"S; 73°25'7"W, Figura 2.1). El Canal Caucahue se encuentra ubicado en la Provincia de Chiloé, Región de Los Lagos, entre la costa Oeste de la Isla Caucahue y la ribera Este de la Isla Grande de Chiloé, se conecta con el Golfo Ancud por una salida norte, de 4,1 km de ancho, y por una salida sur, de 2,5 km de ancho. El canal tiene una superficie de ~52 km² y su profundidad llega hasta los 120 m. A lo largo del canal se presenta una angostura de 0,9 km de ancho en donde se encuentra el poblado de Quemchi. Además, producto de su ubicación, existen centros de cultivos instalados en la zona, tanto de moluscos filtradores (4 centros) como de salmónidos (2 centros).

Durante los dos cruceros de investigación se caracterizaron las variables químicas y biológicas en ocho estaciones de muestreo, realizándose además un monitoreo de las variables hidrográficas de la columna de agua utilizando un sensor CTDO (SAIV A/S, Norway).

Además, se realizaron incubaciones *in situ* en estaciones dentro y fuera del canal con el fin de evaluar el efecto de los pesticidas azametifos y deltametrina sobre las tasas de asimilación carbono de las comunidades microbianas. De igual manera, se desarrollaron incubaciones utilizando microcosmos provenientes de la estación Q2, la que se encuentra en una zona influenciada por la actividad acuícola y en la cercanía de centros de cultivos de salmónidos, con el fin de evaluar el efecto de los pesticidas azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina sobre la abundancia de la comunidad picoplactónica.

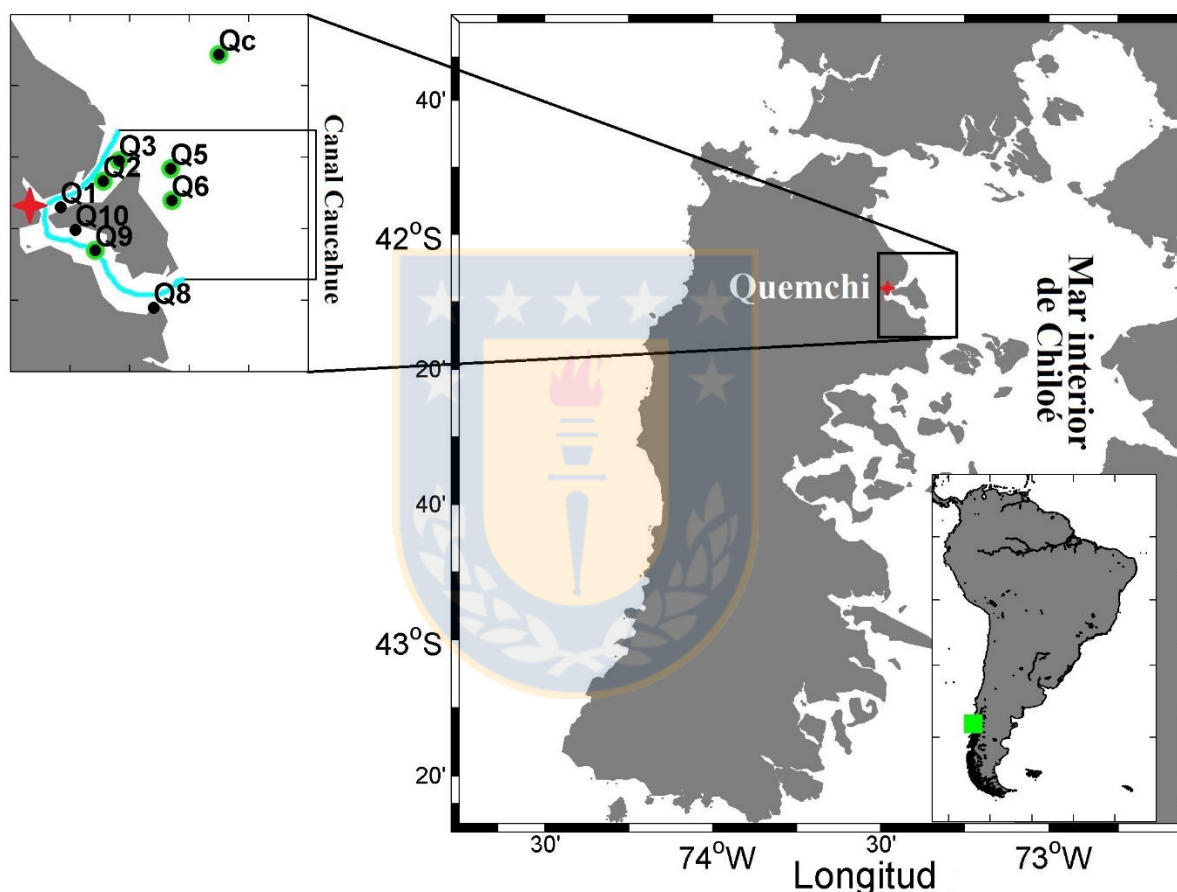


Figura 2.1. Ubicación de los puntos muestrados en el Canal Caucahue (línea celeste) (Región de Los Lagos), en las cercanías de la localidad de Quemchi (rojo). Los puntos verdes representan los sitios de instalación de líneas *in situ* durante los experimentos de producción primaria. Fuente: Elaboración propia.

2.1.2. Canal Puyuhuapi, Región de Aysén

Durante la campaña de investigación Patagonian Spring Bloom (PSB), organizada por el Centro de Investigación y Estudios Patagónicos (CIEP) y el Programa Copas Sur-

Austral, en agosto de 2014, se realizaron experimentos de evaluación del efecto de los pesticidas azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina sobre la abundancia de un microcosmos de comunidades microbianas tomadas de una muestra de agua extraída de la estación Amparo, ubicada en las cercanías de un centro de cultivo de salmónidos en el Canal Puyuhuapi ($44^{\circ}19'S$; $72^{\circ}34'W$; Figura 2.2). El canal Puyuhuapi está situado en la parte Norte de la Patagonia Chilena, en la comuna de Puerto Cisnes. Las condiciones hidrográficas en el Canal Puyuhuapi son controladas por flujos atmósfera-océano, la escorrentía principalmente del Río Cisnes, cuyo caudal medio alcanza los $190\text{ m}^3\text{s}^{-1}$, y a través de otros pequeños ríos y arroyos. Además, en los últimos 15 años se han establecido alrededor de 45 criaderos de salmón en la zona (www.dga.cl). De esta manera, este sistema de canales se caracteriza por recibir aportes de elementos inorgánicos (nitrato, amonio, fosfato, etc.), así como partículas y materia orgánica disuelta, proveniente principalmente de cultivos de salmónidos (Gaez, 2009).

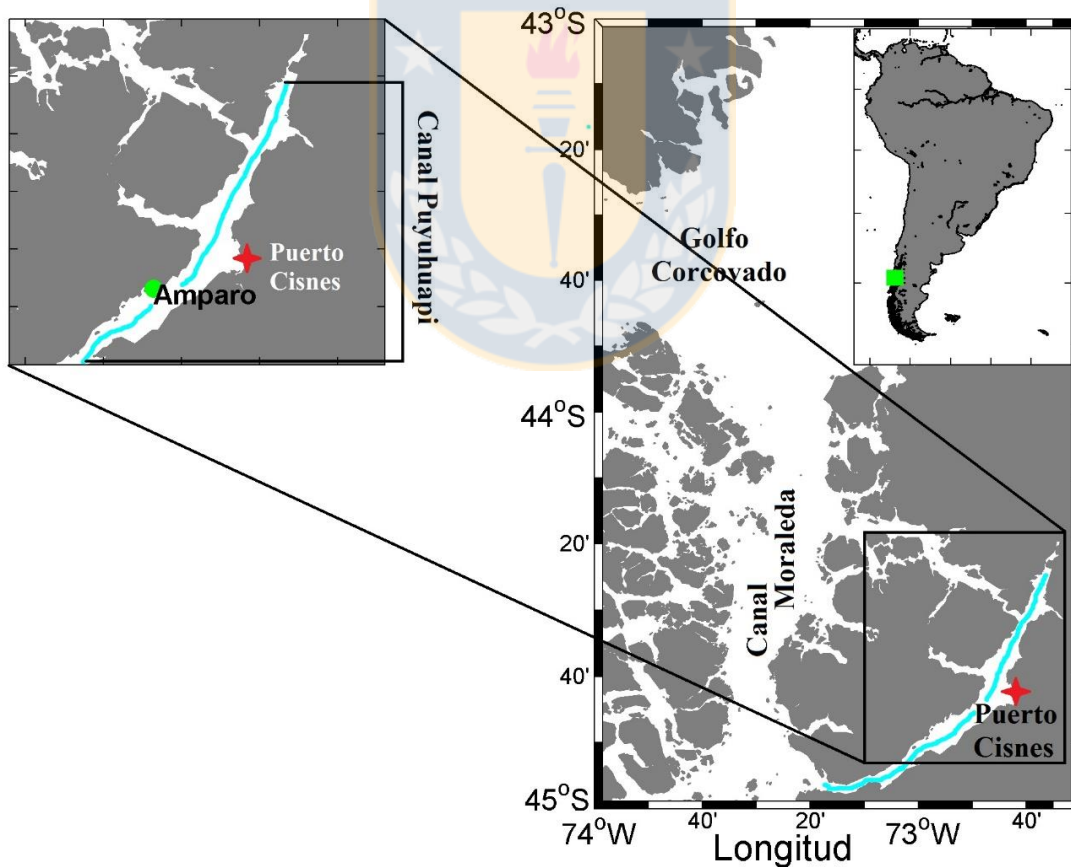


Figura 2.2. Ubicación de la estación Amparo (verde), en el Canal Puyuhuapi (línea celeste), Región de Aysén, en las cercanías de la localidad de Puerto Cisnes (rojo). Fuente: Elaboración propia.

2.1.3. Golfo de Arauco, Región del Biobío

En el marco de la campaña de investigación denominada “Llico”, se realizaron cinco cruceros oceanográficos, organizados por el Centro Fondap INCAR, entre diciembre de 2014 y abril de 2016, en el Golfo de Arauco (37,1°S; 73,5°W; Figura 2.3). El Golfo de Arauco está situado en la zona costera frente a la Región del Bio-Bío. Constituye un cuerpo de agua en un área semicerrada que tiene como límites Punta Lavapié al Sur y la Península de Hualpén al Norte. En su extremo occidental se encuentra ubicada la Isla Santa María y a su vez recibe las aguas del Río Bío-Bío. Además, este golfo es considerado uno de los centros pesqueros pelágicos más importantes en Chile, ubicándose además en su interior dos centros de cultivo de mitílidos y uno de ostras (Parada et al., 2001). En general, el área costera frente a Concepción es considerada una zona altamente productiva debido a que se encuentra bajo la influencia de vientos anticiclónicos asociados al centro de alta presión del Pacífico suroriental, con vientos predominantes del N en invierno y del S-SW en primavera-verano, los que inducen frecuentes e intensos eventos de surgencia costera, particularmente en torno a Punta Lavapié (Sobarzo, 1993; Linacre y Palma, 2004).

Durante cinco cruceros de investigación se realizó un monitoreo de la bahía de Llico, además, se monitoreó las variables hidrográficas de la columna de agua en la bahía utilizando un sensor CTD Minus X (AML Oceanographic, Canadá), también se realizó una caracterización de las variables químicas y biológicas en cada crucero oceanográfico.

Incubaciones *in situ* fueron realizadas en las estaciones al interior de la bahía de Llico con el fin de evaluar el efecto de los pesticidas azametifos y deltametrina sobre la tasa de fijación de carbono de las comunidades microbianas marinas en esta zona. Además, incubaciones experimentales, con muestras de agua proveniente de la estación BLL2 (2m), fueron realizadas en el Liceo Técnico Acuícola Filidor Gaete, ubicado en la localidad de Llico, frente a la estación denominada BLL1, con el fin de conocer las diferencias entre las tasas de fijación de carbono de organismos fotoautotróficos y quimioautotróficos en presencia de los pesticidas azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina.

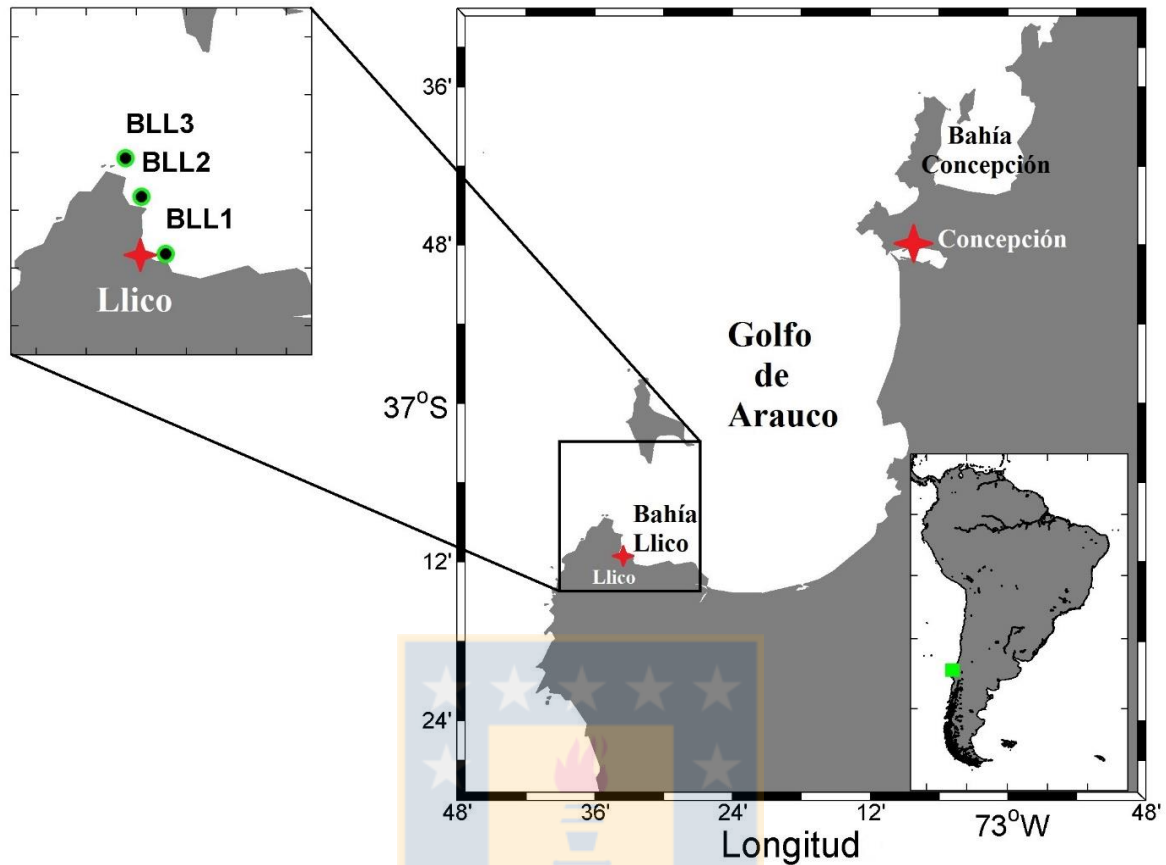


Figura 2.3. Ubicación de los puntos muestreados en el Golfo de Arauco (Región del Biobío), en las cercanías de la localidad de Llico (rojo). Los puntos verdes representan los sitios de instalación de líneas *in situ* durante los experimentos de producción primaria. Fuente: Elaboración propia.

2.2. Capítulo 1: Impacto de tres pesticidas utilizados en salmonicultura sobre comunidades microbianas marinas naturales

Durante agosto de 2014, se realizaron ensayos experimentales con tres pesticidas utilizados en acuicultura, benzoato de emamectina (B), deltametrina (D) y azametifos (A), con el fin de evaluar posibles efectos de estos sobre comunidades microbianas marinas. Para ello, se tomaron muestras de agua de mar para la realización de 2 experimentos, los días 14 y 19 de agosto de 2014, desde las cercanías del centro de engorda de salmones Amparo ubicado en el Canal Puyuhuapi (Figura 2.2). La extracción de muestras de agua se realizó a bordo de la embarcación Scarlett, propiedad de la empresa Sur Patagonia E.I.R.L y su traslado a tierra se efectuó a bordo de la embarcación Calafate, propiedad del Centro

de Investigación en Ecosistemas de la Patagonia (CIEP). Durante la maniobra se realizaron mediciones de temperatura y salinidad *in situ*, utilizando un CTD SeaBird 19.

De igual manera, durante el mes de enero de 2015, se realizó un nuevo ensayo experimental para evaluar posibles efectos de los pesticidas azametifos y deltametrina sobre comunidades microbianas marinas en el Canal Caucahue, en la Provincia de Chiloé, región de Los Lagos.

2.2.1. Experimento I y II en el Canal Puyuhuapi

Para cada experimento se recolectaron 120 L de agua de mar de una profundidad de 2 m mediante la utilización de botellas Niskin de 10 L. El agua fue depositada en 6 bidones Nalgene de 20 L y trasladada al laboratorio. Posteriormente, las muestras biológicas fueron filtradas secuencialmente en el laboratorio por 10 μm (Millipore TCTP), 3 μm (Millipore SSWP) y 1,6 μm (Millipore APFA), con el fin de obtener un microcosmos de comunidades microbianas picoplanctónicas.

Antes de iniciar la inoculación de los microcosmos, se procedió a preparar las soluciones de pesticidas. Para ello se disolvió una cantidad de estándar de cada uno de los pesticidas, deltametrina (12120000 Deltamethrin, Dr. Ehrenstorfer, 99,5 %), azametifos (10340000 Azamethiphos, Dr. Ehrenstorfer, 98,5 %) y benzoato de emamectina (13117000 Emamectin benzoate, Dr. Ehrenstorfer, 91 %) en un volumen conocido de acetonitrilo (100030 Acetonitrilo, Merck Millipore, 99,9 %).

Se depositaron 15 L de agua de mar previamente filtrada en bidones Nalgene (20 L) y se les aplicaron 6 dosis distintas de soluciones de pesticidas previamente preparadas y combinaciones de estos (Figura 2.4).

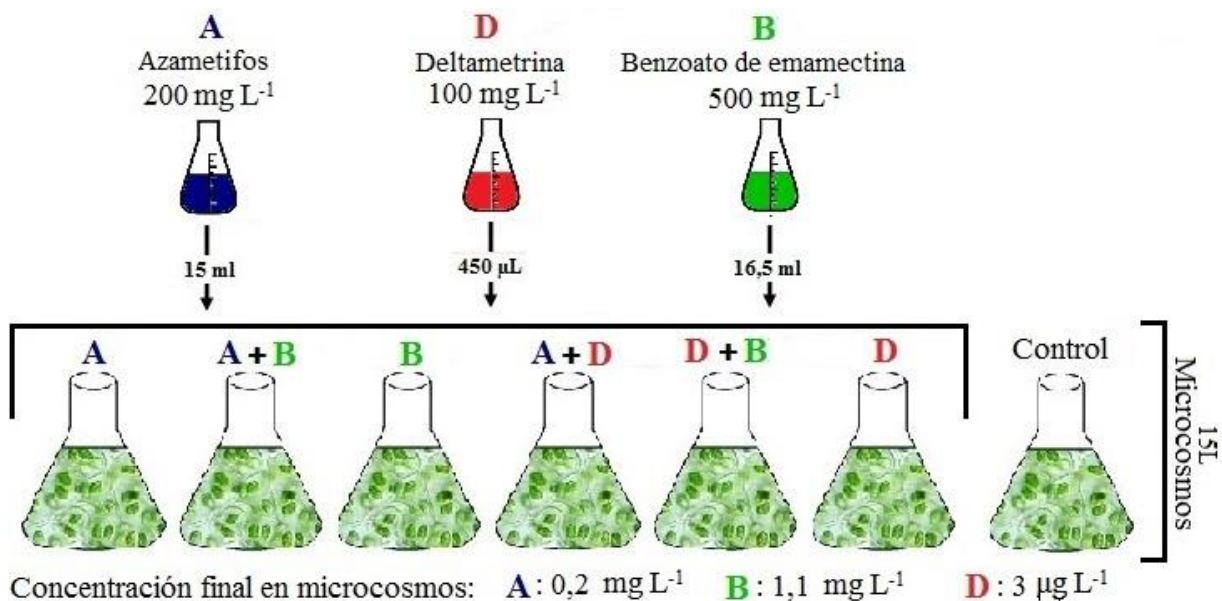


Figura 2.4. Esquema de tratamientos utilizados en los experimentos de impacto de los pesticidas azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina sobre comunidades microbianas marinas provenientes del Canal Puyuhuapi. Fuente: Elaboración propia.

Para deltametrina y azametifos la dosis final utilizada correspondió a la concentración en la cual estos compuestos son administrados en tratamientos de desparasitación en cultivos de salmónidos, siendo de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de agua de mar para deltametrina y de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de agua de mar para azametifos (Tabla 2.1). En el caso de benzoato de emamectina se estimó una dosis dividiendo el contenido del estándar en dos partes iguales, con el fin de obtener la concentración experimental más alta posible. Se consideró además un bidón control sin pesticidas, y sin acetónitrilo, ya que en experiencias previas no se observaron efectos de este solvente, en concentraciones inferiores al 1%, sobre microorganismos.

Los tratamientos fueron incubados durante 120 horas y mantenidos en oscuridad a una temperatura aproximada de $12 \text{ }^\circ\text{C}$, la cual fue registrada en cada tiempo de muestreo.

Tabla 2.1. Concentración final de pesticidas en el microcosmos de 15 L de agua de mar, durante los experimentos I y II. Fuente: Elaboración propia.

| Tratamiento | Concentración de pesticida (en volumen incubado) |
|-------------|--|
| Control | Sin pesticidas |
| D | 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| B | 1,1 mg L^{-1} |
| A | 0,2 mg L^{-1} |
| D+B | 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ D + 1,1 mg L^{-1} BE |
| D+A | 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ D+ 0,2 mg L^{-1} A |
| A+B | 0,2 mg L^{-1} A + 1,1 mg L^{-1} BE |

La abundancia de bacterias, *Synechococcus sp* y picoeucariontes en cada tratamiento se estimó mediante la toma de muestras para análisis de citometría de flujo. Para ello se extrajeron muestras de 1350 μL , en duplicado en los tiempos T0 y T6 y posteriormente cada 12 horas durante las 120 horas de incubación. Las muestras fueron depositadas en criotubos de 2 mL y fijadas con 150 μL de glutaraldehído (354400 Glutardehído, Merck Millipore) al 1 % y se almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente fueron analizadas por medio de citometría de flujo (Marie et al., 2000) en el Laboratorio de Procesos Oceanográficos y Clima (PROFC), en la Universidad de Concepción. Adicionalmente se tomaron muestras para análisis de nutrientes (NO_3^- y NO_2^-) cada 24 horas con el fin de observar variaciones en sus concentraciones durante los experimentos. Para ello se filtraron 12 mL de agua de cada tratamiento por un filtro de 0,7 μm , las muestras fueron preservadas con 50 μL de una solución HgCl_2 22 mM (104419 Mercurio (II) cloruro, Merck Millipore), posteriormente fueron leídas mediante un análisis colorimétrico utilizando un autoanalizador Brann Luebbe (Aminot and K erouel, 2007) en el Laboratorio de Biogeoquímica del Departamento de Oceanografía, en la Universidad de Concepción.

Paralelamente, durante el segundo experimento, se midió producción bacteriana para cada tratamiento utilizando el método descrito por Smith and Azam (1992), mediante la extracción de muestras de agua al iniciar los tratamientos (T0), a las 6 horas, 12 horas, 24 horas y posteriormente al final del experimento.

2.2.2. Experimento III en el Canal Caucahue

Las muestras de agua para la realización del experimento III fueron tomadas el día 26 de enero de 2015, en la estación Q2, ubicada en el Canal Caucahue (Figura 2.1). La extracción de muestras se realizó a bordo de embarcación “Don José” L/M.

Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento para preparación de soluciones y toma de muestras utilizado durante la ejecución de los experimentos I y II, considerando además las mismas dosis, sin embargo, solo fueron utilizados los pesticidas A y D, reduciendo a tres la cantidad de tratamientos, además de un control negativo (Figura 2.5; Tabla 2.2).

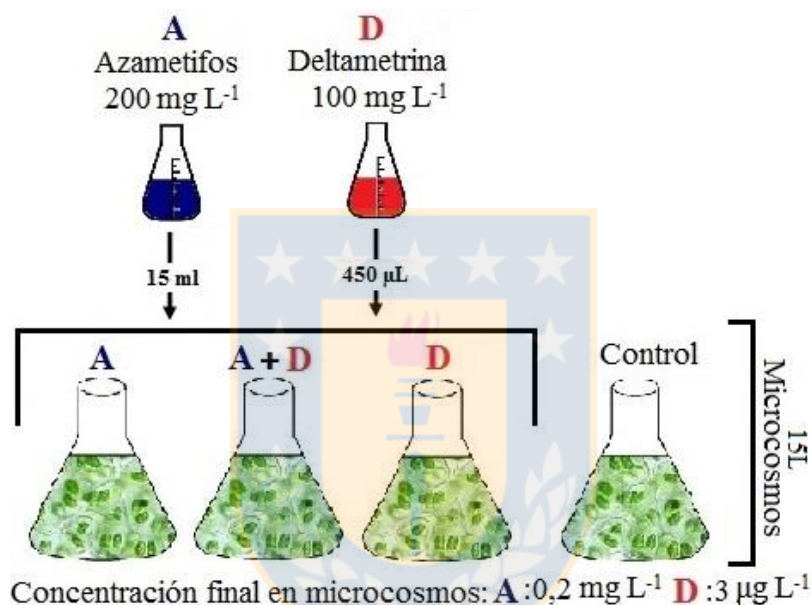


Figura 2.5. Esquema de tratamientos utilizados en los experimentos de impacto de los pesticidas azametifos y deltametrina sobre comunidades microbianas marinas provenientes del Canal Caucahue. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2.2. Dosis de soluciones de pesticidas utilizadas para inocular 15 L de agua de mar, en cada uno de los tratamientos, durante el experimento III. Fuente: Elaboración propia.

| Tratamiento | Concentración de pesticida (en volumen incubado) |
|-------------|---|
| Control | Sin pesticidas |
| D | 3 µg L ⁻¹ |
| A | 0,2 mg L ⁻¹ |
| D+A | 3 µg L ⁻¹ D + 0,2 mg L ⁻¹ A |

2.2.3. Análisis estadísticos y gráficas

Se utilizó el software R para crear mapas de las zonas de estudio y gráficas de perfiles de temperatura y salinidad utilizando el registro CTD en los puntos de muestreo para los distintos experimentos, en el canal Puyuhuapi y Caucahue.

Para analizar los datos de abundancia de microorganismos, bacterias, *Synechococcus sp* y picoeucariontes, de los experimentos I, II y III de impacto de pesticidas sobre comunidades microbianas marinas, se utilizó el programa estadístico SigmaPlot 11.0 para realizar un análisis de varianza, ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, según corresponda, dependiendo del cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad del conjunto de datos, con el fin de observar diferencias entre los distintos tratamientos, en cada tiempo de muestreo. Además, se realizó el test *a posteriori* Tukey entre aquellos resultados que presentaron diferencias significativas.

También se utilizó el programa SigmaPlot 11.0, sobre los datos de concentración de nitrito y nitrato obtenidos durante los experimentos, para realizar análisis de distribución de probabilidad, t-Student o U de Mann-Whitney según corresponda, con el fin de observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores registrados en cada tratamiento, en cada tiempo. Se realizó el test *a posteriori* Tukey.

2.3. Capítulo 2: Efecto de la presencia de los pesticidas benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre la tasa de asimilación de carbono

Se realizaron experimentos *in situ* sobre la producción primaria (PP) de la bahía de Llico y el canal Caucahue, con el fin de evaluar el efecto de los pesticidas azametifos y deltametrina sobre las tasas de asimilación carbono de las comunidades microbianas. Para ello, durante dos cruceros de investigación en la localidad de Caucahue, se dispusieron incubaciones de PP *in situ* en estaciones dentro y fuera del canal, además de una estación control, en tres profundidades distintas. Mientras que, durante cinco cruceros de investigación al interior de la bahía de Llico, fueron instalas líneas de PP *in situ* en dos profundidades diferentes. En ambos casos las profundidades de incubaciones fueron determinadas dependiendo la batimetría de la estación. Además, se realizaron incubaciones experimentales con el fin de conocer las diferencias entre las tasas de fijación de carbono de organismos fotoautotrofos y quimioautotrofos en presencia de los pesticidas

azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina, con muestras de agua superficial proveniente de la estación BLL2 (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Ubicación geográfica de las estaciones oceanográficas y profundidades muestreadas durante las campañas Llico y Caucahue. Los valores destacados en negro corresponden a las profundidades en las cuales se realizaron incubaciones *in situ*. * Estación con PP *in situ* solo en la campaña Caucahue 2 (verano). ** Estación con PP *in situ* solo en la campaña Caucahue 1 (invierno). Fuente: Elaboración propia.

| Localidad | Estación | Latitud (°S) | Longitud (°W) | Profundidades |
|-----------|----------|--------------|---------------|----------------------------------|
| Llico | BLL1 | 37,192 | 73,547 | 2, 4, 6 |
| Llico | BLL2 | 37,159 | 73,563 | 2, 10, 15 |
| Llico | BLL3 | 37,137 | 73,574 | 2, 10, 20 |
| Caucahue | Q1 | 42,135 | 73,458 | 2, 10, 20 |
| Caucahue | Q2 | 42,117 | 73,422 | 2, 10, 20, 30, 40 |
| Caucahue | Q3* | 42,102 | 73,409 | 2, 10, 20, 30, 50 |
| Caucahue | Q5 | 42,108 | 73,366 | 2, 10, 20, 30, 50, 60 |
| Caucahue | Q6** | 42,130 | 73,365 | 2, 10, 20, 30 |
| Caucahue | Q8 | 42,205 | 73,380 | 2, 10, 20, 30 |
| Caucahue | Q9 | 42,165 | 73,429 | 2, 10, 20, 30, 50 |
| Caucahue | Q10 | 42,151 | 73,446 | 2, 10, 30 |
| Caucahue | Qc | 42,048 | 73,325 | 2, 10, 20, 30, 50, 65, 80 |

2.3.1. Tasa de asimilación de carbono *in situ*

Se realizaron ensayos del efecto de los pesticidas deltametrina y azametifos sobre la tasa de asimilación de carbono de productores primarios en dos zonas. Para para ello, se instalaron líneas de incubación *in situ* (Tabla 2.4) en cinco estaciones ubicadas en el Canal Caucahue (Figura 2.1), durante julio de 2014 y enero de 2015, en tres profundidades distintas. Mientras, al interior de la bahía de Llico (Figura 2.3), se realizaron incubaciones durante 5 campañas, entre diciembre de 2014 y abril de 2016, en dos profundidades. Posteriormente se procedió a tomar muestras de agua de las profundidades establecidas utilizando una botella Niskin de 10L.

El agua obtenida fue depositada en botellas de policarbonato de 600mL (Nalgene), previamente esterilizadas, a las cuales se le adicionó 0,5 mL de una solución isotópica de bicarbonato de sodio ¹³C (IC 4628 Icon Isotopes) y distintas dosis de tratamientos con pesticidas (Tabla 5). Las concentraciones de los tratamientos con pesticidas en el volumen total inoculado correspondieron a las cuales estos compuestos son administrados en

tratamientos para control del ectoparásito *C. rogercresseyi*, siendo de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para deltametrina y de 0,2 mg L^{-1} para azametifos.

Tabla 2.4. Estaciones de muestreo en el Canal Caucahue y la bahía de Llico. Fuente: Elaboración propia.

| Crucero | Fecha | Estación | Estaciones PP <i>in situ</i> | Tratamientos aplicados |
|------------|---------|----------------|------------------------------|---|
| Caucahue 1 | 06/2014 | Invierno | Qc, Q2, Q5, Q6, Q9 | ^{13}C control, $^{13}\text{C}+\text{A}$ |
| Llico 1 | 12/2014 | Primavera 2014 | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C control, $^{13}\text{C}+\text{A}$ $^{13}\text{C}+\text{D}$, $^{13}\text{C}+\text{AD}$ |
| Caucahue 2 | 01/2015 | Verano | Qc, Q2, Q3, Q5, Q9 | ^{13}C control, $^{13}\text{C}+\text{A}$ |
| Llico 2 | 07/2015 | Invierno | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C control, $^{13}\text{C}+\text{A}$ $^{13}\text{C}+\text{D}$, $^{13}\text{C}+\text{AD}$ |
| Llico 3 | 10/2015 | Primavera 2015 | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C control |
| Llico 4 | 01/2016 | Verano | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C control |
| Llico 5 | 04/2016 | Otoño | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C control, $^{13}\text{C}+\text{A}$ $^{13}\text{C}+\text{D}$, $^{13}\text{C}+\text{AD}$ |

Una vez administrados los tratamientos, las botellas fueron incubadas en las profundidades correspondientes a las muestras de agua que contenían, durante aproximadamente 7 horas (durante un ciclo solar).

2.3.2. Tasa de asimilación de carbono de organismos foto y quimioautótrofos

Durante el invierno de 2015, la primavera de 2015, el verano de 2016 y el otoño de 2016, se realizaron experimentos en laboratorio utilizando muestras de agua superficial (2m) tomadas en la estación BLL2, en la bahía de Llico, con el fin de establecer los posibles efectos de tres pesticidas sobre la asimilación de carbono de organismos foto y quimioautótrofos.

El agua de mar fue distribuida en botellas Duran Schott transparentes de 500 mL, llenadas hasta completar 580 mL, las que posteriormente fueron inoculadas con 1 mL de solución de pesticida a las concentraciones y combinaciones descritas en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Tratamientos utilizados en incubaciones de laboratorio en la localidad de Llico, en experimentos de producción primaria foto y quimioautotrófica. Todos los tratamientos fueron aplicados en duplicado. *No tuvo tratamientos combinados. Fuente: Elaboración propia.

| Crucero | Experimento | Tratamientos |
|---------|-------------|---|
| Llico 2 | Exp.1* | $^{13}\text{C} + \text{D}$, $^{13}\text{C} + \text{A}$, $^{13}\text{C} + \text{B}$, ^{13}C control |
| Llico 3 | Exp. 2 | $^{13}\text{C} + \text{D}$, $^{13}\text{C} + \text{A}$, $^{13}\text{C} + \text{B}$, $^{13}\text{C} + \text{AD}$, $^{13}\text{C} + \text{ADB}$, ^{13}C control |
| Llico 4 | Exp. 3 | $^{13}\text{C} + \text{D}$, $^{13}\text{C} + \text{A}$, $^{13}\text{C} + \text{B}$, $^{13}\text{C} + \text{AD}$, $^{13}\text{C} + \text{ADB}$, ^{13}C control |
| Llico 5 | Exp. 4 | $^{13}\text{C} + \text{D}$, $^{13}\text{C} + \text{A}$, $^{13}\text{C} + \text{B}$, $^{13}\text{C} + \text{AD}$, $^{13}\text{C} + \text{ADB}$, ^{13}C control |

Para simular condiciones de luz natural de los organismos fotoautotróficos, las botellas Duran Schott fueron depositadas al interior de un incubador cubierto con un filtro de densidad neutra 0,3 (47 % de la transmitancia promedio entre 400-700 nm; LeeFilters 209S) y un filtro azul acero (LeeFilters 117R). Las botellas inoculadas y expuestas a condiciones de oscuridad fueron puestas en un incubador cerrado. Ambas condiciones se mantuvieron con un flujo continuo de agua con el fin de mantener una temperatura constante durante el desarrollo del experimento. Además, se realizaron mediciones de la radiación solar incidente (PAR, 400-700 nm) utilizando un radiómetro portátil (RM-21 Dr. Gröbel, Alemania), los valores obtenidos fueron expresados en Wm^{-2} .

2.3.3. Análisis de muestras y datos obtenidos

Posteriormente, en ambos experimentos, *in situ* y en laboratorio, el agua de cada botella fue filtrada a través de un filtro de 0,7 μm (Whatman GF/F, 25 mm) previamente calcinado, el filtro fue guardado en papel aluminio calcinado (450 °C; 4h) y conservado a -20 °C para su posterior análisis por espectrometría de masas en el Laboratorio de Biogeoquímica e Isótopos Estables Aplicados (LABASI) del Departamento de Ecología, de la Pontificia Universidad Católica de Chile, utilizando un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS) Thermo Delta V Advantage acoplado a un Analizador Elemental modelo Flash 2000 (THERMO SCIENTIFIC™).

La concentración de la solución del trazador de carbono fue 3,6456 mg ^{13}C mL^{-1} (0,5 μmol mL^{-1}) de la cual se añadió un volumen de 0,5 mL en cada muestra, (botella Duran Schott con 580 mL de agua de mar). Las tasas de asimilación de carbono (mg C m^{-3}

t^{-1}) fueron calculadas según lo descrito por Fernández et al., (2001) siguiendo la ecuación (1):

$$\rho DI^{13}C = \left[\frac{(\%R_{POC} - 1.112) * \left(\frac{POC * 1000}{12 * V_f} \right)}{\%R_{DIC}} \right] * \frac{12}{1000} \quad \text{Eq. (1)}$$

Donde V_f corresponde al volumen filtrado, POC representa la cuantificación de partículas de carbono obtenida por espectrometría de masa (μg) y $\%R_{POC}$ es el enriquecimiento de ^{13}C de los filtros GF/F después de la incubación. Mientras que $\%R_{DIC}$ corresponde al exceso de enriquecimiento de ^{13}C después de la inoculación (T_0) estimado a partir de la ecuación (2):

$$\%R_{DIC} = \frac{\left(\frac{^{13}\text{C} * ^{13}\text{DIC}}{V_B} \right) + DIC_i * 0.0112}{DIC_i - \frac{^{13}\text{C} * ^{13}\text{DIC}}{V_b}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Donde ^{13}C es el volumen de la solución isotópica, ^{13}DIC representa la concentración de ^{13}C añadida. El valor 0,01112 corresponde a la abundancia natural (promedio) de ^{13}C , mientras que DIC_i representa la concentración de DIC en la muestra antes de la adición del trazador (Fernández et al., 2005), este valor correspondió a 26 mg C L^{-1} para la bahía de Llico, mientras que para el canal Caucahue se utilizó un valor promedio de estudios anteriores en el Mar interior de Chiloé correspondiente a $25,1 \text{ mg C L}^{-1}$ (Alarcón et al., 2015; Jantzen et al., 2013). En el caso de las incubaciones *in situ* las tasas obtenidas fueron multiplicadas por 12 con el fin de obtener una tasa diaria de fijación de carbono ($\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) mientras que, en los experimentos de laboratorio, las tasas fueron expresadas en $\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

En los experimentos *in situ* de PP con pesticidas en Llico y Caucahue se realizaron análisis estadísticos mediante la aplicación de una prueba t-Student pareada con el fin de comparar los resultados obtenidos en los tratamientos con pesticidas y su respectivo control. En los experimentos *in situ* en Caucahue el análisis estadístico se realizó utilizando muestras en triplicado, mientras que en los ensayos realizados en Llico se utilizaron muestras en duplicado.

2.3.4. Análisis estadísticos

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los valores de fijación de carbono de los distintos tratamientos en cada tiempo, durante cada uno de los experimentos de laboratorio, se realizó una ANOVA de 2 vías mediante la función ‘ANOVA.2way.R’ (Legendre, 2007). La homogeneidad de varianza fue testada mediante el test de Bartlett, mientras que los datos que no pasaron la prueba fueron sometidos a una transformación logarítmica. En aquellos casos donde se observó diferencias significativas se aplicó el test de comparaciones múltiple de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software R (<https://www.r-project.org/>).

2.4. Capítulo 3: Ensayos de toxicidad de benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre modelos biológicos

2.4.1. Ensayos de toxicidad de sobre división temprana y desarrollo larval de los equinodermos *Sphaerechinus granularis* y *Paracentrotus lividus*

Durante febrero de 2015, se realizaron tres pruebas de toxicidad de los pesticidas azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina sobre los equinodermos *Sphaerechinus granularis* y *Paracentrotus lividus*, con el fin de evaluar el efecto sobre su división temprana y desarrollo larval. Los experimentos se realizaron en el Observatorio Oceanológico de Banyuls sur mer (Francia).

Para ello, el día previo al inicio de las incubaciones se procedió a preparar las soluciones experimentales de los 3 pesticidas (deltametrina, azametifos y benzoato de emamectina), a una concentración de 10^4 mg L⁻¹ en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, 99,9 %). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas, con DMSO al 1 %, de cada solución inicial, hasta obtener concentraciones experimentales, en incubación, de 1000, 100, 10 y 1 µg L⁻¹ (Figura 2.6).

Las incubaciones se realizaron en 3 microplacas de 96 celdas (Perkin-Elmer), dividiendo cada una en 4 cuadrantes (Figura 2.7), correspondiente a los 3 tratamientos y sus 4 diluciones, cada una con 5 réplicas, además de un cuadrante control, sin pesticidas, con 12 réplicas.

