



UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ
FACULTAD “CIENCIAS DEL MAR”
CARRERA DE BIOLOGÍA PESQUERA

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

BIÓLOGO PESQUERO

TÍTULO:

“MEDICIÓN DE LA RESPUESTA DE FUGA DE LARVAS DEL
CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*, BOONE, 1931)
EXPUESTAS AL COBRE”.

AUTOR

LUIS ALBERTO CEDEÑO MACÍAS

DIRECTOR DE TESIS

CRISTIANO VENICIUS DE MATOS ARAÚJO

MANTA-MANABÍ-ECUADOR

2014-2015

“MEDICIÓN DE LA RESPUESTA DE FUGA DE
LARVAS DEL CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*, BOONE, 1931)
EXPUESTAS AL COBRE”

DERECHOS DE AUTORIA

Yo, Luis Alberto Cedeño Macías, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, realizado dentro de las actividades del proyecto “Influencia de los contaminantes en la dispersión de los organismos acuáticos” desarrollado en el Departamento Central de Investigación, ULEAM, bajo la Dirección de **Cristiano Venicius de Matos Araújo PhD**; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual de la tesis titulada “**Medición de la Respuesta de fuga de larvas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) expuestas al cobre**” a la Facultad de “Ciencias del Mar”, de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, y que cualquier publicación que se desprenda de esta tesis debe ser avalada y aceptada por el Departamento Central de Investigación, ULEAM, según lo establecido por la Ley de Propiedad intelectual y sus reglamentos.

Luis Alberto Cedeño Macías

TESIS DE BIÓLOGO PESQUERO

Sometido a consideración del honorable Consejo de la Facultad Ciencias del Mar, como requisito para obtener el título de Biólogo Pesquero, aprobado por el tribunal.

Dr. Cristiano Venicius de Matos Araújo

Director de tesis

Blga. Tania Lin Maldonado Sabando

Presidente del tribunal

DECANA

Miembro Principal

Miembro Principal

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por las ideas, autenticidad, contenido y resultados expuestos en la presente tesis corresponde de manera exclusiva al autor y patrimonio intelectual de la misma a la **UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ.**

Luis Alberto Cedeño Macias

EGRESADO

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Dr. Cristiano Araújo Venicius de Matos, investigador Prometeo I, del Departamento Central de Investigación, certifico que el Sr. Luis Alberto Cedeño Macías realizó la tesis titulada “**Medición de la respuesta de fuga de larvas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) expuestas al cobre**”, bajo mi auditoria y responsabilidad, que ha sido desarrollada previa a la obtención del título de Biólogo Pesquero, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí. U.L.E.A.M.

Dr. Cristiano Venicius de Matos Araújo

AGRADECIMIENTO

Mi primer agradecimiento es hacia mi Director de tesis Cristiano Araújo por apoyarme en todo momento, por compartir sus conocimientos, por su paciencia, correcciones, por su lucha cesante para formar parte de la directriz de mi tesis, por el cual le quedo muy agradecido. También agradezco a mis compañeros de trabajos “Los Pitufos” (Victoria Vera, David Salvatierra y Nikoll Vera) y el papá pitufo mayor Cristiano Araújo, que aparte de ser mi Director de tesis es el líder del proyecto en el que participo. Gracias a ustedes por hacerme formar parte de este gran equipo, en el que me he sentido muy aceptado, pero sobre todo sabemos que toda la culpa la tiene Victoria.

Agradezco también a Ocean Farm por brindarme espacio en sus instalaciones, especialmente a Ufredo Mendoza. También a los laboratorios de Lardema y Rivermar le quedo muy agradecido por proporcionarme los organismos para desarrollar los experimentos. Al DCI agradezco por abrirme sus puertas y hacerme partícipe en sus proyectos de investigación y permitir que este trabajo sea posible.

Agradezco a mis abuelos por su acogida y apoyarme en todo momento con sus sabios consejos (Norma Mero y Vicente Macías).

De antemano agradezco a mi tía Rosa Elía, por permitirme estar en su hogar y cuando se enojaba porque estaba chateando en el celular y no haciendo la tesis jejeje, también le quedo muy agradecido.

Agradezco a mis demás familiares que estuvieron acompañándome en todo momento, tías, primos, sobrinos y de una u otra forma aquellas personas que estuvieron a mi lado apoyándome, muchas gracias.

DEDICATORIA

Mis padres que son la base de mi vida, aquellos que me supieron guiar desde pequeño inculcándome de buenas enseñanzas, aunque a veces no siempre haga las cosas de la mejor manera, ellos siempre estarán ahí en todo momento. Mi papi Luis Alberto Cedeño Villavicencio para mi eres el mejor papá y aunque no estés a mi lado en lo terrenal, yo sé que estás compartiendo conmigo cada momento de mi vida y que desde el cielo me estás vigilando y apoyándome en todo momento. Mi mamá Norma Piedad Macias Mero, eres la mujer que siempre ha estado conmigo en todo momento, nunca me has fallado, eres muy importante en mi vida y si volviera a nacer quisiera que usted volviera a ser mi mamá. Mis hermanas Diana y Tatiana, estas dos mujeres las quiero un montón, siempre han estado conmigo en todo momento apoyándome incondicionalmente y velando lo mejor para mí, ustedes son lo mejor de mi vida.

Luis Cedeño Macias

ÍNDICE

ÍNDICE.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
GLOSARIO.....	XI
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT	XIV
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2.- PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	5
1.3.- JUSTIFICACIÓN	7
1.4.- OBJETIVOS	10
1.4.1.- Objetivo general	10
1.4.2.- Objetivo específico.....	10
1.5.- HIPÓTESIS	11
1.6.- VARIABLES	11
1.6.1.- VARIABLES DEPENDIENTES	11
1.6.2.- VARIABLES INDEPENDIENTES	11
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	12
2.1 APARICIÓN Y DESARROLLO DE LA ECOTOXICOLOGÍA.....	12
2.1.1 ¿Que tipos de efectos ecotoxicológicos pueden medirse?.....	14
2.2 ¿Qué es un bioensayo?	15
2.2.1 Objetivo de los bioensayos	16
2.3 Criterios para elegir un organismo de ensayo	17
2.4 Estimación de la curva concentración/dosis-respuesta.....	19
2.5 Bioensayos de comportamiento: la respuesta de fuga (<i>avoidance</i>)	20
CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	22
3.1 Especie: Característica, obtención y mantenimiento	22
3.2 Implementación del sistema	23
3.3 Prueba del sistema de fuga.....	24
3.4 Ensayo de fuga	25
3.5 Análisis de datos	26
CAPITULO IV: RESULTADOS	28
4.1 Calibración, distribución con agua control	28

4.2 Respuesta de fuga al Cu	29
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	31
CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
6.1 CONCLUSIONES.....	35
6.2 RECOMENDACIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la ecología, toxicología ambiental y ecotoxicología (Chapman, 2002).	13
Figura 2 Relación de la dosis / concentración – respuesta. Conforme aumenta la concentración o la dosis aumenta la respuesta.	20
Figura 3. Larvas de <i>L. vannamei</i> usadas en los experimentos	22
Figura 4 Diagrama del sistema de fuga (Araújo et al., 2014a).....	24
Figura 5. Relación concentración-respuesta de fuga de larvas de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas a un gradiente lineal de Cu. Arriba: resultados del ensayo #1 tras 3 y 24 h de exposición; abajo: resultados de los ensayos #1 y #2 tras 3 h de exposición.	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Toxicología ambiental vs ecotoxicología (Chapman, 2002).	14
Tabla 2 Comparación criterio estándar y recomendados para la elección de un organismo de ensayo.....	19
Tabla 3 Análisis físico-químico de la muestra de agua de cultivo.....	23
Tabla 4 Valores de conductividad y concentraciones de NaCl (\pm desviación estándar), para cada compartimento sin presencia de camarones de 0 h a 24 h.	28
Tabla 5 Número de organismos encontrados en cada compartimento (\pm desviación estándar), solo agua de cultivo en ausencia de contaminación	29

GLOSARIO

Toxicología: Es la ciencia que se encarga de evaluar los efectos que pueden tener las sustancias sobre la especie humana, así como su sensibilidad y toxicidad en distintos organismos (Moisenko, 2008).

Ecología: La ecología estudia la relación entre los sistemas biológicos y su ambiente inanimado, explicando los procesos ecológicos, los patrones de distribución, abundancia, densidad e interacción de especies (Underwood et al., 2000).

Ecotoxicología: La ecotoxicología es la ciencia encargada de estudiar el impacto de las sustancias químicas en los organismos bajo condición experimental u observaciones de campo, incluyendo a toda su comunidad biológica, estructura y funcionamiento (Chapman, 2002).

Bioensayos: Pruebas de laboratorio que usan sistemas biológicos para evaluar o predecir el potencial impacto de contaminantes en el ecosistema (Calow, 1989; Maltby & Calow, 1989)

Contaminación: Es el deterioro del ambiente como consecuencia de la presencia de sustancias perjudiciales o del aumento exagerado de algunas sustancias que forman parte del medio.

Cobre: Elemento traza que es necesario para el correcto funcionamiento de muchas enzimas en sistemas biológicos (Kiaune & Nan, 2011), pero que en concentraciones elevadas puede convertirse en un contaminante.

Fuga (*avoidance*): La habilidad que tienen los organismos de detectar la presencia de un agente tóxico y escapar hacia un zona menos contaminada (Moreira-Santos et al., 2008).

ABREVIATURAS

LC50: Concentración que mata al 50% de una población

AC50: Concentración que lleva a la fuga del 50% de la población

EC50: Concentración que provoca un efecto al 50% de la población

DL: Dosis letal

NaCl: Cloruro de sodio

Cu: Cobre

N_o: Número de organismos observados

N_E: Número de organismos esperados

mg L⁻¹: Miligramos por litro

SD: desviación estándar

mL: mililitros

RESUMEN

El presente estudio tiene como propósito medir la respuesta de fuga de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* expuestas al cobre (Cu), por medio de un sistema multicompartimentado de exposición no forzada, diseñado con el propósito de simular un gradiente de contaminación. Inicialmente, se montó un sistema con siete compartimentos al que se realizó una prueba de calibración para verificar que el gradiente se mantuviera durante la misma duración de los experimentos. Además, se realizó una prueba para evaluar la distribución del camarón blanco en ausencia de contaminante, verificando que las larvas de *L. vannamei* se desplazarían libremente en el sistema sin tener una afinidad hacia las extremidades del sistema o uno de los compartimentos. La ausencia de preferencia por cualquiera de los compartimentos en los ensayos de control de distribución indicó que la respuesta apreciada sería influencia por el Cu y no por otro factor externo (luz, temperatura, etc). Para los experimentos de fuga, las larvas fueron expuestas a un gradiente de contaminación con siete concentraciones distribuidas en cada compartimento, en los que 5 organismos fueron introducidos. En el ensayo #1 las concentraciones fueron 0, 0.05, 0.11, 0.17, 0.22, 0.28, 0.40 mg L⁻¹ de Cu y las observaciones se dieron tras 3 y 24 h de exposición. En el ensayo #2, que tuvo una duración de 3 h, el gradiente de cobre ha sido formado por las concentraciones 0.05, 0.08, 0.10, 0.50, 0.90, 1.10, 1.30 mg L⁻¹. Ambos ensayos se hicieron por triplicado y en oscuridad. Después de 3 h de exposición, el camarón blanco fue capaz de detectar y evitar todas las concentraciones de cobre. Para 3 y 24 horas de exposición las larvas de camarón blanco presentaron similares porcentajes de fuga, indicando que el tiempo de exposición no necesita superar las 3 h. Se integraron el ensayo #1 (bajas concentraciones) y ensayo #2 (altas concentraciones) para obtener una mejor estimación de la AC50 (concentración que lleva a la fuga del 50% de la población), por lo que en 3 h la AC50 calculada fue de 0.22 (0.09-0.44) mg L⁻¹ de cobre. Visto que no hubo mortalidad a ninguna de las concentraciones ensayadas, la fuga debe ocurrir antes que efectos tóxicos letales sean observados, por lo tanto la respuesta de evitación juega un papel importante en la disminución inmediata de la población y consecuentemente la desaparición de la especie dentro de un hábitat.

ABSTRACT

The present study aimed to measure the avoidance response of larvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to copper (Cu). Assays were performed in a multi-compartment non-forced exposure system designed to simulate a contamination gradient. Initially, a calibration test was performed to verify that the gradient was maintained during the same time period of the experiments. In addition, a control test was performed to evaluate the distribution of white shrimp in the absence of contaminant, verifying that the larvae of *L. vannamei* had no affinity towards the extremities of the system or some of the compartments. For avoidance experiments, the larvae were exposed to a gradient of contamination with seven concentrations distributed in each compartment, in which five organisms were introduced. In assay #1, concentrations were 0, 0.05, 0.11, 0.17, 0.22, 0.28 and 0.40 mg L⁻¹ Cu and observations were recorded after 3 and 24 h exposure. In assay #2 which lasted 3 h, the gradient of copper was formed by the concentrations 0.05, 0.08, 0.10, 0.50, 0.90, 1.10 and 1.30 mg L⁻¹ Cu. Both assays were performed in triplicate and in darkness. After 3 h, white shrimp was able to detect and avoid very low copper concentrations such as 0.05 mg L⁻¹. For 3 and 24 h exposure white shrimp larvae showed similar percentages of avoidance, indicating that exposure longer than 3 h is unnecessary. Assay #1 (low concentration) and assay #2 (high concentrations) were integrated to obtain a better estimate of the AC50 (concentration that triggers avoidance of 50% of the population), so that the 3 h-AC50 calculated was 0.22 (0.09 to 0.44) mg L⁻¹ copper. Given that there was no mortality in any of the tested concentrations, the avoidance should occur before lethal effects are observed. Thus the avoidance response plays an important role in immediate decline in population and consequently the disappearance of the species within a habitat.

CAPÍTULO I:

1.1 INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento de la población, la amplia aportación de los minerales en los procesos de producción y el progreso tecnológico han afectado drásticamente el medio ambiente. A mediados del siglo XX, la revolución industrial condujo impactos extremadamente severos que han alterado en gran medida el equilibrio entre la humanidad y el medio ambiente (Moiseenko, 2008). Con el deterioro de los recursos naturales, se ha evidenciado que éstos eran limitados y que medidas para su conservación, dentro de un uso sostenible, eran cada vez más necesarias. En consecuencia de ello, se ha ampliado el número de estudios destinados a evaluar las transformaciones en los ecosistemas y la respuesta de los sistemas biológicos como producto de la actividad antropogénica. En el área ambiental, la ecotoxicología ha surgido como ciencia que integra principios de la toxicología y ecología (Chapman, 1995). La función de la ecotoxicología es determinar si un contaminante ejerce efectos adversos sobre el ecosistema y la salud de los organismos, y por tanto proporcionar un manejo sostenible ante ellos (Moiseenko, 2008). En la actualidad, el papel de la ecotoxicología se basa en entender y predecir los cambios que generan determinadas sustancias tóxicas en las comunidades naturales, ya sea a nivel de individuo, población o comunidad y cómo estos cambios pueden afectar la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, bien como la salud humana (Chapman, 2002).

La medición de estos efectos se lleva a cabo por medio del uso de bioensayos en laboratorio o *in situ*, que involucran sistemas biológicos para evaluar o predecir el potencial impacto de sustancias que serán vertidas o ya presentes en el ecosistema (Calow, 1989; Maltby & Calow, 1989). El objetivo de los bioensayos se basa principalmente en conocer el rango de peligrosidad de un producto tóxico, establecer límites de descarga, predecir las consecuencias ambientales, proteger las especies importantes y la estructura y función del ecosistema (Cairns & Pratt, 1989). Además, los ensayos deben proporcionar

información que faciliten las predicciones de las concentraciones que no dañen la vida en el medio ambiente desde todos los niveles de organización biológica (Cairns, 1983).

Los ensayos ecotoxicológicos son en su gran mayoría realizados con una especie que debe ser suficientemente sensible, es decir, capaz de detectar mínimas concentraciones del contaminante, de modo a garantizar mínimos o ningún efecto en las demás especies (Cairns, 1986). A partir de estas mediciones, se tomarán en cuenta las concentraciones que deberían de servir como base para el establecimiento de límites permisibles de descartes que garantizan la protección de las demás especies (Cairns, 1983, 1984).

La relación entre la sensibilidad de un organismo y el potencial tóxico de un contaminante está basada en la tradicional curva “concentración-respuesta” (Chapman, 1998). Esta relación puede ser medida en ensayos crónicos (en los que se miden respuestas subletales, como crecimiento, fecundidad, reproducción, osmorregulación, comportamiento, entre otros.) y agudos (basados en la respuesta de supervivencia). Por lo general, la aplicación de estos ensayos fuerzan a los animales a permanecer en una concentración del contaminante, ya sea a concentraciones letales o subletales, donde no se toma en cuenta que el organismo en su ambiente natural, al estar expuesto a contaminación, la puede evitar huyendo a zonas menos impactadas (Kimball & Levin, 1985).

La habilidad para evitar los contaminantes se ha observado en varios organismos acuáticos, como por ejemplo, en anfípodos (Kravitz et al., 1999; De lange et al., 2006), molusco (Araújo et al., 2012), renacuajos (Araújo et al., 2014a, b), peces (SceVICIUS, 2007; Moreira-Santos et al., 2008), y la inclusión del comportamiento de fuga en los ensayos ecotoxicológicos puede ser considerada una herramienta relevante en la evaluación del riesgo ecológico (Lopes et al., 2004; Rosa et al., 2008). El sistema utilizado en la presente investigación fue desarrollado por Lopes et al. (2004), que estudió la fuga en el cladóceros *Daphnia longispina* a dos agentes químicos (cobre y efluente de mina ácida) a través de una exposición no forzada. Este mismo método fue

optimizado por Rosa et al. (2012) y Araújo et al. (2014a), y ha sido utilizado para evaluar la fuga tanto en copépodos (Araújo et al., 2014d) hasta peces (Araújo et al., 20014c), considerando ser una herramienta idónea para medir la evitación de las especies de distintos niveles tróficos. Dado que una especie puede ser sensible a un contaminante pero tolerante a otro (Cairns, 1986), la manera de evaluar el organismo más sensible es probar con un número de diferentes especies de diferentes grupos taxonómicos, es decir, que se incluyan especies de distintos niveles tróficos (USEPA, 1991). Por eso, USEPA (1991) recomendó utilizar tres tipos de pruebas con especies de diferentes niveles tróficos, como puede ser un (vertebrado, invertebrado y planta).

En el presente estudio se tomó como animal de prueba el camarón, que forma parte de un grupo de los crustáceos perteneciente a consumidores primarios. Entre la especie de camarones que representa mayor importancia económica y alta demanda de consumo está el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Esta especie presenta condiciones biológicas con fácil manipulación y reproducción, por lo que es extensamente cultivada en muchos países incluyendo en el Ecuador (FAO, 2006). Sin embargo, a pesar de su cultivo y cuidado en ambientes cerrados, sus poblaciones silvestres pueden sufrir daños dentro de su comunidad, ya que su fase de vida comprende dos ambientes, estuarinos y salinos (Holthuis, 1980). La etapa juvenil está inmersa a estuarios, cuyas poblaciones están más amenazadas en recibir el flujo de contaminación antropogénico debido a la cercanía a sus costas, donde sus poblaciones tempranas (juveniles) son más vulnerables al estrés químico principalmente producido por industrias, minería, y agricultura, el cual puede llevar al deterioro de la población y cambiar la estructura del ecosistema.

Dentro de amplia gama de sustancias químicas que desecha el hombre como producto de su actividad agrícola, industrial y minera está el cobre (Tchernitchin & Herrera, 2006; Kiaune & Singhasemanon, 2011). El Cu es un elemento traza utilizado en varios estudios ecotoxicológicos evaluando la capacidad de evitación tanto en peces (Svecevicus, 1999), cladóceros (Lopes et al., 2004), renacuajos (Araújo et al., 2014a), entre otros. Lee (1980) argumenta que para elegir un contaminante de prueba, éste debe presentar varias características

como: 1) considerarse un contaminante ambiental, 2) ser tóxico a bajas concentraciones, 3) elevada disponibilidad, 4) letalidad rápida, 5) altamente estable, 6) poco volátil y 7) no biodegradable. La presencia del Cu en los ambientes acuícolas puede generar cambios en las comunidades biológicas. Por ejemplo, en los camarones puede provocar lento crecimiento, baja tasa de reproducción y discapacidad de nado interrumpiendo su desplazamiento hacia otras áreas (Wong et al., 1995; Scelzo, 1997).

El presente estudio se ha planteado con el objetivo de evaluar la habilidad que tienen las larvas del camarón blanco *L. vannamei* en detectar y huir del cobre, a través de la exposición de los individuos a un gradiente lineal de contaminación, con el propósito de crear condiciones ambientales más reales a las que se pueden dar cuando un contaminante es vertido en un ecosistema acuático.