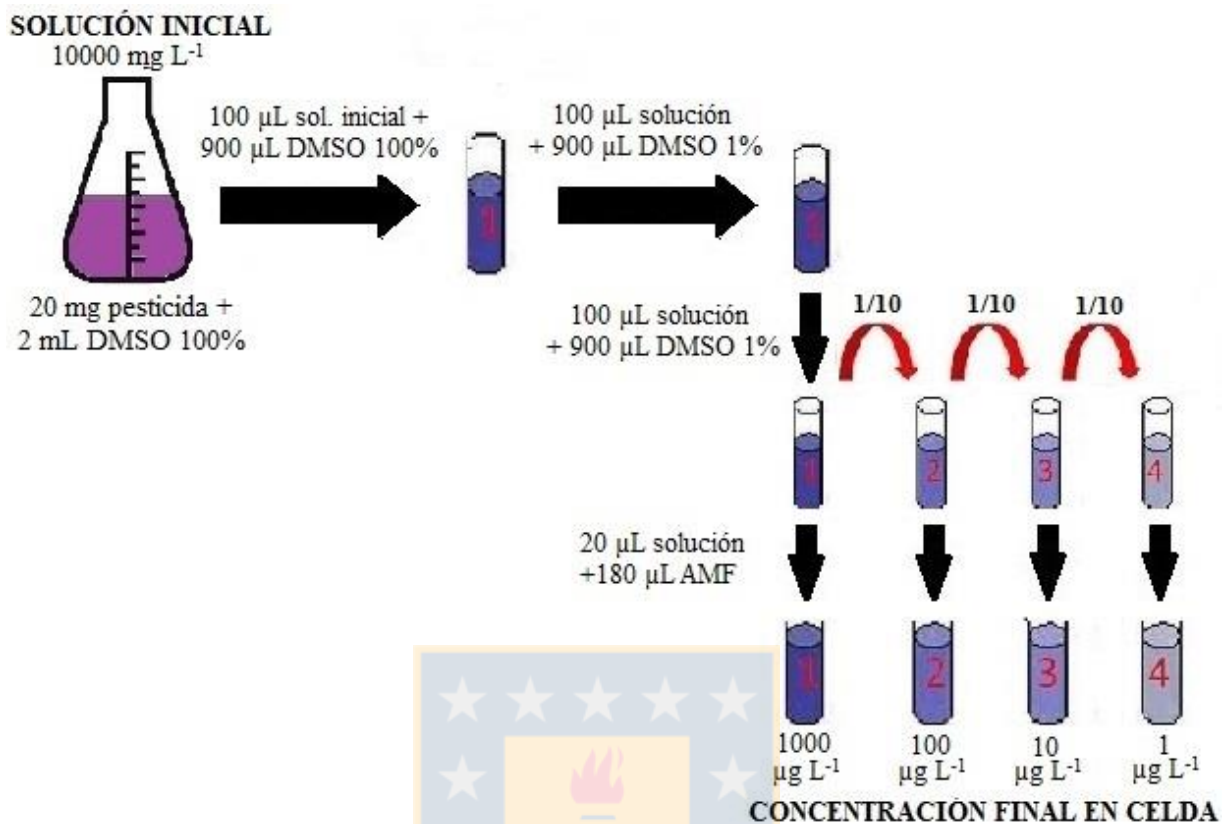


Figura 2.6. Preparación y dilución de soluciones experimentales de los pesticidas deltametrina, azametifos y benzoato de emamectina utilizados en ensayos de toxicidad sobre los equinodermos *S. granularis* y *P. lividus*. Fuente: Elaboración propia.

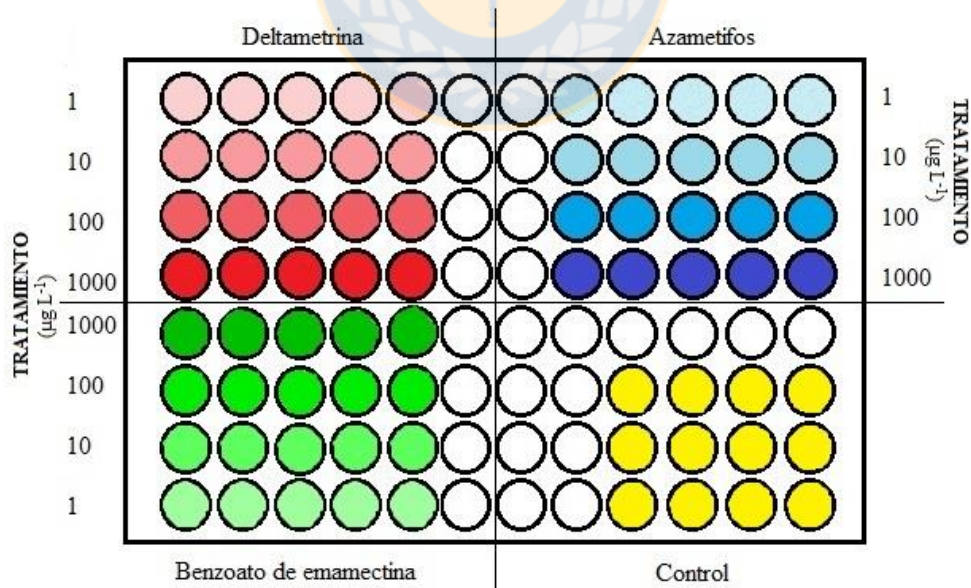


Figura 2.7. Esquema de distribución de tratamientos de las distintas concentraciones de los pesticidas deltametrina, azametifos y benzoato de emamectina utilizados sobre los equinodermos *S. granularis* y *P. lividus* en una microplaca de 96 celdas. Fuente: Elaboración propia.

En cada celda se agregó un volumen específico de agua de mar filtrada (FSW), por un filtro de 0,22 μm de porosidad, según el tratamiento a aplicar (pesticida o control) y posteriormente se inoculó con un volumen específico de la solución experimental correspondiente (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Volumen de solución de pesticidas aplicada según tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

| TRATAMIENTO | Volumen FSW | Volumen solución de pesticidas |
|-------------|-------------------|--------------------------------|
| Pesticidas | 160 μL | 20 μL |
| Control | 180 μL | Sin pesticidas |

Una vez preparadas las placas se realizó el proceso de inducción de desove de *S. granularis* y *P. lividus*, para ello, se tomaron 2 especímenes de cada especie, los cuales fueron agitados vigorosamente y depositados en un vaso plástico de 200 mL, con agua de mar, con el fin de conseguir la expulsión de gametos (ovocitos y espermios). Los gametos fueron recolectados y llevados al laboratorio. Los ovocitos fueron filtrados en un tamiz de nylon de 120 μm y lavados con FSW, para posteriormente ser llevados a una concentración aproximada de 2500 cel mL^{-1} . Los ovocitos fueron fertilizados con esperma diluida (1:1000) en FSW y cuando se observó la formación de la membrana de fecundación (1 minuto después de la fertilización) se distribuyeron 20 μL de muestra en cada celda (~ 50 huevos por celda) con cada uno de los tratamientos, en las 3 placas. Las placas permanecieron en oscuridad y a una temperatura de 17 °C durante todo el experimento.

Se tomaron fotografías y realizaron observaciones del estado de desarrollo de las células y malformaciones de estas, mediante la utilización de un microscopio invertido modelo *Olympus IX70*, a las 48, 72 y 96 horas de iniciada la fecundación. En cada uno de los tiempos de observación se procedió a fijar una de las placas con 20 μL de paraformaldehído al 2 % en cada una de las celdas, con el fin de diferenciar y cuantificar células normales, retrasadas y malformadas. La caracterización de cada tipo de célula se realizó utilizando como referencia las observaciones realizadas por Young *et al* (1997), sobre la especie *S. granularis*, y las descripciones de Carballeira *et al* (2012) sobre la especie *Paracentrotus lividus*.

2.4.2. Ensayos de toxicidad sobre el desarrollo larval del bivalvo *Mytilus chilensis*

Durante el mes de febrero de 2016, en las instalaciones pertenecientes a la Fundación Chinquihue ubicadas en Puerto Montt, región de Los Lagos, se realizaron experimento de laboratorio con el fin de evaluar la toxicidad de los pesticidas azametifos (A) y deltametrina (D), además de una combinación de ambos (A+D), sobre las primeras etapas de desarrollo del bivalvo *Mytilus chilensis*. Para ello, se recolectaron individuos adultos de la especie *M. chilensis* en la localidad de Pichicolo, Provincia de Palena, Patagonia Norte (41°93'S; 72°51'W), los que fueron limpiados retirando material y organismos adheridos en su concha, para posteriormente ser aclimatados durante 3 semanas en estanques con agua de mar previamente filtrada (1 µm) y esterilizada. Una vez terminado el periodo de aclimatación, se realizó la inducción de desove utilizando un shock térmico, mediante la inmersión alternada de los organismos, durante 30 min cada vez, en agua de mar a 12 y 25 °C, el agua de mar fue previamente filtrada por 0,2 µm y esterilizada con luz UV. Una vez iniciado el desove, los individuos fueron separados por sexo en vasos precipitados de 1L. Posteriormente se procedió a fecundar los ovocitos obtenidos añadiendo esperma y dejando reposar durante 40min, con el fin de permitir la sedimentación de aquellos embriones con un mayor contenido de lípidos para asegurar una mejor calidad de estos.

Paralelamente, se procedió a preparar las soluciones de azametifos (Dr. Ehrenstorfer, 98,5%), deltametrina (Dr. Ehrenstorfer, 99,5%) y A+D, disolviendo los reactivos en acetona y luego diluidos de manera seriada hasta obtener cuatro concentraciones de cada uno de los tres tratamientos: 1, 10, 100, 1000 µg L⁻¹.

El inicio de la incubación de las muestras se realizó dos horas después de realizada la fecundación. Para ello se dispusieron quince microplacas de poliestireno con fondo plano, de 96 pocillos, donde cada microplaca se dividió en 4 secciones, de las cuales 3 fueron utilizadas para las pruebas de plaguicidas, aplicando 5 réplicas por concentración, y una sección como control, con 9 réplicas para control negativo (solo agua de mar filtrada) y un control positivo con acetona (Figura 2.8). Para la aplicación de los tratamientos y controles correspondientes, en cada uno de los pocillos se añadió 20 µL de solución con embriones (31 ± 13 embriones), posteriormente en los tratamientos con pesticida se añadió

160 μL de agua de mar filtrada (AMF, 0,22 μm) y 20 μL de solución de pesticida, mientras que, en el caso de los controles, se añadieron 180 μL de AMF (0,22 μm) tanto en el control negativo y como en el positivo, a este último además se le adicionó 20 μL de acetona.

Las microplacas se incubaron durante 22h a 17 °C en oscuridad. Se fijaron tres microplacas con formaldehído al 10% a 0 y 22h post-inoculación, mientras que otras dos microplacas fueron fijadas 5 horas post-inoculación. En cada pocillo, de cada tratamiento aplicado, de cada placa, se contaron y observaron los embriones utilizando un microscopio invertido Olympus CKX41, con el fin de identificar deformidades y malformaciones. Además, se tomaron fotografías de las larvas en cada tiempo de muestreo. La caracterización de cada etapa como: normal, retrasada, sin división y destrozada, se basó en las observaciones realizadas por Ruiz et al. (2008) para *Mytilus galloprovincialis*.

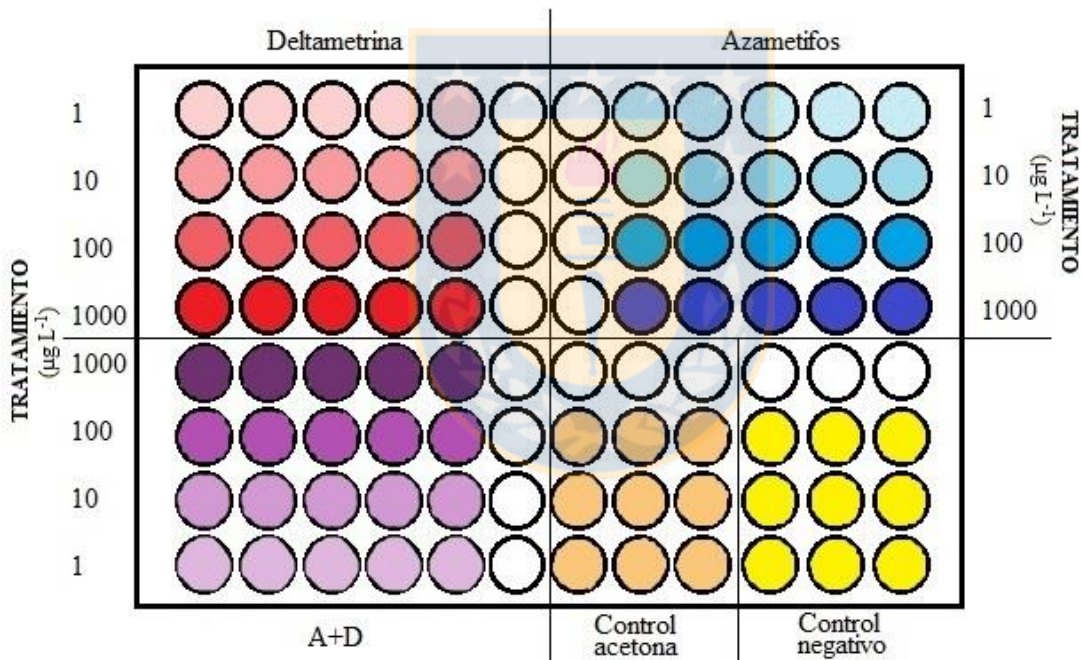


Figura 2.8. Esquema de distribución de tratamientos de las distintas concentraciones de los pesticidas deltametrina, azametifos y A+D utilizados sobre el mitílido *M. chilensis*, en una microplaca de 96 celdas. Fuente: Elaboración propia.

Con la información obtenida se realizó una ANOVA de una vía con y el test *a posteriori* Tukey utilizando el software estadístico R para determinar las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos. No se realizaron transformaciones para el procesamiento de datos.

3. RESULTADOS

3.1. Capítulo 1: Impacto de tres pesticidas utilizados en salmicultura sobre comunidades microbianas marinas naturales

3.1.1. Condiciones ambientales registradas durante la realización de los experimentos I y II en el Canal Puyuhuapi (14 y 19 de agosto de 2014)

El promedio mensual de precipitaciones en Puerto Cisnes para el mes de agosto de 2014 fue de 6,06 mm de agua caída, mientras que durante el mismo mes el río Cisnes alcanzó un caudal promedio de $381,39 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ (Figura 3.1). Los días previos a la extracción de agua para el experimento I (14 de agosto de 2014) los valores de ambas variables se mantuvieron bajo el promedio mensual, sin embargo, antes de iniciar el experimento II (19 de agosto de 2014), en el periodo comprendido entre el 15 y 18 de agosto, se registró un aumento de un 281% respecto del promedio mensual de precipitaciones, alcanzando los 17,05 mm. Respecto al caudal medio del Río Cisnes, este registró valores máximos el día 18 de agosto, alcanzando $1526 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ (Tabla 3.1).

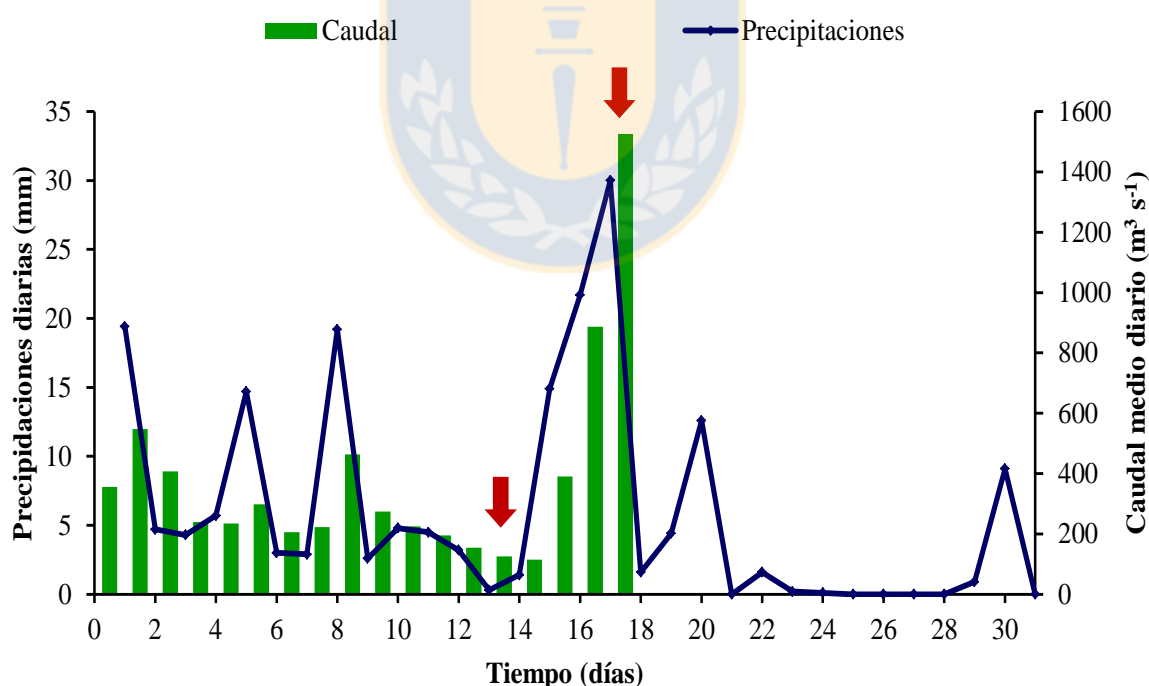


Figura 3.1. Registro de precipitaciones diarias (mm) en la localidad de Puerto Cisnes y variaciones del caudal medio diario (m^3s^{-1}) en el Río Cisnes, región de Aysén, durante el mes de agosto de 2014 (www.dga.cl). Las flechas rojas indican el inicio de los experimentos I y II. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.1. Precipitaciones diarias en la localidad de Puerto Cisnes y caudal medio diario del Río Cisnes, registrado entre el 13 y 19 de agosto de 2014 (www.dga.cl). Fuente: Elaboración propia.

| Día | Caudal medio (m ³ s ⁻¹) | Precipitación (mm) |
|-----|--|--------------------|
| 13 | 154 | 0,3 |
| 14 | 126 | 1,4 |
| 15 | 115 | 14,9 |
| 16 | 390 | 21,7 |
| 17 | 887 | 30 |
| 18 | 1526 | 1,6 |
| 19 | - | 4,4 |

En relación a la temperatura y la salinidad (Figura 3.2), para ambos perfiles se registraron valores mínimos en superficie y un incremento con la profundidad. El día 14 de agosto, tanto la salinidad como la temperatura registraron en superficie su valor más bajo respecto a la profundidad, alcanzando 1,67 y 7,3 °C (1,5 m), posteriormente se observó en ambas variables un incremento constante con la profundidad, alcanzando sus valores más altos a 30 m, registrando 30 y 9,4 °C respectivamente (Figura 3.2a).

De igual manera, el día 19 de agosto se observaron valores mínimos en superficie para ambas variables (1,5 m), alcanzando una salinidad de 1,6 y una temperatura de 7,3 °C. Además, entre los 5 y 10 m se registró una halo y termoclina, observándose valores máximos a 30m que bajo la clina la temperatura y la salinidad aumentaron hasta alcanzar 9,4 °C y 30,7 respectivamente (Figura 3.2b).

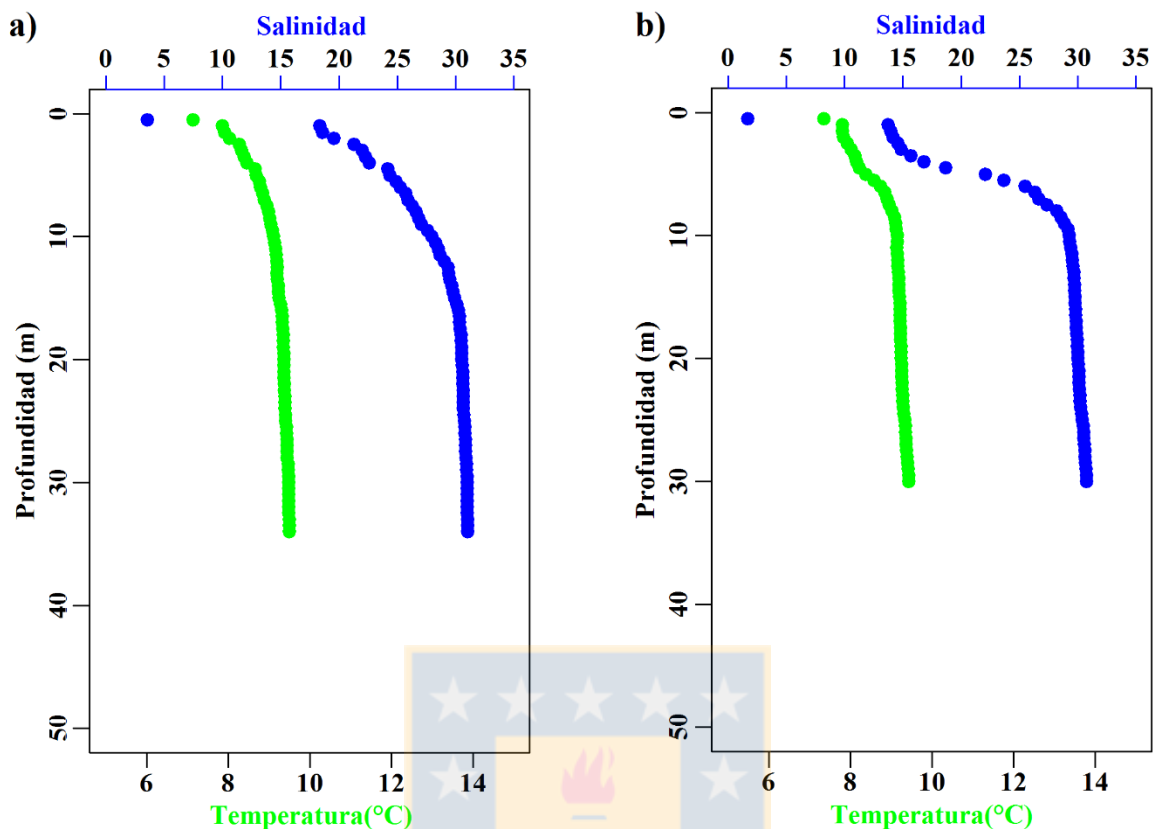


Figura 3.2. Perfiles de temperatura (°C) y salinidad en función de la profundidad (m), registrados en la estación Amparo Grande, en el Canal Puyuhuapi. a) Experimento I (14 de agosto de 2014). b) Experimento II (19 de agosto de 2014). Fuente: Elaboración propia.

En la estación Amparo Grande (Figura 3.3a), se registró una abundancia de bacterioplancton superficial de $253,8 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$, la cual aumentó con la profundidad alcanzando su valor más alto a los 17m con $270,6 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$, para posteriormente disminuir, registrando el valor mínimo a 25m, $169,9 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$.

La abundancia de *Synechococcus sp.* fue máxima en superficie, con un valor promedio de $29,1 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$, disminuyendo con la profundidad, alcanzando un mínimo de $5,98 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ a 25 m de profundidad. De igual manera la abundancia celular de organismos picoeucariontes alcanzó un máximo de $7,0 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ a 2 m de profundidad y un mínimo de $1,2 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ a 25 m (Tabla 3.2).

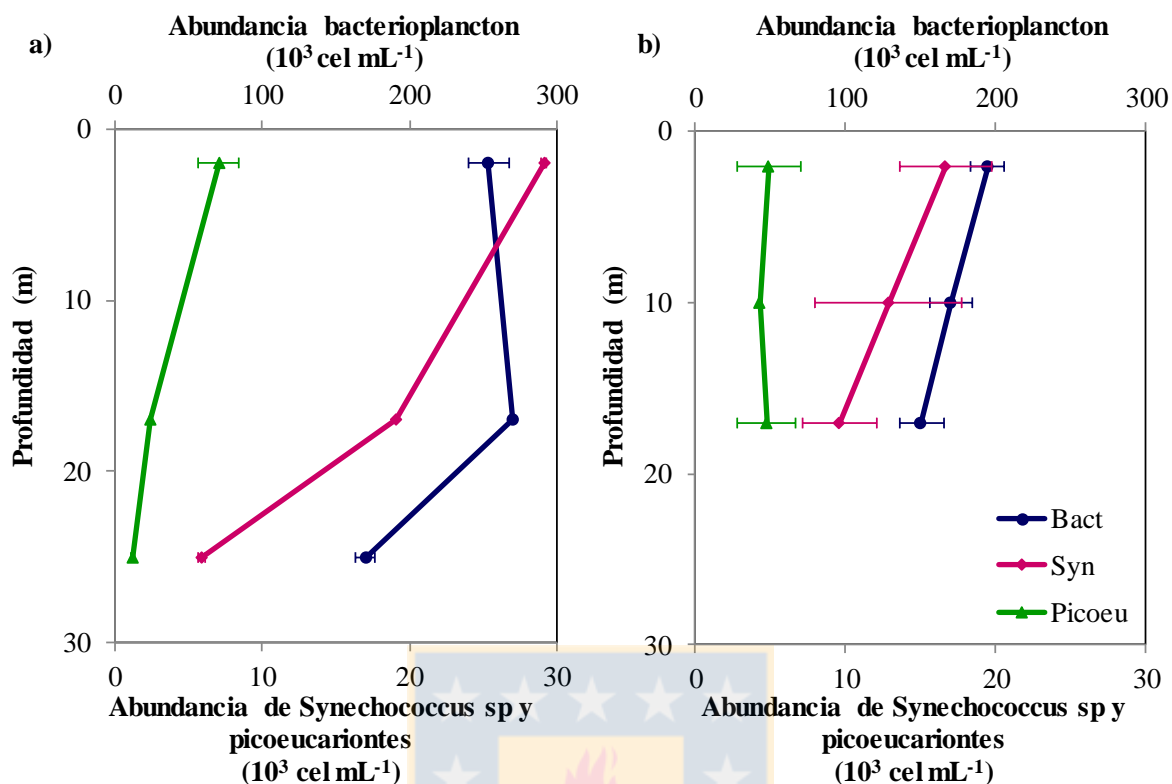


Figura 3.3. Perfil de abundancia del bacterioplancton (Bact), *Synechococcus sp.* (Syn) y picoeucariontes (Picoeu), en la estación Amparo Grande, en el Canal Puyuhuapi. a) Experimento I (14 de agosto de 2014). b) Experimento II (19 de agosto de 2014). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.2. Promedios y desviaciones estándar de la abundancia celular de bacterioplancton, *Synechococcus sp.* y picoeucariontes registrada en la estación Amparo Grande, el 14 de agosto de 2014. Fuente: Elaboración propia.

| Profundidad (m) | Bacterioplancton (10^3 cel mL^{-1}) | <i>Synechococcus sp.</i> (10^3 cel mL^{-1}) | Picoeucariontes (10^3 cel mL^{-1}) |
|-----------------|---|---|--|
| 2 | $253,8 \pm 13,4$ | $29,1 \pm 0,1$ | $7,0 \pm 1,4$ |
| 17 | $270,6 \pm 0,0$ | $19,0 \pm 0,0$ | $2,3 \pm 0,0$ |
| 25 | $169,9 \pm 6,8$ | $5,9 \pm 0,2$ | $1,2 \pm 0,1$ |

En la estación Amparo Grande, durante la ejecución del experimento II (Figura 3.3b), el perfil de abundancia celular registró sus valores máximos en superficie (2 m), alcanzando $194,7 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ de bacterias, $16 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ de *Synechococcus sp.* y $4,9 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ de organismos picoeucariontes. Posteriormente, a 17 m se observó una disminución de la abundancia bacterioplanctónica y de *Synechococcus sp.*, alcanzando las $150,7 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ y $9,6 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ respectivamente, de manera opuesta, no se

registraron variaciones en la abundancia de picoeucariontes, manteniendo un valor promedio de $4,7 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Promedios y desviaciones estándar de la abundancia celular del bacterioplancton, *Synechococcus sp.* y picoeucariontes registrada en la estación Amparo Grande, el 19 de agosto de 2014. Fuente: Elaboración propia.

| Profundidad (m) | Bacterioplancton (10^3 cel mL^{-1}) | <i>Synechococcus sp.</i> (10^3 cel mL^{-1}) | Picoeucariontes (10^3 cel mL^{-1}) |
|-----------------|---|---|--|
| 2 | $194,7 \pm 11,4$ | $16,7 \pm 3,0$ | $4,9 \pm 2,1$ |
| 10 | $170,6 \pm 14,9$ | $12,9 \pm 4,8$ | $4,4 \pm 0,1$ |
| 17 | $150,7 \pm 14,9$ | $9,6 \pm 2,5$ | $4,7 \pm 2,0$ |

Respecto a la concentración de nutrientes, el día 14 de agosto de 2014 (Figura 3.4a) se registró un valor superficial de nitrato de $13,13 \mu\text{M}$, el cual aumentó con la profundidad alcanzando su valor más alto a 25 m ($24,70 \mu\text{M}$). Mientras que la concentración de nitrito fue máxima a 17 m con un valor promedio de $0,12 \mu\text{M}$ y disminuyó a $0,05 \mu\text{M}$ al alcanzar los 25 m.

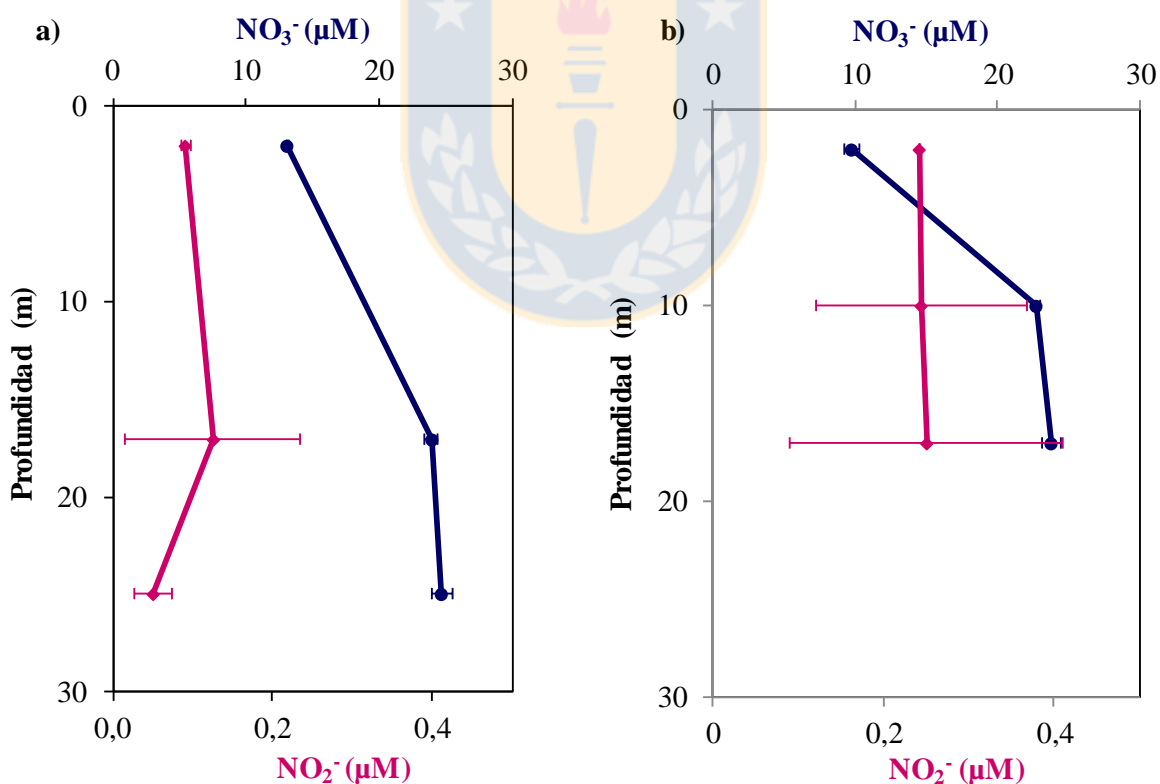


Figura 3.4. Perfil de concentraciones de nitrito y nitrato (μM) en el Canal Puyuhuapi. a) Experimento I (14 de agosto de 2014). b) Experimento II (19 de agosto de 2014). Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, el 19 de agosto de 2014 (Figura 3.4b), se registró una concentración de nitrato superficial de 9,76 μM , la cual aumentó con la profundidad, alcanzando su valor más alto a 17 m con 23,80 μM . De igual manera, la concentración de nitrito fue mínima a 2 m con un valor promedio de 0,24 μM , para posteriormente aumentar hasta alcanzar 0,25 μM a 17 m.

3.1.2. Experimento I en el Canal Puyuhuapi

3.1.2.1. Variación de la abundancia de microorganismos

Los resultados obtenidos para el experimento I, permiten observar diferencias entre las abundancias de bacterioplancton de los distintos tratamientos ($F=21,56$; g. l=6; $p<0,05$; Figura 3.5a). En T12 se registró un aumento en la abundancia de algunos tratamientos, como en el caso de A, que alcanzó un valor máximo de $871 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$. Se observó una disminución de la abundancia bacterioplanctónica en los tratamientos A y D+A durante T48, registrando promedios de $83 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ y $117 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ respectivamente. En T84, el tratamiento A+B mostro un promedio de $890 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$. Mientras que en T96, los tratamientos D+B y A+B disminuyeron sus valores promedio a $25 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ y $191 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$. Al final del experimento (T120), la abundancia de bacterioplancton de todos los tratamientos disminuyó, variando entre $43 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ (A+B) y $184 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ (B).

En general, durante el desarrollo del experimento se registraron diferencias significativas entre los tratamientos en los distintos tiempos de muestreo (Tabla 3.4). Sin embargo, las diferencias más notorias fueron las registradas en T36 ($F=12,47$; g. l=6; $p<0,05$) y T60 ($F=15,68$; g. l=6; $p<0,05$) donde al aplicar el test *a posteriori* se observaron diferencias entre todos los tratamientos combinados de pesticidas respecto del control. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre las abundancias bacterioplactónicas de los tratamientos, en T6 ($F=2,20$; g. l=6; $p>0,05$) y T72 ($F=3,54$; g. l=6; $p>0,05$).

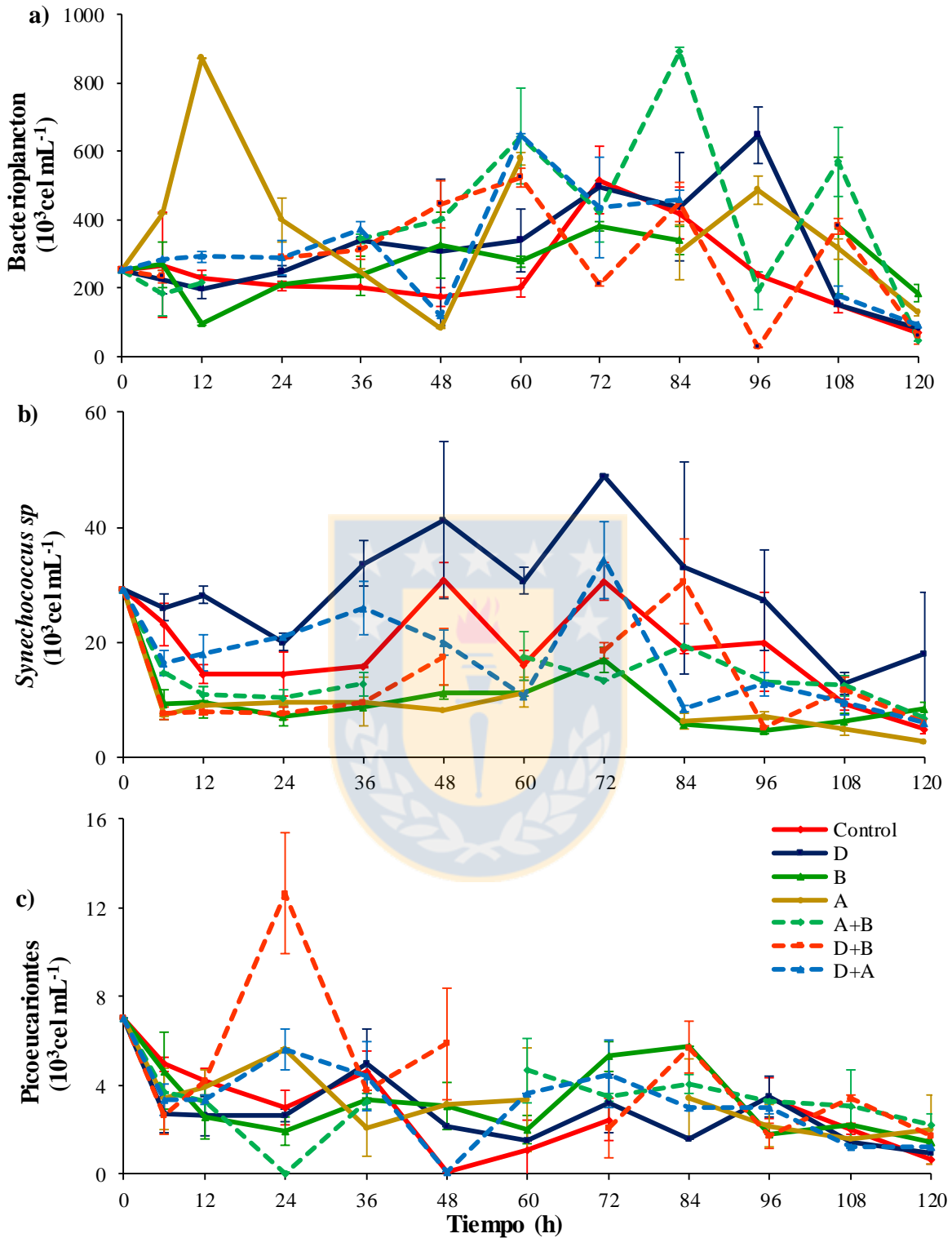


Figura 3.5. Variaciones de la abundancia celular (10^3 cel mL^{-1}) registrada durante la ejecución del experimento I. a) Bacterioplankton. b) *Synechococcus sp.* c) Picoeucariontes. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.4. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de bacterioplancton registrados entre tratamientos durante el experimento I. Valores en negrita indica diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| Tiempo (h) | g. l | F/H | <i>p</i> <0,05 |
|------------|------|--------|----------------|
| 6 | 6 | 2,20 | 0,163 |
| 12 | 5 | 389,70 | < 0,001 |
| 24 | 5 | 8,31 | 0,005 |
| 36 | 6 | 12,47 | 0,002 |
| 48 | 6 | 4,59 | 0,033 |
| 60 | 6 | 15,68 | < 0,001 |
| 72 | 5 | 3,54 | 0,077 |
| 84 | 6 | 12,16 | 0,002 |
| 96 | 4 | 51,97 | < 0,001 |
| 108 | 6 | 6,33 | 0,014 |
| 120 | 6 | 21,05 | < 0,001 |

En relación a la abundancia de la cianobacteria *Synechococcus sp.* (Figura 3.5b), en T6, si bien se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (F=24,02; g. l=6; *p*<0,05), estos disminuyeron, alcanzando valores entre $7 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ (A) y $26 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ (D).

En general, durante todo el experimento se registraron valores máximos de abundancia de *Synechococcus sp.* a partir de T6 para el tratamiento D, cuyo valor más alto fue alcanzado en T72 ($49 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$). Por el contrario, los valores más bajos fueron registrados en el tratamiento A, alcanzando $3 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ en T120.

Se observaron, además, diferencias significativas entre las abundancias de *Synechococcus sp.* de los tratamientos durante las primeras 72 horas de incubación (Tabla 3.5). Sin embargo, el test *a posteriori* (Tukey), solo arrojó diferencias entre los tratamientos individuales de pesticidas (A, D y B) y el control, no observándose diferencias de los tratamientos combinados de pesticidas (D+A, D+B y A+B) con el control. A partir de T84 (F=11,85; g. l=6; *p*>0,05) no se registraron diferencias significativas entre los valores de abundancias de los tratamientos, observándose nuevamente diferencias al final del período experimental (T120; F=11,82; g. l=6; *p*>0,05).

Tabla 3.5. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de *Synechococcus sp.* registrados entre tratamientos, durante el experimento I. Valores en negrita indica diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| Tiempo (h) | g.l. | F/H | <i>p</i> <0,05 |
|------------|------|-------|----------------|
| 6 | 6 | 24,02 | < 0,001 |
| 12 | 5 | 29,15 | < 0,001 |
| 24 | 6 | 21,01 | < 0,001 |
| 36 | 6 | 22,20 | < 0,001 |
| 48 | 5 | 10,83 | 0,002 |
| 60 | 5 | 19,28 | 0,001 |
| 72 | 5 | 35,50 | < 0,001 |
| 84 | 6 | 11,85 | 0,065 |
| 96 | 6 | 12,05 | 0,061 |
| 108 | 6 | 10,85 | 0,093 |
| 120 | 6 | 11,82 | 0,066 |

En relación a la abundancia de organismos picoeucariontes (Figura 3.5c), los resultados muestran que en T6 nuevamente se observó una disminución de los valores de abundancia, variando entre $2,6 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (D+B) y $4,9 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (control).

Durante el desarrollo del experimento se observó un aumento de la abundancia de organismos picoeucariontes en el tratamiento D+B en T24 ($F=24,89$; $g. l=6$; $p<0,05$), cuyo valor promedio alcanzó las $12 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$, el cual fue significativamente diferente al obtenido en los demás tratamientos. Por el contrario, durante los restantes tiempos de muestreo no se observaron diferencias significativas entre las abundancias de organismos picoeucariontes en los distintos tratamientos (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de picoeucariontes registrados entre tratamientos durante el experimento I. Valores en negrita indica diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| TIEMPO (h) | g. l | F/H | <i>p</i> <0,05 |
|------------|------|-------|-------------------|
| 6 | 6 | 1,62 | 0,27 |
| 12 | 6 | 2,01 | 0,191 |
| 24 | 6 | 24,89 | < 0,001 |
| 36 | 6 | 1,46 | 0,313 |
| 48 | 5 | 10,57 | 0,061 |
| 60 | 5 | 2,32 | 0,167 |
| 72 | 5 | 2,50 | 0,147 |
| 84 | 5 | 1,41 | 0,341 |
| 96 | 6 | 2,79 | 0,102 |
| 108 | 6 | 2,72 | 0,108 |
| 120 | 6 | 9,37 | 0,154 |

3.1.2.2. Variación de la concentración de nutrientes

En relación a la variación de los valores de la concentración de nutrientes durante el experimento I, se observó que en T0 la concentración de nitrato (Figura 3.6a) de los distintos tratamientos y el control, variaron entre 11,9 μM (D+B) y 15,5 μM (D). Además, durante todo el experimento los tratamientos A+B y D+A registraron concentraciones inferiores al valor observado en el control.