1.2.- PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Ecuador es un país biodiverso de flora y fauna, dado que sus condiciones climáticas y la diversidad de ambientes hacen favorables el desarrollo de muchas especies terrestres y acuáticas. Sus ambientes tropicales representan una amplia variedad de vida silvestre, sin embargo, esta riqueza biológica está constantemente amenazada por sustancias tóxicas que van de incremento con el desarrollo del país (Lacher & Goldstein, 1997).

La aplicación de la ecotoxicología como una ciencia que actualmente se está desarrollando en nuestro país puede proyectarse como una base para evaluar el potencial riesgo ecológico que en la actualidad estamos enfrentando por el incremento de la contaminación. Los ecosistemas acuáticos son fuentes naturales que requieren mayor énfasis de estudio, al deberse involucrado muchos organismos que son el sustento de varias comunidades. Para la protección de la vida acuática se necesita de cierta información, que dentro de ella requiere la comprensión de las respuestas biológicas respecto a la toxicidad que provocan determinados contaminantes sobre los organismos (Alvarez, 1996). Para tal, se emplean pruebas experimentales exponiendo a los organismos a un grado de estrés químico por determinado periodo de tiempo, al cabo del cual se miden algunas respuestas producidas por el patrón de estrés. Cabe decir que el organismo testado debe cumplir un rol importante en su hábitat, además de ser económicamente importante, sensible y de fácil cultivo, cuya respuesta medible se pueda extrapolar a su medio natural (Chapman, 2002).

Una respuesta apreciable en los organismos para evaluar el riesgo ecológico es la fuga (Lopes et al., 2004). La fuga es una rápida respuesta defensiva contra la exposición de un contaminante (Oliveira et al., 2013), desplazando a los organismos a una zona menos contaminada o donde se sientan menos afectados (Moreira-Santos et al., 2008), y que garantice la supervivencia de la especie. La importancia de medir la respuesta de fuga se debe a que es apreciable a niveles más bajos de toxicidad (Kravitz et al., 1999; Araújo et al., 2014a), dando indicios de señales de alerta temprana sobre un posible

deterioro del ecosistema (Hellou, 2011). Por lo tanto, la respuesta de fuga ha sido empleada en el presente estudio para evaluar el riesgo ecológico que puede producir el cobre, mostrando que el comportamiento de evitación ante un agente tóxico indica un síntoma de alerta sobre posibles repercusiones en el hábitat y la salud de las comunidades biológicas.

1.3.- JUSTIFICACIÓN

Los ecosistemas acuáticos están constantemente amenazados por el vertido de sustancias desconocidas que generalmente son procesadas por el hombre, como por ejemplo, la aplicación de pesticidas en los cultivos, los residuos industriales, desechos urbanos y vertidos de sustancias o fuga accidentales. Sin embargo, muchas de estas actividades no constan de medidas estandarizadas que midan el impacto que ocasionan sobre el ecosistema y los organismos. Originalmente dichas actividades son regularizadas únicamente con los análisis físicos-químicos, sin embargo, estos análisis no pueden evaluar los efectos que las sustancias ocasionan sobre la biota. Por ello, la aplicación de bioensayos de toxicidad puede ser una herramienta complementaria para evaluar el potencial riesgo ecológico y determinar los efectos sobre los individuos o mismo la población en general. Por tal motivo, la realización de bioensayos aportaría un más amplio enfoque en la evaluación de los efectos adversos que causan los contaminantes sobre el ecosistema, especialmente sobre los sistemas biológicos, por lo que se podrían tomar medidas regulatorias para proteger el medio ambiente y la salud pública.

Las pruebas de toxicidad en laboratorio pueden ayudar a entender los efectos adversos que los contaminantes pueden ejercer sobre los organismos. La mayoría de los ensayos implica la exposición forzada de los organismos y no se toma en consideración que el organismo en su ambiente natural, al estar expuesto a determinados tóxicos, puede simplemente huir de la contaminación (Kimball & Levin, 1985). El presente estudio muestra una alternativa para evaluar esta respuesta que constantemente se pasa por alto en las pruebas toxicológicas, empleando un sistema de multi-compartimentado con exposición no forzada con el fin de aumentar la relevancia ecológica de los ensayos ecotoxicológicos, simulando una situación potencialmente real encontrada en los sistemas naturales. Además, el organismo elegido en la presente investigación es el camarón blanco *L. vannamei* presentando un importante valor económico para el Ecuador (FAO, 2006), por lo que diversos sectores se han dedicado a su cultivo, resultando menos esfuerzo en colecta de los organismos para las pruebas de toxicidad. Aunque la toma de organismos de

su ecosistema natural sea más representativo de lo que puede pasar en los ecosistemas, el uso de organismos de cultivo, se debe que los animales que sean usados en los ensayos experimentales estén en un estado fisiológicamente normal, es decir, cuya respuesta medible de tal especie no origine una gran variabilidad en los resultados, ya que un organismo colectado en su medio natural puede ser difícil de ensayar debido que se desconoce sus condiciones fisiológicas (Álvarez, 1999). Por último, los camarones ensayados estaban todos en una misma etapa larval. La misma razón de elegir organismos juveniles es por su mayor vulnerabilidad a intoxicación en las pruebas de toxicidad, por lo que la concentración que origine cambios en sus patrones sirva como base para la protección de toda su población (Álvarez, 1999).

Uno de los principales principios de toda prueba toxicológica es conocer el potencial impacto de los contaminantes y ayudar a establecer límites permisibles de determinada sustancia tóxica que se descargan en las aguas. Por ejemplo, el Cu es un metal muy utilizado en ensayos de toxicidad y puede ser introducido en el medio acuático por descargas producto de las actividades mineras, agricultura e industrias (kiaune & Singhasemanon, 2011). El cobre es conocido por producir alteraciones en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las especies, aun cuando expuesto a niveles subletales. Varios estudios se han dedicado a observar mediante pruebas ecotoxicológicas la respuesta que ejerce este metal en los procesos reproductivos, crecimiento, la sobrevivencia y procesos embrionarios en diferentes especies de camarones (Wong et al., 1995; Osunde et al., 2004; Greco et al., 2010; Asih et al., 2013). Sin embargo, no hay estudios sobre la capacidad de evitación del camarón blanco expuestos al Cu. Por tal motivo, la aplicación de los ensayos de fuga puede constituir una herramienta para predecir el potencial impacto del cobre en los camarones. Además, la fuga puede resultar una herramienta fundamental para predecir futuros cambios en la distribución y dinámica poblacional de la especie.

Por lo tanto, el presente estudio tiene como propósito implementar un sistema de fuga de exposición no forzada con múltiples cámaras para formar un gradiente contaminado de cobre y simular escenarios más asociados a la

realidad del ecosistema. El sistema empleado busca medir el comportamiento de evitación de los camarones al cobre y determinar las concentraciones que pueden disparar la huida de la población en su hábitat contaminado. La fuga es conocida por ser una respuesta rápida que se presenta antes de la mortalidad, como una señal de alerta temprana contra el posible deterioro del hábitat y futura desaparición de sus poblaciones en el ecosistema. Por último, los resultados podrían ser aprovechados por los reguladores de la conservación de la vida acuática, estableciendo medidas de protección para las comunidades naturales como preventiva para un futuro manejo sostenible del recurso.

1.4.- OBJETIVOS

1.4.1.- Objetivo general

Evaluar la respuesta de fuga de las larvas del camarón blanco (*L. vannamei*) expuestas a un gradiente de contaminación por cobre.

1.4.2.- Objetivo específico

- Determinar el porcentaje de fuga de la larva de camarón blanco *L. vannamei* en distintas concentraciones y si este porcentaje varía en función del gradiente al que son sometidas.
- Estimar la reducción poblacional causada por el cobre teniendo en cuenta la respuesta de fuga.
- Determinar la concentración que lleva a la fuga el 50% de la población (AC50) de las larvas del camarón blanco cuando expuestas al cobre.

1.5.- HIPÓTESIS

H1. Las larvas de camarón blanco serán capaces de detectar concentraciones subletales de cobre y evadirlas.

H2. A bajas concentraciones de cobre la respuesta de fuga jugará un papel más importante que la mortalidad para la reducción inmediata de la población.

1.6.- VARIABLES

1.6.1.- VARIABLES DEPENDIENTES

- Fuga
- Mortalidad

1.6.2.- VARIABLES INDEPENDIENTES

- Cobre.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1 APARICIÓN Y DESARROLLO DE LA ECOTOXICOLOGÍA

El término ecotoxicología fue propuesto por Truhaut en 1969 a partir de la integración de la ecología y toxicología (Chapman, 1995). En la siguiente descripción haremos un análisis de la diferencia y conjunción de éstas disciplinas en el dominio de la ecotoxicología.

Ecología + toxicología= ecotoxicología.

Los estudios ecológicos están enfocados principalmente en 3 niveles de organización biológica: individuo, población y comunidad (Moiseenko, 2008). El propósito de la ecología es entender y explicar el fenómeno natural, proceso ecológico y, por lo tanto, el resultado de patrones de distribución, abundancia, densidad e interacción de especies (Underwood et al., 2000). Los ecologistas comienzan con simples observaciones de campo y manipulación experimental (Chapman, 2002), que a su vez las interrogantes que se utilizan frecuentemente en estudios son ¿Dónde están los organismos? ¿Cuántos son? ¿Por qué los organismos están allí?, sin embargo, estas clásicas preguntas pueden ser un problema debido a la influencia de factores antropogénicos que comúnmente perturban el estado ambiental y la salud de las especies, trayendo posibles cambios en la distribución y abundancia causadas por el deterioro del hábitat y los efectos deletéreos en los organismos. Es por ello que a menudo se reconoce que la manera de revelar la toxicidad más claramente en el medio ambiente debe ser llevando a cabo bioensayos en los que se miden respuestas biológicas a nivel individual (Moiseenko, 2008), a pesar del carácter reduccionista de los bioensayos cuando comparados a los sistemas ecológicos muy complejos (Straalen, 2003).

Por otra parte la toxicología es la ciencia que se encarga en la evaluación de distintos tipos de efectos causados por diversos productos químicos en distintos organismos. Los toxicólogos llevan a cabo experimentos a nivel individual, evaluando sus condiciones fisiológicas, bioquímicas, histológicas entre otras (Moiseenko, 2008). En general, la toxicología centra sus estudios

para evaluar los efectos que pueden tener las sustancias sobre la especie humana. La toxicología no puede predecir los efectos que pueden sufrir los más altos niveles de organización biológica, como los ecosistemas (Chapman, 2002).

Por ello, la ecotoxicología ha surgido con el propósito de estudiar el impacto de las sustancias químicas en los organismos bajo condición experimental u observaciones de campo, incluyendo a toda su comunidad biológica, estructura y funcionamiento (Chapman, 2002). En términos más sencillos, la ecotoxicología nos es más que la ecología en presencia de tóxicos



Figura 1).

Figura 1. Desarrollo de la ecología, toxicología ambiental y ecotoxicología (Chapman, 2002).

En algunos casos la toxicología ambiental suele ser confundida con la ecotoxicología, pero hay varias características que diferencian a estas dos disciplinas (Tabla 1).

Tabla 1 Toxicología ambiental vs ecotoxicología (Chapman, 2002).

Toxicología ambiental	Ecotoxicología
Basados en estudios de laboratorio (muestreo, cultivo, mantenimiento, ensayos).	Basados en estudios ecológicos (importancia: cadena alimenticia, estructura de la comunidad).
Pruebas con simple especies	Ensayos con especies combinadas
El costo del ensayo es primordial	Una decisión incorrecta es lo primordial
Pruebas simples	Pruebas complejas
La sustancia química testada es lo más importante	La sustancia química es una factor, pero no lo más importante
Toxicólogo	Ecotoxicólogo

La diferencia más representativa entre ambas ciencias es que en la ecotoxicología los efectos que importan son los que suceden en las poblaciones y no sobre los individuos exclusivamente. Por ejemplo, hacer una evaluación de la concentración del contaminante que mata el 50% de la población no refleja una significancia mayor, comparada a la concentración de un contaminante que altera o retarda el desarrollo reproductivo o su crecimiento. Aunque a largo plazo, el segundo ejemplo puede generar grandes complicaciones ecológicas, pues la estructura de la población se verá afectada. Del mismo modo, si un contaminante modifica el hábitat, las consecuencias ecológicas pueden ser altamente perjudiciales (Chapman, 1995).

2.1.1 ¿Qué tipos de efectos ecotoxicológicos pueden medirse?

La ecotoxicología se basa en dos herramientas fundamentales que son: monitoreo ambiental y biológico. El monitoreo ambiental permite comprender las formas las cuales se descartan los contaminantes y estudiar cuál es su destino en el ambiente, es decir, detectar su presencia en distintos compartimentos como agua, suelo, aire y sedimentos (SEMARNAT, 2009), poniendo énfasis en la estructura y propiedades de los agentes químicos

peligrosos y su transformación en el medio ambiente (formas de transporte, procesos de transformación, decadencia, la sedimentación e inactivación) (Moiseenko, 2008). El monitoreo biológico consiste en evaluar los efectos adversos sobre los individuos, poblaciones y comunidad que han estado expuesto en el ecosistema, y para ello, se aplican pruebas de laboratorio, como los bioensayos, o estudios de campo (SEMARNAT, 2009).

2.2 ¿Qué es un bioensayo?

Un bioensayo son pruebas de laboratorio que usan sistemas biológicos para evaluar o predecir el potencial impacto de contaminantes en el ecosistema (Calow, 1989; Maltby & Calow, 1989). Además, los mismos bioensayos de toxicidad en laboratorio se desarrollaron para proporcionar información directa del efecto causado por la contaminación en el ambiente (Kimball & Levin, 1985). Los efectos que pueden ser evaluados en los organismos de prueba son: crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos, histológicos, sobrevivencia, comportamiento, entre otros.

Uno de los principios de todo bioensayo es establecer límites permisibles para distintas sustancias tóxicas vertidas en las aguas, como tal, los bioensayos también pueden ser utilizados para anticipar el impacto de una sustancia antes de ser introducida en el ecosistema, o como monitor de los efectos reales en la naturaleza. Aunque los análisis físicos-químicos son una herramienta de importancia en la evaluación de riesgo ambiental, no son suficientes para comprender la toxicidad de un producto ni evaluar el potencial contaminador de cualquiera de ellos sobre la biota (Álvarez, 1996). Usualmente los ensayos ecotoxicológicos realizados en laboratorio en los que una población es expuesta a un compuesto nocivo se da bajo condiciones controladas (SEMARNAT, 2009), de modo que alternativas para aumentar la relevancia en los experimentos son siempre bienvenidas.

2.2.1 Objetivo de los bioensayos

El objetivo de un bioensayo de toxicidad es determinar las concentraciones de una sustancia, material o efluente capaz de provocar una respuesta medible para una población sometida a condiciones de laboratorio (Álvarez, 1996). La respuesta cuantitativa es mejor indicador para el análisis experimental, es decir, aquella que sea fácil de observar, el cual se estime con exactitud la afectación que sobre los organismos provoca un contaminante. Por ello, los datos cuantitativos en los bioensayos establecen una mejor evaluación estadística en los resultados de la curva concentración-respuesta (Álvarez, 1996). Sin embargo, los experimentos *in situ* también son relevantes por ser realizados bajo condiciones reales, incluyendo todas sus variables bióticas y abióticas presentes en el medio.

Para la aplicación de bioensayos ecotoxicológicos se debe tener en cuenta algunas características importantes:

Según la renovación del medio los ensayos pueden ser:

- Estático: No hay renovación de la concentración del tóxico introducido al inicio del ensayo, ni se admite que ocurra flujo del mismo.
- Semiestático: Hay renovación periódica del medio de ensayo y del tóxico cada 24 o 48 horas.
- Flujo continuo: La sustancia testada es renovada constantemente a través del flujo del contaminante dentro del sistema.

Según el tipo de respuesta, los ensayos pueden ser:

- Agudos
- Crónicos

Para la cuantificación de un efecto en los ensayos agudos sobre una población, se utiliza como índice estándar la LC50 que es la concentración que resulta letal al 50% de los organismos de ensayo. Dentro de las pruebas de toxicidad letal, está aquella que se utilizan para definir la concentración el cual un

material de ensayo puede provocar un patrón de respuesta letal en una población experimental.

Para medir un efecto en los ensayos crónicos, se utiliza como medida estándar la EC50 que es la concentración subletal que inhibe una función vital del 50% de los organismos de ensayo. Los efectos subletales son aquellos que normalmente se realizan en periodos prolongados y se evalúan las respuestas fisiológicas, como metabolismo, osmorregulación, crecimiento, comportamiento, alimentación, reproducción, entre otros, y se realizan con concentraciones que no provoquen la mortalidad (Álvarez, 1991). Por lo general, este tipo de ensayos muestra ser un escenario de exposición más real, en que los animales acuáticos están más asociados a su entorno (Eggen et al., 2004). Además, para estudiar estos efectos se suele evaluar en un tiempo superior a 96 horas. Por otra parte, la NOEC que corresponde la concentración máxima del ensayo que no produce un efecto, y la LOEC concentración más baja del ensayo que produce un efecto, se usan comúnmente en ensayos crónicos basados en medir el crecimiento, reproducción o en algunos casos la bioconcentración (USEPA, 1991).

Para la elección de organismos en las pruebas de toxicidad la EPA (por sus siglas en inglés, Environmental Protection Agency) argumenta utilizar especies sensibles y recomienda un mínimo de tres pruebas de especies (vertebrados, invertebrados y plantas). Usualmente los animales que son utilizados para las pruebas de toxicidad según el criterio de la EPA comprenden peces en representación de los consumidores de carne (vertebrados), las dafnias en representación de los zooplancton (invertebrados) y microalgas que representan la base de la cadena alimenticia (plantas) (Calow & Forbes, 2003).

2.3 Criterios para elegir un organismo de ensayo

Una de las primeras consideraciones que se establecen en los ensayos de toxicidad, es la elección de una especie adecuada para la evaluación del riesgo ecológico asociada a la contaminación antropogénica. Para ello, se define que el organismo ensayado sea sensible a la contaminación (Cairns, 1986; Maltby

et al., 2005), por lo que la especie seleccionada para las pruebas de toxicidad demuestre ser más vulnerable a una amplia gama de sustancias tóxicas (Cairns, 1986), donde sus mediciones o respuesta sobre el mismo sirvan como base para el estableciendo de normas para la protección de las demás especies (Cairns, 1984).

Otro punto importante que hay que destacar para la elección de un organismo de prueba, es que tiene que ser económicamente o ecológicamente importante. Además, para evaluar el grado de contaminación en un sitio específico en la naturaleza, se realiza un previo monitoreo biológico evaluando la especie más abundante o en otros criterios que sea clave para en el equilibrio de las comunidades naturales (Chapman, 2002). En la imposibilidad de usar una especies ecológicamente representativa, se usa la que tenga alguna similitud con las especies presentes en el ecosistema que se quiere estudiar.

Muchos esfuerzos han sido concentrados en la selección de organismos que pueden ser usados en los bioensayos. Por ejemplo, se conoce una gran variabilidad de patrones de respuesta de los organismos tales como anomalías de mortalidad en los puntos de control, por lo que un factor de gran importancia para aplicar una especie en las pruebas toxicológicas es que los animales experimentales se encuentren en un estado fisiológicamente normal (Álvarez, 1996). Uno de los criterios de importancia se basa en ensayar con organismos de fácil cultivo (Chapman, 2002), debido que provienen de una misma población y un estado fisiológicamente estándar (Álvarez, 1996).

Según la USEPA (1991), cada organismo responde de manera distinta a un contaminante, de modo que una especie puede ser sensible a un tóxico pero tolerante a otro y la única manera de evaluar la gama de sensibilidades es probar con un número de diferentes especies y grupos taxonómicos, es decir, que se incluyan especies de distintos niveles tróficos.

A continuación en la siguiente Tabla 2 se pone en comparación criterios estándar y recomendados para la selección de los organismos de ensayos (Chapman, 2002).

Tabla 2 Comparación criterio estándar y recomendados para la elección de los organismo de ensayo

Criterio estándar	Criterio recomendado
Importante grupo ecológico (Taxonomía, nivel trófico)	Dominante o especie clave
Ampliamente disponible (menos esfuerzo)	Razonablemente disponible (mayor esfuerzo)
Fácil cultivo y genéticamente estable	Fácil colecta en campo y laboratorio
-----	Pueda ser testado con otras especies/taxa
-----	Relevancia ecológica y toxicológica
Resistente, respuesta medible a los tóxicos	Puede ser testado en laboratorio o campo
Resistente a enfermedades, daños físicos y fácilmente manejable en laboratorio	

2.4 Estimación de la curva concentración/dosis-respuesta

La cantidad de contaminantes a los que cada individuo se expone se llama concentración, y la magnitud del daño en la salud se llama respuesta (Calow & Forbes, 2003). No se debe confundir dosis con concentración, debida que la dosis es la sustancia o contaminante de prueba que es introducida, mientras que la concentración es la que presenta el ambiente en el cual se encuentra el organismo. Así que, para los bioensayos con animales acuáticos se debe emplear el término concentración porque es la que en realidad se presentará en el medio e influirá sobre la biota (Álvarez, 1996).