En el tratamiento D+B se observaron dos aumentos de la concentración de NO_3^- , en T24 y T72. Mientras que, la concentración de nitrato de los tratamientos A y B permaneció bajo los valores del control hasta T96. Posteriormente ambos tratamientos tuvieron un aumento, sobrepasando la concentración del control, alcanzando valores de 13,1 y 13,3 μM respectivamente.

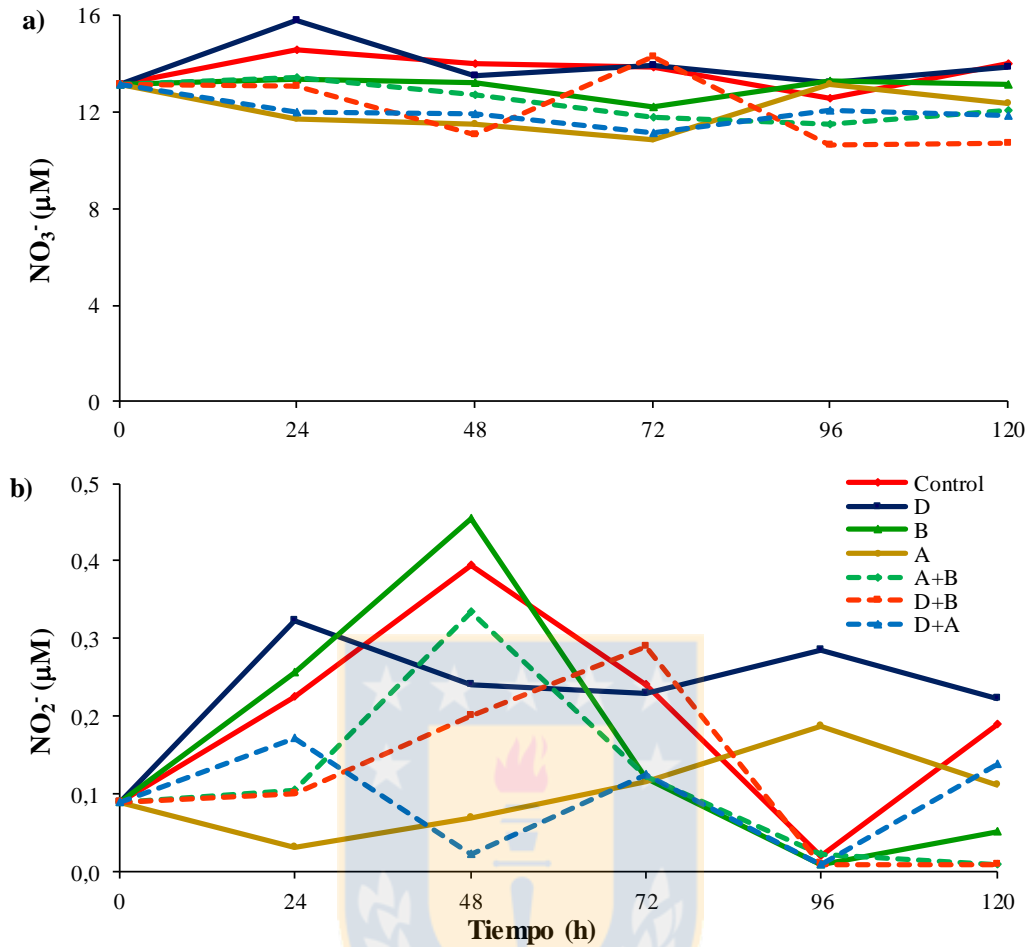


Figura 3.6. Variación en la concentración de nutrientes (µM) registrada durante la ejecución del experimento I. a) NO₃⁻. b) NO₂⁻. Fuente: Elaboración propia.

En relación a los resultados estadísticos, se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de nitrato de los tratamientos y el control, exceptuando el tratamiento D ($t=-0,73$; $p>0,05$). Además, durante el experimento I, no se registraron diferencias entre las concentraciones de nitrato de los tratamientos combinados de pesticidas, D+A, D+B y A+B (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Valores calculados y valores p obtenidos al aplicar un análisis de distribución de probabilidad, t de Student (t) o U de Mann-Whitney (T), entre las concentraciones de nitrato de los distintos tratamientos y el control, durante el experimento I. Valores en negrita indican diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| | | D | B | A | A+B | D+B | D+A |
|---------|-----|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| CONTROL | t/T | -0,739 | 51 | 4,397 | 3,848 | 2,969 | 57 |
| | P | 0,477 | 0,041 | 0,001 | 0,003 | 0,014 | 0,002 |
| D | t/T | - | 2,575 | 4,22 | 3,731 | 3,183 | 4,974 |
| | P | - | 0,028 | 0,002 | 0,004 | 0,01 | <0,001 |
| B | t/T | - | - | 2,972 | 2,225 | 50 | 54 |
| | P | - | - | 0,014 | 0,05 | 0,093 | 0,004 |
| A | t/T | - | - | - | 0,823 | 0,049 | 0,137 |
| | P | - | - | - | 0,43 | 0,961 | 0,894 |
| A+B | t/T | - | - | - | - | 0,595 | 1,209 |
| | P | - | - | - | - | 0,565 | 0,255 |
| D+B | t/T | - | - | - | - | - | 36 |
| | P | - | - | - | - | - | 0,699 |

Respecto a las variaciones de la concentración de nitrito (Figura 3.6b), se observó un aumento en T48 en los tratamientos B, A+B y el control, alcanzando valores de 0,45, 0,33 y 0,39 μM respectivamente. Por el contrario, en T96 se registró un descenso en la concentración de nitrito en los tratamientos B, D+B, D+A, A+B y el control, el cual varió entre 0,01 y 0,02 μM . Además, solo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos D y A ($T=4,302$; $p<0,05$), y D con D+B ($T=2,297$; $p<0,05$), no así entre los tratamientos y el control.

3.1.3. Experimento II en el Canal Puyuhuapi

3.1.3.1. Variación de la abundancia de microorganismos

Los resultados permiten observar que entre T6 y T12 los valores de abundancia bacterioplanctónica (Figura 3.7a) aumentaron en todos los tratamientos y el control. Además, se registró un aumento en los valores de abundancia de algunos tratamientos, como en el caso de A+B en T48, que alcanzó un valor de $427 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ y de B en T96 con un promedio de $449 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$. De igual manera, se observaron diferencias significativas entre las abundancias de bacterioplancton de los distintos tratamientos y el control a partir de T48 ($F=28,75$; g. l=6; $p<0,05$).

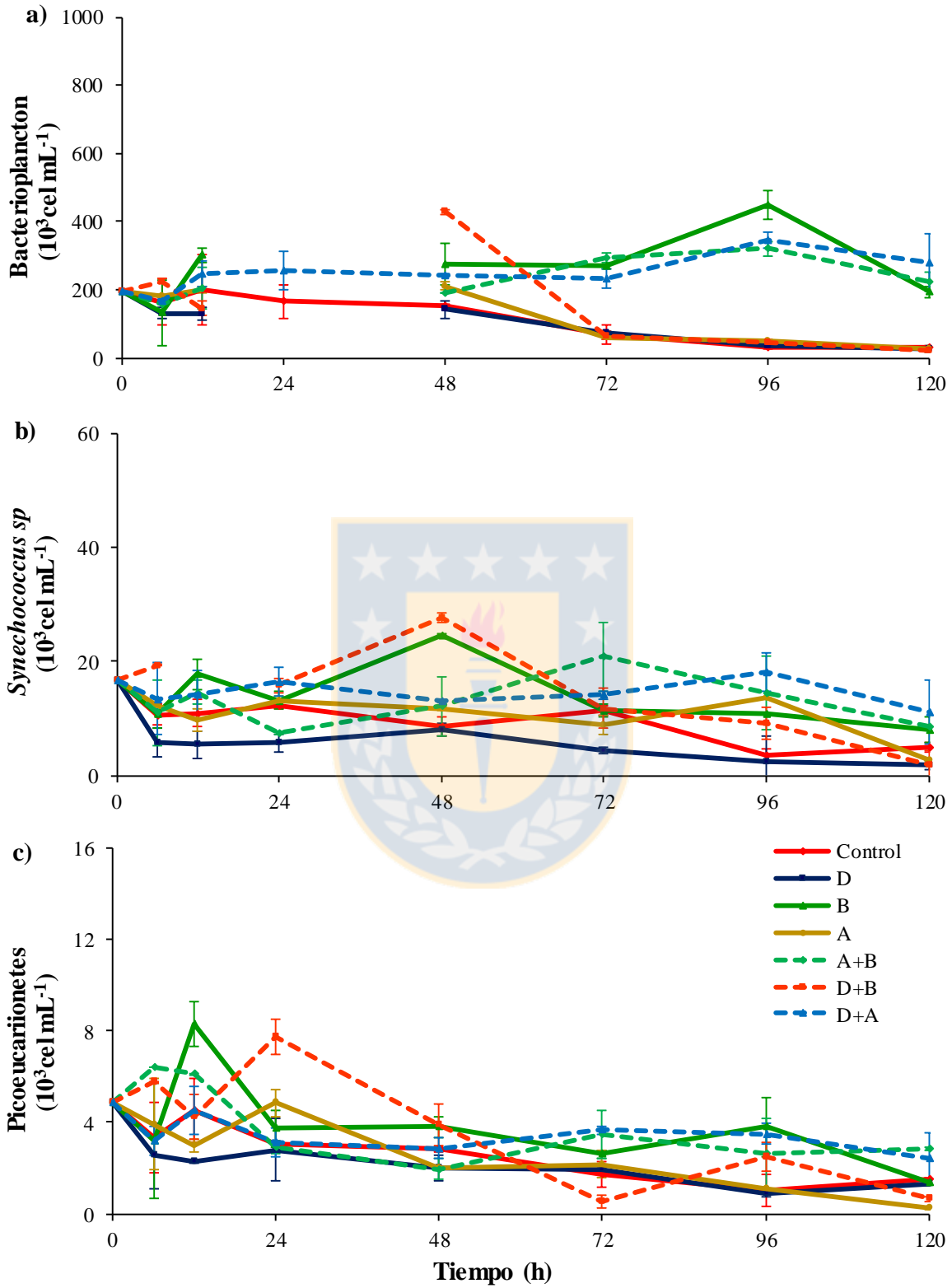


Figura 3.7. Variaciones de la abundancia celular (10^3 cel mL^{-1}) registrada durante la ejecución del experimento II. a) Bacterioplankton. b) *Synechococcus sp.* c) Picoeucariontes. Fuente: Elaboración propia.

Asimismo, a partir de las 48 horas de incubación se observaron dos tendencias en los tratamientos, un primer grupo formado por el control y los tratamientos A, D y D+B, con una tendencia general a disminuir su abundancia, los que en el test *a posteriori* (Tukey) no mostraron diferencias significativas entre ellos. Y un segundo grupo formado por los tratamientos B, D+A y A+B, que no registraron diferencias significativas entre sus abundancias, las cuales tendieron a aumentar (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia bacteriana registrados entre tratamientos durante el experimento II. Valores en negrita indican diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| Tiempo (h) | g. l | F/H | <i>p</i> <0,05 |
|------------|------|--------|----------------|
| 6 | 6 | 0,97 | 0,507 |
| 12 | 6 | 2,81 | 0,101 |
| 24 | | | |
| 48 | 6 | 28,75 | < 0,001 |
| 72 | 6 | 82,18 | < 0,001 |
| 96 | 6 | 162,66 | < 0,001 |
| 120 | 6 | 23,39 | < 0,001 |

En relación a la abundancia celular de *Synechococcus sp.* durante el experimento II (Figura 3.7b), transcurridas 48 horas de incubación, se registraron dos valores máximos de abundancia de *Synechococcus sp.*, correspondientes a los tratamientos B y D+B ($24,7 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ y $27,7 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ respectivamente). De manera opuesta, se registraron valores mínimos de abundancia en el tratamiento D durante todo el experimento, alcanzando el valor más bajo en T120 con $1,9 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$.

Entre T12 (F=5,78; g. l=5; *p*<0,05) y T96 (F=5,62; g. l=6; *p*<0,05) se visualizaron diferencias significativas entre las abundancias de *Synechococcus sp.* de los tratamientos y el control, las cuales, de acuerdo a lo obtenido mediante la aplicación del test *a posteriori* Tukey corresponderían solo a diferencias entre los tratamientos y no de estos respecto del control (Tabla 3.9).

Al final del experimento, en T120, se observó una tendencia de los valores de abundancia a disminuir, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos y el control (H=12,16; g. l=6; *p*>0,05).

Tabla 3.9. Análisis de varianza realizado en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia de *Synechococcus sp.* registrados entre tratamientos, durante el experimento II. Valores en negrita indican diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| Tiempo (h) | g. l | F/H | <i>p</i> <0,05 |
|------------|------|-------|----------------|
| 6 | 6 | 2,66 | 0,113 |
| 12 | 5 | 5,78 | 0,027 |
| 24 | 6 | 20,17 | < 0,001 |
| 48 | 6 | 22,64 | < 0,001 |
| 72 | 6 | 6,56 | 0,013 |
| 96 | 6 | 5,62 | 0,02 |
| 120 | 6 | 12,16 | 0,058 |

Respecto a la abundancia de organismos picoeucariontes (Figura 3.7c), entre T12 (F=11,13; g. l=6; *p*<0,05) y T96 (F=4,10; g. l=6; *p*<0,05) se observaron diferencias significativas entre las abundancias de los distintos tratamientos y el control (Tabla 3.10).

Además, durante el desarrollo del experimento se registraron dos aumentos de abundancia, en T12 en el tratamiento B con $8,3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ y en T24 en el tratamiento D+B, cuyo valor de abundancia promedio alcanzó $7,7 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$. Asimismo, se observó una disminución de las abundancias en T120, alcanzando valores mínimos, los cuales variaron entre $1,8 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (D+B) y $1,9 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (D) y no presentaron diferencias significativas entre ellos (H=12,16; g. l=6; *p*>0,05).

Tabla 3.10. Análisis de varianza realizados en cada tiempo de muestreo sobre los valores de abundancia picoeucariontes registrados entre tratamientos, durante el experimento II. Valores con negrita indican diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| Tiempo (h) | g. l | F/H | <i>p</i> <0,05 |
|------------|------|--------|----------------|
| 6 | 6 | 1,955 | 0,200 |
| 12 | 6 | 11,131 | 0,003 |
| 24 | 6 | 11,095 | 0,003 |
| 48 | 6 | 5,508 | 0,021 |
| 72 | 6 | 8,502 | 0,006 |
| 96 | 6 | 4,101 | 0,043 |
| 120 | 6 | 12,37 | 0,054 |

En relación a la producción bacteriana registrada durante el experimento II (Figura 3.8), se observaron los valores más altos de DPM (degradaciones por minuto) en todos los tratamientos y el control durante T24, variando entre $78514 \text{ DPM mL}^{-1}$ (A+B) y 98282

DPM mL⁻¹ (D+B). Mientras que los valores más bajos fueron observados en T120, donde el valor más bajo fue alcanzado por el tratamiento D+A, registrando 5603 DPM mL⁻¹.

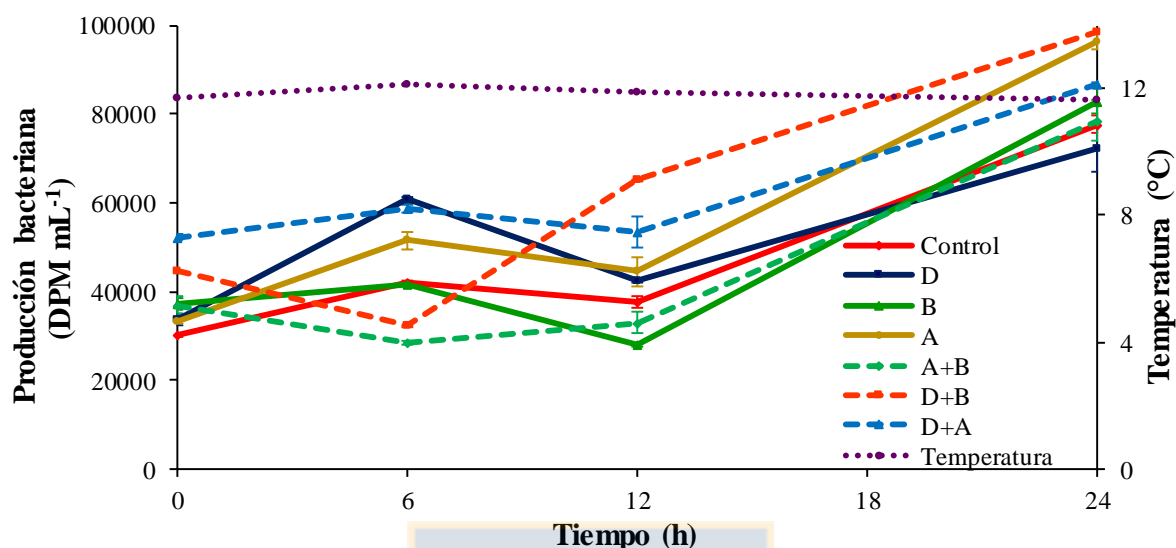


Figura 3.8. Variación de producción bacteriana (DPM mL⁻¹) durante la ejecución del experimento II, en el Canal Puyuhuapi. Fuente: Elaboración propia.

Asimismo, los resultados obtenidos en los análisis estadísticos (Tabla 3.11), arrojaron diferencias significativas entre los valores de DPM mL⁻¹ de los distintos tratamientos y el control durante todo el experimento, desde T0 (F=131,97; g. l=6; $p<0,05$) hasta T120 (F=6621,11; g. l=6; $p<0,05$). Respecto a la variación de temperatura durante el experimento II, se registró un valor promedio de 11,8 °C durante todo el experimento, presentando su valor más bajo en T24, alcanzando los 11,6 °C, valor que coincide con el máximo de producción bacteriana.

Tabla 3.11. Análisis de varianza realizado sobre los valores de producción bacteriana registrados durante el experimento II. Valores en negrita indican diferencias significativas. Fuente: Elaboración propia.

| Tiempo (h) | g. l | F/H | $p<0,05$ |
|------------|------|----------|----------------|
| 0 | 6 | 131,97 | < 0,001 |
| 6 | 6 | 507,12 | < 0,001 |
| 12 | 6 | 19,394 | 0,004 |
| 24 | 6 | 29,275 | < 0,001 |
| 120 | 6 | 6621,113 | < 0,001 |

3.1.3.2. Variación de la concentración de nutrientes

Durante el desarrollo del experimento, las concentraciones de nitrato de todos los tratamientos se comportaron de manera similar (Figura 3.9a). Así, en T72 se observó un aumento de la concentración nitrato en todos los tratamientos y el control, registrándose el valor máximo en el tratamiento D, alcanzando 0,47 μM .

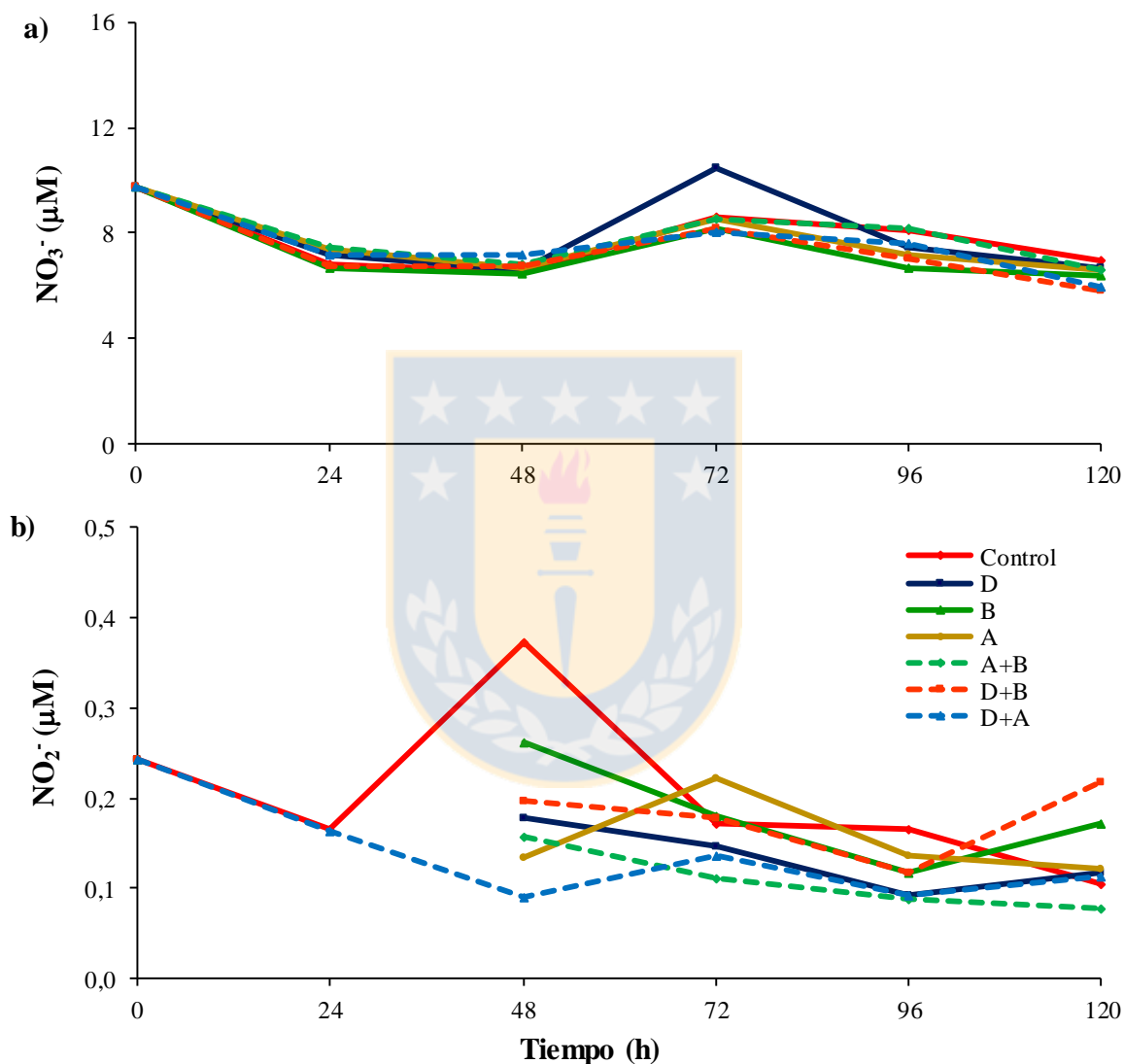


Figura 3.9. Variación en la concentración de nutrientes (μM) registrada durante la ejecución del experimento II. a) NO_3^- . b) NO_2^- . Fuente: Elaboración propia.

De manera opuesta, en T120 se visualizó una disminución en la concentración de nitrato de todos los tratamientos, registrándose valores entre 5,82 (D+B) y 6,975 μM (Control).

Adicionalmente, al aplicar los análisis estadísticos correspondientes, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de NO_3^- de los tratamientos, ni de estos con el control.

La concentración de nitrito registrada en T24 se encontró bajo el límite de detección. Mientras que la concentración máxima registrada durante el experimento correspondió al control en T48, con un valor de $0,37 \mu\text{M}$. Durante las primeras 96h todos los tratamientos se mantuvieron bajo el valor registrado en el control, observándose un único aumento en T72, donde el tratamiento A alcanzó una concentración de $0,22 \mu\text{M}$ (Figura 3.9b).

Asimismo, de manera general, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de nitrito entre los tratamientos y el control. Respecto a los valores de concentración de nitrito registrados en el control, estos solo presentaron diferencias significativas con el tratamiento A+B ($t=0,87$; $p<0,05$).

3.1.4. Condiciones ambientales registradas durante el experimento III en el Canal Caucahue (26 de enero de 2015)

Los valores más bajos de salinidad se observaron en superficie, registrando en promedio 32, para posteriormente incrementarse con la profundidad hasta alcanzar los 33 a 60 m. De manera opuesta, la temperatura registró su valor más alto en superficie ($15,3 \text{ }^\circ\text{C}$), para luego disminuir con la profundidad hasta $11,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Igualmente, se observó una termoclina a los 10 m y una haloclina a los 12 m (Figura 3.10).

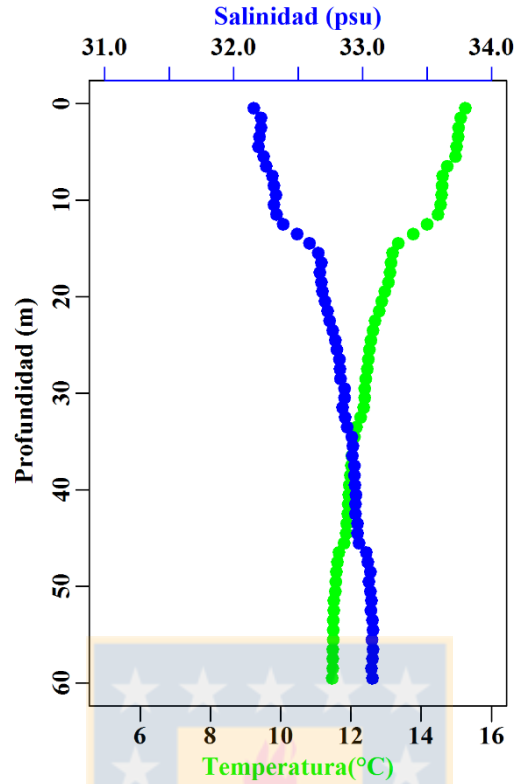


Figura 3.10. Perfil de temperatura (°C) y salinidad en la estación Q2 en el Canal Caucahue, el 26 de enero de 2015. Fuente: Elaboración propia.

En la estación Q2, lugar de muestreo para el experimento III, el 26 de enero de 2015, se registró una abundancia bacterioplanctónica superficial de $1606,5 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$, la cual disminuyó con la profundidad alcanzando su valor más bajo a 20 m, con $187,9 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$, posteriormente, a 30 m presentó un nuevo aumento, llegando a $769,6 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$, para nuevamente descender a $437,4 \times 10^3 \text{cel mL}^{-1}$ al alcanzar los 40 m (Figura 3.11a).

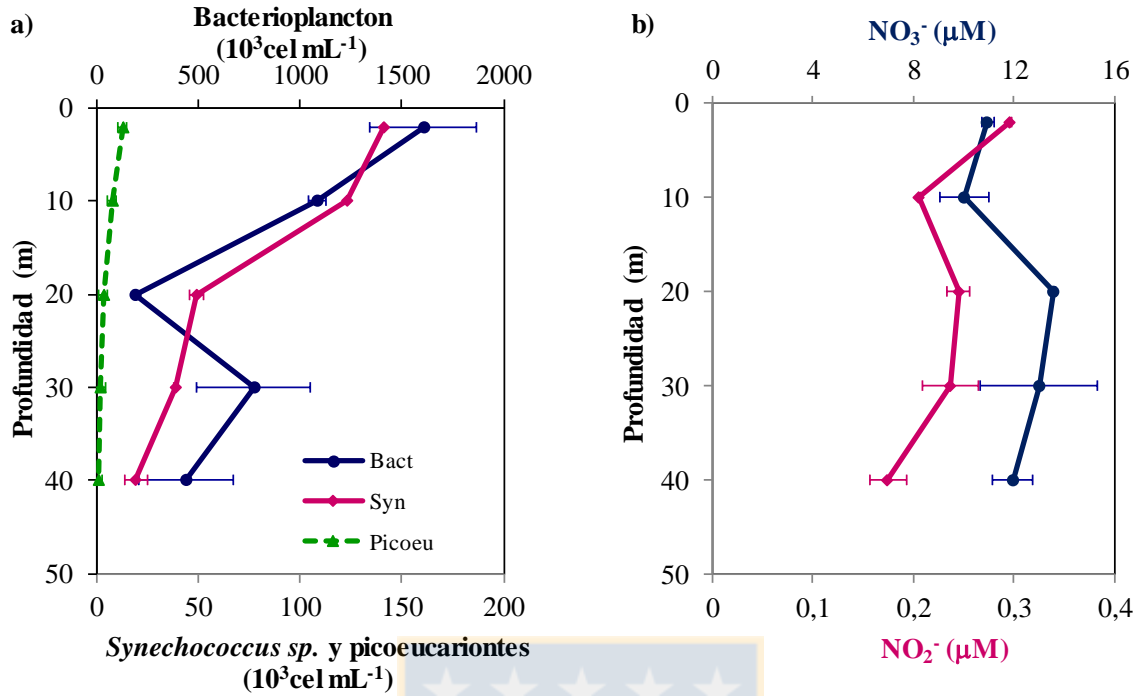


Figura 3.11. Perfil de la abundancia microbiana (10^3 cel mL^{-1}) y la concentración de nutrientes (μM) en la estación Q2, en el Canal Caucahue (experimento III) a) Bacterioplankton, *Synechococcus sp.* y picoeucariontes. b) NO_2^- y NO_3^- . Fuente: Elaboración propia.

De igual manera, las abundancias de *Synechococcus sp.* y organismos picoeucariontes, fueron máximas en superficie, alcanzando valores promedio de $141,1 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ y $12,7 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ respectivamente (Figura 3.11a), las cuales posteriormente disminuyeron con la profundidad, hasta alcanzar sus valores más bajo a 40 m, registrando abundancias de $19,0 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ de *Synechococcus sp.* y $0,6 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ de picoeucariontes (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Promedios y desviaciones estándar de la abundancia del bacterioplankton, *Synechococcus sp.* y picoeucariontes, en la estación Q2 durante el experimento III. Fuente: Elaboración propia.

| Profundidad (m) | Bacterioplankton (10^3 cel mL^{-1}) | <i>Synechococcus sp.</i> (10^3 cel mL^{-1}) | Picoeucariontes (10^3 cel mL^{-1}) |
|-----------------|---|---|--|
| 2 | $1606,5 \pm 262,1$ | $141,1 \pm 0,0$ | $12,0 \pm 0,0$ |
| 10 | $1080,1 \pm 44,2$ | $122,9 \pm 0,0$ | $7,3 \pm 0,0$ |
| 20 | $187,9 \pm 5,0$ | $49,0 \pm 3,0$ | $3,0 \pm 0,1$ |
| 30 | $769,6 \pm 281,0$ | $38,3 \pm 1,0$ | $1,7 \pm 1,2$ |
| 40 | $437,4 \pm 234,1$ | $19,0 \pm 6,0$ | $0,6 \pm 0,2$ |

Respecto a la concentración de nutrientes en la estación Q2 (Figura 3.11b), se registró una concentración de nitrato superficial de 10,97 μM , la cual aumentó con la profundidad hasta alcanzar 13,62 μM a 20 m, disminuyendo nuevamente 11,95 μM a 40 m. Por el contrario, la concentración más alta de nitrito se registró en superficie, alcanzando 0,29 μM , y la más baja a 40 m de profundidad, con un promedio de 0,17 μM (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Promedios y desviaciones estándar de la concentración de nitrito y nitrato registrados a distintas profundidades en la estación Q2, el 26 de enero de 2015. Fuente: Elaboración propia.

| Profundidad (m) | $\text{NO}_3^- (\mu\text{M})$ | $\text{NO}_2^- (\mu\text{M})$ |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 2 | 10,97 \pm 0,22 | 0,29 \pm 0,00 |
| 10 | 10,04 \pm 0,97 | 0,20 \pm 0,00 |
| 20 | 13,62 \pm 0,07 | 0,24 \pm 0,01 |
| 30 | 13,00 \pm 2,32 | 0,23 \pm 0,02 |
| 40 | 11,95 \pm 0,83 | 0,17 \pm 0,00 |

3.1.5. Experimento III en el Canal Caucahue

3.1.5.1. Variación de la abundancia de microorganismos

Los resultados de abundancia de bacterioplancton (Figura 3.12a) permitieron observar que, en T12 ($F=7,42$; g. l=3; $p<0,05$) se registraron diferencias significativas y se observó un aumento general en la abundancia bacterioplanctónica en todos los tratamientos y el control. De igual manera, en T60 donde se observó un aumento de la abundancia en todos los tratamientos, registrándose valores entre 1450 x 10³cel mL⁻¹ (D) y 1719 x 10³cel mL⁻¹ (control y D+A).

Por el contrario, entre T72 ($F=0,74$; g. l=3; $p>0,05$) y T96 ($F=3,35$; g. l=3; $p>0,05$) se visualizó una disminución de la abundancia en todos los tratamientos y el control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las abundancias de los distintos tratamientos y el control.

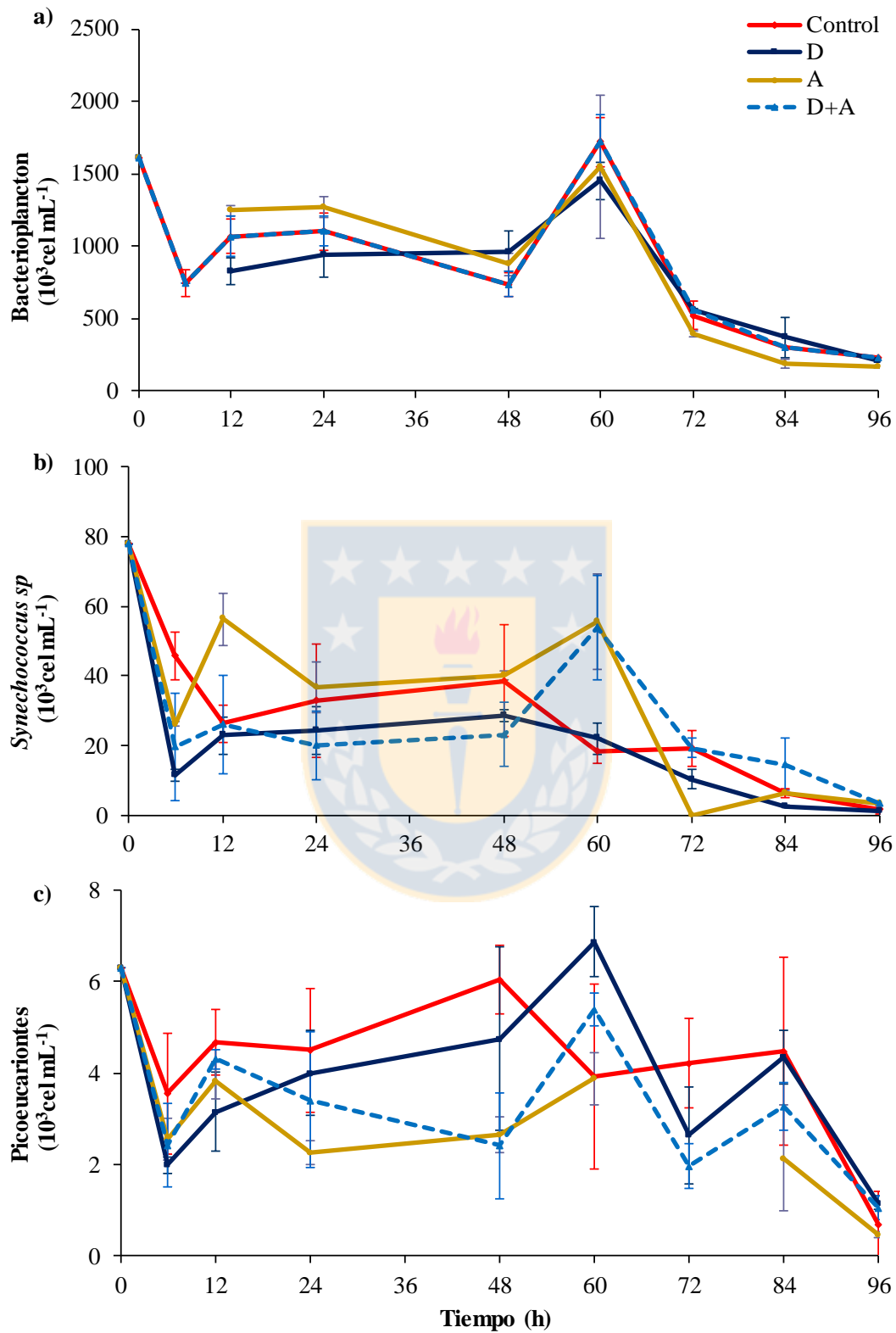


Figura 3.12. Abundancia celular (10^3 cel mL^{-1}) registrada durante la ejecución del experimento III. a) Bacterioplankton. b) *Synechococcus sp.* c) Picoeucariontes. Fuente: Elaboración propia.

En relación a la abundancia de *Synechococcus sp.* (Figura 3.12b), no se observaron diferencias significativas entre las abundancias de los tratamientos y el control. Sin embargo, durante la ejecución del experimento se registraron dos aumentos de abundancia, ambos en el tratamiento A, el primero en T12 y el segundo en T60, en ambos casos el valor promedio alcanzado fue de $56 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$.

Respecto a la abundancia de organismos picoeucariontes (Figura 3.12c), no se registraron diferencias significativas entre las abundancias de los tratamientos y el control entre T6 ($F=1,41$; g. l=3; $p>0,05$) y T24 ($F=1,49$; g. l=3; $p>0,05$). Por el contrario, entre T48 ($F=8,42$; g. l=3; $p<0,05$) y T72 ($F=6,99$; g. l=3; $p<0,05$) fue posible observar diferencias significativas entre las abundancias de los distintos tratamientos y el control. Igualmente, durante el desarrollo del experimento, se registró un único aumento de abundancia, observado en el tratamiento D, durante T60, alcanzando $6,9 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$. De igual manera se observaron disminuciones de abundancia en todos los tratamientos y el control en T96, con promedios que variaron entre $0,5 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (A) y $1,2 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (D). Adicionalmente, durante T84 ($F=1,16$; g. l=3; $p>0,05$) y T96 ($F=1,11$; g. l=3; $p>0,05$) no se obtuvieron diferencias significativas entre las abundancias celulares de los tratamientos y el control.

3.1.5.2. Variación de la concentración de nutrientes

Se observó un aumento en la concentración de nitrato en los tratamientos D ($7,7 \mu\text{M}$) y A ($8,4 \mu\text{M}$), además de una disminución en el control ($5,7 \mu\text{M}$), el cual, de manera opuesta, en T48 presentó un aumento de su concentración, alcanzando los $8,3 \mu\text{M}$ (Figura 3.13a). Igualmente, en T48, se observó una disminución en los tratamientos D ($6,2 \mu\text{M}$) y A ($7,2 \mu\text{M}$), mientras que en T96 se observó un leve aumento de las concentraciones de nitrato de los tratamientos y el control, registrando valores entre $6,1$ (A) y $6,9 \mu\text{M}$ (control). Durante el experimento no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de nitrato de los distintos tratamientos y el control.

Respecto a la variación de la concentración de nitrito (Figura 3.13b), se observó una disminución de la concentración en el control ($0,21 \mu\text{M}$) y un aumento en los tratamientos D ($0,29 \mu\text{M}$) y A ($0,27 \mu\text{M}$). De manera opuesta, a partir de T48 se visualizó un aumento de la concentración de nitrito en el control y una disminución en todos los tratamientos. Mientras que en T96 se observó un aumento de concentración en los tratamientos,

alcanzando valores entre 0,19 (D) y 0,22 μM (D+A). Además, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de nitrito de los distintos tratamientos y el control.

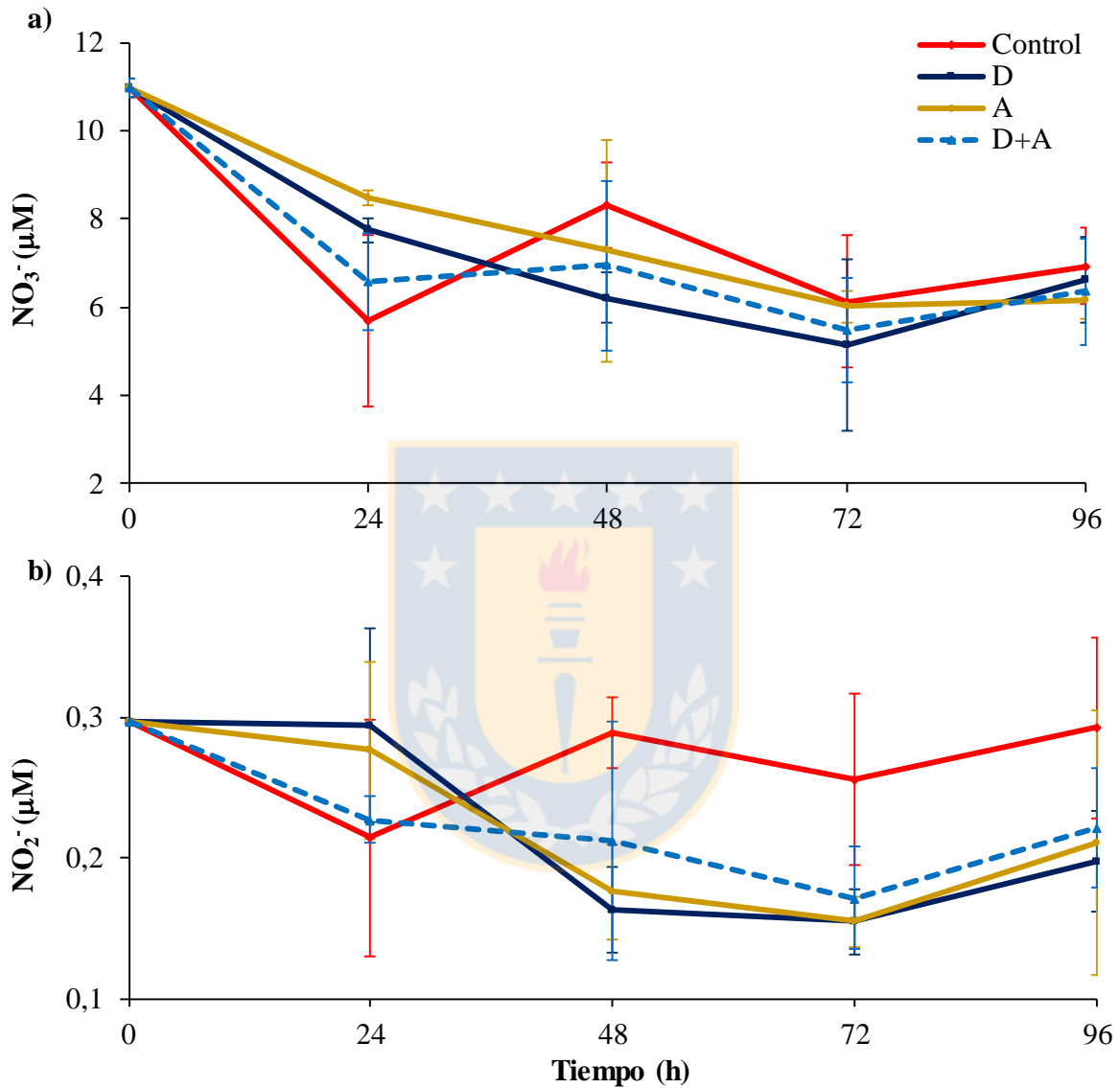


Figura 3.13. Concentración de nutrientes (μM) registrada durante la ejecución del experimento III. b) NO_3^- . a) NO_2^- . Fuente: Elaboración propia.