Las exposiciones acuosas comprenden la situación más simple de predecir, porque solo hay una vía de absorción (agua). Por lo general, las medidas estudiadas en concentraciones del medio son LC50 y EC50 (concentración

letal al 50% de la población y concentración que provoca un efecto del 50% de la población), mientras que para la dosis el parámetro utilizado es LD50 (dosis letal del 50% de la población) (Chapman, 1995).

En la siguiente Figura 2 se presentará un modelo de curva de respuesta y dosis-concentración.

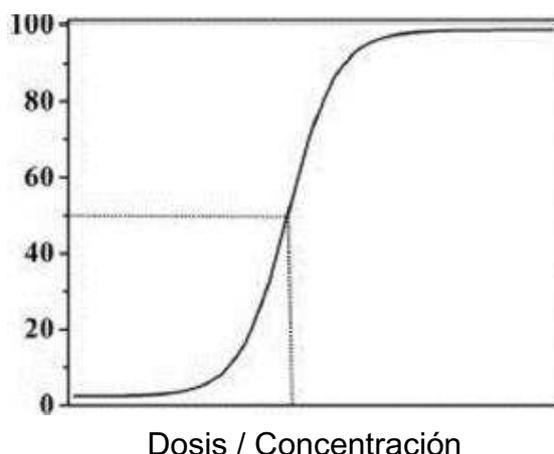


Figura 2 Relación de la dosis / concentración – respuesta. Conforme aumenta la concentración o la dosis aumenta la respuesta.

2.5 Bioensayos de comportamiento: la respuesta de fuga (*avoidance*)

Los bioensayos de comportamiento en condiciones de laboratorio sirven para medir los cambios o actividad de un organismo cuando expuesto a distintas sustancias tóxicas. Para estos ensayos se suele usar organismos que tengan movilidad, para evaluar cómo sus actividades pueden verse afectadas (Álvarez, 1996).

Para las especies móviles, el escape puede ser en algunos casos la respuesta clave, comprendiendo una señal predictiva sobre un probable deterioro en el ecosistema. Varios autores enmarcan que el comportamiento de fuga puede considerarse como una herramienta complementaria en la evaluación del riesgo ecológico (Lopes et al., 2004; Rosa et al., 2008; Araújo et al., 2012), porque se asemeja a la respuesta más real expresada por los organismos en el

medio al entrar en contacto con un agente tóxico. Además, la fuga de la población tiene consecuencias ecológicas similares a la mortalidad, una vez que los organismos no más se encuentran en el ecosistema.

El comportamiento de fuga es la habilidad que tienen los organismos de detectar la presencia de un agente tóxico y escapar hacia una zona menos contaminada. Por lo general, evitar un ambiente contaminado se produce en condiciones reales, donde los organismos al enfrentar cualquier tipo de amenaza que afecte su supervivencia puedan detectar el peligro y evitarlo. La fuga es considerada una respuesta clave para estimar el riesgo ecológico, pues se presenta mucho más temprano que la letalidad (Lopes et al., 2004). Los ensayos tradicionales en ecotoxicología usan la exposición forzada de los organismos a los contaminantes, midiendo una respuesta (daño) al cabo de un tiempo, y por lo tanto subestiman los efectos deletéreos de la contaminación sobre el ecosistema, es decir, que los organismos al estar al frente de un tóxico simplemente huyen de la zona contaminada y no necesariamente tiene que sufrir un daño en sus funciones biológicas. En efecto, la evitación o escape puede considerarse como un signo que aparece fácilmente en los organismos, como un mecanismo de defensa que refleja una primera señal de alerta antes de presentar un síntoma perjudicial (Hellou, 2011). Es por ello que los ensayos de fuga muestran ser una herramienta complementaria para evaluar el riesgo ecológico, ya que la respuesta de fuga es mucho más apreciable, fácil de observar, fiable, rápida y altamente relevante (Lopes et al., 2004).

CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

El tipo de investigación usado en la presente tesis ha sido bibliográfica y descriptiva experimental. En cuanto a la ubicación aunque el trabajo se llevó a cabo en la ciudad de Manta su importancia se extiende a nivel internacional. Sin embargo los experimentos se hicieron en el laboratorio de Ocean Farm. La duración del trabajo desde la búsqueda bibliográfica hasta la entrega de la tesis fue de 9 meses comprendido desde el mes de mayo del 2013 a Febrero del 2014.

3.1 Especie: Característica, obtención y mantenimiento

Las larvas de camarón blanco *L. vannamei* se obtuvieron de la empresa LARDERMA y RIVERMAR (Manabí-Ecuador). Los organismos ensayados tenían una edad aproximadamente de 17 días y ± 2 cm (Figura 3). Los organismos fueron transportados al laboratorio en bolsas plásticas introduciendo oxígeno y agua de cultivo. En laboratorio, las larvas fueron puestas en un recipiente con aireación constante para la aclimatación. El agua usada en los cultivos y experimentos fue caracterizada y los parámetros medidos son representados en la Tabla 3.

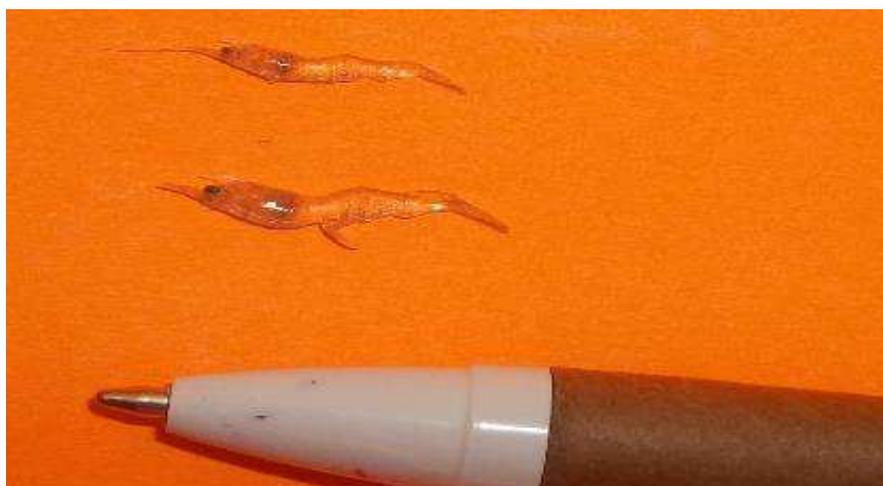


Figura 3. Larvas de *L. vannamei* usadas en los experimentos

Tabla 3 Análisis físico-químico de la muestra de agua de cultivo

PARÁMETRO	VALOR	UNIDAD
pH	7,95	-
Potencial redox	-3,9	Mv
Salinidad	16700	mg/L
Sólidos disueltos totales	13910	mg/L
Conductividad eléctrica	27,50	mS/cm
Cloruro	29778	mg Cl ⁻ /L
Alcalinidad	162,50	mg CaCO ₃ /L
Amonio	0,25	mg NH ₄ ⁺ /L
Ortofosfato	0,25	mg PO ₄ ⁻³ /L
Nitrito	0,15	mg NO ₂ ⁻ /L
Sulfato	5675	mg SO ₄ ⁻² /L
Oxígeno disuelto	3,8	mg O ₂ /L
Hierro	0,07	mg Fe/L

3.2 Implementación del sistema

Se elaboró un sistema para los ensayos de fuga de exposición no forzada con botellas plásticas interconectadas formando siete compartimentos (Figura 4), con el fin de simular un gradiente de contaminación por cobre (Rosa et al., 2012). Cada compartimento tuvo un volumen de 300 mL con un total de 2100 mL para todo el sistema. Para crear cada compartimento se realizaron cortes en la parte media de las botellas uniendo dos botellas por la mitad dejando a los extremos en ambos lados la boca de las dos botellas. Además, se realizó un corte en la mitad de los compartimentos dejando una apertura en la parte superior para introducir los organismos. Este mismo procedimiento fue aplicado hasta obtener siete compartimentos. Posteriormente, se conectaron cada uno de los compartimentos desde el extremo (boca) cubriéndolo con cinta teflón

para evitar cualquier pérdida de la solución al momento de realizar los ensayos de fuga. Una vez terminado el sistema, se dejó en reposo hasta 24 h. El pegamento utilizado (Sikaflex- 11FC) no tiende a considerarse tóxico, por lo que la realización de los ensayos de fuga no tiene que haber otra influencia de cualquier material que altere la respuesta de los organismos.

Una vez desarrollado el sistema, se elaboró una base firme para estabilizarlo, con la finalidad de evitar cualquier movimiento inadecuado al momento del conteo de los organismos y derrame de la solución. Además, se realizó una prueba previa llenando el sistema con agua de grifo para verificar que no hubiera pérdida del volumen en las diluciones empleadas (reposo 24 h).

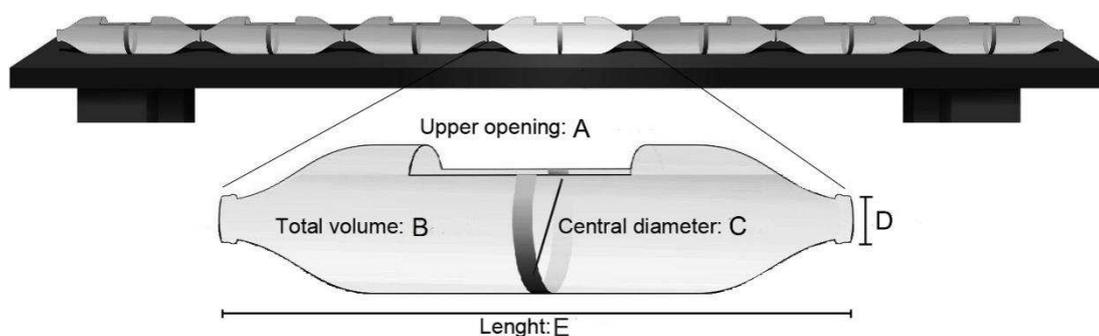


Figura 4 Diagrama del sistema de fuga (Araújo et al., 2014a).

3.3 Prueba del sistema de fuga

Inicialmente, se realizó una calibración del sistema de fuga, con el objetivo de confirmar la estabilidad del gradiente lineal de contaminación. Para realizar la calibración del sistema, se usó una solución de cloruro de sodio (NaCl), cuyas concentraciones fueron determinadas a través de los valores de conductividad. Cinco concentraciones (17, 34, 50, 66, 84 mg L⁻¹) fueron preparadas usando una solución stock de 100 mg L⁻¹ (considerado 100%) más el control (0%), diluidas con agua de grifo. Antes de ingresar las concentraciones en el sistema, se aislaron los compartimentos adyacentes con tapones de plastilina envueltos en teflón, con el fin de evitar el paso de la solución al compartimento siguiente y así originar una mezcla brusca en el gradiente antes del inicio del experimento. Posteriormente, cuando todos los compartimentos estaban llenos de agua, se

retiraron los tapones y se dejó 24 h, ya que comprende el tiempo máximo de exposición de los organismos en los ensayos de fuga. La calibración del sistema fue realizado por cuadruplicado y sin organismos.

3.4 Ensayo de fuga

Se llevó a cabo un ensayo control con agua de cultivo para conocer la dispersión de los organismos en el sistema en ausencia de contaminación, es decir, que no hubiera ninguna preferencia o evitación de cualquier compartimento del sistema y, por lo tanto, evaluar que los organismos presentarían una distribución aleatoria (no preferencial). La realización del ensayo control se realizó por triplicado y el número de organismos empleados fue de 5 por compartimento con un total de 35 por sistema.

Para las pruebas de fuga con Cu, se llevó a cabo un primer ensayo con concentraciones bajas (ensayo #1). Seis concentraciones de Cu (0.05; 0.11; 0.17; 0.22; 0.28; 0.34 mg L⁻¹) fueron preparadas de una solución stock de 500 mg L⁻¹ de Cu y depositadas en cada compartimento del sistema. Cinco organismos por compartimento fueron introducidos después de haber formado el gradiente de Cu, totalizando 35 organismos por sistema. El ensayo fue realizado por triplicado y el tiempo de exposición fue de 24 h, con observaciones a 3 y al final del ensayo, donde se evaluó la posición de los organismos y si estaban vivos o muertos.

Un segundo ensayo de fuga con Cu se llevó a cabo (ensayo #2) con concentraciones más altas que las testadas anteriormente (0.34; 0.66; 1.00; 1.32; 1.66; 2.00 mg L⁻¹). El número de individuos introducidos en cada compartimento fue 5 organismos (* 7 compartimentos * 3 réplicas) y con un periodo de exposición de 3 h.

Ambos ensayos fueron realizados en un área cerrada en oscuridad para evitar la influencia de la luz o presencia humana en el desplazamiento de los organismos durante la exposición. La temperatura fue de 26 °C. Al final de los experimentos, antes de realizar el conteo de los camarones y evaluar la

posición de ellos en el sistema, se colocaron los tapones para cortar el paso de los camarones entre los compartimentos. Dicho procedimiento se hizo utilizando una luz roja, con el fin de evitar que los camarones detecten la presencia humana y que su distribución en el sistema fuera alterada. Los camarones no fueron alimentados para evitar añadir interferencias al sistema y el agua utilizada en la dilución de los ensayos con Cu fue la usada en los cultivos.

Durante los experimentos al final de 3 h (respuesta inmediata) y 24 h (respuesta en corto tiempo), se tomaron muestras de cada uno de los compartimentos para determinar la concentración real de Cu. Al final de los ensayos de fuga, la actual concentración de Cu para el ensayo #1 (3 y 24 h) fue (0; 0.05; 0.11; 0.17; 0.22; 0.28; 0.40 mg L⁻¹) y para el ensayo #2 (3 h) fue de (0.05; 0.08; 0.10; 0.50; 0.90; 1.10; 1.30 mg L⁻¹). El corto periodo de duración de los ensayos se debe que los camarones presentaban una alta movilidad y rápida habilidad de desplazamiento entre un compartimento a otro.

3.5 Análisis de datos

Para comprobar que el gradiente de NaCl se mantuvo estable en el sistema, se usó el análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post test (prueba de comparación múltiple – Tukey test). En el ensayo control para verificar la distribución de los organismos en el sistema puestos solo con agua de cultivo (sin contaminante), se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis. En los ensayos de fuga con agua contaminada de Cu, el número de organismos fugados en cada compartimento se determinó calculando el número de organismos esperados (N_E) menos el número de organismos observados (N_O): Fugados= N_E - N_O (Moreira-Santos et al., 2008; Araújo et al., 2014a). El N_E se calculó con el número de organismos introducidos al inicio de la prueba, más los que se esperaban que llegaran de los compartimentos restantes con mayor concentración de cobre, es decir, el N_E del compartimento más contaminado de Cu con 5 camarones introducidos sería 5; sin embargo, para al compartimento adyacente, se esperaría que migraran a este compartimento los 5 organismos del compartimento más contaminado, con lo cual los N_E serían 10 organismos.

Para el compartimento control el N_E correspondería un total de 35 organismos, pues se esperaría que todos los organismos migraran hacia dicho compartimento. El N_0 es igual a los organismos encontrados en cada compartimento sumados a los encontrados en los compartimentos con concentraciones más altas. Los porcentajes de fuga en cada compartimento se calcularon dividiendo el número de los organismos fugados por los N_E multiplicados por cien: $Fuga = (fugados / N_E) * 100$. Los valores de la AC50 (concentración que causa la fuga del 50% de la población) fue estadísticamente calculada por el programa de software PritProbit 1.63 (Sakuma, 1998).

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Calibración, distribución con agua control

Los resultados de calibración del sistema de fuga sin presencia de organismos indicaron que tras las 24 horas las concentraciones de NaCl en cada compartimento fueron estadísticamente diferentes ($F_{6,21}=1369.8$; $p<0.0001$), validando la estabilidad del gradiente de contaminación (Tabla 4).

Tabla 4 Valores de conductividad y concentraciones de NaCl (\pm desviación estándar) para cada compartimento para el periodo de calibración del sistema (de 0 h a 24 h) sin presencia de camarones.

Compartimento #	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		NaCl (mg L^{-1})	
	0 h	24 h	0 h	24 h
1	1621	1619 (1.7)	0	3 (0.8)
2	1651	1645 (1.4)	17	15 (0.6)
3	1669	1675 (4.8)	33	28 (2.2)
4	1731	1714 (6.0)	50	46 (2.7)
5	1757	1733 (3.8)	66	54 (1.7)
6	1794	1777 (4.5)	83	74 (2.0)
7	1841	1813 (1.5)	100	90 (0.7)

En los resultados del ensayo control, la distribución de los organismos sin contaminante se dio de manera aleatoria sin ninguna diferencia estadística en el número de individuos encontrados en cada uno de los compartimentos ($F_{6,14}=0.4912$; $p>0.05$), validando que no hubo una preferencia por ninguno de los compartimentos del sistema (Tabla 5).

Tabla 5 Número de organismos encontrados en cada compartimento (\pm desviación estándar) con agua de cultivo en ausencia de contaminación

Compartimento #	# de organismos	
	0 h	24 h
1	15	15(2.0)
2	15	16(0.6)
3	15	16(0.6)
4	15	12(1.7)
5	15	18(2.0)
6	15	15(2.6)
7	15	13(0.6)
n=	105	105

4.2 Respuesta de fuga al Cu

La respuesta de fuga de las larvas del camarón blanco tanto en las bajas (ensayo #1) como en las altas concentraciones (ensayo #2) está representada en la (Figura 5). En el ensayo #1, la fuga en 3 h llegó a un 66.7% en la concentración más alta de 0.40 mg L⁻¹ de Cu, mientras que en las bajas concentraciones ensayadas (0.05; 0.11; 0.17; 0.22; 0.28 mg L⁻¹ de Cu) la fuga fue de (28.9; 29.3; 31.7; 40.0 y 33.3 %, respectivamente). En el mismo ensayo, para 24 h de exposición, la fuga presentó similar respuesta que a 3 h con un valor del 60% a una concentración de 0.40 mg L⁻¹ de Cu, mientras que en las concentraciones más bajas la fuga se mantuvo por debajo del 50%. Durante todo el ensayo no se registró mortalidad.

Para el ensayo #2 (altas concentraciones), las larvas de camarón blanco fueron capaces de detectar el Cu, con una evasión mayor del 50% de la población en todas las concentraciones. La concentración más alta de 1.30 mg L⁻¹ de Cu la fuga fue de 86.7%, mientras que en las concentraciones de 0.90 y 1.10 mg L⁻¹ se observaron similares valores (71.1 y 76.7%, respectivamente). El menor porcentaje de fuga registrado fue de 66.3% para la concentración de 0.08 mg L⁻¹ de Cu. En este ensayo se registró una mortandad poco representativa con valores por debajo del 10%. La AC50 (concentración que lleva a la fuga del 50% de la población) calculada para el periodo de 3 h (ensayo #1) fue de 0.32

(0.31 – 0.33) mg L⁻¹ de Cu, mientras que para el periodo de 24 horas la AC50 disminuyó a 0.30 (0.28-0.32) mg L⁻¹ de Cu. Para el ensayo # 2 el valor de la AC50 fue de 0.16 (no calculado - 0.08) mg L⁻¹ de Cu. Sin embargo, los valores de 3 h en el ensayo #1 y el ensayo #2, se integraron para obtener una mejor estimación de la AC50, calculando un valor de 0.22 (0.09-0.44) mg L⁻¹ de Cu.