3.2. Capítulo 2: Efecto de la presencia de los pesticidas benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre la tasa de asimilación de carbono *in situ*

Artículo en preparación

Claudia Margarita Rojas Pérez

Magister en Ciencias mención en Oceanografía

Universidad de Concepción

Resumen

La acuicultura se ha convertido en un importante componente de la economía chilena, especialmente en la zona sur, donde la salmonicultura es una industria activa. Sin embargo, las condiciones inadecuadas en los cultivos de salmón (p. e. alta densidad de cultivo) pueden producir un aumento del estrés y la susceptibilidad a epidemias parasíticas, como el copépodo *Caligus rogercresseyi*. El potencial efecto de los pesticidas utilizados contra este piojo del mar, sobre la microbiota no objetivo y la estructura y funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, ha recibido poca atención. El objetivo de este estudio fue investigar la respuesta de las comunidades microbianas naturales a la adición de tres pesticidas anti-piojos (p.e. azametifos, deltametrina y benzoato de emamectina) y el potencial impacto sobre la actividad foto y quimioautotrófica en el centro y sur de Chile (37°S a 42 ° S). La aplicación de los pesticidas en aguas marinas produjo cambios en la incorporación de carbono. Estos efectos fueron significativos al aplicar un solo pesticida, principalmente benzoato de emamectina. En las aguas superficiales de la Bahía de Llico, el benzoato de emamectina produjo una disminución de un 60-90% en la asimilación carbono foto y quimioautotrófico. También se observaron efectos positivos en la producción primaria *in situ* tras la adición del pesticida azametifos en el Canal Caucahue. Sin embargo, esta estimulación fue limitada y posiblemente está relacionada con el suministro de nitrógeno y fosfato, para los requerimientos de fitoplancton, por el organofosfato azametifos.

1 **Potential responses of photo and chemoautotrophic carbon uptake under pesticides**
2 **currently used in salmon farming in Chile**

3 Rain-Franco, A.^a, Rojas, C.^b, Fernandez, C.^{a, c, d*}

4
5 ^a*Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepción,*
6 *O'Higgins 1695, Concepción, Chile.*

7 ^b*Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, University of*
8 *Concepcion, Barrio universitario s/n, Casilla 160-C. Concepción, Chile.*

9 ^c*COPAS SUR-AUSTRAL (PFB-31), University of Concepción, Concepción, Chile.*

10 ^d*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire d'Océanographie*
11 *Microbienne (LOMIC), Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/mer, France.*

12
13 *Corresponding author: Camila Fernandez, fernandez@obs-banyuls.fr.
14 tel.+33 (0)4 30 19 24 31.

15
16
17 **Abstract**

18 Aquaculture has become an important component of Chilean economy, especially in the
19 southern region, where the salmon farming is an active industry. However, inadequate
20 conditions in salmon cages (e.g. high density cultures) can produce increasing stress and
21 susceptibility to parasitic epidemics such as the copepod *Caligus rogercresseyi*. The
22 potential effect of pesticides used against the sea lice on non-target microbiota and the
23 structure and functioning of aquatic ecosystems has received little attention. The objective
24 of this study was to investigate the response of natural microbial communities to the
25 addition of three anti-lice pesticides (e.g. azamethiphos, deltamethrin and emamectin
26 benzoate) and the potential impact on photoautotrophic and chemoautotrophic activity in
27 central and southern Chile (37°S to 42°S). The influence of pesticides on marine waters
28 produced changes in carbon uptake. These effects were significant if a single pesticide was
29 applied, mainly emamectin benzoate. In the surface waters of Llico Bay, emamectin
30 benzoate produced a 60-90% decrease for both photo and chemoautotrophic carbon
31 fixation. Positive effects were also observed for *in situ* primary production after addition of
32 the pesticide azamethiphos in the Caucahue channel. However, such stimulation was

33 limited and possibly related to the supply of nitrogen and phosphate for phytoplankton
34 requirements by the organophosphate azamethiphos.

35

36 **Keywords**

37 Emamectin benzoate; Deltamethrin; Azamethiphos; Salmon farming; primary production

38

39 **1. Introduction**

40 During the last 20-years, aquaculture has grown steadily as an alternative to the use of
41 fishery resources (Duarte et al., 2007; FAO, 2016). In southern Chile, aquaculture has
42 become an important component of the economy (Medina and Ramos-Jiliberto, 2009),
43 especially salmon farming (Burrige et al., 2010).

44 Along with an increase in production, an increase of salmon susceptibility to parasitic
45 infections has been steadily observed (Burrige et al., 2010). The copepod *Caligus*
46 *rogercresseyi* is the most important parasite currently affecting salmon farms in Chile
47 (Bravo et al., 2013). It causes economic losses estimated in US\$0.30 per kg (Carvajal et al.,
48 1998). Chemical products are necessary to increase fish survival rates and controlling the
49 development of sea lice blooms. Between 2000 and 2007, only emamectin benzoate was
50 authorized for the treatment of *C. rogercresseyi* infections in Chile, as a food additive
51 (Sevatdal et al., 2005; Stone et al., 2000). When administered at a dose of 50 $\mu\text{g kg fish}^{-1}$
52 day^{-1} during seven days, its use can reduce the caligus population by 90% (juvenile
53 chalimus and adult stages (Bravo et al., 2012). However, evidence of resistance developed
54 by *C. rogercresseyi* to emamectin benzoate, the use of deltamethrin, a synthetic pyrethroid
55 applied as a bath treatment was authorized (Burrige et al., 2010). Deltamethrin interferes
56 with the transmission of nerve impulses, causing paralysis and the subsequent death of the
57 parasite (Burka et al., 2012). Since 2013, the organophosphate azamethiphos was approved
58 for use in salmon farming. This compound inhibits the activity of acetylcholinesterase
59 increasing the control of the sea lice (Bravo et al., 2015; Burrige et al., 2010; Kazemi et
60 al., 2012).

61 The pesticides used in sea lice treatment were initially developed for the control of parasites
62 in livestock, so their effects on the aquatic environment were initially unknown (Burrige et
63 al., 2010; Nash, 2003). However, the potential effect of these substances on non-target

64 species and the structure and functioning of aquatic ecosystems is still poorly understood
65 (Burrige et al., 2010; Buschmann et al., 2006). For this reason, Medina et al. (2004)
66 suggest the necessity of studies using microcosms and mesocosms allowing the observation
67 of the direct and indirect effects generated by the application of these compounds in
68 exposed communities (Medina et al., 2004).

69 Carbon fixation into organic matter is essential to the ecosystems and is mainly associated
70 to photoautotrophic phytoplankton (Field et al., 1998) and chemoautotrophic bacteria in
71 dark conditions (Boschker et al., 2014). However, many factors have been suggested to
72 limit growth in oceanic and coastal systems, including nutrient concentration and light
73 intensity (Iriarte et al., 2007). Nonetheless, the increase in agricultural and aquaculture
74 activities, as well as the melting of glaciers (Pantoja et al., 2011), could generate new inputs
75 of nutrients to aquatic systems, altering nutrient concentrations and consequently changing
76 phytoplankton structure (Beman et al., 2005; Iriarte et al., 2010; Labbé-Ibañez et al., 2015;
77 Olsen et al., 2014). Although some organic compounds can add nutrients (N, P) into the
78 water column, there has been no research on the direct effects of pesticides on marine
79 primary production.

80
81 The goal of our study was to investigate the potential responses of natural microbial
82 communities through photoautotrophic and chemoautotrophic carbon fixation to the
83 addition of three pesticides used against *C. royercreyii*: emamectin benzoate, deltamethrin
84 and azamethiphos.

85

86 **2. Materials and Methods**

87 **2.1. Study area and oceanographic survey**

88 Incubations of primary production were conducted in two study areas in central-southern
89 Chile: The Llico bay located south of Golfo de Arauco (37.1°S 73.5°W; Fig. 1A) on board
90 of R/V Kay Kay II (University of Concepción) and The Cauahue Channel located at
91 Chiloé Island in Northern-Patagonia (42.1°S 73.4°W; Fig.1B) on board L/M “Don José”.
92 The Llico Bay was visited 5 times between December 2014 and April 2016 (Table 1). The
93 Cauahue Channel was visited twice, the first cruise was carried out in June 2014 and a
94 second cruise was performed in January 2015 (Table 1).

95 In order to follow the hydrographic variability of the water column we used a CTDO sensor
96 data (SAIV A/S, Norway) at Cauahue. At Llico Bay we used CTD Minus X (AML
97 Oceanographic, Canada) for stations inside the Bay.

98 In order to characterizing the chemical and biological variability in every oceanographic
99 cruise, discrete sampling was performed using Niskin bottles. For Llico campaign samples
100 were taken from Llico Bay (Stations BLL1, BLL2 and BLL3; Table 1). Similarly, during
101 Cauahue channel cruises profiles were performed at stations Q1, Q2, Q3, Q5, Q6, Q9, Q10
102 and Qc (Table 1 and Fig. 1B).

103 Bacterioplankton and *Synechococcus sp.* abundances were determined by flow cytometry
104 (Marie et al., 2000) at the Laboratory for Oceanographic Processes and Climate (PROFC),
105 University of Concepcion (Chile). Nutrient samples were collected to determine nitrate
106 (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) and phosphate (PO_4^{3+}) concentrations. N/P ratio was estimated by the
107 addition of NO_3^- and NO_2^- dividing by PO_4^{3+} . Samples were prefiltered by $0.7 \mu\text{m}$ and then
108 stored at -20°C until a colorimetric analysis using a Brann Luebbe autoanalyzer (Aminot
109 and K erouel, 2007). Total Chlorophyll-a (Chl-a) was estimated using a Turner Design
110 fluorometer (Holm-Hansen et al., 1965).

111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125

126 **Table 1.** Geographical location of the sampled stations in Llico Bay and Caucahue
 127 Channel. * *In situ* Primary production experiment only in Caucahue summer 2015. ** *In*
 128 *situ* Primary production experiment only in Caucahue winter 2014.

| Study area | Station ID | Latitude (°S) | Longitude (°W) | Depths of sampling (m) |
|------------|------------|---------------|----------------|---------------------------|
| Llico | BLL1 | 37.192 | 73.547 | 2, 4, 6 |
| Llico | BLL2 | 37.159 | 73.563 | 2, 10, 15 |
| Llico | BLL3 | 37.137 | 73.574 | 2, 10, 20 |
| Caucahue | Q1 | 42.135 | 73.458 | 2, 10, 20 |
| Caucahue | Q2 | 42.117 | 73.422 | 2, 10, 20, 30, 40 |
| Caucahue | Q3* | 42.102 | 73.409 | 2, 10, 20, 30,50 |
| Caucahue | Q5 | 42.108 | 73.366 | 2, 10, 20, 30, 50, 60 |
| Caucahue | Q6** | 42.130 | 73.365 | 2, 10, 20, 30 |
| Caucahue | Q8 | 42.205 | 73.380 | 2, 10, 20, 30 |
| Caucahue | Q9 | 42.165 | 73.429 | 2, 10, 20, 30, 50 |
| Caucahue | Q10 | 42.151 | 73.446 | 2, 10, 30 |
| Caucahue | Qc | 42.028 | 73.325 | 2, 10, 20, 30, 50, 65, 80 |

129

2.2. *In situ* carbon uptake experiments

Rates of carbon uptake were measured using the (^{13}C) stable isotopes technique (Fernandez and Farías, 2012; Slawyk and Raimbault, 1995). Incubations started at sunrise and were done using an in situ mooring line. The water was taken by Niskin bottles and then distributed in polycarbonate bottles (previously autoclaved) were filled with 620 mL and then inoculated with 0.5 mL of Sodium bicarbonate C-13 (Icon Isotopes IC 4628). At sunset, the bottles were recovered and filtered by Whatman GF/F filters (precombusted at 450°C, 4h) using a vacuum pump. Filters were maintained at -20°C until analysis by isotope mass spectrometry at the Laboratory for Biogeochemistry and Applied Stable Isotopes (LABASI) of Pontificia Universidad Católica de Chile using a Thermo Delta V Advantage IRMS coupled with a Flash2000 Elemental Analyzer.

Deltamethrin and Azamethiphos were amended to primary production incubations at doses determined according to concentrations used in sea lice treatments ($3 \mu\text{g L}^{-1}$ for deltamethrin) (Siwicki et al., 2010) and 0.2 mg L^{-1} azamethiphos (Burrige et al., 2010; Canty et al., 2007; Davies et al., 2001). For Emamectin benzoate, the dose was estimated by dividing the standard into two equal parts, in order to obtain the highest possible experimental concentration.

Incubation depths were determined from the compensation depth (~2.7 times the depth of view of the Secchi disk) both at Llico Bay (photic zone of 10 m) and Cauahue channel (photic zone of 30 m), where the light availability allows the phytoplankton growth, and the oxygen produced (photosynthesis) is equal to that consumed by respiration. In Llico Bay, stations BLL2 and BLL3 were sampled at 2 and 10 m while BLL1 was sampled at 2 and 4 m (see Table 2). Integrated primary production was estimated using all the incubation depths.

161 **Table 2.** Summary of *in situ* incubations of primary production during the Llico and Caucahue cruise.

| Location | Dates | Season | Stations of <i>in situ</i> primary production | Pesticides solution concentration and isotopes |
|-----------------|---------------|---------------|--|---|
| Caucahue | 18-30/06/2014 | Winter 2014 | Q2, Q5, Q6, Q9, Qc | ^{13}C ($0.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$), Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$) |
| Caucahue | 20-30/01/2015 | Summer 2015 | Q2, Q3, Q5, Q9, Qc | ^{13}C ($0.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$), Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$) |
| Llico | 01-05/12/2014 | Spring 2014 | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C ($0.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$), Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$), Deltamethrin ($3.0 \mu\text{mol L}^{-1}$), Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Deltamethrin ($3.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) |
| Llico | 21-25/07/2015 | Winter 2015 | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C ($0.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$) + Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$), Deltamethrin ($3.0 \mu\text{mol L}^{-1}$), Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Deltamethrin ($3.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) |
| Llico | 21-25/10/2015 | Spring 2015 | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C ($0.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$) |
| Llico | 05-09/01/2016 | Summer 2016 | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C ($0.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$) |
| Llico | 21-29/04/2016 | Autumn 2016 | BLL1, BLL2, BLL3 | ^{13}C ($0.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$), Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$), Deltamethrin ($3.0 \mu\text{mol L}^{-1}$), Azamethiphos ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Deltamethrin ($3.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) |

162

2.3. On deck carbon uptake experiments

In order to simultaneously study photo and chemoautotrophic carbon uptake, several on deck experiments using stable isotopes (^{13}C) were performed with 2 m water of station BLL2 (Fig. 1). These experiments were carried out in winter 2014, spring 2015, summer 2016 and autumn 2016 (Table 1) at Llico town (Fig. 2).

In order to simulate solar radiation, we performed atmospheric measurements of incident solar radiation (PAR; 400–700 nm) using a portable radiometer (RM-21 Dr. Gröbel, Germany). Values of PAR are expressed in Wm^{-2} . For simulating natural light condition photoautotrophic, samples were incubated under two cutoff filters: 0.3 Neutral density 209 (47% of average transmittance between 400-700 nm) and a Steel Blue 117 (www.leefilters.com). Dark treatments were put in a closed incubator. Temperature conditions were maintained with a continuous flow of water in order to keep a constant temperature through the development of the experiment.

Seawater (580 mL) was poured into Duran Schott bottles and amended with ^{13}C solution and 1 mL with a solution pesticides at concentrations described in the Table 2. The pesticide treatments used were azamethiphos, deltamethrin emamectin benzoate (0.66 mmol L^{-1} , Dr. Ehrenstorfer GmbH; thereafter 13C+B) and combined azamethiphos and deltamethrin treatments (13C+AD) and the combination of azamethiphos, deltamethrin and emamectin benzoate (13C+ADB). Only experiment of Llico during spring 2014 did not have combined treatments. All treatments were performed in duplicate.

2.4. Carbon uptake estimations

Carbon tracer was $3.6456 \text{ mg } ^{13}\text{C mL}^{-1}$ ($0.5 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$). A volume of 0.5 mL was added to each sample. Carbon uptake rates ($\text{mg C m}^{-3} \text{ t}^{-1}$) were computed according Slawyk and Raimbault (1995) and Fernandez and Farias (2012) following the equation (1):

$$\rho DI^{13}\text{C} = [((\%R_{\text{POC}} - 1.112) * (\text{POC} * 1000 / 12 * V_f)) / \%R_{\text{DIC}}] * 12 / 1000 \quad \text{Eq. (1)}$$

Where V_f is the filtrated volume, POC represents the quantity of particulate carbon obtained by mass spectroscopy (μg) and $\%R_{\text{POC}}$ is the enrichment in ^{13}C in the GF/F filter

193 after the incubation. %R_{DIC} is the excess of enrichment of ¹³C after the inoculation (T₀)
194 computed according equation (2):

195

$$196 \quad \%R_{DIC} = \frac{((^{13}C * ^{13}DIC / V_B) + (DIC_i * 0.0112))}{(DIC_i - (^{13}C * ^{13}DIC) / V_b)} \quad \text{Eq. (2)}$$

198

199 Where ¹³C is the volume of isotopic solution, ¹³DIC represents the concentration of ¹³C
200 added. The term 0.0112 represents the natural abundance (average) of ¹³C, DIC_i represents
201 the concentration of DIC in the sample before the tracer addition (Fernández I. et al., 2005;
202 Slawyk et al., 1977). This value was 26 mg C L⁻¹ for Llico bay. In the case of Caucahue
203 channel the value as computed as the average of previous studies in the inner sea of Chiloé
204 (25.1 mg C L⁻¹) (Alarcon et al., 2015; Jantzen et al., 2013). For in situ incubations the rate
205 was multiplied by 12 for obtained the daily carbon fixation rate (mg C m⁻³ d⁻¹) while in the
206 on-deck experiments, the rates were expressed in mg C m⁻³ h⁻¹.

207

208 **2.5. Statistical analysis**

209 For Caucahue (triplicate) and Llico (duplicate) data, paired t-tests were performed in order
210 to compare treatments with respect to control conditions. To determine if there was
211 significant variation between carbon fixation experiments among treatments, a 2-way
212 ANOVA was computed with the “ANOVA.2way.R” function (Legendre, 2007).
213 Homogeneity of variance was tested by the Bartlett’s test whereas data did not pass the test
214 a log transformation was implemented. If there was a significant difference, a multiple t-
215 test with a Bonferroni correction was performed. All statistical analyses were performed
216 using the software R (<https://www.r-project.org/>).

217

218 **3. Results**

219 **3.1. Seasonal environmental variability in central Chile**

220 Temperature and salinity in Llico Bay stations varied between seasons but were observed
221 similar trends among stations (Fig.2). Stratification due temperature were registered during
222 summer and spring with maximum values in BLL1 and BLL2 (~16°C), whereas in winter
223 profiles showed lower salinities in BLL1 and BLL2 (31.5 PSU). Nitrate presented higher

224 concentrations in spring 2014 and winter 2015 compared to spring 2015, summer 2016 and
225 autumn 2016 (Fig.3). No seasonally was observed in phosphate concentrations at Llico
226 Bay. The station BLL1 presented an average concentration of $1.491 \pm 0.555 \mu\text{mol L}^{-1}$, the
227 PO_4^{3+} station BLL2 was $1.656 \pm 0.644 \mu\text{mol L}^{-1}$ and for BLL3 was $1.190 \pm 0.521 \mu\text{mol L}^{-1}$.
228 The N/P ratio were varied between seasons with lowest values estimated during summer
229 2016 at BLL3 for 2 and 10 m (0.31 and 0.50, respectively). Also, BLL3 station presented
230 the maximum N/P ratios during spring 2015 at 2 and 10 m (27.98 and 29.51, respectively;
231 Fig. 3). The highest Chl-a concentrations were registered in spring 2014, specifically at
232 BLL1 station (44.82 mg m^{-3}), followed by summer 2016 and spring 2015 (Fig. 3D). The
233 lowest Chl-a value was observed in winter season (0.72 mg m^{-3}).
234 Microbial abundances showed small changes among stations at Llico Bay with exception of
235 spring season in 2015 (Fig. 4). The bacterioplankton abundance (BA) presented in almost
236 all seasons levels $\sim 1000 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ with maximum values registered during spring
237 2015 at BLL2 ($3990 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$). The cyanobacteria *Synechococcus sp.* showed
238 abundances $< 10 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$, at Llico Bay. However, during spring 2015 the abundance
239 of *Synechococcus sp.* was in average $27 \pm 20 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ and the maxima was in the
240 station BLL3 ($78 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$).

241

242 **3.2. *In situ* carbon uptake in central Chile**

243 Carbon uptake rates were variable among stations in the Llico Bay (Fig. 5). Station BLL1
244 showed constant levels of carbon fixation ($398 \pm 114 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) except in autumn 2016
245 when the lowest rates were estimated ($48 \pm 9 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and $57 \pm 3 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, 2 and 4
246 m depth respectively). Station BLL2 presented maximum rates at 2 meters in spring 2014
247 and summer 2016 ($1215 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and $571 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectively) and minimum
248 values in winter and autumn ($283 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and $298 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectively). The
249 carbon assimilation rates at BLL3 were variable and showed a subsurface maximum at 10
250 m in spring 2014 and spring 2015 ($496 \pm 15 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and $217 \pm 12 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$,
251 respectively). Integrated primary production at station BLL1 peaked in spring with 1.92 g C
252 $\text{m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ while the lowest estimations were reached in autumn ($0.20 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Stations
253 BLL2 and BLL3 showed high and similar primary production levels during summer with

254 3.69 and 3.80 g C m⁻² d⁻¹, respectively. Winter values of integrated primary production
255 rates reached 0.65 g C m⁻² d⁻¹ for BLL2 and 0.43 g C m⁻² d⁻¹ for BLL3.

256 Results for paired t-test per station revealed different responses of carbon assimilation rates
257 to the addition of pesticides and combinations of pesticides. During spring 2014, negative
258 effects were observed with 13C+D specifically at BLL1 station (paired t-test, p<0.001)
259 compared to the control. The reduction reached 23 and 30% at 2 and 4 m, respectively. For
260 winter 2015 only station BLL3 showed increased C fixation in the presence of 13C+D
261 (paired t-test, p<0.003). The increase was close to 6 and 54% at 2 and 10 m, respectively.
262 Finally, no significant differences were found for pesticide additions at any station during
263 the autumn season.

264

265 **3.3. Pesticide effect experiments of photoautotrophic and** 266 **chemoautotrophic carbon uptake**

267 Incident PAR radiation was highest during the experiment in spring 2015 (median of 350
268 W m⁻² at 13 h) and lowest in autumn 2016 (median of 70 W m⁻² at 12 hrs). Pattern observed
269 in hourly fluctuation of solar radiation was related time of the day and local cloudiness
270 (Fig. 6A-D).

271 Time course experiments showed that photoautotrophic carbon uptake at 2 hours was
272 higher in spring and summer (37.55 and 29.39 mg C m⁻³ h⁻¹, respectively) compared to
273 autumn (7.89 m C m⁻³ h⁻¹) and winter (24.01 mg C m⁻³ h⁻¹). In all cases, rates exceeded *in*
274 *situ* rates. Chemoautotrophic rates were also high and exceeded in spring the values of
275 photoautotrophic activity (26.55 mg C m⁻³ h⁻¹ and 45.99 for 2 and 4 hours of incubation,
276 respectively; Fig.6 E-L). Additionally, the magnitude of dark carbon uptake related to
277 photoautotrophic uptake varied during the incubation time and the season of the
278 experiments. In the experiment carried out in spring the chemoautotrophic uptake
279 represented 70%-74% at 2 and 4 of incubation of photoautotrophic activity. In contrast, in
280 winter chemoautotrophic activity represented the 5 to 20% of photoautotrophic carbon
281 fixation. Results of 2-way ANOVA for dark incubations showed significant differences in
282 each experiment (Table 3). Only in spring 2015 the experiment showed a significant effect
283 of pesticides on the dark carbon uptake (p=0.001) and also in the interaction of the factors
284 (Pesticides per Incubation time, p=0.028). These carbon uptake rates were significantly

285 different ($p < 0.05$) in the treatments 13C+B and 13C+ADB compared to the rest of the
286 treatments and the control both at 2 and 6 hours of incubation (Table 4).

287 Results of 2-way ANOVA under light conditions showed significant differences for all the
288 experiments. Carbon uptake rates for spring winter 2015 experiment under light conditions
289 presented significant differences between the ^{13}C control and the treatments 13C+A and
290 13C+B ($p = 0.012$ and $p < 0.001$, respectively). After 6 hours of incubation, only significant
291 differences between 13C+A and 13C+B ($p = 0.042$) were found. Phototrophic carbon uptake
292 rates during spring 2015 were significantly different ($p < 0.05$) in the treatments 13C+B and
293 13C+ADB in comparison with all other pesticides treatments and the control after 2 hours
294 and 6 hours of incubation (Table 4). Light treatments during summer 2016 at 2 hours of
295 incubation did not show significant differences respect the control ($p > 0.05$), however at 6 h
296 the treatments 13C+B and 13C+ADB were significantly different to all the treatments
297 ($p < 0.05$). No significant differences were found between 13C+D and 13C+AD ($p = 0.670$).

298



299 Table 3. Results from 2-way ANOVA examining the effect of pesticides and the time of
 300 incubation on the rates of carbon uptake under dark and light conditions in Llico Bay.
 301 Significant values are presented in bold.

| Season | Date | Source of variation | d.f | Dark | | d.f | Light | |
|----------------|--------------|---------------------|-----|----------|--------------|-----|----------|--------------|
| | | | | <i>F</i> | <i>P</i> | | <i>F</i> | <i>P</i> |
| Winter 2015 | July 205 | Pesticides | 3 | 0.516 | 0.688 | 3 | 59.800 | 0.001 |
| | | Time | 1 | 14.213 | 0.007 | 1 | 24.921 | 0.001 |
| | | Pesticides x Time | 3 | 0.134 | 0.957 | 3 | 9.152 | 0.010 |
| | | Residuals | 8 | | | 8 | | |
| Spring 2015 | October 2015 | Pesticides | 5 | 56.720 | 0.001 | 5 | 216.539 | 0.001 |
| | | Time | 1 | 0.917 | 0.357 | 1 | 0.479 | 0.548 |
| | | Pesticides x Time | 5 | 4.058 | 0.029 | 5 | 4.800 | 0.028 |
| | | Residuals | 12 | | | 12 | | |
| Summer 2016 | January 2016 | Pesticides | 5 | 0.320 | 0.899 | 5 | 4.944 | 0.008 |
| | | Time | 1 | 14.099 | 0.007 | 1 | 3.453 | 0.078 |
| | | Pesticides x Time | 5 | 0.406 | 0.829 | 5 | 3.291 | 0.031 |
| | | Residuals | 12 | | | 12 | | |
| Autumn 2016 | April 2016 | Pesticides | 5 | 1.901 | 0.157 | 5 | 2.125 | 0.138 |
| | | Time | 1 | 26.395 | 0.004 | 1 | 26.380 | 0.001 |
| | | Pesticides x Time | 5 | 0.787 | 0.568 | 5 | 2.482 | 0.097 |
| | | Residuals | 12 | | | 12 | | |

302 Table 4. Results from pairwise t-test for the on deck carbon fixation experiments performed in Llico Bay.

303 +: represents $p < 0.05$. *: represents $p < 0.001$. na: no comparison.

304

| Season | Light Condition | Incubation time | Incubation time | 2 | | | | | | 6 | | | | | |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|------|--------|---------|----------|--------|--------|------|--------|---------|----------|--------|
| | | | | Pesticides | 13 C | 13C+ A | 13C+A D | 13C+A DB | 13C+ B | 13C+ D | 13 C | 13C+ A | 13C+A D | 13C+A DB | 13C+ B |
| Winter 2015 | Light | 2 | 13C+A | + | | | | | | | | | | | |
| | | | 13C+AD | na | na | | | | | | | | | | |
| | | | 13C+ADB | na | na | Na | | | | | | | | | |
| | | | 13C+B | * | + | Na | Na | | | | | | | | |
| | | | 13C+D | | | Na | Na | * | | | | | | | |
| | | 6 | 13C | + | | Na | Na | + | | | | | | | |
| | | | 13C+A | + | | Na | Na | + | | | | | | | |
| | | | 13C+AD | na | na | Na | Na | Na | na | na | na | na | | | |
| | | | 13C+ADB | na | na | Na | Na | Na | na | na | na | na | Na | | |
| | | | 13C+B | * | + | Na | Na | | * | + | + | Na | na | | |
| | | | 13C+D | + | | Na | Na | + | | | | Na | na | + | |
| Spring 2015 | Dark | 2 | 13C+A | | | | | | | | | | | | |
| | | | 13C+AD | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|---------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|
| Spring 2015 | Light | 6 | 13C+ADB | + | + | + | | | | | | | | | |
| | | | 13C+B | + | + | + | | | | | | | | | |
| | | | 13C+D | | | | + | + | | | | | | | |
| | | | 13C | | | | + | + | | | | | | | |
| | | | 13C+A | | | | + | + | | | | | | | |
| | | | 13C+AD | | | | + | * | | | | | | | |
| | | 13C+ADB | * | * | * | | | * | * | * | * | | | | |
| | | 13C+B | * | * | * | | | * | * | * | * | | | | |
| | | 13C+D | | | | + | * | | | | | * | * | | |
| | | 13C+A | | | | | | | | | | | | | |
| | | 13C+AD | | | | | | | | | | | | | |
| | | 2 | 13C+ADB | * | * | * | | | | | | | | | |
| 13C+B | * | * | * | | | | | | | | | | | | |
| 13C+D | | | | * | * | | | | | | | | | | |
| 6 | 13C | | | | * | * | | | | | | | | | |
| 13C+A | | | | * | * | | | | | | | | | | |
| 13C+AD | | | | * | * | | | | | | | | | | |
| 13C+ADB | * | * | * | | | * | * | * | * | | | | | | |
| 13C+B | * | * | * | | | * | * | * | * | | | | | | |
| 13C+D | | | | * | * | | | | | * | * | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------|---------|---------|----|----|----|----|----|----|---|---|--|---|---|--|
| Summe r 2016 | Light | 2 | 13C+A | na | | | | | | | | | | | |
| | | | 13C+A+D | | na | | | | | | | | | | |
| | | | 13C+ADB | | na | | | | | | | | | | |
| | | | 13C+B | na | na | Na | Na | | | | | | | | |
| | | | 13C+D | | na | | | Na | | | | | | | |
| | 6 | 13C | na | na | Na | Na | Na | na | | | | | | | |
| | | 13C+A | | na | | | Na | | na | | | | | | |
| | | 13C+AD | | na | | | Na | | na | | | | | | |
| | | 13C+ADB | | na | | | Na | | na | | | | | | |
| | | 13C+B | | na | | | Na | | na | + | + | | | | |
| | | 13C+D | | na | + | + | Na | | na | | | | + | + | |

305

3.4. Seasonal environmental variability in Caucahue channel, Chiloé

306
307 Caucahue Channel was characterized by seasonal variability between winter and summer.
308 Temperature during winter was lower (11°C) in the water column and weak fluctuations with
309 depth were observed compared with summer (Fig. 7A-B). Summer showed higher
310 temperatures in first 30 meters all the stations compared to Qc (Fig. 7A). The structure of
311 salinity in the Caucahue Channel showed stronger vertical variations in winter compared to
312 summer. During winter, salinity profiles showed the influence of freshwater restricted to the
313 first 2 m and values remained stable with depth (Fig. 7C), no vertical changes in salinity were
314 observed for summer (Fig. 7D).

315 Nitrate concentrations in winter were low in almost all the stations with exception of Q6 and
316 Q2 which showed several maximum values (Fig. 8A). Similarly, summer showed low nitrate
317 values. However a subsurface peak of nitrate was observed at stations Q5 and Q6 at 20 meters
318 depth (Fig. 8A). Phosphate concentrations during summer did not increase with the depth
319 showing average concentration of 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with exception of stations Q5 and Q6, however
320 in winter season reported a PO_4^{3+} increased with the depth even in the station Qc reaching ~2
321 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig 8B, F). The ratio between inorganic nitrogen (NO_3^- , NO_2^-) and phosphorous
322 (PO_4^{3+}) varied with depth and between stations and seasons (Fig. 9C, G). Station Qc showed
323 the lowest average N/P ratio (1.71 ± 1.17 , 2.84 ± 1.14 in winter and summer, respectively).
324 Stations Q2 and Q5 presented the highest N/P ratio in winter season at 20 and 2 m (14.95 and
325 22.84, respectively).

326 Winter concentrations of Chl-a were in average 4-times lower than summer values (Fig. 8D,
327 H). In winter the stations with highest concentrations were Q8 and Qc with surface levels
328 around 0.613 mg Chl-a m^{-3} and 0.516 mg Chl-a m^{-3} , respectively. Whereas in summer the
329 stations with highest concentrations were Q1 (3.894 mg Chl-a m^{-3}), Q2 (1.544 mg Chl-a m^{-3}),
330 Q3 (1.855 mg Chl-a m^{-3}) and Qc (3.155 mg Chl-a m^{-3}).

331 Microbial abundances in the Caucahue Channel varied between stations and seasons.
332 Bacterioplankton in winter was more abundant at Q6, Q8, Q9 and Q10 compared to Qc (Fig.
333 9A, B). In summertime, the abundance of bacterioplankton were 6-times higher than winter
334 (Fig. 9C). The maximum abundances were observed at stations Q9 ($1837 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$), Q10
335 ($1632 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$) and Q1 at 10 m ($1736 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$; Fig.9D). Station Qc presented
336 abundances $< 1000 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$. Overall, *Synechococcus sp.* were 50-fold higher in summer

337 than winter (Fig. 10). *Synechococcus sp.* presented higher values at stations Qc, Q8 and Q9
338 ($\sim 3 \times 10^3$ cell mL⁻¹) than rest of the stations in the channel in winter 2014 (Fig.10A, B).
339 Summer 2015 showed the highest abundances in the stations Q9, Q10, Q1 (located at the
340 south of the channel).

341

342 **3.5. Primary production in Caucahue channel**

343 Primary production estimated by *in situ* incubation presented high variability through the
344 channel and between seasons (Fig.11; Fig.12). During winter carbon uptake in Caucahue
345 channel reached 10 mg C m⁻³ d⁻¹ at 2 m decreasing with depth. At Qc station the surface
346 uptake rate was higher (20 mg C m⁻³ d⁻¹ at 2 m). Pesticide additions resulted in an increase in
347 fixation rates only for the treatment 13C+A at station Qc (paired t-test, p= 0.028). Rates at Qc
348 presented an increase of 8, 23 and 49% at 2, 10 and 30 m, respectively. Treatment 13C+D and
349 the combined treatment A+D did not show significant changes in *in situ* primary production
350 rates. Integrated primary production for Q2 and Q9 reached 0.13 g C m⁻² d⁻¹ and 0.22 g C m⁻²
351 d⁻¹, while station Qc reached levels of 0.44 g C m⁻² d⁻¹.

352 During summer the magnitude of carbon uptake in the surface of the channel (2 m) varied
353 from 90 mg C m⁻³ d⁻¹ at the station Q9 to 170 mg C m⁻³ d⁻¹ at the station Q2. The station Qc as
354 the same way as winter presented maximum rates in comparison with the channel reaching
355 378 mg C m⁻³ d⁻¹. During this season, the treatments inoculated with pesticides did not show
356 significant differences with their respective control at any station (paired t-test, p>0.05).
357 Estimations of integrated primary production showed highest values at Qc (7.44 g C m⁻² d⁻¹)
358 for summer season. Stations Q9 and Q2 reached 3.36 g C m⁻² d⁻¹ and 2.59 g C m⁻² d⁻¹, follow
359 for Q3 (1.45 g C m⁻² d⁻¹). Finally, station Q3 presented the lowest magnitude in the Caucahue
360 channel with 0.76 g C m⁻² d⁻¹.

361

362 **4. Discussion**

363 Our study contributes to the understanding of the potential responses of photoautotrophic and
364 chemoautotrophic carbon uptake to the addition of three pesticides currently used in salmon
365 farm activity (delthametrin, azamethiphos and emamectine benzoate). The carbon uptake rates
366 were studied using both *in situ* and on deck experimental approaches in two economically
367 important areas in central ($\sim 37^\circ\text{S}$) and southern ($\sim 42^\circ\text{S}$) Chile.

368 Seasonal and spatial environmental variability was observed both in Llico bay and Caucahue
369 channel with the highest abundances of the cyanobacteria *Synechococcus sp.*,
370 bacterioplankton, and Chl-a concentrations with spring-summer productive periods. Primary
371 production (PP) in the Llico bay was lower than gross primary production previously
372 registered for the Humboldt Current System (Daneri et al., 2000; Montero et al., 2007; Vargas
373 et al., 2007). However, it is within the ranges reported in the Concepción Bay in winter and
374 spring-summer (Table 5). The PP registered in Caucahue Channel was lower than the values
375 observed in Inner Sea of Chiloé (Qc). Also, summer primary productivity registered in this
376 study in the inner Sea of Chiloé was similar to previously published data for the same zone
377 (Aracena et al., 2011; Cuevas et al., 2004; González et al., 2010; Jacob et al., 2014) and also
378 for the Chilean Patagonian fjords (González et al., 2011). Values of this study were however
379 higher than data obtained from other areas of the Humboldt Current System (Thiel et al.,
380 2007) (Table 5). The integrated primary production showed differences of 15 and 20 fold
381 between summer and winter at the stations in the Caucahue channel with highest integrated
382 primary production registered in Qc. Llico bay presented higher integrated primary production
383 than stations in the interior the Caucahue channel but control station Qc was the most
384 productive station sampled even compared with previous gross primary production estimations
385 for the Inner sea of Chiloé (González et al., 2010) .

386 In general, the impact of pesticides on the carbon uptake was variable and significant effects
387 were detected in the treatments with a single pesticide in Llico Bay with emamectin benzoate
388 and deltamethrin, and with azamethiphos in Caucahue Channel cruise, but combined
389 treatments did not represent a significant impact on primary production. The use of pesticides
390 to assess the in situ responses of primary production revealed an increase in rates related to the
391 addition of the pesticide azamethiphos for winter during the Caucahue campaign, and this
392 effect was local as it was observed only at station Qc (Fig. 11). These findings are in contrast
393 with the only field study available on azamethiphos effects on microorganisms. In that study,
394 no changes in dissolved oxygen and Chl-a levels were observed during or after pesticide
395 application, suggesting no effects on primary production (Burrige et al., 2010). Interestingly,
396 station Qc was the station with the highest primary production (Qc), which matched with the
397 highest *Synechococcus sp.* abundance, high Chl-a concentrations and the lowest N/P ratio of
398 all field campaign (Fig.8D, H). The low N/P ratios found in Caucahue and particularly at

399 station Qc are on the range of previous results obtained for the Inner Sea of Chiloé, suggesting
400 waters with nitrogen deficiency (Iriarte et al., 2007; Olsen et al., 2017, 2014). Under this
401 conditions, the use of the organophosphate insecticide Azamethiphos (Mayor et al., 2008),
402 highly soluble compound (Burrige et al., 2010; Canty et al., 2007), may represent a source of
403 P and N in periods of deficiency in zones with high productivity and low nutrients availability.
404 However, few information has been reported of nitrogen enrichment in the water column at
405 the inner Sea of Chiloé, as a result of aquaculture activity (Soto and Norambuena, 2004).

406 The experiments performed in Llico Bay allowed observing negative emamectin benzoate
407 effects on both photoautotrophic and chemoautotrophic carbon uptake. Emamectin benzoate
408 produced a 60 to 90% decrease in photoautotrophic primary production. This effect was
409 observed in spring, summer and even in winter but no changes were observed in autumn.
410 However, chemoautotrophic primary production was only decreased during the spring season
411 (70-80%). The avermectin emamectin benzoate is a semi-synthetic derivative produced by
412 *Streptomyces avermetilis* (Bravo et al., 2008; Cárcamo et al., 2011; Stone et al., 2000). The
413 effects of the commercial compound emamectin benzoate (SLICE®) related to non-target
414 species have been reported for many authors with varied results, suggesting that this
415 compound is not toxic to organisms at recommended concentrations (Burrige et al., 2010,
416 2004; Willis and Ling, 2003) or the effect is limited to a small number of organisms (Waddy
417 et al., 2002). A particularly toxic effect has been described in different species of mammals
418 (Olsvik et al., 2008; Yen and Lin, 2004) and invertebrates (Burrige et al., 2004; Grant, 2002).
419 It therefore has the potential to produce negative impact altering the structure and diversity
420 within the indigenous organisms at different trophic levels (Burrige et al., 2010; Johnson et
421 al., 2004).

422

423 For microorganisms, toxic or inhibitory effect of pesticides could depend on the microbial
424 species exposed (DeLorenzo et al., 2001). In this sense this is the first study about the
425 biological effects of Emamectin benzoate in marine natural microbial ensembles. These are
426 therefore, the first evidence of negative effects of emamectin benzoate on natural carbon
427 fixing microbial communities.

428 Deltamethrin addition resulted in varied effects on primary production in Llico bay but no
429 effects were observed in Caucahue channel. Negative consequences were detected in spring

430 2014 for station BLL1 dropping carbon uptake by between 23 to 30 %. However, a positive
431 effect was observed in winter 2015 for station BLL3 in which primary production increased
432 between 6 and 54%. This synthetic pyrethroid (Bhanu et al., 2011; Leboulanger et al., 2009;
433 Pavan et al., 1999) has low toxicity to mammals (Burridge et al., 2010; Rehman et al., 2014)
434 and high toxicity to arthropods (Knapp et al., 2005). In microorganism, there are no reports of
435 a direct effect, Knapp et al. (2005) explained that the addition of deltamethrin could cause the
436 decrease of zooplanktonic arthropods. Moreover, the release of nutrients and reduced grazing
437 pressure on phytoplankton and bacterial populations, could allow temporarily growth. But,
438 was by necessary add more nutrients and apply higher light after deltamethrin addition for
439 produce the phytoplankton bloom. A similar situation was described for fenvalerate (a
440 pyrethroid insecticide), where non-permanent grow on phytoplankton abundance were
441 associated with a disimintion in zooplankton abundance produced by the pesticide addition,
442 generating a nutrient input from the deceased zooplankton at to the system (DeLorenzo et al.,
443 2001). In both studies, just the pesticide addition did not produce an effect in the
444 phytoplankton abundance, an added supply of nutrients and/or light was necessary for a long-
445 term stimulation.

446 In summary, the response of microorganism communities exposed to the addition of different
447 pesticides can be positive or negative, depending on the compound used, the characteristics of
448 each location and the season. In some cases, the effect may not be direct and can require some
449 special conditions in the system so that the impact can be produced, such as light intensity
450 levels, nutrients concentration or zooplankton abundance (predation pressure). These diverse
451 responses of the environment, as a result of the chemical use in the salmon farming, evidence
452 the need of more studies in order to understand which environmental factors can influence the
453 effects of pesticides. Considering that primary production sustains marine food chain and
454 others economic activities, as bivalve culture and fisheries, unraveling the variability of
455 pesticide effect is relevant to determining the overall impact of aquaculture on natural
456 ecosystems.

457

458

459

460

461 Table 5. Comparison of Integrated Primary Production estimations in this study with other
 462 published values for the same places.

| Location | Season | Primary productivity | Source |
|--------------------------|---------------------|---|--------------------------------|
| Chilean Patagonian fjord | Winter | 0.2 - 0.3 g C m ⁻² d ⁻¹ | Gonzalez <i>et al.</i> , 2011 |
| | Spring | 5.1 g C m ⁻² d ⁻¹ | |
| Inner Sea of Chiloé | Spring | 4.5 g C m ⁻² d ⁻¹ | Jacob <i>et al.</i> , 2014 |
| Inner Sea of Chiloé | spring-summer | 2.4-5.8 g C m ⁻² d ⁻¹ | Aracena <i>et al.</i> , 2011 |
| Northern Patagonia | | 1.6-2.6 g C m ⁻² d ⁻¹ | |
| Inner Sea of Chiloé | winter-spring | 0.1-3.2 g C m ⁻² d ⁻¹ | Gonzalez <i>et al.</i> , 2010 |
| Inner Sea of Chiloé | Winter | 0.4 g C m ⁻² d ⁻¹ | This study |
| | Summer | 7.4 g C m ⁻² d ⁻¹ | |
| Caucahue Channel | Winter | 0.1-0.2 g C m ⁻² d ⁻¹ | This study |
| | Summer | 2.5-3.3 g C m ⁻² d ⁻¹ | |
| Concepción Bay | spring-early autumn | 1-25.8 g C m ⁻² d ⁻¹ | Montero <i>et al.</i> , 2007 * |
| | autumn-early spring | 0-0.8 g C m ⁻² d ⁻¹ | |
| Concepción Bay | | 0.5-5.5 g C m ⁻² d ⁻¹ | Vargas <i>et al.</i> , 2007 |
| Concepción Bay | Winter | 0.3-0.5 g C m ⁻² d ⁻¹ | Cuevas <i>et al.</i> , 2004 |
| | Spring | 1.2-8.7 g C m ⁻² d ⁻¹ | |
| Concepción Shelf | Spring | 1.2-5.9 g C m ⁻² d ⁻¹ | Daneri <i>et al.</i> , 2000 |
| Llico Bay | autumn-winter | 0.2-0.6 g C m ⁻² d ⁻¹ | This study |
| | spring-summer | 1.9-3.8 g C m ⁻² d ⁻¹ | |
| Iquique and Antofagasta | | 3-9 g C m ⁻² d ⁻¹ | Thiel <i>et al.</i> , 2007 |

463 *reported one of the highest value for the HCS

464

465

466

5. Conclusion

467

In conclusion, the application of pesticides in marine waters can produce changes on photo
468 and chemoautotrophic carbon uptake by natural microbial communities. However, this effect
469 varies depending on season and location. Also, these effects are significant if a single pesticide
470 is applied, the combining two or more no produce a substantial impact. In surface waters of
471 Llico Bay, the pesticide emamectin benzoate produces a reduction between 60-90% of
472 photoautotrophic and chemoautotrophic carbon uptake. Also, the effect was stronger in spring
473 and summer, the periods of higher primary productivity. The addition of azamethiphos in the
474 Caucahue channel produced local stimulation in a system with nitrogen deficiency, suggesting
475 that this organophosphate pesticide can supply nutrient requirements. Therefore, considering
476 the increasing importance of aquaculture, our study provides important evidences to improve
477 our knowledge about pesticides consequences on the environment, especially in an aquatic
478 vulnerable system and the development of a sustainable aquaculture.

479

480 Acknowledgements

481

We thankful to Miss Claudia Muñoz, Oliver Alarcón and Odette Vergara for the support in
482 field campaigns, processing of CTD profiles and chlorophyll data. We thank FONDAP center
483 INCAR (Project 15110027) and COPAS SUR-AUSTRAL (PFB-31). This study is part of the
484 French-Chilean project LIA-MORFUN.

485

486

6. References

487

Alarcon, E., Valdes, N., Torres, R., 2015. Saturacion del carbonato de calcio en un area de
488 cultivo de mitilidos en el Seno Reloncavi, Patagonia norte, Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*
489 43, 277–281. doi:10.3856/vol43-issue2-fulltext-1

490

Aminot, A., K erouel, R., 2007. *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines.*
491 Editions Quae.

492

Aracena, C., Lange, C.B., Luis Iriarte, J., Rebolledo, L., Pantoja, S., 2011. Latitudinal patterns
493 of export production recorded in surface sediments of the Chilean Patagonian fjords (41-
494 55°S) as a response to water column productivity. *Cont. Shelf Res.* 31, 340–355.
495 doi:10.1016/j.csr.2010.08.008

496

Beman, J., Arrigo, K., Matson, P., 2005. Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms

497 in vulnerable areas of the ocean. *Nature* 434, 211–214. doi:10.1038/nature03370

498 Bhanu, S., Archana, S., Ajay, K., Surendra Singh, P., Vandana, B., 2011. Impact of
499 Deltamethrin on Environment, use as an Insecticide and its Bacterial degradation – A
500 preliminary study. *Int. J. Environ. Sci.* 1.

501 Boschker, H.T.S., Vasquez-Cardenas, D., Bolhuis, H., Moerdijk-Poortvliet, T.W.C., Moodley,
502 L., 2014. Chemoautotrophic carbon fixation rates and active bacterial communities in
503 intertidal marine sediments. *PLoS One* 9 (7), e101443. doi:10.1371/journal.pone.0101443

504 Bravo, S., Nuñez, M., Silva, M.T., 2013. Efficacy of the treatments used for the control of
505 *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a new fish-farming
506 location in Region XI, Chile. *J. Fish Dis.* 36, 221–228. doi:10.1111/jfd.12023

507 Bravo, S., Pozo, V., Silva, M.T., 2015. Evaluación de la efectividad del tratamiento con agua
508 dulce para el control del piojo de mar *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000. *J.*
509 *Aquat. Res* 43, 322–328. doi:10.3856/vol43-issue2-fulltext-8

510 Bravo, S., Sevatdal, S., Horsberg, T.E., 2008. Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi*
511 to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture* 282, 7–12.
512 doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.011

513 Bravo, S., Silva, M.T., Monti, G., 2012. Efficacy of emamectin benzoate in the control of
514 *Caligus rogercresseyi* on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile from 2006 to
515 2007. *Aquaculture* 364, 61–66. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.036

516 Burka, J.F., Fast, M.D., Revie, C.W., 2012. *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus*
517 *rogercresseyi*, in: Bushmann, K.W.P.T.K. (Ed.), *Fish Parasites: Pathobiology and*
518 *Protection*. Cambridge, MA: CABI., Wallingford, Oxfordshire, pp. 350–370.

519 Burrige, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K., 2010. Chemical use in salmon
520 aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects.
521 *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.05.020

522 Burrige, L.E., Hamilton, N., Waddy, S.L., Haya, K., Mercer, S.M., Greenhalgh, R., Tauber,
523 R., Radecki, S. V, Crouch, L.S., Wislocki, P.G., Endris, R.G., 2004. Acute toxicity of
524 emamectin benzoate (SLICEtm) in fish feed to American lobster, *Homarus americanus*.
525 *Aquac. Res.* 35, 713–722. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01093.x

526 Buschmann, A., Riquelme, V., Hernandez Gonzalez, M., Varela, D., Jimenez, J., Henriquez,
527 L., Vergara, P., Guinez, R., Filun, L., 2006. A review of the impacts of salmonid farming

528 on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 1338–1345.
529 doi:10.1016/j.icesjms.2006.04.021

530 Canty, M.N., Hagger, J.A., Moore, R.T.B., Cooper, L., Galloway, T.S., 2007. Sublethal
531 impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the
532 marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 396–402.
533 doi:10.1016/j.marpolbul.2006.11.013

534 Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C.A., Carreño, C.F., Quezada, C.A., Bustos, C.,
535 Manríquez, R.A., Avendaño-Herrera, R., Yañez, A.J., 2011. Effect of emamectin
536 benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug
537 transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice
538 *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture* 321, 207–215. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.09.012

539 Carvajal, J., González, L., George-Nascimento, M., 1998. Native sea lice (Copepoda:
540 Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile.
541 *Aquaculture* 166, 241–246. doi:10.1016/S0044-8486(98)00301-9

542 Cuevas, L.A., Daneri, G., Jacob, B., Montero, P., 2004. Microbial abundance and activity in
543 the seasonal upwelling area off Concepción (~36°S), central Chile: A comparison of
544 upwelling and non-upwelling conditions. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51,
545 2427–2440. doi:10.1016/j.dsr2.2004.07.026

546 Daneri, G., Dellarossa, V., Quiñones, R., Jacob, B., Montero, P., Ulloa, O., 2000. Primary
547 production and community respiration in the Humboldt Current System off Chile and
548 associated oceanic areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197, 41–49. doi:10.3354/meps197041

549 Davies, I.M., Rodger, G.K., Redshaw, J., Stagg, R.M., 2001. Targeted environmental
550 monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish.
551 *ICES J. Mar. Sci.* 58, 477–485. doi:10.1006/jmsc.2000.1040

552 DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic
553 microorganisms: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 84–98.
554 doi:10.1002/etc.5620200108

555 Duarte, C.M., Marbá, N., Holmer, M., 2007. Rapid Domestication of Marine Species. *Science*
556 (80-.). 316, 382–383. doi:10.1126/science.1138042

557 FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad
558 alimentaria y la nutrición para todos, Roma, FAO. doi:978-92-5-306675-9

559 Fernandez, C., Farías, L., 2012. Assimilation and regeneration of inorganic nitrogen in a
560 coastal upwelling system: Ammonium and nitrate utilization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 451,
561 1–14. doi:10.3354/meps09683

562 Fernández I., C., Fernandez, C., Raimbault, P., Garcia, N., Rimmelin, P., Caniaux, G., 2005.
563 An estimation of annual new production and carbon fluxes in the northeast Atlantic
564 Ocean during 2001. *J. Geophys. Res.* 110, 1–15. doi:10.1029/2004JC002616

565 Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., 1998. Primary Production of the Biosphere :
566 Integrating Terrestrial and Oceanic Components 281, 237–240.

567 González, H.E., Calderón, M.J., Castro, L., Clement, A., Cuevas, L.A., Daneri, G., Iriarte,
568 J.L., Lizárraga, L., Martínez, R., Menschel, E., Silva, N., Carrasco, C., Valenzuela, C.,
569 Vargas, C.A., Molinet, C., 2010. Primary production and plankton dynamics in the
570 Reloncaví Fjord and the Interior Sea of Chiloé, northern Patagonia, Chile. *Mar. Ecol.*
571 *Prog. Ser.* 402, 13–30. doi:10.3354/meps08360

572 González, H.E., Castro, L., Daneri, G., Iriarte, J.L., Silva, N., Vargas, C.A., Giesecke, R.,
573 Sánchez, N., 2011. Seasonal plankton variability in Chilean Patagonia fjords: Carbon
574 flow through the pelagic food web of Aysen Fjord and plankton dynamics in the
575 Moraleda Channel basin. *Cont. Shelf Res.* 31, 225–243. doi:10.1016/j.csr.2010.08.010

576 Grant, A.N., 2002. Medicines for sea lice, in: *Pest Management Science*. pp. 521–527.
577 doi:10.1002/ps.481

578 Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965. Fluorometric
579 Determination of Chlorophyll. *ICES J. Mar. Sci.* 30, 3–15. doi:10.1093/icesjms/30.1.3

580 Iriarte, J.L., González, H.E., Liu, K.K., Rivas, C., Valenzuela, C., 2007. Spatial and temporal
581 variability of chlorophyll and primary productivity in surface waters of southern Chile
582 (41.5–43° S). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 471–480. doi:10.1016/j.ecss.2007.05.015

583 Iriarte, J.L., Gonzalez, H.E., Nahuelhual, L., 2010. Patagonian fjord ecosystems in Southern
584 Chile as a highly vulnerable region: Problems and needs. *Ambio* 39, 463–466.
585 doi:10.1007/s13280-010-0049-9

586 Jacob, B.G., Tapia, F.J., Daneri, G., Iriarte, J.L., Montero, P., Sobarzo, M., Quiñones, R.A.,
587 2014. Springtime size-fractionated primary production across hydrographic and PAR-
588 light gradients in Chilean Patagonia (41–50°S). *Prog. Oceanogr.* 129, 75–84.
589 doi:10.1016/j.pocean.2014.08.003

- 590 Jantzen, C., Hussermann, V., Forsterra, G., Laudien, J., Ardelan, M., Maier, S., Richter, C.,
591 2013. Occurrence of a cold-water coral along natural pH gradients (Patagonia, Chile).
592 *Mar. Biol.* 160, 2597–2607. doi:10.1007/s00227-013-2254-0
- 593 Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., 2004. A review of the
594 impact of parasitic copepods on marine aquaculture, in: *Zoological Studies*. pp. 229–243.
- 595 Kazemi, M., Tahmasbi, a M., Valizadeh, R., Naserian, a a, Soni, A., 2012. Organophosphate
596 pesticides: A general review. *Agric. Sci. Res. Journals* 2, 512–522.
- 597 Knapp, C.W., Caquet, T., Hanson, M.L., Lagadic, L., Graham, D.W., 2005. Response of water
598 column microbial communities to sudden exposure to deltamethrin in aquatic
599 mesocosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 157–165. doi:10.1016/j.femsec.2005.03.004
- 600 Labbé-Ibañez, P., Iriarte, J.L., Pantoja, S., 2015. Respuesta del microfitoplancton a la adición
601 de nitrato y ácido silícico en fiordos de la Patagonia chilena. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43,
602 80–93. doi:10.3856/vol43-issue1-fulltext-8
- 603 Leboulanger, C., Bouvy, M., Pagano, M., Dufour, R.A., Got, P., Cecchi, P., 2009. Responses
604 of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin
605 exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 39–51. doi:10.1007/s00244-008-9164-z
- 606 Legendre, P., 2007. Anova.2way.R: two-way crossed-factor ANOVA with permutation tests
607 (balanced design): models I, II, and III.
- 608 Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., Vaultot, D., 2000. Flow cytometry analysis of
609 marine picoplankton, in: Diamond, R., DeMaggio, S. (Eds.), *Living Color: Protocols in*
610 *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Berlin, pp. 421–454.
- 611 Mayor, D.J., Solan, M., Martinez, I., Murray, L., McMillan, H., Paton, G.I., Killham, K.,
612 2008. Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture
613 industry to *Corophium volutator* and *Hediste diversicolor*: Whole sediment bioassay
614 tests. *Aquaculture* 285, 102–108. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.008
- 615 Medina, M., Barata, C., Telfer, T., Baird, D.J., 2004. Effects of cypermethrin on marine
616 plankton communities: A simulated field study using mesocosms. *Ecotoxicol. Environ.*
617 *Saf.* 58, 236–245. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.07.001
- 618 Medina, M.H., Ramos-Jiliberto, R., 2009. Direcciones futuras de la ecotoxicología en Chile:
619 Implicancias para la evaluación de riesgo ambiental de productos veterinarios utilizados
620 en acuicultura. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 82, 443–457. doi:10.4067/S0716-

621 078X2009000300010

622 Montero, P., Daneri, G., Cuevas, L.A., González, H.E., Jacob, B., Lizárraga, L., Menschel, E.,
623 2007. Productivity cycles in the coastal upwelling area off Concepción: The importance
624 of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Prog. Oceanogr.* 75, 518–
625 530. doi:10.1016/j.pocean.2007.08.013

626 Nash, C.E., 2003. Interactions of Atlantic salmon in the Pacific Northwest. VI. A synopsis of
627 the risk and uncertainty. *Fish. Res.* doi:10.1016/S0165-7836(03)00068-7

628 Olsen, L., Hernández, K., Ardelan, M., Iriarte, J., Bizsel, K., Olsen, Y., 2017. Responses in
629 bacterial community structure to waste nutrients from aquaculture: an in situ microcosm
630 experiment in a Chilean fjord. *Aquac. Environ. Interact.* 9, 21–32. doi:10.3354/aei00212

631 Olsen, L.M., Hernández, K.L., van Ardelan, M., Iriarte, J.L., Sánchez, N., González, H.E.,
632 Tokle, N., Olsen, Y., 2014. Responses in the microbial food web to increased rates of
633 nutrient supply in a southern Chilean fjord: Possible implications of cage aquaculture.
634 *Aquac. Environ. Interact.* 6, 11–27. doi:10.3354/aei00114

635 Olsvik, P.A., Lie, K.K., Mykkeltvedt, E., Samuelsen, O.B., Petersen, K., Stavrum, A.-K.,
636 Lunestad, B.T., 2008. Pharmacokinetics and transcriptional effects of the anti-salmon lice
637 drug emamectin benzoate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *BMC Pharmacol.* 8, 16.
638 doi:10.1186/1471-2210-8-16

639 Pantoja, S., Luis Iriarte, J., Daneri, G., 2011. Oceanography of the Chilean Patagonia. *Cont.*
640 *Shelf Res.* 31, 149–153. doi:10.1016/j.csr.2010.10.013

641 Pavan, F.A., Dallago, R.M., Zanella, R., Martins, A.F., 1999. Determination of deltamethrin in
642 cattle dipping baths by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*
643 47, 174–6.

644 Rehman, H., Aziz, A.T., Saggi, S., Abbas, Z.K., Mohan, A., Ansari, A.A., 2014. Systematic
645 review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *J. Entomol. Zool.*
646 *Stud. JEZS* 2, 60–70.

647 Sevattal, S., Copley, L., Wallace, C., Jackson, D., Horsberg, T.E., 2005. Monitoring of the
648 sensitivity of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) to pyrethroids in Norway, Ireland and
649 Scotland using bioassays and probit modelling. *Aquaculture* 244, 19–27.
650 doi:10.1016/j.aquaculture.2004.11.009

651 Siwicki, A.K., Terech-Majewska, E., Grudniewska, J., Malaczewska, J., Kazun, K., Lepa, A.,

652 2010. Influence of deltamethrin on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms
653 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 29, 489–491.
654 doi:10.1002/etc.75

655 Slawyk, G., Collos, Y., Auclair, J., 1977. The Use of the 13C and 15N Isotopes for the
656 Simultaneous Measurement of Carbon and Nitrogen Turnover Rates in Marine
657 Phytoplankton. Limnol. Oceanogr.

658 Slawyk, G., Raimbault, P., 1995. Simple procedure for simultaneous recovery of dissolved
659 inorganic and organic nitrogen in 15N-tracer experiments and improving the isotopic
660 mass balance. Mar. Ecol. Prog. Ser. doi:10.3354/meps124289

661 Soto, D., Norambuena, F., 2004. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in
662 the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. J. Appl. Ichthyol.
663 20, 493–501. doi:10.1111/j.1439-0426.2004.00602.x

664 Stone, J.K., Bacon, C.W., White, J.F., 2000. An Overview of Endophytic Microbes
665 Endophytism Defined, in: Bacon, C.W., White, J.F. (Ed.), Microbial Endophytes. Marcel
666 Dekker, New York, pp. 3–29.

667 Thiel, M., Macaya, E.C., Acuña, E., Arntz, W.E., Bastias, H., Brokordt, K., Camus, P.A.,
668 Castilla, J.C., Castro, L.R., Cortés, M., Dumont, C.P., Escribano, R., Fernandez, M.,
669 Gajardo, J.A., Gaymer, C.F., Gomez, I., González, A.E., González, H.E., Haye, P.A.,
670 Illanes, J.-E., Iriarte, J.L., Lancellotti, D.A., Luna-Jorquera, G., Luxoro, C., Manriquez,
671 P.H., Marín, V., Muñoz, P., Navarrete, S.A., Perez, E., Poulin, E., Sellanes, J., Sepúlveda,
672 H.H., Stotz, W., Tala, F., Thomas, A., Vargas, C.A., Vasquez, J.A., Vega, J.M.A., 2007.
673 The Humboldt Current System of northern and central Chile - Oceanographic processes,
674 ecological interactions and socioeconomic feedback. Oceanogr. Mar. Biol. 45, 195–344.
675 doi:10.1091/mbc.E04-05-0427

676 Vargas, C.A., Martinez, R.A., Cuevas, L.A., Pavez, M.A., Cartes, C., González, H.E.,
677 Escribano, R., Daneri, G., 2007. The relative importance of microbial and classical food
678 webs in a highly productive coastal upwelling area. Limnol. Oceanogr.
679 doi:10.4319/lo.2007.52.4.1495

680 Waddy, S.L., Burrige, L.E., Hamilton, M.N., Mercer, S.M., Aiken, D.E., Haya, K., 2002.
681 Emamectin benzoate induces molting in American lobster, *Homarus americanus*. Can. J.
682 Fish. Aquat. Sci. 59, 1096–1099. doi:10.1139/F02-106

683 Willis, K.J., Ling, N., 2003. The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide, to
684 planktonic marine copepods. *Aquaculture* 221, 289–297. doi:10.1016/S0044-
685 8486(03)00066-8
686 Yen, T.-H., Lin, J.-L., 2004. Acute poisoning with emamectin benzoate. *J. Toxicol. Clin.*
687 *Toxicol.* 42, 657–661. doi:10.1081/CLT-200026968

688

689

690 7. Figure Legends

691

692 Figure 1. Study areas and sampling stations in situ primary production experiments. A) Llico
693 Bay (south of Golfo de Arauco in central Chile). Llico point represents the site of on deck
694 experiments. B) Caucahue channel in the inner sea of Chiloé Island, Northern Patagonia. Red
695 circles indicate points of in situ primary production experiments.

696

697 Figure 2. Hydrographic structure of Llico Bay. Profiles of temperature (°C) and salinity (PSU)
698 at BLL1, BLL2 and BLL3 stations during research campaigns. A, F) spring 2014. B, G) winter
699 2015. C, H) spring 2015. D, I) summer 2016. E, J) autumn 2016.

700

701 Figure 3. Profiles of nitrate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), phosphate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), N/P ratio and Chl-a (mg m^{-3}) at
702 Llico Bay stations from spring 2014 to autumn 2015. A, B, C, D) BLL1. E, F, G, H) BLL2. I,
703 J, K, L) BLL3.

704

705 Figure 4. Profiles of bacterioplankton and *Synechococcus sp.* abundance ($10^3 \text{ cell mL}^{-1}$) at
706 BLL1, BLL2 and BLL3 stations during research campaigns. A, F) spring 2014. B, G) winter
707 2015. C, H) spring 2015. D, I) summer 2016. E, J) autumn 2016.

708

709 Figure 5. Carbon uptake rates ($\text{mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) per depth with and without the addition of
710 pesticides at BLL1, BLL2 and BLL3 stations during oceanographic campaigns at Llico Bay.
711 A, F, K) spring 2014. B, G, L) winter 2015. C, H, M) spring 2015. D, I, N) summer 2016. E, J,
712 O) autumn 2016. Error bars represented standard deviation (duplicate).

713

714 Fig. 6. On deck experiments under light and dark conditions with the addition of ^{13}C and
715 pesticides. Experiments were performed with samples of station BLL2 at Llico Bay during
716 four field campaigns. Boxplot of PAR radiation (Wm^{-2}), chemoautotrophic and
717 photoautotrophic carbon uptakes ($\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$). A, E, I) winter 2015. B, F, J) spring 2015. C,
718 G, K) summer 2016. D, H, L) autumn 2016. Bars represent mean of duplicate vales. Error bars
719 show standard deviation.

720 Figure 7. Hydrographic structure of Caucahue Channel. Temperature ($^{\circ}\text{C}$) and salinity (PSU)
721 profiles for winter 2014 (A, B) and summer 2015 (C, D).

722

723 Figure 8. Nitrate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), phosphate ($\mu\text{mol L}^{-1}$), N/P ratio and Chl-a (mg m^{-3}) profiles for
724 station at Caucahue Channel. Vertical profiles for winter 2014 of A) NO_3^- , B) PO_4^{3+} , C) N/P
725 ratio and D) Chl-a. Vertical profiles for summer 2015 of E) NO_3^- , F) PO_4^{3+} , G) N/P ratio and
726 D) Chl-a.

727

728 Figure 9. Spatial distribution and vertical profiles of bacterioplankton abundance ($10^3 \text{ cell mL}^{-1}$)
729 at Caucahue channel. A, B) winter 2014. C, D) summer 2015.

730

731 Figure 10. Spatial distribution and vertical profiles of *Synechococcus sp.* abundance (10^3 cell
732 mL^{-1}) at Caucahue channel. A, B) winter 2014. C, D) summer 2015.

733

734 Figure 11. Carbon uptake rates ($\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) with the addition of pesticides during winter
735 2014. A) Q2, B) Q5, C) Q6, D) Q9 and E) Qc. Error bars represent standard deviation
736 (duplicate).

737

738 Figure 12. Carbon uptake rates ($\text{mgC m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) with the addition of pesticides during summer
739 2015. A) Q2, B) Q3, C) Q5, D) Q9 and E) Qc. Error bars represent standard deviation
740 (duplicate).

Figures

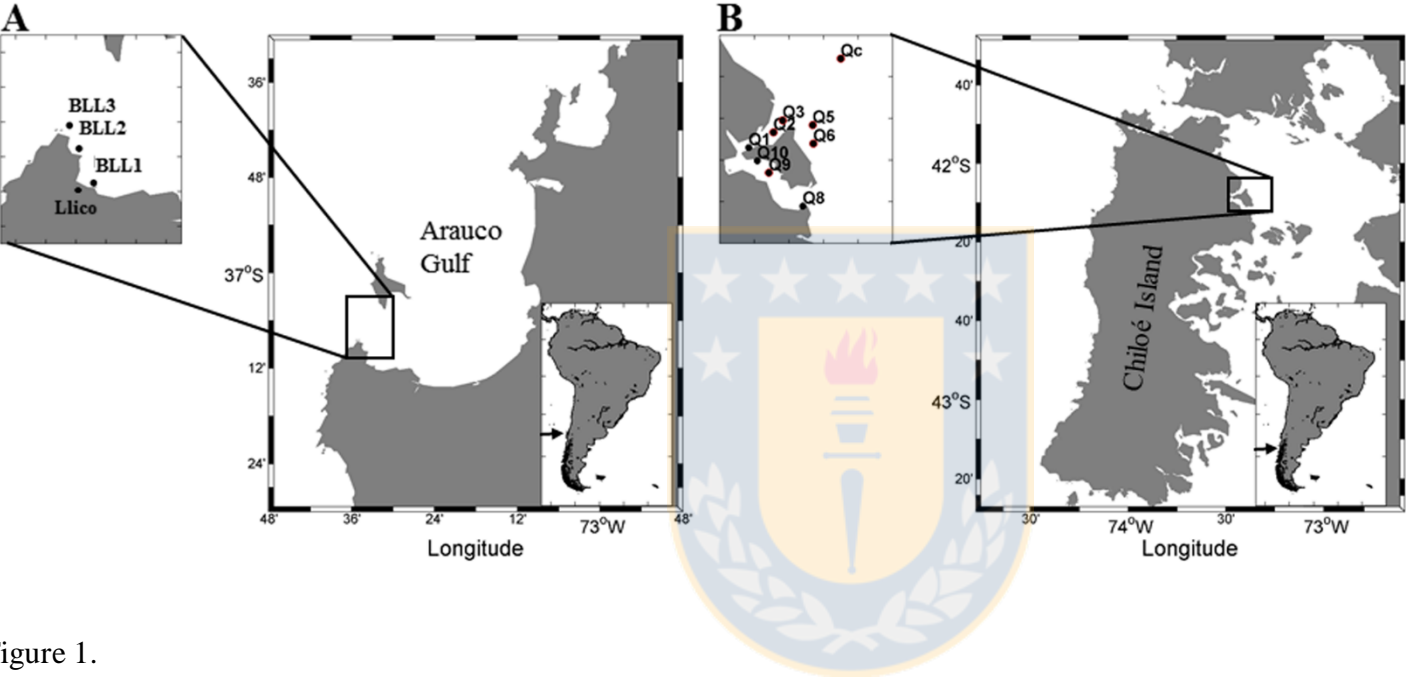


Figure 1.

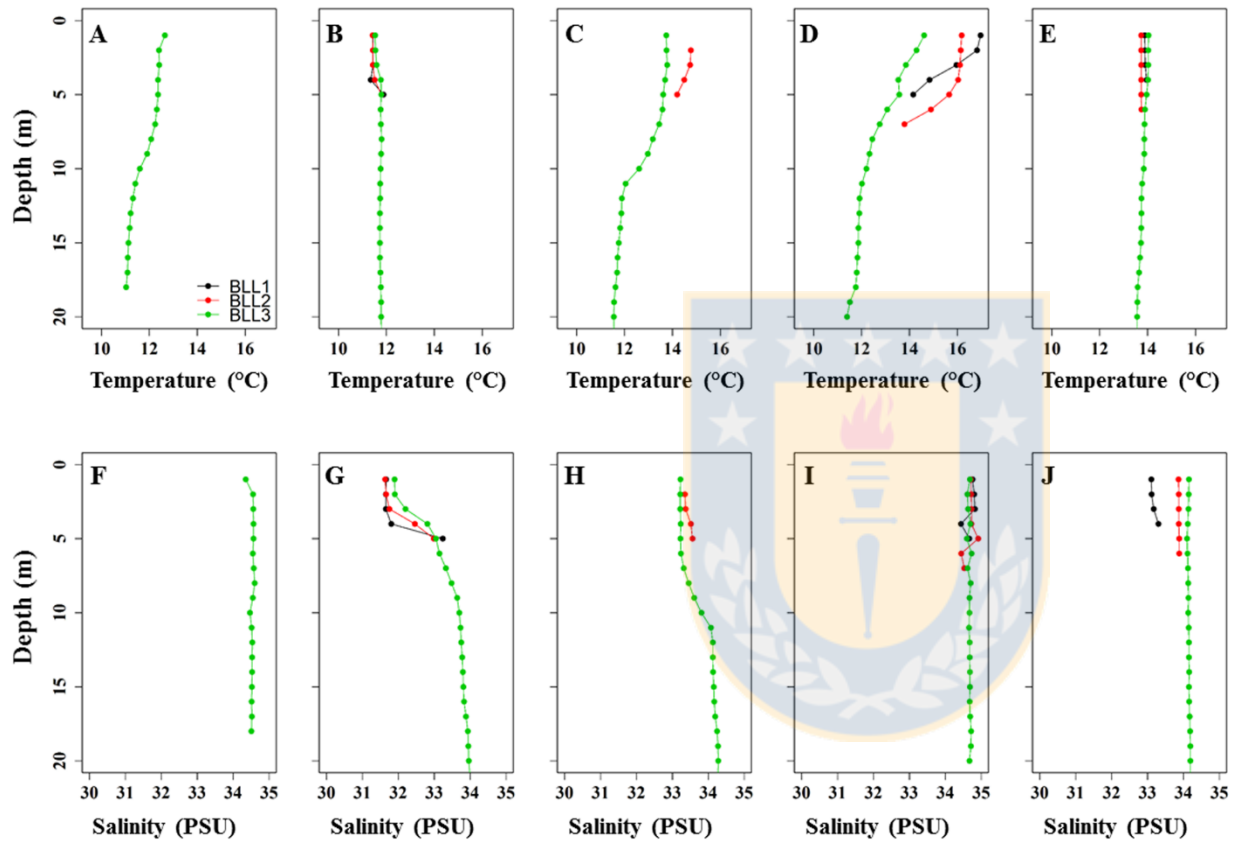


Figure 2.

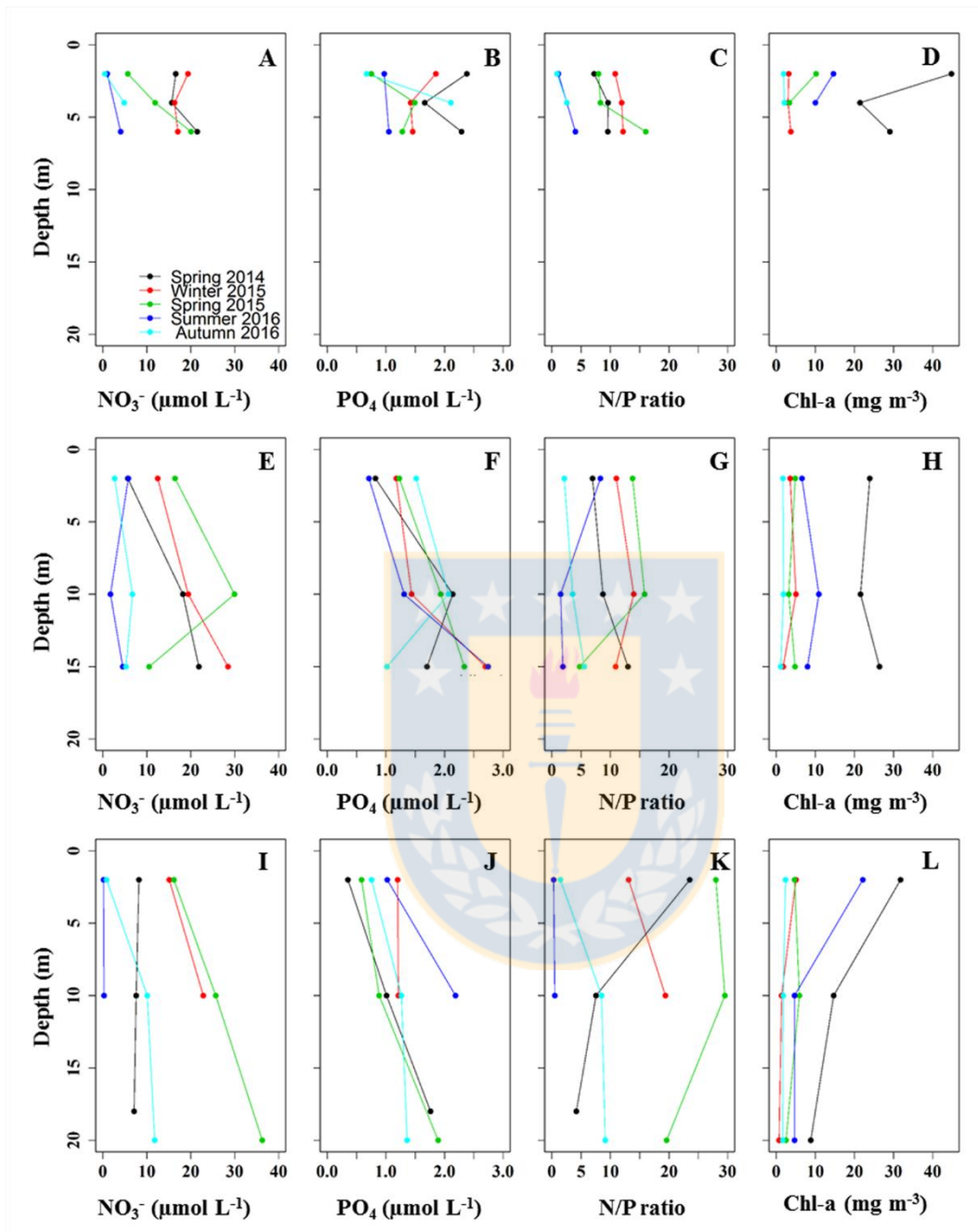


Figure 3.

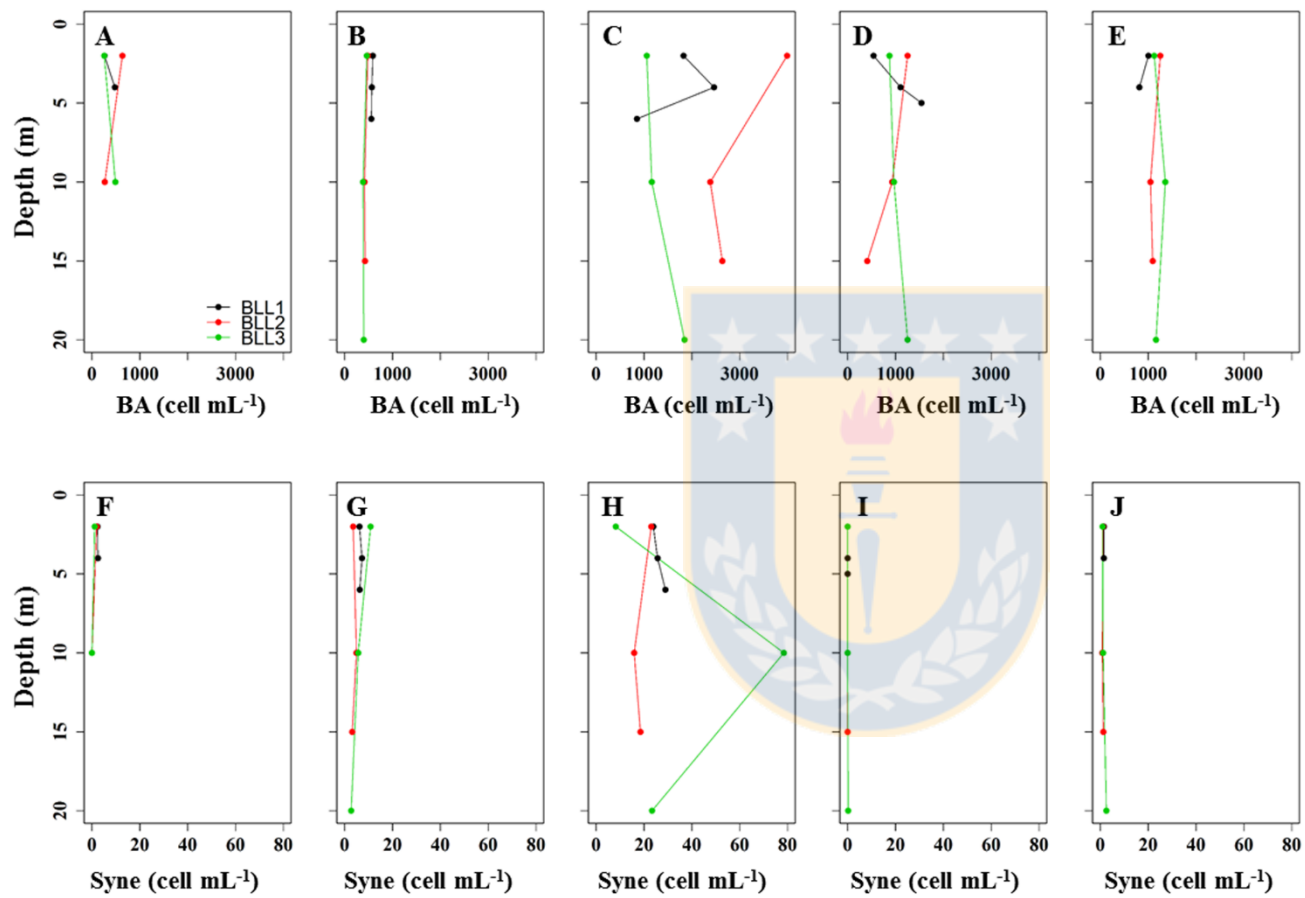


Figure 4.