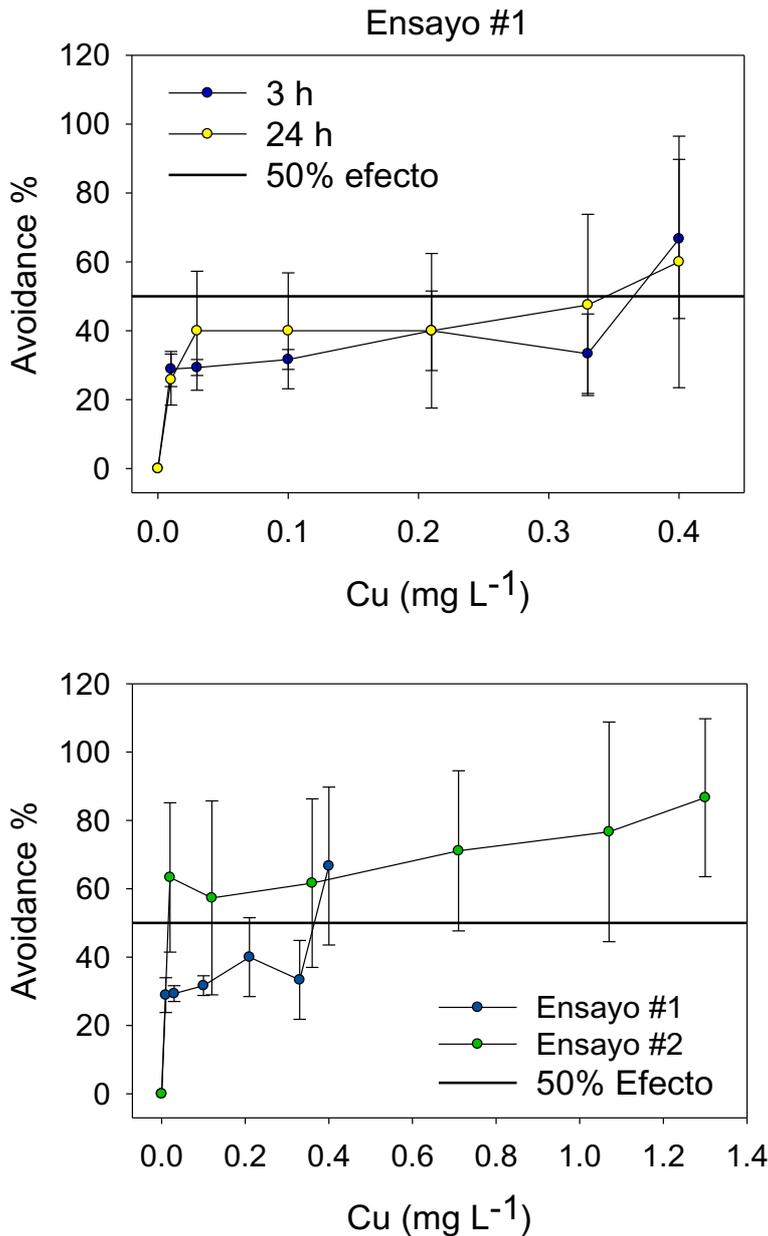


Figura 5. En ambas figuras se hace relación concentración-respuesta de fuga de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* expuestas a un gradiente lineal de Cu. Arriba: resultados del ensayo #1 tras 3 y 24 h de exposición; abajo: resultados de los ensayos #1 y #2 tras 3 h de exposición.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Los estudios realizados midiendo la respuesta de fuga, por lo general se basan en dos compartimentos (agua control y contaminante) (SceVICIUS 1999, 2007; Richardson et al., 2001), sin embargo el escenario de contaminación en el ambiente es más complejo y la respuesta de evitación de los organismos usando solamente dos compartimentos es más difícil de extrapolar de laboratorio a campo. Por ello, el sistema utilizado en el presente estudio trató de simular un escenario más realista formando un gradiente de contaminación, tal como los contaminantes más frecuentemente se presentan en la naturaleza. El sistema empleado fue desarrollado por Lopes et al. (2004), que expuso a *D. longispina* a un agente químico a través de cámaras con flujo continuo. El mismo método se aplicó en la presente investigación sin necesidad de flujo, pero manteniendo igualmente el gradiente, con diluciones depositados en las cámaras del sistema en condiciones estáticas. Posteriormente, para confirmar la adecuación del sistema para el estudio de evitación y la formación del gradiente, pruebas previas se llevaron a cabo, donde un ensayo de calibración demostró que el gradiente de contaminación con NaCl se mantuvo estable después de las 24 horas, garantizando su linealidad y estabilidad a lo largo de los siete compartimentos.

Además, un ensayo de control de distribución sin contaminante verificó que la respuesta de evitación de los organismos no ha sido inducida por ningún factor externo, pues los organismos no tuvieron preferencia por ninguno de los compartimentos, confirmando los procedimientos idóneos para la evaluación de evitación, lo que corrobora con otros resultados (Moreira-Santos et al., 2008; Rosa et al., 2012 y Araújo et al., 2014a).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el camarón blanco fue capaz de evitar ambientes contaminados con Cu, tal como fue observado en cladóceros, copépodos y renacuajos (Lopes et al., 2004; Gutierrez et al., 2012 y Araújo et al., 2014a). En nuestro estudio se observó que la intensidad de fuga del camarón blanco estuvo asociado al incremento de la concentración del químico de prueba, tal como fue descrito por Lopes et al. (2014). Sin embargo, aunque

la capacidad de evitar muestra ser una respuesta sensible que es asociada a la toxicidad de un compuesto, dicha respuesta debe ser apreciada hasta un determinado umbral de contaminación, ya que con un aumento en la concentración de los contaminantes, la fuga podría verse afectada y los efectos letales estarían más marcados en la disminución de la población. Araújo et al. (2014a) observaron la disminución inmediata de la población (PID, por sus siglas en inglés) en tres anfibios, *Leptodactylus latrans*, *Lithobates catesbeianus*, *Pelophylax perezi*, donde la fuga jugó un papel importante a concentraciones más bajas que $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre, pero con el aumento de ésta la mortalidad fue la respuesta determinante en el PID. Por eso, para muchos organismos acuáticos y en efecto el camarón blanco, la fuga parece ser la respuesta más clara, que es dada mucho antes que efectos letales sean observados, lo que garantiza el mantenimiento de sus poblaciones y la sobrevivencia de las especies aunque desplazadas hacia otros ecosistemas. Además, 3 h fueron suficientes para disparar la huida del camarón blanco, tal como se observó en el pez *Danio rerio* con 4 h de exposición al fungicida pirimetanil (Araújo et al., 2014c), indicando que no necesita exceder las 3 h de exposición al Cu, para observar la respuesta de evasión del camarón blanco. Aunque la evasión se pudo haber dado antes, con 3 h de exposición la fuga muestra ser una rápida respuesta defensiva sobre los contaminantes antes que se experimente otros efectos más dañinos (Oliveira et al., 2013). De hecho, en el ensayo #1 donde las concentraciones ensayadas eran más bajas y el tiempo de exposición fue de 24 h, el aumento del tiempo de exposición se hizo con el propósito de observar si los organismos a mayor tiempo presentaban una respuesta más acentuada. Sin embargo, se registró un similar porcentaje de fuga para ambos periodos, 3 y 24 h.

Estudios usando la exposición forzada reportaron distintos efectos subletales en el *L. vannamei*, tales como alteraciones histológicas y daños a nivel celular en el tejido branquial a 25 y 15 días de exposición al cobre (Abad-Rosales et al., 2010; Soegianto et al., 2013) con concentraciones similares a las ensayadas en nuestro estudio, el cual refleja la alta sensibilidad de este *endpoint* como una señal de alerta temprana sobre posibles repercusiones en la salud de los organismos (Hellou, 2011).

En nuestro estudio para el ensayo #2, se registró mortalidad del camarón blanco por debajo del 10% con mismos valores de 2.9% en concentraciones 0.10 y 0.50 mg L⁻¹ de Cu. En las más altas concentraciones ensayadas no se registró mortalidad, debido que los organismos que fueron expuestos a niveles más altos evitaron el químico antes de producir un efecto letal. Es posible que los camarones que no fueron capaz de recuperarse del daño producido por el cobre, perecieron en los compartimento adyacentes donde las concentraciones eran más bajas. Algunos ejemplos de cómo el cobre puede afectar a los organismos han sido descritos: Scelzo (1997) observó una alteración de nado del camarón *Artemesia longinaris* expuesto al cobre; Loureiro et al. (2005) con el isópodo *Porcellionides pruniosus* y lombriz de tierra *Eisenia andrei*, concluyeron que el cobre puede afectar al sistema nervioso, por lo tanto, desorientar a los isópodos e implicar discapacidad de escape. Estos mismos daños también pueden haberse notado en el camarón blanco, provocando daños en su habilidad natatoria y consecuentemente perecer en concentraciones más bajas. Sin embargo, la tasa de mortalidad observada ha sido tan baja, que posiblemente la mortalidad registrada pudo que ver con las condiciones fisiológicas del individuo.

El hecho que impulsa el escape del camarón blanco producido por el Cu se debe a la presencia de células quimiorreceptoras que proyectan estímulos provocados por el químico, con señales hacia el cerebro (Carr et al., 1987; Blaxter & Hallers-TJa bees, 1992), de modo que una lesión de los quimiorreceptores impide que los organismos detecten el Cu, con lo cual no puedan escapar de las zonas tóxicas. Aunque el cobre es un metal esencial para las funciones metabólicas, en muchos casos un aporte excesivo de sus niveles puede ser perjudicial para la salud de los organismos acuáticos, donde no solo causa un efecto letal en las especies, si no también se ven involucrado con otros efectos perniciosos que amenazan con la salud de los organismos y el estado del ecosistema. El cobre ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su toxicidad para muchas especies de camarones, mostrando ser una sustancia nociva pudiendo causar efectos en el desarrollo histológico (Frías-

Espericueta et al., 2008; Abad-Rosales et al., 2010; Soegianto et al., 2013), embrionario (Greco et al., 2002), en el crecimiento (Wong et al., 1995; Santos et al., 2000; Bo et al., 2014), alimentación (Chen & Lin, 2001) y supervivencia (Osunde et al., 2004; Asih et al., 2013). Nuestros resultados demostraron que el cobre puede desencadenar la respuesta de evitación del camarón blanco, donde el escape podría ser la respuesta más relevante en la reducción de las poblaciones en un nicho ecológico, por el desplazamiento hacia zonas más favorables. A ello refleja que los contaminantes juegan un papel importante como perturbadores del hábitat, e incluso a niveles que son vistos sin riesgo para la biota que con el tiempo pueden llevar a la erradicación de las comunidades biológicas y la desaparición de la especie dentro de un área local.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- El sistema de fuga empleado en el presente estudio demostró ser efectivo para medir la respuesta de evitación de larvas del camarón blanco *L. vannamei* expuestas a un gradiente contaminado de cobre.
- Los resultados de calibración con NaCl confirmaron la estabilidad del gradiente a lo largo de los seis compartimentos más el control, validando que las soluciones se mantuvieron hasta el final de las pruebas.
- El ensayo control (sin contaminante) con larvas de *L. vannamei* demostró que los individuos no tuvieron afinidad a ninguno de los compartimentos, por lo que se observó una distribución aleatoria en el sistema, confirmando que la respuesta de evitación fue inducida por el contaminante y no por otro factor externo.
- Un tiempo de 3 horas fue suficiente para estimar la respuesta de fuga del camarón blanco al cobre.
- En nuestro estudio se comprobó que el camarón blanco fue capaz de detectar y evitar ambientes contaminado por cobre, confirmando las dos hipótesis planteadas en el trabajo.
- Finalmente, la baja ausencia de mortalidad en los ensayos, determinó que la respuesta de evitación juega un papel importante en la disminución de la población en el área contaminada, generando el desplazamiento de los organismos hacia otras áreas más favorables, lo que puede llevar a una disminución local de sus poblaciones, aunque las concentraciones en el ecosistema sean subletales.