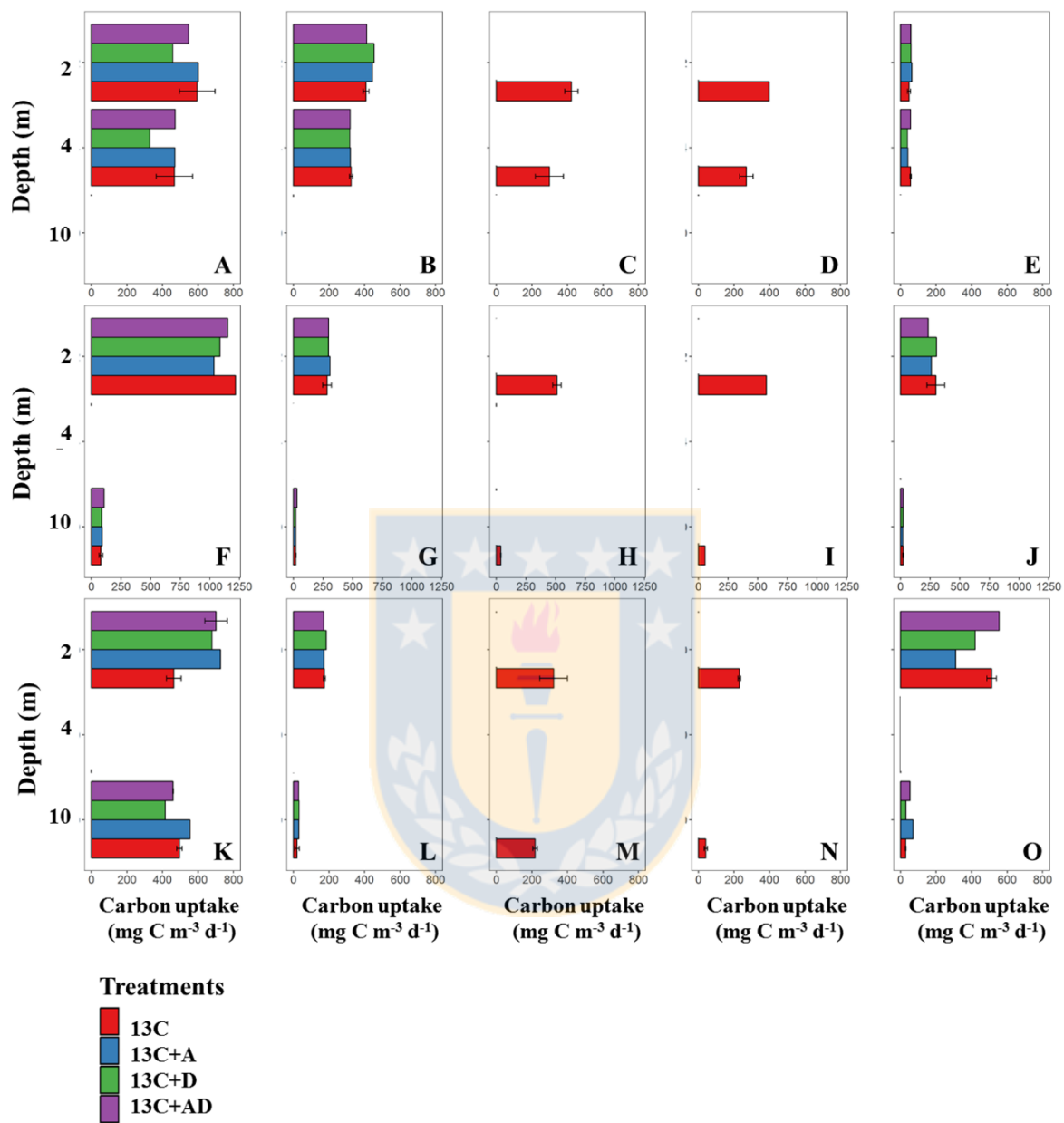


Figure 5.

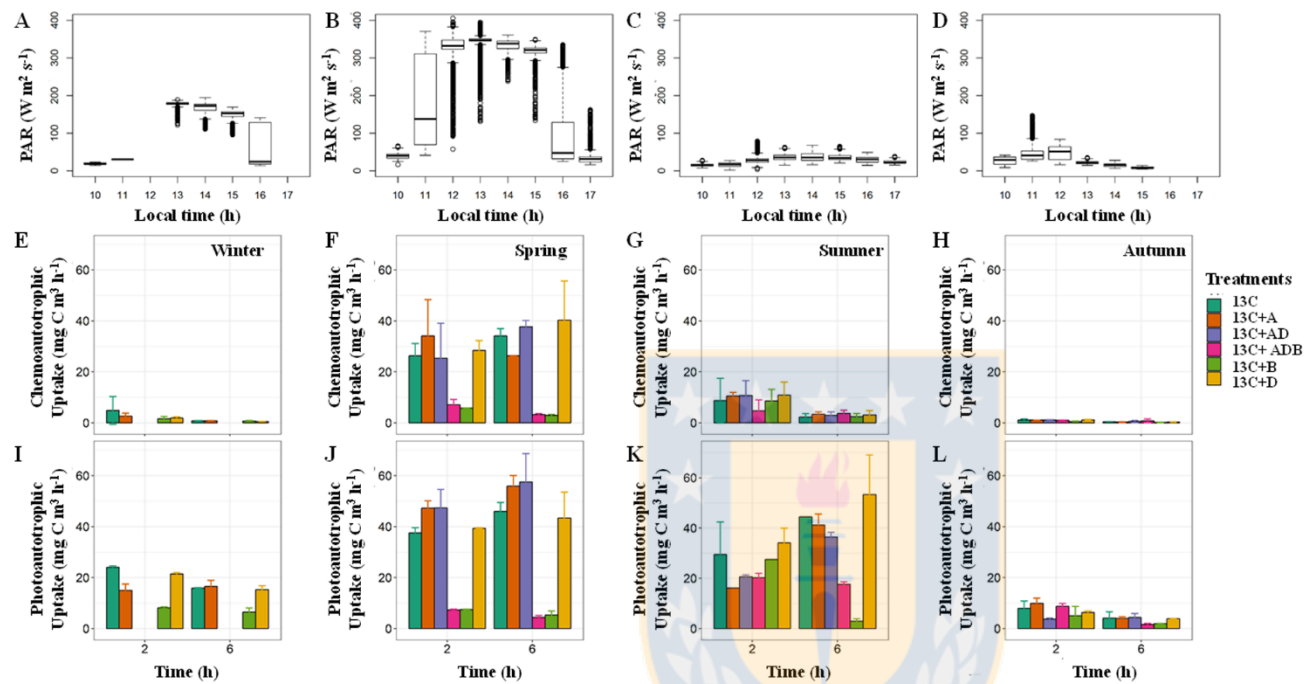


Fig. 6.

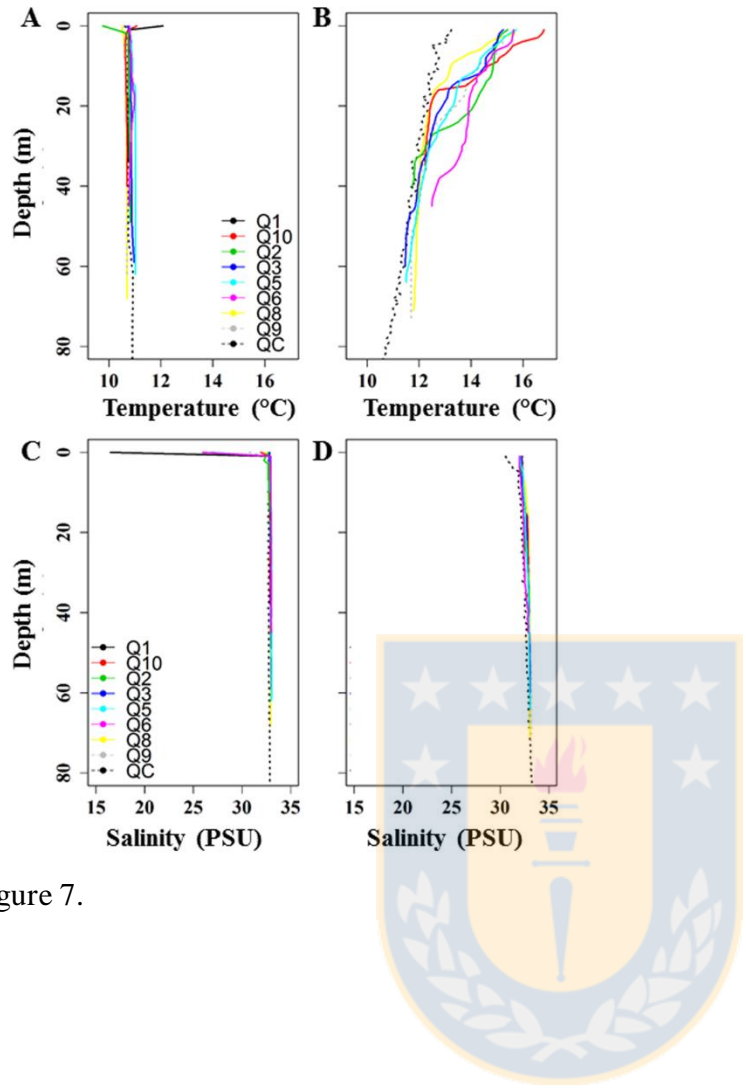


Figure 7.

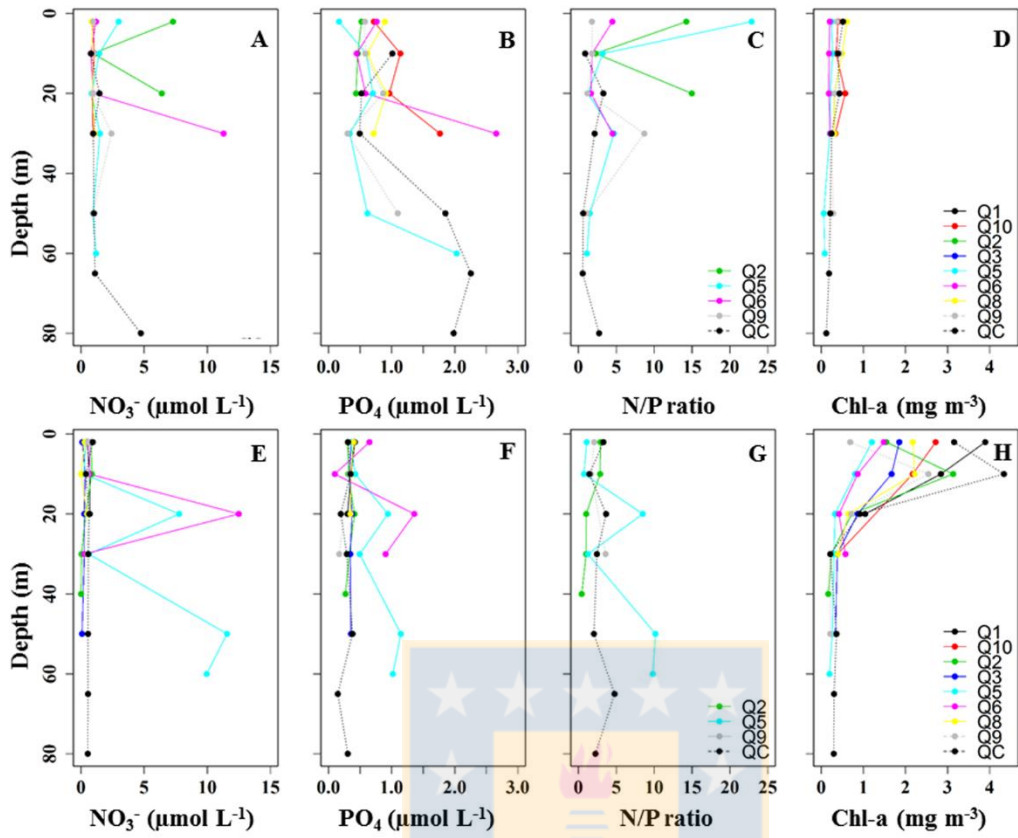


Figure 8.

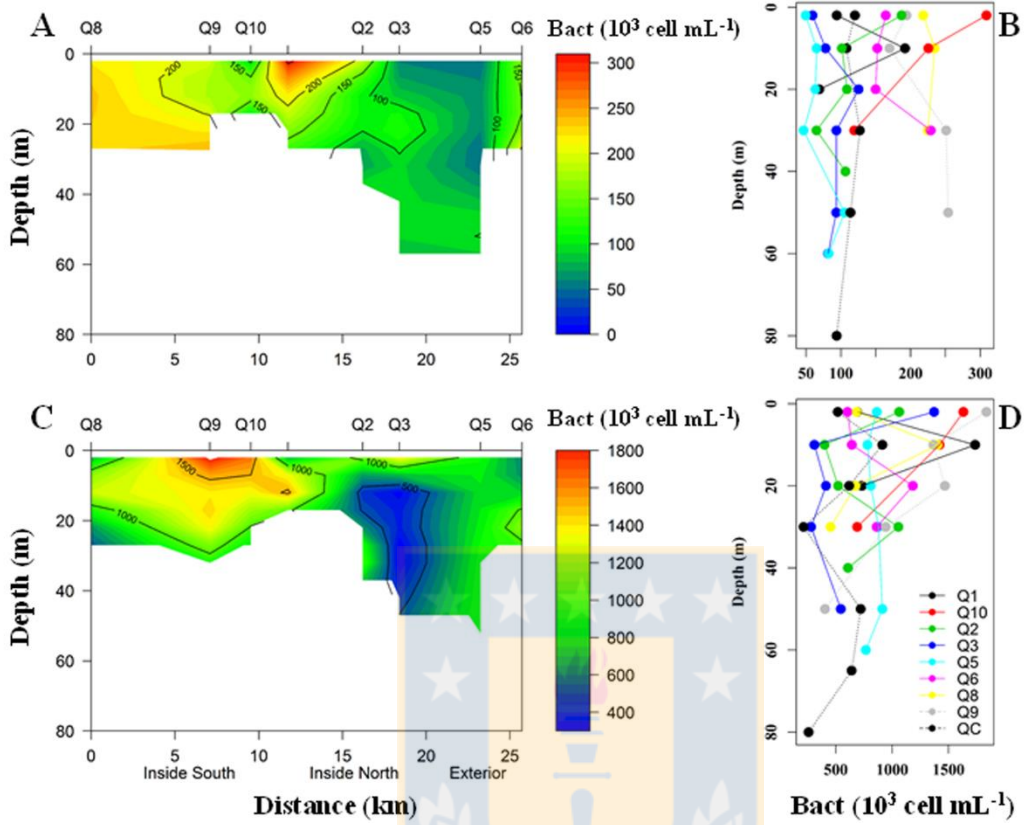


Figure 9.

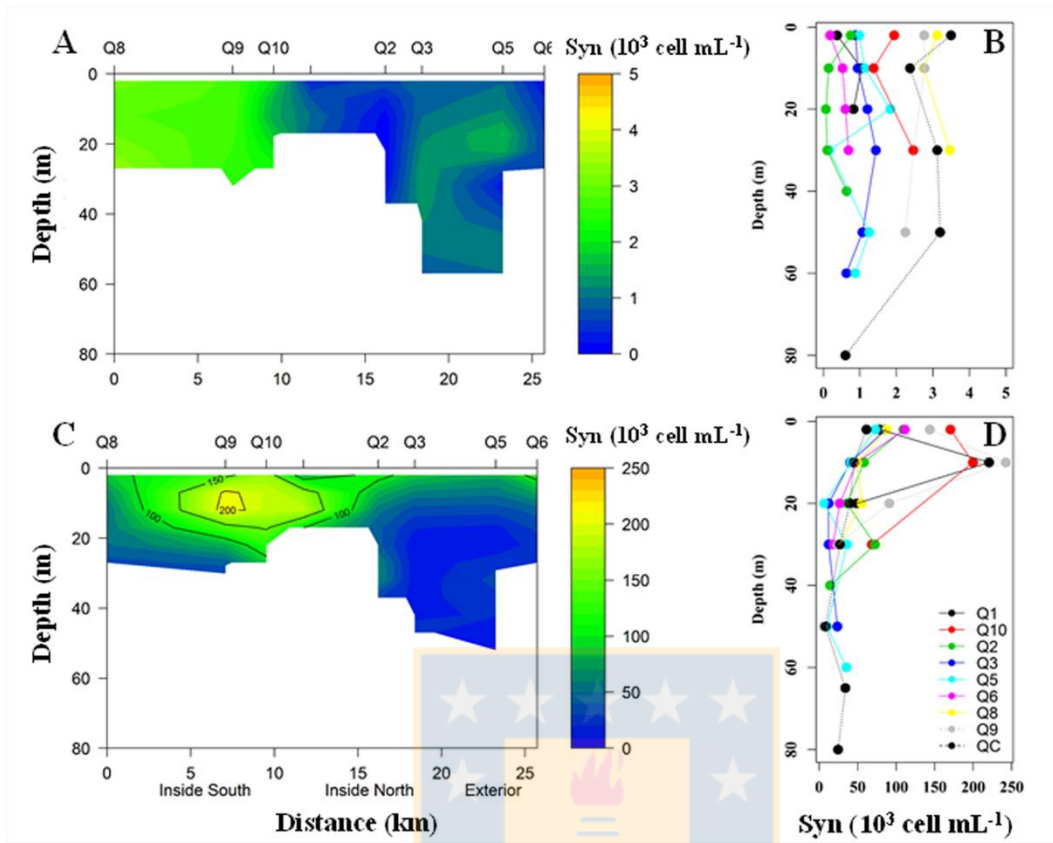


Figure 10.

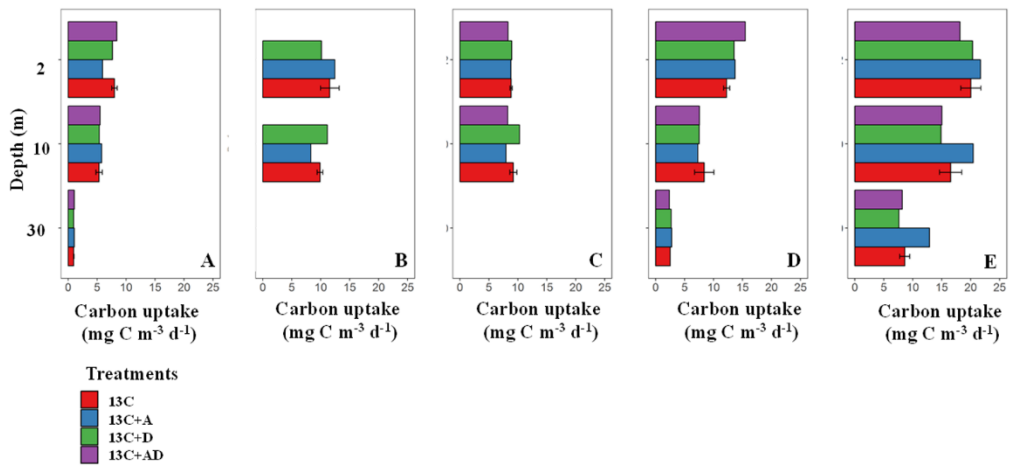


Figure 11.

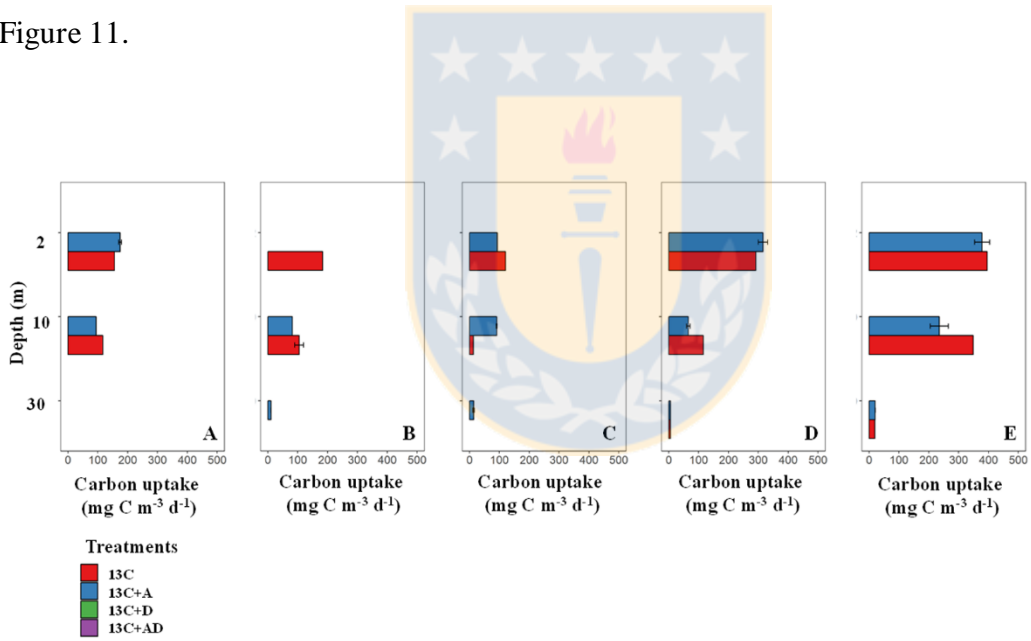


Figure 12.

3.3. Capítulo 3: Ensayos de toxicidad de benzoato de emamectina, deltametrina y azametifos sobre modelos biológicos

Artículo enviado a Latin American Journal of Aquatic Research

Claudia Margarita Rojas Pérez

Magister en Ciencias mención en Oceanografía

Universidad de Concepción

Resumen

La sobreproducción en la industria del salmón ha derivado en la aparición de múltiples enfermedades que afectan a los individuos en sus distintas etapas de desarrollo. Para el control de *Caligus rogercresseyi*, como potencial vector de estas patologías, se han empleado distintos antiparasitarios como piretroides y organofosforados. En este estudio se evalúan los efectos de los pesticidas Azametifos, Deltametrina y Benzoato de Emamectina en el desarrollo temprano de tres organismos modelo: el mitílido *Mytilus chilensis* y los erizos *Sphaerechinus granularis* y *Paracentrotus lividus*. No se observaron efectos de los pesticidas en *M. chilensis* durante las primeras 24h de desarrollo. Por el contrario, la presencia de pesticidas resultó un incremento de larvas con desarrollo anormal en *P. lividus* y *S. granularis*.

1 Effects of three pesticides used in salmon farming on the early development of three biological
2 models: *Mytilus chilensis*, *Sphaerechinus granularis* and *Paracentrotus lividus*

3
4 Neira-Osses Karina¹, Rojas C², Genevière A. M.³, Fernandez C^{1,4,5*}

5 (*En revision en Latin American Journal of Aquatic Research*)

6
7 ¹Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Universidad de Concepción,
8 Concepción, Chile

9 ²Postgraduate program in Oceanography, Department of Oceanography, Universidad de
10 Concepción, Concepción, Chile

11 ³Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Biologie Intégrative des Organismes
12 Marins (BIOM), Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/Mer, France

13 ⁴Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire d'Océanographie
14 Microbienne (LOMIC), Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/mer, France

15 ⁵COPAS Sur-Austral, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

16 Corresponding autor: C. Fernandez (fernandez@obs-banyuls.fr)

17
18 **Abstract**

19 The high production levels of Chilean salmon farming have resulted in the emergence of
20 several diseases that affect all development stages of cultured specimens. The parasite
21 copepod *Caligus rogercresseyi* is a potential vector of pathologies and different chemical
22 compounds such as pyrethroides have been used to prevent infections. In this study, we
23 explore the effects of pesticides Azametiphos, Deltamethrin and Emmamectin benzoate in the
24 early development of three biological models: the mussel *Mytilus chilensis* and the sea-urchins
25 *Sphaerechinus granularis* and *Paracentrotus lividus*. No direct effect of pesticides was
26 observed for *M. chilensis* during the first 24 h of development. In the case of *P. lividus* and *S.*
27 *granularis*, an increase of larvae with abnormal development was observed after exposure to
28 pesticides.

30 Efectos de tres pesticidas usados en salmonicultura sobre los estadios tempranos de desarrollo
31 de tres modelos biológicos: *Mytilus chilensis*, *Sphaerechinus granularis* and *Paracentrotus*
32 *lividus*

33 **Resumen**

34 La sobreproducción en la industria del salmón ha derivado en la aparición de múltiples
35 enfermedades que afectan a los individuos en sus distintas etapas de desarrollo. Para el control
36 de *Caligus rogercresseyi*, como potencial vector de estas patologías, se han empleado distintos
37 antiparasitarios como piretroides y organofosforados. En este estudio se evalúan los efectos de
38 los pesticidas Azametifos, Deltametrina y Benzoato de Emamectina en el desarrollo temprano
39 de tres organismos modelo: el mitílido *Mytilus chilensis* y los erizos *Sphaerechinus granularis*
40 y *Paracentrotus lividus*. No se observaron efectos de los pesticidas en *M. chilensis* durante las
41 primeras 24h de desarrollo. Por el contrario, la presencia de pesticidas resulto un incremento
42 de larvas con desarrollo anormal en *P. lividus* y *S. granularis*.

43 Keywords: Salmon farming, embryo-larvae bioassay, pesticides, *M. chilensis*, *P. lividus*, *S.*
44 *granularis*

45 Running title: Effect of pesticides on larvae development

47 **1. Introduction**

48 The salmon farming industry has been one of the most productive sectors in Chilean economy
49 for several decades (Bravo *et al.*, 2013, FAO 2016). Following a global trend (Olesen *et al.*,
50 2011), large farming enterprises develop new technology in order to increase production.
51 However, current levels of production (e.g. density in farming cages) have coincided with the
52 emergence of several diseases such as Rickettsial septicemia, Infectious Salmon Anemia
53 Virus (ISA), Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPN) and the parasitic infection by the sea
54 louse *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000). The problem is present in all the
55 development stages of salmon, with different pathologies being present during freshwater and
56 seawater steps of development.

57 Parasitic infections derived from copepods have been described in Chilean salmon farming
58 since its beginning. Reports of *Caligus teres* were followed by the appearance of *Caligus*
59 *rogercresseyi* in 1997 (Reyes & Bravo 1983b, Reyes & Bravo 1983a, Boxshall & Bravo
60 2000). This copepod mainly affects two species of salmon; the Atlantic salmon (*Salmo salar*)

61 and the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Oelckers *et al.*, 2015) and can act as a vector
62 for parallel diseases (e.g. ISA) creating important economic losses associated to a lower
63 quality in the final product and lower growth rates (Bravo *et al.*, 2012, Bravo *et al.*, 2013,
64 Bravo *et al.*, 2015, Oelckers *et al.*, 2015).

65 In order to control this parasite, different pesticides, originally developed for the bovine and
66 agriculture industry, have been used. Currently, the pyrethroids Deltamethrin (DELTA) and
67 Emamectin benzoate (EMA) are widely used in baths or supplied in food in Chile and
68 Norway. The organophosphate Azamethiphos (AZA) has been recently introduced with high
69 efficacy (Nilsen *et al.*, 2017). Since treatments are done at high frequency in highly impacted
70 areas, significant quantities of these compounds can potentially be released to the aquatic
71 environment by either dilution of bath treatments of uneaten medicated food pellets, which can
72 account for as much as 15% of total administered food (Chen *et al.*, 1999) . EMA acts by
73 binding the invertebrate glutamate regulated ion channels while DELTA causes paralysis by
74 interfering with the sodium potassium channels in nerve cells. Whatever the mode of action or
75 administration of anti-lice compounds, there are high possibilities of toxicity effects for non-
76 target species.

77 Several studies have described the general effects of some of these products (i.e. cipermethrin,
78 deltamethrin) on macrofauna, phytoplankton and some species of economic importance (Ait *et*
79 *al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2011, Shen *et al.*, 2012, Samuelsen *et al.*, 2015).
80 EMA for instance is known to cause premature molting in *Homarus americanus* but lethal
81 effects on this species have been discarded. However, the existing information on the effect of
82 these compounds on the early stages of development of marine organisms is not conclusive
83 and seems to vary depending on the compound tested.

84 The embryo-larvae bioassays have been widely used, because the early stages of development
85 are more sensitive to pollutants than adults. It is a quick and inexpensive method, to evaluate
86 the normal development in early stages (Stebbing *et al.*, 1980). Mussels and sea urchins have
87 been successfully used as models to evaluate the quality of water and the biological effects of
88 contamination in marine environments (Liu & Lee 1975, Dermeche *et al.*, 2012). *Mytilus*
89 *chilensis* is a species of commercial interest (mussels production in Chile is the second largest
90 productive sector on aquaculture after salmon) whose production is carried out often in the
91 vicinity to salmons farming (Norambuena 2015). *Sphaerechinus granularis* and *Paracentrotus*

92 *lividus* on the other hand, are two species of echinoderms with wide distribution in the
93 Mediterranean Sea and Atlantic Ocean and commonly used for toxicity tests (Young *et al.*,
94 1997, De Nicola *et al.*, 2003, Carballeira *et al.*, 2011). *P. lividus* in particular is considered an
95 excellent indicator of environmental health (Dermeche *et al.*, 2012).

96 Our experiments were designed to describe the possible effects of three pesticides
97 (Azamethiphos, Deltamethrin and Emamectin Benzoate) on the early development of the
98 mussel *Mytilus chilensis* and two species of sea urchin; *Sphaerechinus granularis* and
99 *Paracentrotus lividus*.

100

101 **2. Materials and methods**

102 **2.1. Effect of three pesticides on the early stages of mussel's development**

103 The experiments were carried out between in February 2016 (8th to 13th) at the Chinquihue
104 Foundation in Puerto Montt, Chile.

105 The experiments were designed to evaluated the toxicity of three pesticides solutions;
106 Azamethiphos (AZA), Deltamethrin (DELTA) and a combination of both (Azamethiphos +
107 Deltamethrin; 90:10v/v, AZA/DELTA) on the initial stages of development of *Mytilus*
108 *chilensis*. A negative control was setup with no pesticide addition. Stock solutions of
109 Azamethiphos (Dr. Ehrenstorfer, 98.5% purity), Deltamethrin (Dr. Ehrenstorfer, 99.5% purity)
110 and Azametiphos + Deltamethrin were prepared by dissolving the reagents (analytical grade)
111 in acetone and then diluting onto four concentrations per pesticides as treatments: 1, 10, 100,
112 1000 µg L⁻¹. These concentrations were defined in order to test increasing effects and keeping
113 the actual concentration within ranges commonly used in the salmon industry. We used high
114 pesticides at high purity and not the commercial version used in salmon farming. The reason
115 was to avoid interference with other chemical species used in the commercial version of the
116 product.

117

118 The experimental setup included the following steps: spawning induction, incubation (with
119 added pesticides) and evaluation of malformations.

120 **2.2. Spawning induction**

121 Adult stages of mussels *Mytilus chilensis* were collected in Pichicolo, Palena Province in
122 northern Chilean Patagonia (41°93'S; 72°51'E). Previous to spawning, they were cleaned of

123 any attached materials and acclimated for 3 weeks in tanks with 1 µm filtered and sterilized
124 seawater.

125 Spawning was induced by temperature shock by alternating immersion in seawater at 12°C
126 and 25°C for 30 min each time (repeated twice) in 0.2 µm-filtered and UV-sterilized seawater.
127 Once the spawning started, mussels were separated by sex in individual beakers (1L). Sperm
128 was added to the eggs and carefully stirred to allow fertilization. The embryos were allowed to
129 stand for 30-40 minutes, in order to allow sedimentation of the embryos with higher lipids
130 content and therefore better quality.

131

132 **2.3. Incubations with added pesticides**

133 The incubations were carried out in 96-well polystyrene flat-bottom microplates (Table 1) and
134 started two hours after the fertilization. In total, fifteen microplates were incubated. Each
135 microplate was divided in 4 sections; 3 sections were used for the pesticides tests (with 5
136 replicates per concentration), and one section was used as control with 9 replicates for each
137 control (seawater and acetone; Fig. 1a). In each well tested for pesticides effect we added 160
138 µL of 0.22 µm filtered seawater (FSW), 20 µL of a pesticide solution and 20 µL of embryos
139 solution. In the acetone and seawater control wells we added 180 µL of 0.22 µm FSW and 20
140 µL of embryos solution. Because embryos were fixed in acetone, an acetone control was
141 additionally added and included 20 µL of acetone (Table 1).

142 The microplates were incubated for 22 h at 17°C in dark conditions, without mixing. Three
143 microplates were fixed with 10% formaldehyde at 0 and 22 h post-incubation while two
144 microplates were fixed after 5 h of incubation. Embryos were counted and observed for
145 deformities and malformations using an *Olympus CKX41* inverted microscope. Pictures of the
146 larvae were taken at each sampling time. In general, the initial quantity of embryos per well
147 was variable but had a mean of 31 ± 13 embryos per well.

148 The characterization of each stage as: normal, retarded, without division and busted, was
149 based on the observations made by Ruiz et al. (2008) for *Mytilus galloprovincialis* (Ruiz et al.,
150 2008).

151

152

153

154 **2.4. Statistical analysis**

155 A one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's post-hoc tests were done using “R”
156 in order to determine the significant differences ($p \leq 0.05$) among the treatments. No
157 transformations were made for data processing.

158

159 **2.5. Effect of three pesticides on early stages of sea urchin larvae**

160 The experiments were carried out between March 2nd and April 9th 2015 at the Observatoire
161 Océanologique de Banyuls sur Mer, France.

162 We tested the effect of three pesticides (AZA, DELTA and EMA) on embryonic and larval
163 stages of development of two species of cultured sea urchins, *Sphaerechinus granularis* and
164 *Paracentrotus lividus*. The initial solutions of AZA, DELTA and EMA were prepared to a
165 concentration of 10 g L^{-1} in a solution of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, 99.9 %).
166 Serial dilutions were made with DMSO 1% to obtain the final concentrations of 1000, 100, 10
167 and $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

168 As seen for mussels, the experimental setup includes three steps: spawning induction,
169 fertilization and incubation.

170

171 **2.6. Spawning induction**

172 Specimens from each species (*S. granularis* and *P. lividus*) were shaken vigorously and
173 deposited on a 200 mL plastic beaker filled with seawater for collecting the eggs and sperm.
174 Eggs were filtered through nylon 120 μm mesh, washed with 0.22 μm filtered seawater (FSW)
175 and diluted to 2500 cell mL^{-1} . The eggs were fertilized with diluted sperm (1:100.000 FSW;
176 10 μL of dry sperm per mL of FSW and 10 μL of this solution to 10 mL of eggs).

177

178 **2.7. Incubations with added pesticides**

179 The incubations were carried out in three 96-well polystyrene flat-bottom microplates (Perkin
180 Elmer). Each microplate was divided in 4 sections; 3 sections were used for the pesticides test
181 (with 5 replicates for each concentration), and one section was used for a seawater control
182 with 12 replicates (Fig.1b). In each well treated with pesticide 160 μL of 0.22 μm filtered
183 seawater (FSW) were added along with 20 μL of pesticides solution and 20 μL of embryos
184 solution. In control wells, 180 μL 0.22 μm FSW and 20 μL of embryos solution were added

185 (see Table 2). We did not perform a DMSO control because no impacts were reported on
186 development of sea-urchin, especially in *P. lividus* (Sciarrino & Matranga 1995).

187 The microplates were incubated at 17°C in dark conditions. Two microplates were fixed with
188 formaldehyde 2% at 48, 72 and 96 hours post-fertilization. Embryos in each well were
189 observed using an *Olympus IX70* inverted microscope.

190 The embryos were classified as normal, delayed or abnormal. The characterization of each
191 embryo category was performed using the observations made by Young *et al* (1997) as a
192 reference for the species *S. granularis*, and descriptions of (Carballeira *et al.*, 2012b) for *P.*
193 *lividus*.

194

195 **3. Results**

196 **3.1. Effect of pesticides on larvae of *M. chilensis***

197 At T0, the embryos with normal development presented cells with more of three divisions
198 (Fig. 2a and b). The number of embryos in normal state for each treatment and concentration
199 is shown in Figure 3 (a, d and g). For all the pesticide treatments and concentrations, only 2 to
200 4% of embryos were delayed and had less than three cell divisions while between 0 and 2%
201 were undivided. Significant differences were observed between treatments due to variability in
202 the initial amounts of embryos deposited in the wells (14 minimum-70 maximum). Overall, the
203 percentage of normal development at T0 was ~96%.

204 After five hours of incubation, only embryos of the control treatment (FSW) showed normal
205 development (blastula phase; Fig. 2d) while, in treatments with acetone (acetone control and
206 pesticides) more of 90% of the larvae had a late development (Fig. 2c-d), showing no
207 advancements in development compared to T0. Significant differences were found between
208 the seawater control and the treatments with acetone (Table 3; $p < 0.05$). Between 1 and 12% of
209 the larvae were busted and up to 5% were undivided (Fig. 3 b, f and h). In general, the
210 percentage of normal development was only 15.9 %. Cell debris was observed in all the wells.

211 Similar results were obtained after 22h of incubation. The embryos showed multiple divisions
212 in the FSW control and were in a delayed state of development in treatments with acetone
213 (Fig. 2e-f). Significant differences were found between the seawater control and the treatments
214 with acetone (Table 3; $p < 0.05$). A 15% of larvae were busted in FSW control and up to 8% of
215 the larvae were undivided in AZA/DELTA 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Unknown quantities of embryos were

216 busted. Again, cells debris was observed in all the wells. Considering the total normal
217 embryos, only a 21% had a normal development.

218

219 **3.2. Effect of pesticides on sea urchin larvae**

220 After addition of pesticides, different states of larval development were observed including
221 normal, delayed and with malformations.

222 The *P. lividus* pluteus larvae with normal development 48 h post fertilization (Fig. 4a) had a
223 complete skeleton with a pointed aboral end, total formation of the first pairs of skeletal rods
224 and second pair growing. Delayed larvae had a late skeletal development, skeleton with a
225 rounded tip, first pair of skeletal rods growing and without evidence of a second pair of arms
226 (Fig. 4b-c).

227 Larvae with malformations showed different defects in the skeleton; the aboral end open or
228 crossed (Fig. 4 d, e and f), the skeletal rods and aboral end gathered up (Fig .4g), aboral end
229 and skeletal rods development stopped (Fig. 4h). In some cases development completely
230 stopped before gastrulation (Fig. 4i).

231 In control conditions, about 10 % of *P. lividus* larvae showed a small delay in development
232 (Fig. 6a, b and c) and 20% have light morphological anomalies. The frequency of abnormal
233 development severely increased with pesticides concentration. The percentages of
234 malformation reach 70% of the larvae in DELTA (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), 66% in AZA (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$)
235 and 70% in EMA (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$).

236 Similar skeletal abnormalities have been already reported in *P. lividus* after exposure to the
237 organophosphate Diazinon (Pesando *et al.*, 2003) with ruptures of the ectoderm and
238 incomplete skeletal rods (Carballeira *et al.*, 2012b). Similarly, embryos and larvae of this
239 species showed a high sensitivity to heavy metal exposure (Dermeche *et al.*, 2012).

240 The *S. granularis* pluteus larvae with normal development 96 h post fertilization (Fig. 5a) had
241 a developed skeleton, total formation of the first pair of skeletal rods and a growing second
242 pair. Larvae in a delayed state showed a formed skeleton with the first pair of skeletal rods
243 growing and without the second pair (Fig. 5b and c). Moreover, malformations in the skeleton
244 of the larvae were observed (Fig. 5d, e) with incorrect location of the skeletal bars, hyper-
245 extended arms, fused tips into the aboral end as well as aborted development (Fig. 5f).

246 The percentage of retarded larvae increased with pesticides concentration. At low pesticide
247 concentrations ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), 15% of DELTA or AZA and 28% of EMA treated larvae had a
248 delayed development. Those percentages reach respectively 20 to 25% in DELTA and AZA
249 and 35% in EMA treated eggs ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$; Fig. 6a, b). While 25% of larvae presented
250 deformities at low pesticides concentration ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), this percentage increased with the dose
251 with a maximum of 50% larval abnormalities in EMA ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) treated embryos.
252 Higher percentages of abnormal larvae were observed in *P. lividus*, compared to *S. granularis*
253 suggesting different levels of sensitivity to xenobiotics in different species as already reported
254 (Carballeira *et al.*, 2012a). Moreover, preliminary tests did not find effects of pesticides on the
255 fertilization and early development divisions of *P. lividus* and *S. ganularis*. Carballeira *et al.*
256 (2011) suggest that fertilization tests are less sensitive than the embryo-larval bioassays and
257 that pollutants can disturb the larval development without affecting the fertilization process
258 (Carballeira *et al.*, 2011).

259

260 **4. Discussion**

261 The compounds tested in this study are commonly used by the salmon industry as treatments
262 for lice infections in Chile (*C. rogercresseyi*) and Norway (*L. salmonis*) (Olesen *et al.*, 2011).
263 Their intensive use is currently instrumental for decreasing losses due to diseases and
264 parasites. While Azametifos and Deltamethrin can be applied as external bath treatments,
265 Emamectin benzoate is orally administrated as food supplement and therefore is less absorbed
266 by fishes. However, it can be significantly transferred into the environment as uneaten food
267 pellets and fecal pellets. Pesticides can also be added to the environment through plant feeds
268 that have been recently developed. Mixtures of contaminants are therefore possible, with yet
269 poorly characterized effect in non target biota (Søfteland *et al.*, 2014).

270 Through the experiments described here, we explored the occurrence of development
271 abnormalities resulting from the exposure of three biological models with potential economic
272 importance to these compounds.

273 Mussel's larvae development did not show significant abnormalities after exposure to any
274 compound or combination of compounds. Possible effects were undistinguishable from the
275 effects of acetone (which showed a high percentage of embryos with delayed development).

276 Tucca *et al.* (unpublished data) observed more than 60% of undeveloped larvae of *M. chilensis*

277 after being exposed to this solvent. Severe reduction of oxygen levels and the presence of
278 acetone were also found to influence development in previous studies with mussels (Liu &
279 Lee 1975, Wang & Widdows 1991).

280 Although negative effects after exposure to pesticides such as pyrethroids and organic
281 phosphorus compounds have been reported in mussel's adults and larvae stages (Gowland *et al.*,
282 2002, Renault 2011), there are no studies that evaluate their effects during the first 24 h of
283 development of larvae, particularly in *M. chilensis*. Adults of freshwater mussels (*Anodonta*
284 *cygnea*) suffered altered filtration behavior after exposure to Deltamethrin (Kontreczky *et al.*,
285 1997). For other organisms, such as American oyster and hardshell-clam, different effects
286 were found for pesticides in different stages of development (Calabrese 1972). Some
287 pesticides affect primarily embryonic development compared to survival rate or growth of
288 larvae. Likewise, a low concentration of toxicant that had a low effect in embryonic
289 development can delay the growth of fully development larvae.

290 Concerning echinoderms, the exposure of embryos of *P. lividus* and *S. granularis* to the
291 pesticides Azamethiphos, Deltamethrin and Emamectin benzoate altered their larval
292 development, therefore compromising the viability of exposed individuals. Until now, there
293 are no evidence of reversible effects after exposure to chemicals, so that alterations of
294 embryonic and larval development can reduce the success of the adult individuals and the
295 continuity of the population in natural environment (Carballeira *et al.*, 2012b).

296 It is known that the distribution of chemical compounds (particularly of pharmaceutical use) in
297 marine environments depends on the depth of the farm and local circulation (Langford *et al.*,
298 2014, Samuelsen *et al.*, 2015). In Norway, Emamectine benzoate accumulates in high
299 quantities in sediments (Langford *et al.*, 2014). Low currents can also enhance organic
300 accumulations of pesticides (i.e. tuflubenzuron) below or near salmon cages and can limit its
301 horizontal distribution beyond 500m (Samuelsen *et al.*, 2015).

302 Wild fauna associated to salmon farming can also be affected an studies on adult fish species
303 have proved inconclusive. Although accumulation of chemical has been described (e.g.
304 tuflubenzuron), toxic testing revealed low toxicity effect (Olsvik *et al.*, 2013, Samuelsen *et al.*,
305 2015). High accumulation but low lethal outcome has been reported for polychaetes but high
306 toxicity was observed in diverse species of crustacean (Olsvik *et al.*, 2013, Samuelsen *et al.*,
307 2015). Unlike Emmamectine Benzoate, Deltamethrin was not detected in natural samples in a

308 study in Norway (Langford *et al.*, 2014). EMA is mostly accumulated in sediments and its
309 incidence in blue mussel (*M. edulis*) has been reported as low or under detection limits during
310 treatments (Telfer *et al.*, 2006, Langford *et al.*, 2014).

311 Resistance to drugs developed in caligid copepods is partly caused by transcriptional
312 modifications. By occurring, it forces alternation in the use of specific products by the salmon
313 farming industry. However, the use of chemical treatments for lice infections cannot be
314 suspended until the still variable effectiveness of alternative treatments such as freshwater and
315 biological methods is improved (Olesen *et al.*, 2011, Bravo *et al.*, 2015). Recent increase in
316 resistance to EMA has lead to a decrease in its use while deltamethrin, cypermethrin and other
317 pyrethroids have known increases in its use, including the organophosphorous AZA. AZA has
318 been known to cause mortality and spawning damage in lobster in confined conditions
319 (BurrIDGE *et al.*, 2008, Couillard & BurrIDGE 2015) and to alter some metabolic functions in *M.*
320 *edulis* adult stages (Canty *et al.*, 2007).

321 The concentrations of veterinary pesticides used in salmon industry are lower than those tested
322 in this study. In contrast to the highly pure products used on our experiments, treatments of
323 baths for salmons use Azametiphos and Deltamethrin at 50% and 1% of purity, respectively.
324 In the case of Emamectin benzoate supplied as food, a product with only 0.2% of purity is
325 applied (IFOP, 2015). Therefore, the concentrations of compounds found in marine
326 environments during treatments are likely to be lower than those used in our tests.
327 Nevertheless, the frequency of treatments and the rotation of compounds usually applied given
328 the little information that exists about the amounts of this compounds used regularly, more
329 studies are necessary for evaluating the effects of these compounds and mixture of them in the
330 organisms.

331

332 Our results suggest variable effects of anti-lice treatments for marine organisms going from
333 innocuous impact on *M. chilensis* larvae to recruitment compromising effects for echinoderms.

334 These responses imply that although used in low concentrations, anti lice drugs can affect non
335 target species of the benthic fauna in near shore facilities. Although the simplicity of the
336 embryo-larval bioassay makes it a good method for evaluating the effect of pollutants in the
337 organisms and the environmental health, further molecular tests will allow understanding the
338 regulation of toxicity in vulnerable species.

339 **5. Conclusions**

340 Considering the early stages of development of *M. chilensis*, embryos did not show a clear
341 effect to exposure to pesticides. All the possible effects were masked by the presence of
342 acetone in the pesticide treatments making unlikely the occurrence of independent defects
343 linked to pesticide use. We did not observe clear differences between pesticides at the
344 different concentrations tested.

345 The development stages of *P. lividus*, embryos and larvae were more sensitive to pesticide
346 exposure compared to *S. granularis*, with a higher percentage of abnormal embryo-larvae
347 development or malformations. Therefore, the response of organisms in different
348 developmental stages is species-specific to the exposure to pollutants.

349

350 **6. References**

- 351 Ait, A. M., F. M. Ait and A. Mouabad. 2011. Effects of cypermethrin (Pyrethroid insecticide)
352 on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine
353 mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch. Environ. Con. Tox 60: 462-470.
- 354 Boxshall, G. A. and S. Bravo. 2000. On the identity of the common Caligus (Copepoda:
355 Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen system in southern Chile. Contrib. Zool.
356 69(137-146).
- 357 Bravo, S., M. Nuñez and M. Silva. 2013. Efficacy of the treatments used for the control of
358 Caligus rogercresseyi infecting Atlantic Salmon, *Salmo Salar* L., in a new fish-farming
359 location in Region XI, Chile. Journal of Fish Diseases 36: 221-228.
- 360 Bravo, S., V. Pozo and M. Silva. 2015. Evaluación de la efectividad del tratamiento con agua
361 dulce para el control del piojo de mar *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000. Latin
362 American Journal of Aquatic research 43(2): 322-328.
- 363 Bravo, S., M. T. Silva and G. Monti. 2012. Efficacy of emamectin benzoate in the control of
364 Caligus rogercresseyi on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile from 2006-2007.
365 Aquaculture 364-365: 64-66.
- 366 BurrIDGE, L. E., K. Haya and S. L. Waddy. 2008. The effect of repeated exposure to
367 azamethiphos on survival and spawning in the American lobster (*Homarus americanus*).
368 Ecotoxicology and Environmental Safety 69(3): 411-415.

369 Calabrese, A. 1972. How some pollutants affects embryos and larvae of American oyster and
370 hardshell clam. *Mar. Fish. Rev* 34: 66-77.

371 Canty, M. N., J. A. Hagger, R. T. B. Moore, L. Cooper and T. S. Galloway. 2007. Sublethal
372 impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine
373 mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin* 54(4): 396-402.

374 Carballeira, C., M. de Orte, I. Viana and A. Carballeira. 2012a. Implementation of a minimal
375 set of biological test to assess the ecotoxic effect of effluents from land-based marine fish
376 farms *Ecotox. Environ* 78: 148-161.

377 Carballeira, C., M. Martín-Díaz and T. DelValls. 2011. Influence of salinity on fertilization
378 and larval development toxicity test with two species of sea urchin. *Mar. Environ. Res* 72:
379 196-203.

380 Carballeira, C., J. Ramos-Gómez, L. Martín-Díaz and T. DelValls. 2012b. Identification of
381 specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine
382 pisciculture effluents. *Marine Environmental Research* 77: 12-22.

383 Chen, Y., M. Beveridge and T. C. Telfer. 1999. Physical characteristics of commercial
384 pelleted Atlantic salmon feeds and consideration of implications for modeling of waste
385 dispersion through sedimentation. *Aquaculture International* 7: 89-100.

386 Couillard, C. M. and L. E. Burrige. 2015. Sublethal exposure to azamethiphos causes
387 neurotoxicity, altered energy allocation and high mortality during simulated live transport in
388 American lobster. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 115: 291-299.

389 De Nicola, E., M. Gallo, M. Lacarrino, S. Meric, R. Oral, T. Russo, T. Sorrentino, O. Tünay,
390 E. Vutariello, M. Warnau and G. Pagano. 2003. Hormetic versus toxic effect og vegetable
391 tannin in a multitest study. *Arch. Environm. Contam. Toxicol* 46: 336-344.

392 Dermeche, S., F. Chahrour and Z. Boutiba. 2012. Evaluation of the toxicity of metal pollutants
393 on embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)
394 (Echinodermata Echinoidea) *Biodiversity Journal* 3(3): 165-172.

395 FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016: Contribucion a la eguridad
396 alimentaria y la nutricion para todos. O. d. l. N. U. p. l. a. y. agricultura. Rome: 224.

397 Gowland, B., L. Webster, R. Fryer, I. Davies, C. Moffat and R. Stagg. 2002. Uptake and
398 effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in the marine mussel, *Mytilus*
399 *edulis*. *Environ. Pollut* 120: 805-811.

400 Kontreczky, C., A. Farkas, J. NemcsÁk and J. SalÁnki. 1997. Short- and Long-Term Effects
401 of Deltamethrin on Filtering Activity of Freshwater Mussel (*Anodonta cygnea L.*).
402 *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38(3): 195-199.

403 Kumar, A., B. Sharma and R. S. Pandey. 2011. Cyper-methrin induced alterations in nitrogen
404 metabolism in freshwater fishes. *Chemosphere* 83: 492-501.

405 Langford, K., S. Øxnevad, M. Schøyen and K. Thomas. 2014. Do antiparasitic medicines used
406 in aquaculture pose a risk to the Norwegian aquatic environment? *Environ. Sci. Technol*
407 48(7774-7780).

408 Liu, H. W. and J. M. Lee. 1975. Toxicity of selected pesticides to the bay mussel (*Mytilus*
409 *edulis*). *Ecological Report Series (EPA-660)*: 110.

410 Nilsen, A., K. Nielsen, E. Biering and A. Bergheim. 2017. Effective protection against sea lice
411 during the production of Atlantic salmon in floating enclosures. *Aquaculture* 466: 41-50.

412 Norambuena, L. 2015. Evaluación de la capacidad de mitílidos de bioacumular productos
413 químicos y farmacéuticos de uso en la acuicultura División Investigación en Acuicultura. I. d.
414 F. P. (IFOP): 598.

415 Oelckers, K., S. Vike, H. Duesund, J. González, A. Nylund and G. Yany. 2015. *Caligus*
416 *rogercresseyi* as a potential vector for transmission of infectious salmon anaemia (ISAv). *Lat.*
417 *Am. J. Aquat. Res* 43(2): 380-387.

418 Olesen, I., A. Ingeborg and G. Rosendal. 2011. Sustainable Aquaculture: Are We Getting
419 There? Ethical Perspectives on Salmon Farming. *J Agric Environ Ethics* 24: 381-408.

420 Olsvik, P., O. Samuelsen, A. Erdal, B. Holmelid and B. Lunestad. 2013. Toxicological
421 assessment of the anti-salmon lice drug diflubenzuron on Atlantic cod *Gadus morhua*. *Dis.*
422 *Aquat. Org* 105: 27-43.

423 Pesando, D., P. Huitorel, V. Dolcini, C. Angelini, P. Guidetti and C. Falugi. 2003. Biological
424 targets of neurotoxic pesticides analysed by alteration of developmental events in the
425 Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Mar Environ Res* 55: 39-57.

426 Renault, T. (2011). Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What
427 Do We Need to Know? *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*. D. M.
428 Stoytcheva, InTech, DOI: 10.5772/19155.

429 Reyes, X. and S. Bravo. 1983a. Nota sobre una copepoi-dosis en salmones de cultivo. *Invest*
430 *Mar* 11: 55-57.

431 Reyes, X. and S. Bravo. 1983b. Salmón coho (*Onchorynchus kisutch*) cultivado en Puerto
432 Montt, Chile, nuevo huésped para el copépodo *Caligus teres* (Caligidae). Invest. Mar. 11: 51-
433 54

434 Ruiz, M., E. Tarifeño, A. Llanos-Rivera, C. Padget and B. Campos. 2008. Efecto de la
435 temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis*
436 (Lamarck, 1819). Revista de Biología Marina y Oceanografía 43(1).

437 Samuelsen, O., B. Lunestad, R. Hannisdal, R. Bannister, S. Olsena, T. Tjensvoll, E. Farestveit
438 and A. Ervik. 2015. Distribution and persistence of the anti sea-lice drug teflubenzuron in wild
439 fauna and sediments around a salmon farm, following a standard treatment. Science of the
440 Total Environment 508: 115-121.

441 Sciarrino, S. and V. Matranga. 1995. Effects of retinoic acid and dimethylsulfoxide on the
442 morphogenesis of the sea urchin embryo. 19(8).

443 Shen, M.-F., A. Kumar, S.-Y. Ding and S. Grocke. 2012. Comparative study on the toxicity of
444 pyrethroids, α -cypermethrin and deltamethrin to *Ceriodaphnia dubia*. Ecotoxicol. Environ. Safe
445 78: 9-13.

446 Søfteland, L., J. A. Kirwan, T. S. F. Hori, T. R. Størseth, U. Sommer, M. H. G. Berntssen, M.
447 R. Viant, M. L. Rise, R. Waagbø, B. E. Torstensen, M. Booman and P. A. Olsvik. 2014.
448 Toxicological effect of single contaminants and contaminant mixtures associated with plant
449 ingredients in novel salmon feeds. Food and Chemical Toxicology 73(0): 157-174.

450 Stebbing, A., A. B, C. A, G. J.H, J. A and L. R. 1980. The role of bioassays in marine
451 pollution monitoring. Rapp P-V Reun CIESM Mediterr 179: 322-332.

452 Telfer, T. C., D. J. Baird, J. G. McHenry, J. Stone, I. Sutherland and P. Wislocki. 2006.
453 Environmental effects of the anti-sea lice (Copepoda: Caligidae) therapeutant emamectin
454 benzoate under commercial use conditions in the marine environment. Aquaculture 260(1-4):
455 163-180.

456 Wang, W. X. and J. Widdows. 1991. Physiological responses of mussel larvae *Mytilus edulis*
457 to environmental hypoxia and anoxia. Mar. Ecol. Prog. Ser 70: 223-236.

458 Wang, Z. H., X. Nie and W. Yue. 2011. Toxicological effects of cypermethrin to marine
459 phytoplankton in a co-culture system under laboratory conditions. Ecotoxicology 20: 1258-
460 1267.

461 Young, C. M., P. Tyler and L. Fenaux. 1997. Potential for deep sea invasion by Mediterranean
462 shallow water echinoids: pressure and temperature as stage-specific dispersal barriers. Mar.
463 Ecol. Prog. Ser 154: 197-209.

464

465 7. Figure Legends

466 **Figure 1:** Distribution of pesticides concentration treatments (1 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) and controls in
467 each 96-wells microplate for (a) *M. chilensis* bioassay and (b) sea urchin bioassay. FSW:
468 Filtered Sea Water (0.2 μm).

469 **Figura 1:** Distribución de tratamientos de pesticidas (1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) y controles en las
470 microplacas (96-pozos) (a) bioensayo *M. chilensis* y (b) Bioensayo echinodermos. FSW: Agua
471 de mar filtrada (0.2 μm).

472 **Figure 2:** Larval development of *M. chilensis* during the experiment. Left side, larvae in
473 normal state in seawater control. Right side, larvae in delayed state in acetone control and
474 pesticides treatments. T0 (a - b), T5 (c - d) and T22 (e - f). Scale: 40X.

475 **Figura 2:** Desarrollo larval de *M. chilensis* durante el experimento. Panel izquierdo: larvas
476 con desarrollo normal en el control. Panel derecho, larvas con retraso en el desarrollo, en el
477 control acetona y tratamientos con pesticidas. T0 (a - b), T5 (c - d) y T22 (e - f). Escala: 40X.

478 **Figure 3:** Percentage of embryos of *M. chilensis* with normal, retarded, busted and undivided
479 development, exposed to AZA a) T0 b) T5 and c) T22, DELTA d) T0 e) T5 and f) T22 and the
480 combination AZA/DELTA g) T0, h) T5 and i) T22.

481 **Figura 3:** Porcentaje de embriones de *M. chilensis* con desarrollo normal, retrasado, células
482 inviables y no-divididas, como resultado de la exposición a AZA a) T0 b) T5 y c) T22,
483 DELTA d) T0 e) T5 y f) T22 y la combinación AZA/DELTA g) T0, h) T5 y i) T22.

484 **Figure 4:** Stages of pluteus larvae of *P. lividus* after 48h of incubation with pesticides. a)
485 Normal larvae b)- c) larvae with retarded development d)- i) larvae with malformations. Scale:
486 10X.

487 **Figura 4:** Estados de desarrollo de larvas pluteus de *P. lividus* a las 48h de incubación en
488 presencia de pesticidas. a) Normal b)- c) larvas con retraso en el desarrollo d)- i) larvas con
489 malformaciones. Escala: 10X.

490 **Figure 5:** Type of pluteus larvae of *S. granularis* after 96h of incubation with pesticides. a)
491 Normal larvae b) - c) larvae with retarded development d) - f) larvae with malformations.
492 Scale: 10X.

493 **Figura 5:** Estados de desarrollo de larvas pluteus de *S. granularis* a las 96h de incubación con
494 pesticidas. a) Normal b) - c) larvas con retraso en el desarrollo d)- i) larvas con
495 malformaciones. Escala: 10X.

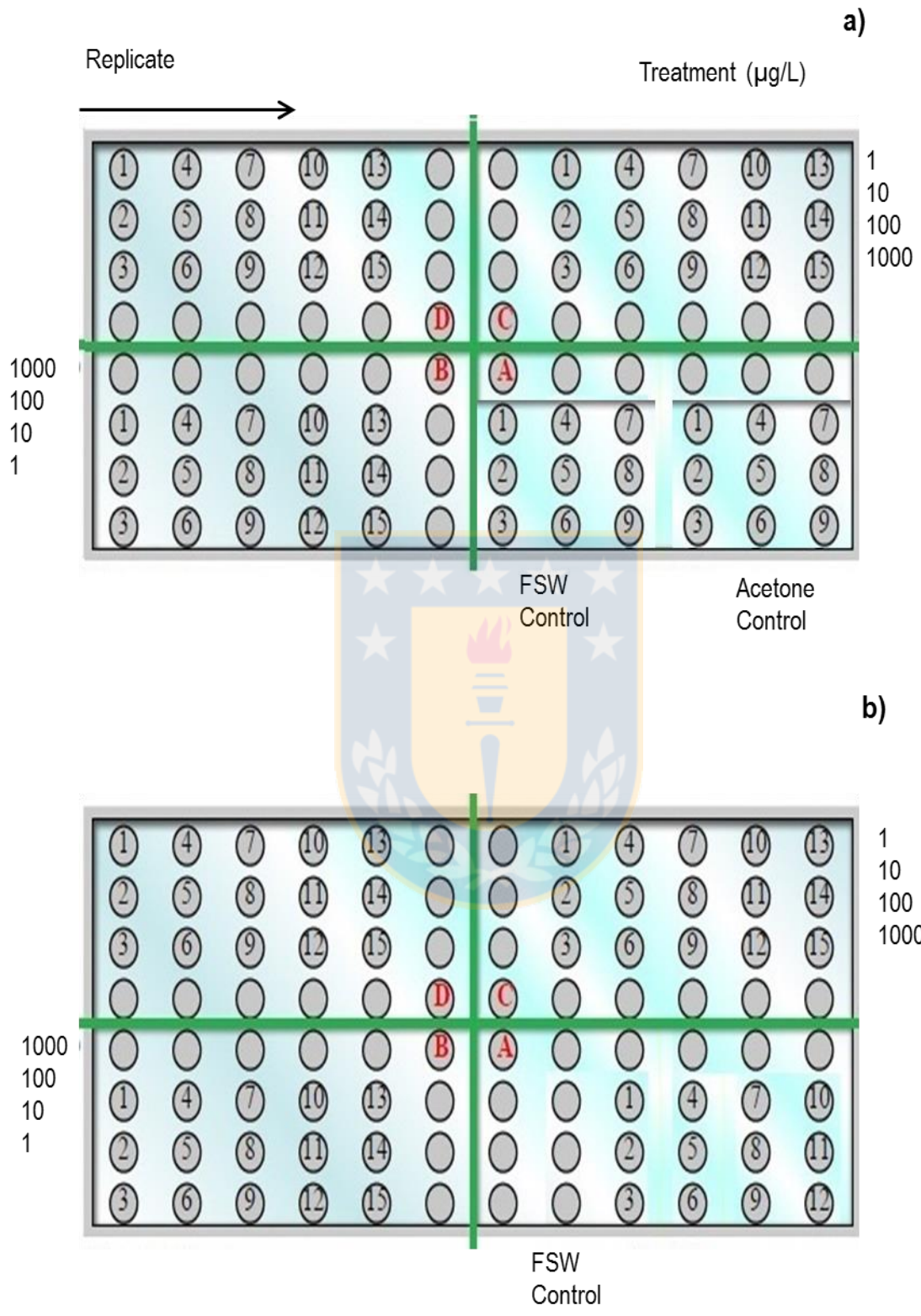
496 **Figure 6:** Percentage of pluteus larvae of *S. granularis* (72 h) and *P. lividus* (48 h) with
497 normal, retarded development and malformations when exposed to pesticides. a-d)
498 Deltamethrine, b-e) Azamethiphos, c-f) Emamectin benzoate.

499 **Figura 6:** Porcentaje de larvas pluteus de *S. granularis* (72 h) y *P. lividus* (48 h) con
500 desarrollo normal, retrasado y con malformaciones expuestos a pesticidas. a-d) Deltametrina,
501 b-e) Azametifos, c-f) Benzoato de emamectina.

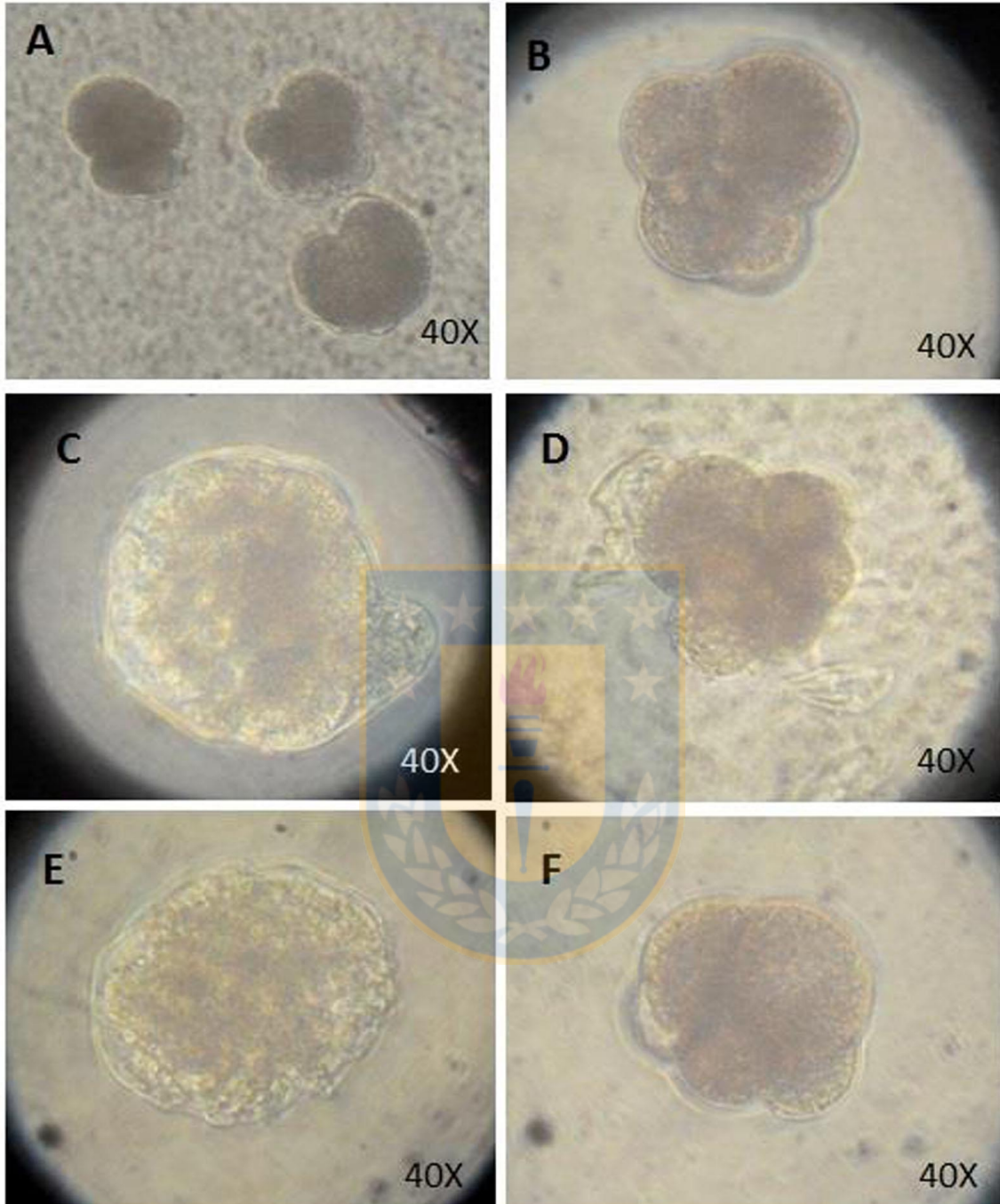
502

503



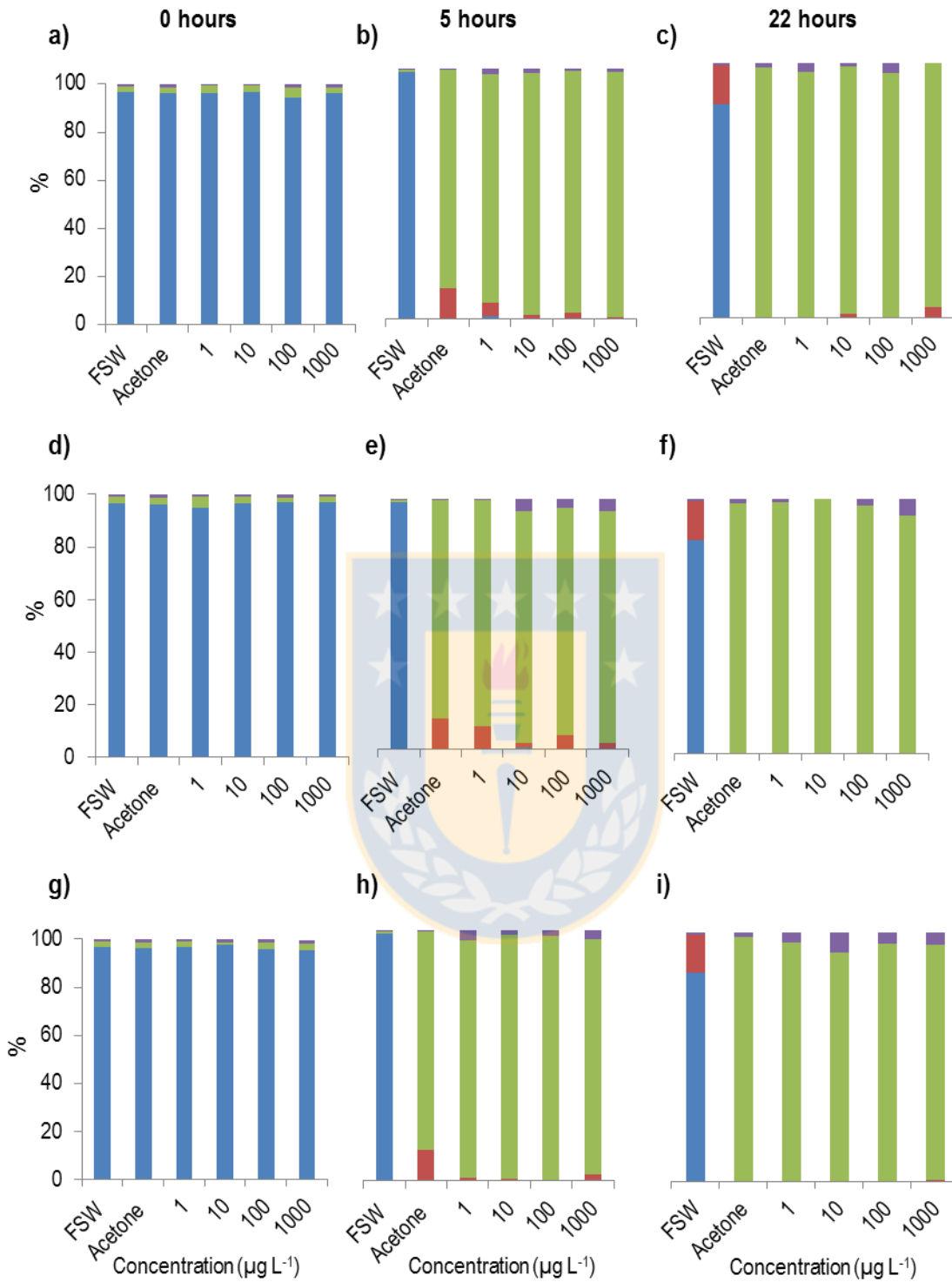


504
505 **Figure 1.**



506

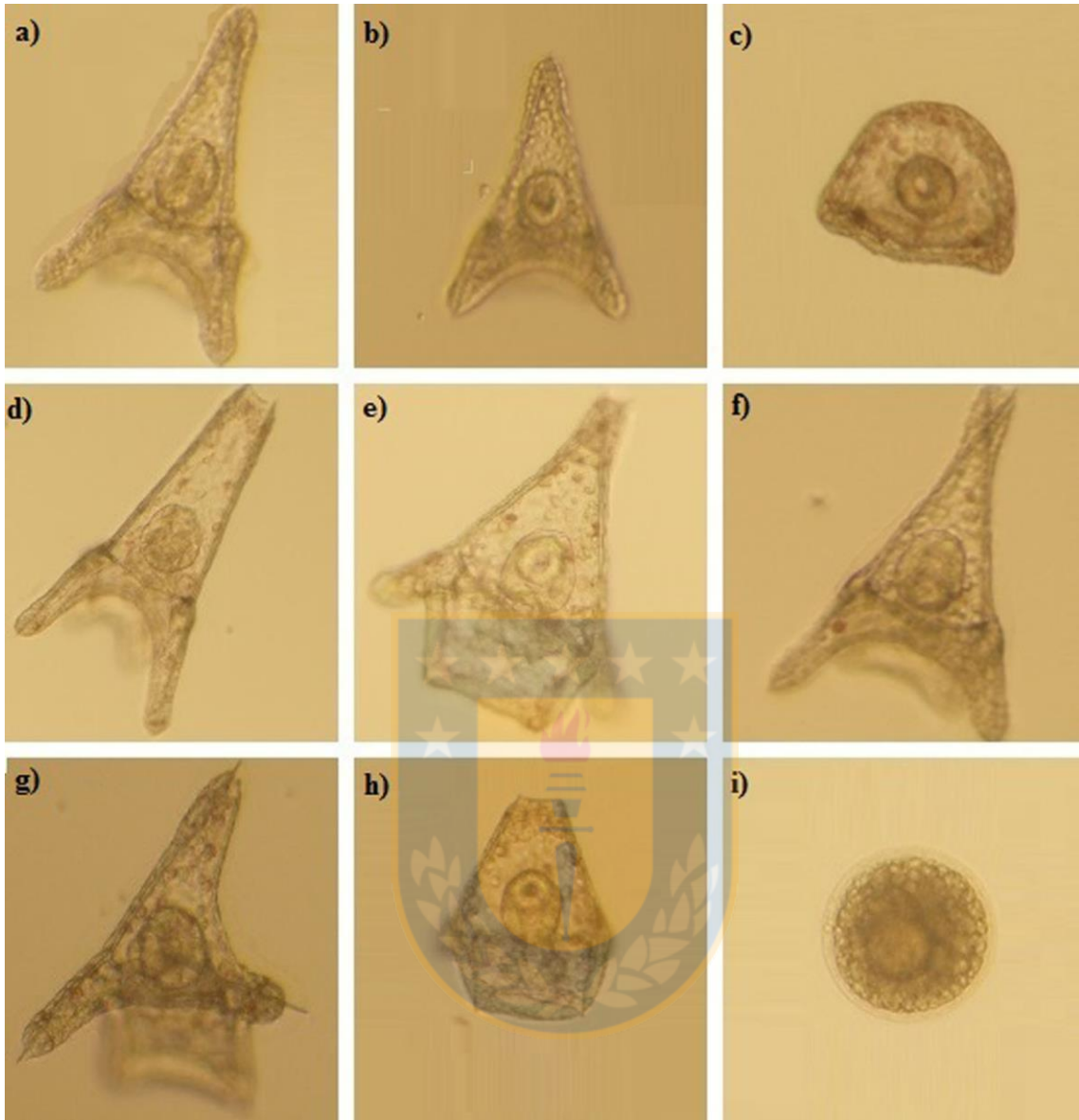
507 **Figure 2.**



■ Normal
 ■ Retarded
 ■ Busted
 ■ Undivided

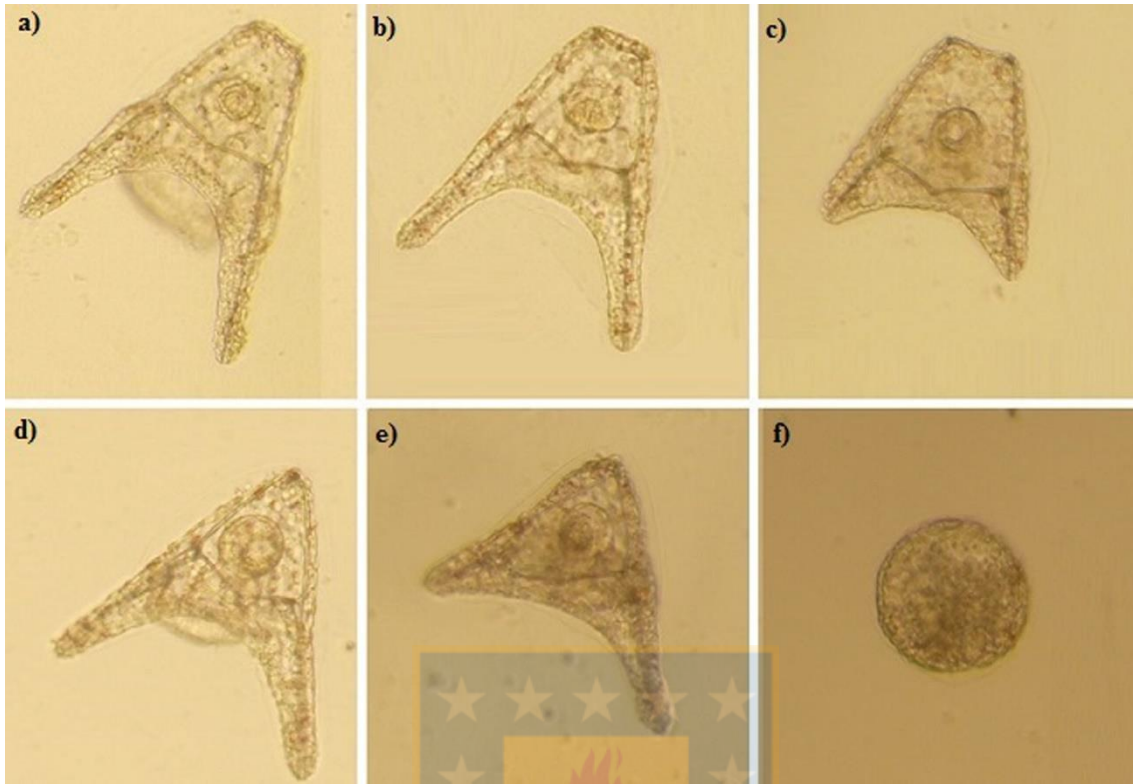
508

509 **Figure 3.**



510

511 **Figure 4.**



512

513

Figure 5.



514

515 **Figure 6.**

516 Table 1. Pesticide concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) per well in each treatment and control used in
 517 mussels bioassay. FSW: Filtered seawater, AZA: Azamethiphos, DELTA: Deltamethrin, EM:
 518 embryos in FSW.

519 Tabla 1. Concentraciones de pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) por tratamiento y control usado en el
 520 bioensayo de mitílidos. FSW: Agua de mar filtrada, AZA: Azametifos, DELTA: Deltametrina,
 521 EM: embriones en FSW.

| | | |
|-------------------------|---|------------|
| Pesticides | 160 μL FSW + 20 μL AZA+ 20 μL EM Solution | 522 |
| Treatment | 160 μL FSW + 20 μL DELTA + 20 μL EM Solution | 523 |
| | 160 μL FSW + 20 μL AZA/DELTA + 20 μL EM Solution | 524 525 |
| | | 526 |
| Seawater control | 180 μL FSW + 20 μL EM Solution | 527 |
| Acetone control | 160 μL FSW + 20 μL ACE + 20 μL EM Solution | 528 |
| | | 529 |

530 Table 2. Pesticide concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) per well in each treatment and control used in sea-
 531 urchin bioassay. FSW: Filtered seawater, AZA: Azamethiphos, DELTA: Deltamethrin, EM:
 532 embryos in FSW.

533 Tabla 2. Concentraciones de pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) por tratamiento y control usado en el
 534 bioensayo de erizos. FSW: Agua de mar filtrada, AZA: Azametifos, DELTA: Deltametrina,
 535 EM: embriones en FSW.

| | |
|-------------------|---|
| Pesticides | 160 μL FSW + 20 μL AZA + 20 μL EM Solution |
| Treatment | 160 μL FSW + 20 μL DELTA + 20 μL EM Solution |
| | 160 μL FSW + 20 μL EMA + 20 μL EM Solution |
| Control | 180 μL FSW + 20 μL EM |

536

537

538

539

540 Table 3. One-way analysis of variance (ANOVA) between treatments for each pesticide
 541 concentration used. df: Degrees of freedom, Pr: Significance probability value.

542

543 Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía entre tratamientos para cada concentración
 544 de pesticida utilizada. df: Grados de libertad, Pr: Valor de probabilidad de significancia.

545

| Time | Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) | df | F Value | Pr |
|-------------|--|-----------|----------------|--------------|
| T0 | 1 | 4 | 5.674 | 0.00039 *** |
| | 10 | 4 | 3.46 | 0.0111* |
| | 100 | 4 | 3.754 | 0.00705 ** |
| | 1000 | 4 | 4.412 | 0.00259** |
| T5 | 1 | 4 | 177.7 | <2e-16 *** |
| | 10 | 4 | 178.7 | <2e-16 *** |
| | 100 | 4 | 179.7 | <2e-16 *** |
| | 1000 | 4 | 179.7 | <2e-16 *** |
| T22 | 1 | 4 | 27.41 | 4.35e-15 *** |
| | 10 | 4 | 27.41 | 4.35e-15 *** |
| | 100 | 4 | 27.41 | 4.35e-15 *** |
| | 1000 | 4 | 27.41 | 4.35e-15 *** |

546

4. DISCUSIÓN

En este estudio se presentan los resultados de los primeros ensayos sobre los posibles impactos que las aplicaciones de tres pesticidas, utilizados en la industria acuícola para el control de ectoparásitos en Chile (*C. rogercresseyi*) y Noruega (*L. salmonis*; Olesen et al., 2011), podrían tener sobre las comunidades microbianas marinas, para ello se realizaron ensayos de laboratorio utilizando modelos biológicos y microcosmos de comunidades picoplanctónicas provenientes de zonas de cultivo intensivo de salmónidos, además de evaluaciones *in situ* y en laboratorio de la respuesta de productores primarios foto y quimioautótrofos a la presencia de estos contaminantes.

En general, los productos químicos utilizados en el tratamiento de cáligos son posteriormente liberados al medio acuático (Softeland et al., 2014), y a pesar de ello prácticamente nada se sabe sobre los efectos que pueden ejercer sobre especies no objetivo, además de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas expuestos (DeLorenzo et al., 2001; Soto and Norambuena 2004; Buschmann et al., 2006; Hernando et al., 2007; BurrIDGE et al., 2008; BurrIDGE et al., 2010).

4.1. Efecto de los pesticidas sobre modelos biológicos

Se han publicado diversos ensayos utilizando una sola especie para evaluar el impacto de distintos pesticidas sobre organismos y comunidades fitoplanctónicas y las respuestas han sido variadas (Megharaj et al., 1989; Megharaj et al., 1987; Sabater et al., 2002, Gatidou y Thomaidis, 2007; Renault, 2011; Sanchez-Ferandin et al., 2013). Sin embargo, los bioensayos con embriones y larvas continúan siendo uno de los métodos más utilizados para evaluar muestras de agua y sedimentos marinos en zonas expuestas a contaminantes debido a su rentabilidad y rapidez (Stebbing et al., 1980; Carballeira et al., 2011). Los erizos de mar y los mitílidos han sido descritos como excelentes modelos biológicos debido a su sensibilidad, disponibilidad y manejo, además de una fecundación *in vitro* simple y un corto periodo de desarrollo (Dermeche et al., 2012).

En este estudio, la aplicación de pesticidas sobre modelos de microorganismos presentó una respuesta variada, siendo inocuos para larvas de *M. chilensis* y altamente tóxicos en larvas de los equinodermos *P. lividus* y *S. granularis*. La toxicidad de los pesticidas sobre las larvas de erizo aumentó con la concentración, registrándose malformaciones de tipo

esqueletal en hasta un 50% de los organismos expuestos. En general, en modelos de microorganismos los efectos son variados y dependen del compuesto utilizado y la sensibilidad de cada especie. En el caso de los mitílidos, se han reportado efectos negativos sobre su desarrollo larval al aplicar pesticidas piretroides y compuestos fosforados (Renault, 2011), y herbicidas (His et al., 1999). Mientras que en erizo de mar se han descrito alteraciones durante el desarrollo embrionario y malformaciones de tipo esqueletal durante su desarrollo larval en diversas especies expuestas a distintos pesticidas, entre ellas *P. lividus* (His et al., 1999; Pesando et al. 2003) y *L. variegatus* (Bottger and McClintock., 2001).

4.2. Efecto de los pesticidas sobre microcosmos de comunidades microbianas

Respecto al estudios de los efectos de distintos contaminantes sobre comunidades microbianas marinas, estos pueden realizarse mediante el muestreo de comunidades naturales *in situ*, en distintas zonas y estaciones, o mediante el seguimiento en microcosmos bajo condiciones controladas (DeLorenzo et al., 1999). Para ello, la utilización de técnicas como la citometría de flujo han permitido proporcionar información sobre las variaciones de abundancia de comunidades microbianas naturales (Rutten et al., 2005), cultivos de fitoplancton (Stauber et al., 2005) o microcosmos de comunidades fotosintéticas naturales (De la Broise y Palenik, 2007), al realizar evaluaciones de toxicidad (Pesce et al., 2008). Sin embargo, las respuestas a distintos compuestos contaminantes dependen de la composición de la comunidad microbiana, la que estaría determinada por los factores ambientales de cada lugar (Levipan et al., 2012; Liu et al., 2013, Kan et al., 2007).

En este estudio se realizaron los primeros experimentos de microcosmos usando comunidades microbianas provenientes de zonas de importancia acuícola, en el mar interior de Chiloé (~ 42 ° S) y un fiordo ubicado en la Patagonia Norte (~ 44 ° S), en los que se estudió las potenciales respuestas de microorganismos acuáticos sometidos a tres pesticidas de uso actual en cultivos de salmónidos (deltametrina, azametifos y benzoato de emamectina). Los experimentos fueron realizados utilizando un enfoque pluridisciplinario mediante incubaciones en condiciones controladas.

Se evidenciaron diferencias en los experimentos en el Canal Puyuhuapi y el Canal Cauahue. Estas diferencias estarías dadas por la composición de la comunidad fitoplanctónica y bacteriana de cada área de estudio, cuyas variaciones espaciales y temporales han sido

atribuidas como una respuesta a cambios en factores ambientales, como salinidad (Levipan et al., 2012; Liu et al., 2013), temperatura (Kan et al., 2007), luz, oxígeno disuelto, nutrientes y pH (Liu et al., 2013).

En el Canal Puyuhuapi, la abundancia bacteriana inicial de los experimentos I y II, fue similar, pero relativamente baja ($\sim 250 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$) en relación a otras datas registradas en la misma zona, en invierno de 2007 (julio-agosto) y 2016 (agosto), las cuales alcanzaron valores de $\sim 1200-1300 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ (Fernández, C. datos no publicados; González H. E. comunicación personal). Sin embargo, se observaron diferencias en las respuestas de la abundancia bacteriana a la aplicación de pesticidas entre los experimentos I y II. Durante el experimento I se observó una estimulación de la abundancia bacteriana luego de la adición del pesticida azametifos sobre la abundancia bacteriana, advirtiéndose un aumento de esta al aplicar los tratamientos A y A+B, respecto al valor observado en el control. Mientras que durante el experimento II, entre T12 y T48 los registros de abundancia bacteriana se encuentran incompletos debido a problemas técnicos durante el análisis, pero a partir de T48 fue posible visualizar una estimulación de la abundancia en los tratamientos B, A+B y D+A. Esta diferencia en la respuesta del bacterioplancton en ambos experimentos, podría sugerir la existencia de cambios al interior de la comunidad microbiana presente en la zona debido a las perturbaciones ambientales producidas durante el periodo de muestreo.

En efecto, entre la primera y segunda extracción de agua (periodo del 14 al 19 de agosto de 2014), se observó el ingreso de un frente de mal tiempo en la zona, registrándose un aumento de las precipitaciones, con valores entre 14 y 30 mm día⁻¹, superando el promedio descrito por Aracena et al. (2011) para la Patagonia chilena (2,7-19,17 mm día⁻¹), y un aumento en el caudal del río Cisnes en un 400% ($1526 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) respecto al promedio mensual registrado por la DGA (www.dga.cl), esto produjo una disminución de 6 puntos en la salinidad superficial (2m) entre el experimento I y II. Lo anterior ha sido registrado en diversos estudios sobre las variaciones de la composición bacteriana a lo largo de gradientes de salinidad en ambientes marinos costeros (Henriques et al. 2006, Levipan et al., 2012), los cuales han permitido asociar directamente la composición de la comunidad con la concentración de sal en el ambiente (Zhang et al., 2015; Paulsen et al., 2016). Además, varios autores han descrito que la abundancia total de la comunidad bacteriana puede mantenerse parcialmente estable, y sin

embargo las abundancias relativas de los grupos que la componen pueden sufrir importantes variaciones (Gasol et al., 2002; Bertoglio, 2012).

De manera opuesta, si bien la abundancia bacteriana registrada en el Canal Caucahue ($\sim 1600 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$) concuerda con lo descrito por Iriarte *et al.* (2014) para el fiordo Comau (42°S ; 72°W), una zona aledaña al mar interior de Chiloé ($\sim 2000 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$). Esta no registró variaciones significativas al aplicar los distintos tratamientos con pesticidas. En general, se han reportado respuestas variadas de la abundancia bacteriana en presencia de distintos plaguicidas, registrando aumentos al aplicar los insecticidas clorpirifós (DeLorenzo et al., 2001) y cipermetrina (Zhang et al., 2009), disminuciones con el insecticida endosulfán y ningún efecto con el herbicida atrazina (DeLorenzo et al., 2001).

La cianobacteria *Synechococcus sp.* es uno de los organismos más abundantes en aguas costeras (Partensky et al., 1999; Grob et al., 2007; Uysal, 2006; Lavin et al., 2008) contribuyendo a la producción primaria global y posicionándose como un organismo clave en la base de la cadena trófica marina (Partensky et al., 1999; Marañón et al., 2003; Zwirgmaier et al., 2007). Respecto al efecto de los pesticidas sobre esta cianobacteria, se observó que solo el tratamiento con deltametrina generó un efecto sobre su abundancia, registrando un aumento de esta durante el experimento I (Puyuhuapi). Mientras que durante los experimentos II (Puyuhuapi) y III (Caucahue) la presencia de los plaguicidas no generó ningún efecto sobre su concentración celular. Respuestas variadas sobre una misma especie también fueron reportado por Megharaj *et al.* (1987), al realizar ensayos de toxicidad utilizando el piretroide cipermetrina, sobre *Synechococcus elongatus*, observando tanto estimulación como leve inhibición en el crecimiento de la cianobacteria.

No se observó ningún efecto de los pesticidas sobre la abundancia de picoeucariontes de los canales Puyuhuapi y Caucahue. Contrastando con lo descrito por otros autores, los cuales han reportado resultados significativamente diversos sobre la abundancia de organismos picoeucariontes al ser expuestos a distintos contaminantes, entre ellos se han observado disminuciones de hasta un 50% de abundancia en presencia de metales pesados como Pb e incrementos de hasta un 200% al adicionar Zn (Caroppo et al., 2006). Igualmente, al aplicar Roundup® (nombre comercial del herbicida glifosato) sobre un microcosmos marino, se observó una estimulación en la abundancia de comunidad de organismos

picoeucariontes, sin embargo, la citometría de flujo no permitió determinar si esto ocurrió de forma directa o indirecta, afectando a algún competidos potencial o depredador, disminuyendo la presión de pastoreo (Stachowski-Haberkorn et al., 2008).

En general durante los experimentos con microcosmos, las mayores diferencias fueron observadas en los efectos entre los distintos tratamientos con pesticidas y no entre los tratamientos con pesticidas y el control. El impacto de los pesticidas sobre la abundancia de microorganismos marinos en los microcosmos fue variable y se detectaron efectos significativos de los tratamientos con pesticidas en el Canal Puyuhuapi. Sin embargo, los tratamientos combinados no presentaron un impacto importante sobre la comunidad microbiana. En relación a la adición de plaguicidas en microcosmos del Canal Caucahue, no se observaron efectos significativos. Esto concuerda con lo mencionado por Wang et al. (2016) donde describen que distintos organismos de una muestra de fitoplancton son capaces de responder de cinco formas diferentes a un contaminante, de manera positiva (aumentando su abundancia), negativa (disminuyendo su abundancia), sin respuesta, respuesta variable dependiendo la dosis (concentración del compuesto) y utilizando el compuesto como fuente de nutrientes.

En resumen, las respuestas de las comunidades de microorganismos expuestas a distintos pesticidas son variadas y dependen del compuesto utilizado. En consecuencia, debido a la diversidad de las respuestas observadas ante la presencia de químicos provenientes de la salmonicultura se evidencia la necesidad de nuevos estudios relacionados con flujos de nutrientes para identificar los reales efectos de estos pesticidas sobre la comunidad microbiana marina.

4.3. Efecto de los pesticidas sobre la tasa de incorporación de carbono

Durante los experimentos de incubación de muestras de comunidades microbianas naturales provenientes de la bahía de Llico, inoculadas con pesticidas produjo cambios en la tasa de asimilación de carbono de organismos foto y quimioautotrófico, sin embargo, los efectos variaron dependiendo la estación, siendo mayores en primavera-verano, y solo fueron significativos al aplica el pesticida benzoato de emamectina.

Asimismo, los estudios *in situ* de microcosmos inmersos en "condiciones de columna de agua" son considerados buenos modelos experimentales para zonas costeras (De la Broise y Palenik, 2007), proporcionando las mejores características de los sistemas de laboratorio y de campo (Van den Brink et al., 2002). Así, durante la realización de las incubaciones *in situ* se observó un efecto variable de los plaguicidas sobre la asimilación de carbono detectándose un impacto significativo al aplicar tratamientos con un solo pesticida en la bahía de Llico (benzoato de emamectina y deltametrina) y en el canal Caucahue (azametifos), sin embargo, los tratamientos combinados no presentaron un impacto significativo sobre la producción primaria.

En general, para los microorganismos, el potencial efecto tóxico o inhibidor producido por el uso de pesticidas podría depender de las especies microbianas expuestas (DeLorenzo et al., 2001). La toxicidad de la avermectina semi-sintética benzoato de emamectina (Stone et al., 2000) ha sido descrita en mamíferos (Olsvik et al., 2008) e invertebrados (Grant et al., 2002), no así para microorganismos. Mientras que efectos indirectos de incremento de la producción primaria, como resultado de un efecto tóxico de deltametrina sobre el zooplancton (disminución de la abundancia) han sido reportados (DeLorenzo et al., 2001; Knapp et al., 2005).

En resumen, las respuestas de los diferentes organismos y comunidades expuestos a los distintos pesticidas fueron diversas, y variaron espacial y temporalmente, posiblemente reguladas por parámetros físico-químicos. Sin embargo, aunque la simplicidad de los ensayos embrionarios y en microcosmos son un buen método para evaluar el efecto de los contaminantes en diferentes organismos, el análisis molecular de muestras tomadas durante estos experimentos, las cuales aún no han sido analizadas.

En consecuencia, debido a la diversidad de las respuestas observadas durante esta investigación, se evidencia la necesidad de nuevos ensayos durante periodos más extensos con adiciones constante de estos compuestos, así como la realización de análisis moleculares que permitan entender mejor el efecto de estos pesticidas sobre las especies fitoplanctónicas no objetivo que dominan las comunidades microbianas marinas de zonas impactadas por la actividad acuícola.

Además, se plantean como nuevas áreas de estudio los posibles efectos indirectos que podrían producirse sobre la comunidad microbiana al aplicar estos pesticidas, como efectos en cascada por muerte del zooplancton (disminución del pastoreo), así como de los factores ambientales que podrían estar condicionando los efectos de estos compuestos, como la intensidad de luz o concentración de nutrientes.



5. CONCLUSIONES

En conclusión, las respuestas de las comunidades picofitoplanctónicas al suministrar distintos pesticidas fueron diversas y dependieron de la composición particular de cada comunidad, dependiendo de las variaciones de los factores físico-químicos de cada localidad.

En relación a los modelos biológicos, *M. chilensis* no presentó reacciones adversas al ser expuesto a distintas concentraciones de pesticidas durante sus primeros estadios de desarrollo. De manera opuesta, los equinodermos *P. lividus* y *S. granularis* presentaron efectos significativos al aplicar los pesticidas, afectando su desarrollo embrionario y larval, aumentando la incidencia de malformaciones y desarrollo anormal. Por lo tanto, la respuesta de los organismos es específica para cada especie y contaminante. Así, mientras que los equinodermos mostraron una mayor sensibilidad de la presencia de contaminantes disminuyendo la viabilidad de los organismos, la especie *M. chilensis* no se vio afectada por la presencia de los plaguicidas.

Además, se observó que la presencia de pesticidas generó un mayor impacto sobre la comunidad bacterioplanctónica y *Synechococcus sp.* del Canal Puyuhuapi, no así sobre la comunidad del Canal Caucahue. Por lo anterior, se puede establecer que, la comunidad microbiana del Canal Puyuhuapi posee una mayor sensibilidad a la presencia de estos pesticidas que la comunidad del Canal Caucahue.

Igualmente, la aplicación de pesticidas en aguas marinas puede producir variaciones en la incorporación de carbono foto y quimioautotrófico al exponer comunidades microbianas naturales a estos compuestos, sin embargo, esta respuesta sería variable (estimulación o inhibición) y dependería de la estación del año y el químico utilizado. Además, estas respuestas únicamente serían significativas si se aplica un solo pesticida, no generándose efectos ante la presencia combinada de dos o más compuestos. Así, en la bahía de Llico, durante el periodo primavera-verano (época de mayor productividad), el pesticida benzoato de emamectina produjo una disminución de la incorporación de carbono foto y quimioautotrófico. Mientras que, en el mar interior de Chiloé, un sistema caracterizado por poseer una deficiencia de nitrógeno (Iriarte et al. 2007), la adición de azametifos provocó una estimulación a nivel local, lo que sugeriría que este compuesto organofosforado podría estar suministrando nutrientes adicionales al sistema.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abarzúa, M., S. Basualto, and H. Urrutia. 1995. Relación entre la abundancia y biomasa de fitoplancton y bacterioplancton heterotrófico en aguas superficiales del Golfo de Arauco, Chile. *Invest. Mar.* **23**: 67-74. doi:10.4067/S0717-71781995002300004
- Ait, A. M., F. M. Ait, and 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. Con. Tox.* **60** (3): 462-470. doi:10.1007/s00244-010-9549-7
- Alarcón, E., Valdés, N., and R. Torres. 2015. Saturación del carbonato de calcio en un área de cultivo de mitílidos en el Seno Reloncaví, Patagonia norte, Chile. Calcium carbonate Satur. state an area mussels Cult. Reloncaví Sound, North. Patagon. Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **43** (2): 277–281. doi:10.3856/vol43-issue2-fulltext-1
- Alaya, M., and J. Iannacone. 2002. Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, diesel 2 y diesel 6 con dos subespecies de *Brachionus Plicatilis* Müller 1786 (Rotifera: Monogononta). *Gayana* **66** (1): 45-58. doi:10.4067/S0717-65382002000100007
- Aminot, A., and R. Kérouel. 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines. Editions Quae.
- Aracena, C., C.B. Lange, J.L. Iriarte, L. Rebolledo, and S. Pantoja. 2011. Latitudinal patterns of export production recorded in surface sediments of the Chilean Patagonian fjords (41-55°S) as a response to water column productivity. *Cont. Shelf Res.* **31**: 340-355. doi:10.1016/j.csr.2010.08.008
- Asir, U., and S. Pulatsü. 2008. Estimation of the Nitrogen-Phosphorus Load Caused by Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Cage-Culture Farms in Kesikköprü Dam Lake: A Comparison of Pelleted and Extruded Feed. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **32** (6): 417-422.
- Barrientos, C. 2009. Efecto del benzoato de emamectina sobre los niveles de expresión y actividad de proteínas de metabolización en cáligus (*Caligus rogercresseyi*) y su huésped trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). BSc. thesis. Univ. Austral de Chile.
- Beman, J., Arrigo, K., Matson, P., 2005. Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature* **434**: 211–214. doi:10.1038/nature03370
- Bertoglio, F. 2012. Respuesta de la comunidad bacteriana a las alteraciones de la trama trófica planctónica en el Río de la Plata. BSc. thesis. Univ. de la República.
- Bhanu, S., S. Archana, K. Ajay, J.L. Bajpai, S.P. Singh, and B. Vandana. 2011. Impact of Deltamethrin on Environment, use as an Insecticide and its Bacterial degradation : A preliminary study. *Int. J. Environ. Sci.* **1** (5): 977-985.
- Boschker, H.T.S., D. Vasquez-Cardenas, H. Bolhuis, T.W.C. Moerdijk-Poortvliet, and L. Moodley. 2014. Chemoautotrophic carbon fixation rates and active bacterial communities in intertidal marine sediments. *PLoS One* **9** (7). doi:10.1371/journal.pone.0101443
- Bottger, S. A., and J.B. McClintock. 2001. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus*

- (Echinodermata: Echinoidea). *Comp. Biochem. Phys. C* **129** (4): 307-315. doi:10.1016/S1532-0456(01)00190-9
- Boxshall, G., and S. Bravo. 2000. On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contrib. Zool.* **69**: 137-146.
- Bravo, S. 2003. Sea lice in Chilean salmon farms. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pat.* **23**: 197-200.
- Bravo, S., S. Sevatdal, and T.E. Horsberg. 2008. Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture* **282** (1): 7-12. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.011
- Bravo, S., M. T. Silva, and G. Monti. 2012. Efficacy of emamectin benzoate in the control of *Caligus rogercresseyi* on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile from 2006 to 2007. *Aquaculture* **364-365**: 61-66. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.036
- Bravo, S., M. Nuñez, and M. Silva. 2013. Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile. *J. Fish Dis.* **36**: 221-228. doi:10.1111/jfd.12023
- Bravo, S. V. Pozo, and M. T. Silva. 2015. Evaluación de la efectividad del tratamiento con agua dulce para el control del piojo de mar *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **43** (2): 322-328. doi:10.3856/vol43-issue2-fulltext-8
- Burka, J. F., M. D. Fast, and C. W. Revie. 2012. *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus rogercresseyi*, p. 350-370. In Bushmann, K. W. P. T. K. [EDS.], *Pathobiology and Protection*.
- Burrige, L. E., K. Haya and S. L. Waddy. 2008. The effect of repeated exposure to azamethiphos on survival and spawning in the American lobster (*Homarus americanus*). *Ecotox. Environ. Safe.* **69** (3): 411-415. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.05.001
- Burrige, L., J. S. Weis, F. Cabello, J. Pizarro, and 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
- Buschmann, A.H., and A. Fortt. 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Ambiente y Desarrollo* **21**: 58-64.
- Buschmann, A.H., D.A. López, M. Troell, and N. Kautsky. 1997. El caso de la acuicultura en Chile: evaluación de la internalización de los costos ambientales. *Ambiente y Desarrollo* **31**: 79-83.
- Buschmann, A. H., V. A. Riquelme, M. C. Hernández-González, D. A. Varela, J. E. Jiménez, L. A. Henríquez, P. Vergara. L. Guíñez, and L. Filun. 2006. A review of the impacts of salmon farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES J. Mar. Sci.* **63**: 1338-1345. doi:10.1016/j.icesjms.2006.04.021
- Canty, M. N., J. A. Hagger, R. T. B. Moore, L. Cooper, and T. S. Galloway. 2007. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* **54** (4): 396-402. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.11.013

- Carballeira, C., L. Martín-Díaz, and T. A. DelValls. 2011. Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. *Mar. Environ. Res.* **72** (4): 196-203. doi:10.1016/j.marenvres.2011.08.008
- Carballeira, C., J. Ramos-Gómez, L. Martín-Díaz, and T.A. DelValls. 2012. Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents. *Mar. Environ. Res.* **77**: 12-22. doi:10.1016/j.marenvres.2012.01.001
- Cárcamo, J.G., M.N. Aguilar, C.A. Barrientos, C.F. Carreño, C.A. Quezada, C. Bustos, R.A. Manríquez, R. Avendaño-Herrera, and A.J. Yañez. 2011. Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture* **321** (3): 207–215. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.09.012
- Cao, L., W. Wang, Y. Yang, C. Yang, Z. Yuan, S. Xiong, and J. Diana. 2007. Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China. *Environ. Sci. Pollut. R.* **14** (7): 456-462. doi:10.1065/espr2007.05.426
- Caroppo, C., L. Stabili, M. Aresta, C. Corinaldesi, and R. Danovaro. 2006. Impact of heavy metals and PCBs on marine picoplankton. *Environ. Toxicol.* **21** (6): 541-551. doi:10.1002/tox.20215
- Davies, I. M., G.K. Rodger, J. Redshaw, and R.M. Stagg. 2001. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. *ICES J. Mar. Sci.* **58** (2): 477-485. doi:10.1006/jmsc.2000.1040
- De La Broise, D., and B. Palenik. 2007. Immersed in situ microcosms: a tool for the assessment of pollution impact on phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **341** (2): 274-281. doi:10.1016/j.jembe.2006.10.045
- DeLorenzo, M.E., G.I. Scott, and P.E. Ross. 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (1): 84-98. doi:10.1002/etc.5620200108
- DeLorenzo, M. E., J. Lauth, P.L. Pennington, G.I. Scott, and P.E. Ross. 1999. Atrazine effects on the microbial food web in tidal creek mesocosms. *Aquat. Toxicol.* **46** (3): 241-251. doi:10.1016/S0166-445X(98)00132-5
- Dermeche, S., F. Chahrour and Z. Boutiba. 2012. Evaluation of the toxicity of metal pollutants on embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata Echinoidea). *Biodiversity Journal* **3** (3): 165-172.
- Duarte, C.M., N. Marbá, and M. Holmer. 2007. Rapid domestication of marine species. *Science* **316**: 382-383. doi:10.1126/science.1138042
- Estay, M., and C. Chávez. 2015. Decisiones de localización y cambios regulatorios: el caso de la acuicultura en Chile. *Lat. Am. J. Aquat Res.* **43** (4): 700-717. doi:10.3856/vol43-issue4-fulltext-9
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos, Roma, FAO. doi:978-92-5-306675-9

- Farias, D. 2005. Aspectos biológicos y conductuales del estadio infectante de *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo 2000 (Copepoda: Caligidae), en peces nativos y de cultivo de Chile. BSc. thesis. Univ. Austral de Chile.
- Fernandes, T. F., K .L. Miller, and P. A. Read. 2000. Monitoring and regulation of marine aquaculture in Europe. *J. Appl. Ichthyol.* **16**: 138–143. doi:10.1046/j.1439-0426.2000.00267.x
- Fernández, I., P. Raimbault, N. Garcia, P. Rimmelin, and G. Caniaux. 2005. An estimation of annual new production and carbon fluxes in the northeast Atlantic Ocean during 2001. *J. Geophys. Res.* **110**: 1-15. doi:10.1029/2004JC002616
- Field, C. B., M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson, and P. Falkowski. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**: 237-240.
- Gáez, D. 2009. Estudio de la variabilidad en la composición de materia orgánica y nutrientes en sedimentos bajo un centro de cultivo de salmonideos. BSc. thesis. Univ. Austral de Chile.
- Gasol, J. M., C. Pedrós-Alió, and D. Vaqué. 2002. Regulation of bacterial assemblages in oligotrophic plankton systems: results from experimental and empirical approaches. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **81** (1): 435-452. doi:10.1023/A:1020578418898
- Gatidou, G., and N.S. Thomaidis. 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat. Toxicol.* **85**: 184-191. doi:10.1016/j.aquatox.2007.09.002
- González, L., and J. Carvajal. 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* **220** (1): 101-117. doi:10.1016/S0044-8486(02)00512-4
- Grant, A. N. 2002. Medicines for sea lice. *Pest. Manag. Sci.* **58** (6): 521-527. doi:10.1002/ps.481
- Grob, C., O. Ulloa, W. K. Li, G. Alarcón, M. Fukasawa, and S. Watanabe. 2007. Picoplankton abundance and biomass across the eastern South Pacific Ocean along latitude 32.5 S. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **332**: 53-62. doi:10.3354/meps332053
- Hernando, M. D., S. De Vettori, M. M. Bueno, and A. R. Fernández-Alba. 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* **68** (4): 724-730. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.097
- Henriques, I. S., A. Alves, M. Tação, A. Almeida, A. Cunha, and A. Correia. 2006. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuar. Coast. Shelf S.* **68** (1): 139-148. doi:10.1016/j.ecss.2006.01.015
- His, E., I. Heyvang, O. Geffard, and X. de Montaudouin. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* **33**: 1706-1718. doi:10.1016/S0043-1354(98)00381-9
- House, M.L., R.P. Hendrick, J.R. Winton, and J.L. Fryer. 2006. An isolate of *Piscirickettsia salmonis* from white seabass *Attarctoscion nobilis* is fully virulent for coho salmon

- Oncorhynchus kisutch*. J. Aquat. Anim. Health **18** (4): 252-256. doi:10.1080/08997659.2015.1114534
- Iriarte, J. L., R. A. Quiñones, R. R. González, and C. P. Valenzuela. 2007. Relación entre actividad enzimática y biomasa de ensamblajes fitoplanctónicos en el sistema pelágico. *Investig. Mar.* **35** (1): 71-84. doi:10.4067/S0717-71782007000100006
- Iriarte, J. L., H. E. González, and L. Nahuelhual. 2010. Patagonian Fjord ecosystems in southern Chile as a highly, vulnerable region: Problems and needs. *AMBIO* **39** (7): 463-466. doi:10.1007/s13280-010-0049-9
- Iriarte, J. L., M. V. Ardelan, L. A. Cuevas, H. E. González, N. Sanchez, and S. M. Mykkestad. 2014. Size-spectrum based differential response of phytoplankton to nutrient and iron-organic matter combinations in microcosm experiments in a Chilean Patagonian Fjord. *Phycol. Res.* **62** (2): 136-146. doi:10.1111/pre.12050
- Jantzen, C., V. Häussermann, G. Försterra, J. Laudien, M. Ardelan, S. Maier, and C. Richter. 2013. Occurrence of a cold-water coral along natural pH gradients (Patagonia, Chile). *Mar. Biol.* **160** (10): 2597-2607. doi:10.1007/s00227-013-2254-0
- Kan J., M. T. Suzuki, K. Wang, S.E. Evans, and F. Chen. 2007. High temporal but low spatial heterogeneity of bacterioplankton in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6776-6789. doi:10.1128/AEM.00541-07
- Knapp, C. W., T. Caquet, M. L. Hanson, L. Lagadic, and D. W. Graham. 2005. Response of water column microbial communities to sudden exposure to deltamethrin in aquatic mesocosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54** (1): 157-165. doi:10.1016/j.femsec.2005.03.004
- Kazemi, M., A. M. Tahmasbi, R. Valizadeh, A. A. Naserian, and A. Soni. 2012. Organophosphate pesticides: A general review. *Agric. Sci. Res. J.* **2** (9): 512- 522.
- Labbé-Ibañez, P., J. L. Iriarte, and S. Pantoja. 2015. Respuesta del microfitoplancton a la adición de nitrato y ácido silícico en fiordos de la Patagonia chilena. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **43** (1): 80-93. doi:10.3856/vol43-issue1-fulltext-8
- Lavin, P., P. Gomez, B. Gonzalez, B., and O. Ulloa. 2008. Diversity of the marine picocyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus* assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **81**: 515-531.
- Leboulanger, C., M. Bouvy, M. Pagano, R. A. Dufour, P. Got, and P. Cecchi. 2009. Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **56**: 39–51. doi:10.1007/s00244-008-9164-z
- Legendre, P., 2007. Anova.2way.R: two-way crossed-factor ANOVA with permutation tests (balanced design): models I, II, and III.
- Levipan, H. A., W. O. Alarcón, and G. S. Saldías. 2012. Fingerprinting analysis of the prokaryote community along a marine–freshwater transect in central-southern Chile. *Ann. Microbiol.* **62** (3): 1121-1140. doi:10.1007/s13213-011-0353-z

- Linacre, L., and S. Palma. 2004. Variabilidad espacio-temporal de los eufáusidos frente a la costa de Concepción, Chile. *Investig. Mar.* **32** (1): 19-32. doi:10.4067/S0717-71782004000100003
- Liu, B. Y., and K. W. Lee. 1975. An aerosol generator of high stability. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **36** (12): 861-865. doi:10.1080/0002889758507357
- Liu, J. T., S. J. Kao, C. A. Huh, and C. C. Hung. 2013. Gravity flows associated with flood events and carbon burial: Taiwan as instructional source area. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **5** (1): 47-68. doi:10.1146/annurev-marine-121211-172307
- Marañón, E., M. J. Behrenfeld, N. González, B. Mouriño, and M.V Zubkov. 2003. High variability of primary production in oligotrophic waters of the Atlantic Ocean: uncoupling from phytoplankton biomass and size structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **257**: 1-11. doi:10.3354/meps257001
- Marie, D., N. Simon, L. Guillou, F. Partensky, and D. Vaultot. 2000. Flow Cytometry Analysis of Marine Picoplankton, p. 421-454. In R. A. Diamond and S. Demaggio [eds.], *Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*.
- Martinez, D. 2013. Efecto de la alta densidad de cultivo sobre la respuesta secundaria al estrés en *Eleginops maclovinus*. BSc. thesis. Univ. Austral de Chile
- Medina, M., C. Barata, T. Telfer, and D. J. Baird. 2004. Effects of cypermethrin on marine plankton communities. A simulated field study using mesocosms. *Ecotox. Environ. Safe.* **58** (2): 236-245. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.07.001
- Medina, M., and R. Ramos-Jiliberto. 2009. Direcciones futuras de la ecotoxicología en Chile: implicancias para la evaluación de riesgo ambiental de productos veterinarios utilizados en acuicultura. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **82** (3): 443-457. doi:10.4067/S0716-078X2009000300010
- Megharaj, M., K. Venkateswarlu, and A. S. Rao. 1987. Influence of cypermethrin and fenvalerate on a green alga and three cyanobacteria isolated from soil. *Ecotox. Environ. Safe.* **14** (2): 142-146. doi:10.1016/0147-6513(87)90056-X
- Megharaj, M., K. Venkateswarlu, and A. S. Rao. 1989. Interaction effects of insecticide combinations on the growth of *Scenedesmus bijugatus* and *Synechococcus elongatus*. *Plant Soil* **114** (2): 159-163. doi:10.1007/BF02220794
- Megharaj, M., R. M. Wittich, R. Blasco, D. H. Pieper, and K. N. Timmis. 1997. Superior survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Microbiol. Biot.* **48** (1): 109-114. doi:10.1007/s002530051024
- Nash, C. 2003. Interactions of Atlantic salmon in the Pacific Northwest: VI. A synopsis of the risk and uncertainty. *Fish. Res.* **62** (3): 339-347. doi:10.1016/S0165-7836(03)00068-7
- O’Ryan, R., and M. Pereira. 2015. Participatory indicators of sustainability for the salmon industry: the case of Chile. *Mar. Policy* **51**: 322-330. doi:10.1016/j.marpol.2014.09.010

- Olesen, I., A. Ingeborg, and G. Rosendal. 2011. Sustainable Aquaculture: Are We Getting There? Ethical Perspectives on Salmon Farming. *J. Agric. Environ. Ethics*. **24**: 381-408. doi:10.1007/s10806-010-9269-z
- Olsen, L.M., K. L. Hernández, M. Van Ardelan, J. L. Iriarte, N. Sánchez, H. E. González, N. Tokle, and Y. Olsen. 2014. Responses in the microbial food web to increased rates of nutrient supply in a southern Chilean fjord: Possible implications of cage aquaculture. *Aquac. Environ. Interact.* **6**: 11–27. doi:10.3354/aei00114
- Olsvik, P., O. Samuelson, A. Erdal, B. Holmelid, and B. Lunestad. 2013. Toxicological assessment of the anti-salmon lice drug diflubenzuron on Atlantic cod *Gadus morhua*. *Dis. Aquat. Org.* **105**: 27-43. doi:10.3354/dao02613
- Osorio, V. 2006. Conducta de apareamiento y reproducción del ectoparásito *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) (Copépoda: Caligidae) en el hospedador *Eleginops maclovinus* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Nototheniidae). BSc. thesis. Univ. de Los Lagos.
- Pantoja, S., J.L. Iriarte, and G. Daneri. 2011. Oceanography of the Chilean Patagonia. *Cont. Shelf Res.* **31** (3): 149-153. doi:10.1016/j.csr.2010.10.013
- Parada, C., M. Sobarzo, D. Figueroa, and L. Castro. 2001. Circulación del Golfo de Arauco en un período de transición estacional: Un nuevo enfoque. *Invest. Mar.* **29** (1): 11-23. doi:10.4067/S0717-71782001000100002
- Partensky, F., J. Blanchot, and D. Vaultot. 1999. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bull. Inst. Oceanogr.* **19**: 457-476.
- Paulsen, M. L., H. Doré, L. Garczarek, L. Seuthe, O. Müller, R. A. Sandaa, G. Bratbak, and A. Larsen. 2016. *Synechococcus* in the Atlantic Gateway to the Arctic Ocean. *Frontiers in Marine Science* **3**: 191. doi:10.3389/fmars.2016.00191
- Pavan, F.A., R. M. Dallago, R. Zanella, A. F. Martins. 1999. Determination of deltamethrin in cattle dipping baths by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 174-176. doi:10.1021/JF980171B
- Pesce, S., C. Fajon, C. Bardot, F. Bonnemoy, C. Portelli, and J. Bohatier. 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquat. Toxicol.* **86** (3): 352-360. doi:10.1016/j.aquatox.2007.11.016
- Pesando, D., P. Huitorel, V. Dolcini, C. Angelini, P. Guidetti, and C. Falugi. 2003. Biological targets of neurotoxic pesticides analysed by alteration of developmental events in the Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Mar. Environ. Res.* **55**: 39-57. doi:10.1016/S0141-1136(02)00215-5
- Renault, T. 2011. Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What Do We Need to Know?, p. 227-240. In D. M. Stoytcheva [eds.], *Pesticides in the Modern World: Risks and Benefits*. doi:10.5772/19155.
- Ruiz, M., E. Tarifeño, A. Llanos-Rivera, C. Padget and B. Campos. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis*

- (Lamarck, 1819). Rev. Biol. Mar. Oceanogr. **43** (1): 51-61. doi:10.4067/S0718-19572008000100006
- Rutten, T.P.A., B. Sandee, and A. R. T. Hofman. 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach?. Cytometry Part A **64** (1): 16-26. doi:10.1002/cyto.a.20106
- Sabater, C., A. Cuesta, and R. Carrasco. 2002. Effects of bensulfuron-methyl and cinosulfuron on growth of four freshwater species of phytoplankton. Chemosphere **46** (7): 953-960. doi:10.1016/S0045-6535(01)00179-5
- Samuelsen, O., B. Lunestad, R. Hannisdal, R. Bannister, S. Olsena, T. Tjensvoll, E. Farestveit, and A. Ervik. 2015. Distribution and persistence of the anti sea-lice drug teflubenzuron in wild fauna and sediments around a salmon farm, following a standard treatment. Sci. Total Environ. **508**: 115-121. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.11.082
- Sanchez-Ferandin, S., F. Leroy, F. Bouget, and F. Joux. 2013. A new, sensitive marine microalgal recombinant biosensor using luminescence monitoring for toxicity testing of antifouling biocides. Appl. Environ. Microb. **79** (2): 632-638. doi:10.1128/AEM.02688-12
- Sevatdal S., L. Copley, C. Wallace, D. Jackson, and T.E. Horsberg. 2005. Monitoring of the sensitivity of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) to pyrethroids in Norway, Ireland and Scotland using bioassays and probit modelling. Aquaculture **244** (1): 19-27. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.11.009
- Shen, M. F., A. Kumar, S. Y. Ding, and S. Grocke. 2012. Comparative study on the toxicity of pyrethroids, α -cypermethrin and deltamethrin to *Ceriodaphnia dubia*. Ecotox. Environ. Safe. **78**: 9-13. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.018
- Silva, J., G. Torrejón, E. Bay-Schmith, and A. Larrain. 2003. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (crustacea: cladocera) usando un toxico de referencia. Gayana **67** (1): 87-96. doi:10.4067/S0717-65382003000100011
- Siwicki, A. K., E. Terech-Majewska, J. Grudniewska, J. Malaczewska, K. Kazun and A. Lepa. 2010. Influence of deltamethrin on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. **29** (3): 489-491. doi:10.1002/etc.75
- Smith, D. C., and F. Azam. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. Mar. Microb. Food Webs **6** (2): 107-114.
- Sobarzo, M. 1993. Caracterización de la circulación de Bahía Concepción, Chile: un análisis temporal en el dominio de la frecuencia. MSc. thesis. Univ. de Concepción.
- Soderlund, D.M., and J.R. Bloomquist. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Annu. Rev. Entomol. **34**: 77-96. doi:10.1146/annurev.en.34.010189.000453
- Softeland, L., J. A. Kirwan, T. S. F. Hori, T. R. Storseth, U. Sommer, M. H. G. Berntssen, M. R. Viant, M. L. Rise, R. Waagbo, B. E. Torstensen, M. Booman, and P. A. Olsvik. 2014. Toxicological effect of single contaminants and contaminant mixtures associated with

- plant ingredients in novel salmon feeds. *Food Chem. Toxicol.* **73**: 157-174. doi:10.1016/j.fct.2014.08.008
- Soto, D., and F. Norambuena. 2004. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *J. Appl. Ichthyol.* **20**: 493-501. doi:10.1111/j.1439-0426.2004.00602.x
- Stachowski-Haberkorn, S., B. Becker, D. Marie, H. Haberkorn, L. Coroller, and D. De La Broise. 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquat. Toxicol.* **89** (4): 232-241. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.004
- Stauber, J., and M. Adams. 2005. Microalgal toxicity tests using flow cytometry, p. 203-241. In C. Blaise, and J. Féraud [eds.], *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations*. doi:10.1007/1-4020-3120-3_6
- Stebbing, A. R. D., B. Akesson, A. Calabrese, J. H. Gentile, A. Jensen, and R. Lloyd. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapp P-V Reun CIESM Mediterr* **179**: 322-332.
- Stone, J.K., C.W. Bacon, and J.F. White. 2000. An Overview of Endophytic Microbes Endophytism Defined, p. 3-29. In C.W. Bacon and J.F. White [eds], *Microbial Endophytes*.
- Tucca, F. 2014. Riesgos ambientales de fármacos antiparasitarios aplicados actualmente en cultivos de salmón en el sur de Chile. Ph.D. thesis. Univ. De Concepción.
- Uysal, Z. 2006. Vertical distribution of marine cyanobacteria *Synechococcus* spp. in the Black, Marmara, Aegean, and eastern Mediterranean seas. *Dee-Sea Res. Pt. II* **53** (17): 1976-1987. doi:10.1016/j.dsr2.2006.03.01d
- Van den Brink, P. J., E. M. Hartgers, R. Gylstra, F. Bransen, and T. C. Brock. 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms: II. Responses of plankton and ecological risk assessment. *Ecotoxicology* **11** (3): 181-197. doi:10.1023/A:1015422815401
- Velásquez, F. 2010. Eficacia de teflubenzurón frente al ectoparásito *Caligus rogercresseyi* en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de un centro de cultivo en el sur de Chile. VMD. thesis. Univ. Austral de Chile.
- Villarroel, C. 2010. Evaluación de la efectividad de dos tratamientos farmacológicos sobre la carga de *Caligus rogercresseyi* en salmónidos de cultivo en Chile. VMD. thesis. Univ. de Chile.
- Wang, K., K. E. Wommack, and F. Chen. 2011. Abundance and distribution of *Synechococcus* spp. and cyanophages in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microb.* **77** (21): 7459-7468. doi:10.1128/AEM.00267-11
- Wang, C., X. Lin, L. Li, and S. Lin. 2016. Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate. *PloS one* **11** (3). doi:10.1371/journal.pone.0151633

- Young, C., P. A. Tyler, and L. Fenaux. 1997. Potential for deep sea invasion by Mediterranean shallow water echinoids: pressure and temperature as stage-specific dispersal barriers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **154**: 197-209. doi:10.3354/meps154197
- Zhang, H. H., S. N. Chen, T. L. Huang, W. X. Ma, J. L. Xu, and X. Sun. 2015. Vertical distribution of bacterial community diversity and water quality during the reservoir thermal stratification. *Int. J. Environ Public Health* **12** (6): 6933-6945. doi:10.3390/ijerph120606933
- Zhang, B., Z. Bai, D. Hoefel, L. Tang, X. Wang, B. Li, A. Li, and G. Zhuang. 2009. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Sci. Total Environ.* **407** (6): 1915-1922. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.049
- Zwirgmaier, K., L. Jardillier, M. Ostrowski, S. Mazard, L. Garczarek, D. Vaultot, F. Not, R. Massana, O. Ulloa, and D. J. Scanlan. 2008. Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environ. Microbiol.* **10** (1): 147-161. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01440.x