6.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda establecer una medida de regulación de un tóxico entrante a las aguas, tomando como referencia ensayos que evalúan el comportamiento de evitación de los organismos, ya que demuestra ser una respuesta temprana y sensible, que puede establecerse de modo preventivo como una señal de alerta ante un posible deterioro de los ecosistemas.

El sistema de fuga utilizado es recomendable para conocer la respuesta de evitación de las especies, debido que comprende un sistema estático multicompartimentado de exposición no forzada, el cual simula un ambiente más realista de contaminación, donde los datos proporcionados puedan ser útiles para extrapolarse de laboratorio a campo.

Proteger nuestra biodiversidad es nuestro deber y, para ello, aplicar estudios ecotoxicológicos sería un aporte importante para extender nuestros conocimientos sobre cómo estamos poco a poco alterando la naturaleza en su conjunto, ecosistema, biota, calidad de los recursos y salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

Abad-Rosales, S.M; Frías-Espericueta, M.G; Inzunza-Rojas, A; Osuna-López, I; Páez-Osuna, F; Lozano-Olvera, R; Voltolina D. 2010. Histological effects of Cu²⁺ to white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) juveniles at low salinities. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 45(1), pp. 99-105.

Álvarez, S. G. 1996. Metodología de bioensayos y efectos tóxicos de algunos contaminantes sobre organismos de interés ecológico pesquero. Tesis de Maestría. Centro de investigaciones Marinas Universidad de la Habana.

Araújo, C. V. M; Blasco, J; Moreno-Garrido, I. 2012. Measuring the avoidance behaviour shown by the snail *Hydrobia ulvae* exposed to sediment with a known contamination gradient. *Ecotoxicology*, Vol. 21, N° 3, pp. 750-758.

Araújo, C. V. M; Shinn, C; Moreira-Santos, M; Lopes, I; Espíndola, E. L. G; Ribeiro, R. 2014a. Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic Toxicology*, Vol. 146, pp. 70-74.

Araújo, C.V.M; Shinn, C; Vasconcelos, A.M; Ribeiro, R; Espíndola, E.L.G. 2014b. Preference and avoidance responses by tadpoles: the fungicide pyrimethanil as a habitat disturber. *Ecotoxicology*, Vol. 23, pp. 851-860.

Araújo, C. V. M; Shinn, C; Mendes, L. B; Delello-Schneider, D; Sanchez, A. L; Espíndola, E. L.G. 2014c. Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient. *Science of the Total Environment*, Vol. 484, pp. 36-42.

Araújo, C. V. M; Moreira-Santos, M; Sousa, J. P; Ochoa-Herrera, V; Encalada, A. C; Ribeiro, R. 2014d. Active avoidance from a crude oil soluble fraction by an Andean paramo copepod. *Ecotoxicology*.

Asih, A. Y. P; Bambang, I; Soegianto, A. 2013. Effect of copper on survival, osmoregulation, gill structure of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergi*, de Man) at the different development stages. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, Vol. 46, N°2, pp. 75-88.

Blaxter, J.H.S & Hallers-TJabbes, C.C.T. 1992. The effect of pollutants on sensory systems and behaviour of aquatic animals. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, Vol. 26(1), pp. 43-58.

Bo, C; Ying, L; Hongsheng, Y; Yi, S; Xian, L. 2014. Effect of copper on the growth of shrimps *Litopenaeus vannamei*: water parameters and copper budget

in a recirculating system. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Vol, 32, N° 5, pp. 1092-1104.

Cairns, J. Jr. 1983. Are single species toxicity test alone adequate for estimating environmental hazard?. Hydrobiologia, Vol. 100, pp. 47-57.

Cairns, J. Jr. 1984. Are single species toxicity test alone adequate for estimating environmental hazard?. Environmental Monitoring and Assessment, Vol. 4, pp. 259- 273.

Cairns, J. Jr. 1986. The Myth of the Most Sensitive Species. BioScience, Vol. 36, N° 10, pp. 670-672

Cairns, J. Jr. & Pratt J. R. 1989. The scientific basis of bioassays. Hydrobiologia 188/189, pp. 5-20.

Calow, P. 1989. The choice and implementation of environmental bioassays. Hydrobiologia 188/189, pp 61-64.

Calow, P; Forbes, V. E. 2003. Does Ecotoxicology inform Ecological Risk Assessment?; Some argue that ecotoxicology is too simplistic to do the job effectively. Environmental Science & Technology, pp. 147-151.

Carr, W. E. S; Ache, B. W; Gleeson, R.A. 1987. Chemoreceptors of Crustaceans: Similarities to Receptors for Neuroactive Sustances in Internal Tissues. Environmental Health Perspectives, Vol. 71, pp. 31-46.

Chapman, P. M. 1995. Ecotoxicology and Pollution-Key Issues. Marine Pollution Bulletin, Vol. 31, pp. 167-177.

Chapman, P. M. 1998. New and emerging issues in ecotoxicology – the shape of testing to come? Australasian Journal of Ecotoxicology, Vol. 4, pp. 1-7.

Chapman, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. Marine Pollution Bulletin, Vol. 44, pp 7-15.

Chen, Jiann-Chu; Lin, Chia-Hsin. 2001. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture Vol. 192, pp. 55-65.

De lange, H. J; Sperber, V; Peeters E. T.H.M. 2006. Avoidance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediment by the Freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 25, N°2, pp. 452-457.

Eggen, R. I. L; Behra, R; Burkhardt-Holm, P; Escher, B.I; Schweigert, N. 2004. Challenges in Ecotoxicology; Mechanistic understanding will help overcome the newest challenges. *Environmental Science & Technology*, pp 59-64

FAO. 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Actualizado 7 April 2006. En línea.

Frías-Espericueta, M.G; Castro-Longoria, R; Barrón-Gallardo, G.J; Osuna-López, J.I; Abad-Rosales, S.M; Páez-Osuna, F; Voltolina, D. 2008. Histological changes and survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with different copper concentrations. *Aquaculture*, Vol. 278, pp. 97-100.

Greco, L. L.S; Rodríguez, E,M; Bolaños, J; Hernández, G; Fingerman, M. 2002. Toxicity of copper sulphate during early and late embryonic development of a palaemonid shrimp (Crustacea). *Invertebrate Reproduction and Development*, Vol. 41(1/3), pp. 165-170.

Gutierrez, M. F; Paggi, J. C; Gagneten, A. M. 2012. Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. *Ecotoxicology*. Vol. 21, pp. 428-438.

Hellou, J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science Pollution Res.* 18: 1-11.

Holthuis, L. B. 1980. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries Synopsis No. 125. Vol 1.

Kiaune, L. & Singhasemanon, N. 2011. Pesticida Copper (I) Oxide: Environmental Fate and Aquatic Toxicity. *Environmental Contamination and Toxicology* 213.

Kimball, K. D & Levin, S. A. 1985. Limitations of Laboratory Bioassays: The Need for Ecosystem-Level Testing. *Bioscience*, Vol. 35, N°, 3, pp. 165-171.

Kravitz, M. J; Lamberson, J. O; Ferraro, S. P; Swartz, R. C; Boese, B. L; Specht, D. T. 1999. Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuaris* to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated, Field-Collected Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18, N°6, pp. 1232-1235.

Lacher, Jr. T. E; Michael, I; Goldstein. 1997. Tropical Ecotoxicology: Status and Needs. *Annual Reviews. Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol, 16, N°1, pp. 100-111.

- Lee, D. R. 1980. "Reference toxicants in quality control of aquatic bioassays," aquatic invertebrate bioassays. ASTM STP 715. A. L. Buikema, Jr., and John Cairns, Jr., Eds., American Society for Testing and Materials, p. 188-199.
- Lopes, I; Baird, D. J; Ribeiro, R. 2004. Avoidance of Copper Contamination by Field Populations of *Daphnia longispina*. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 23, N°7, pp. 1702-1708.
- Loureiro, S; Soares, A. M.V.M; Nogueira, A. J.A. 2005. Terrestrial avoidance behaviour test as screening tool to assess soil contamination. Environmental Pollution, Vol. 138, pp. 121-138.
- Maltby, L; Naomi, B; Brock, T.C.M; Brink, P. J. V. 2005. Insecticide species sensitivity distributions: Importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24, N° 2, pp. 379-388.
- Maltby & Calow, P. 1989. The application of bioassays in the resolution of environmental problems; past, present and future. Hydrobiologia 188/189, pp. 65-76.
- Moiseenko, I. T. 2008. Aquatic Ecotoxicology: Theoretical Principles and Practical Application. Water Resource, Vol. 35, N° 5, pp. 2008.
- Moreira-Santos, M; Donato, C; Lopes, I; Ribeiro, R. 2008. Avoidance test with small fish: Determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. Environmental Toxicology Chemistry, Vol. 27, pp 1576-1582.
- Oliveira, C; Almeida, J. R; Guilhermino, L; Soares, A. M. V. M; Gravato, C. 2014. Swimming velocity, avoidance behavior and biomarkers in *Palaemon serratus* exposed to fenitrothion. Chemosphere, Vol. 90, pp. 936-944.
- Osunde, I. M; Coyle, S; Tidwell, J. 2004. Acute Toxicity of Copper to Juvenile Freshwater Prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Applied Aquaculture, Vol. 14(3/4), pp. 71-79.
- Richardson, J; Williams E. K; Hickey, C. W. 2001. Avoidance behavior of freshwater fish and shrimp exposed to ammonia and low dissolved oxygen separately and in combination, New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, Vol. 35:3, pp. 625-633.
- Rosa, R; Moreira-Santos, M; Lopes, I; Picado, A; Mendonca, E; Ribeiro, R. 2008. Development and Sensitivity of a 12-h Laboratory Test with *Daphia magna* Straus Based on Avoidance of Pulp Mill Effluents. Bull. Environmental Contamination Toxicology, Vol. 81, pp. 454-469.

Rosa, R; Materatski, P; Moreira-santos, M; Sousa, J. P; Ribeiro R. A. 2012. Scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and population immediate decline concentration. *Environmental Toxicology Chemistry*, Vol. 31, pp. 1301-1305.

Sakuma, M. 1998. Probit analysis of preference data. *Applied Entomology Zoology*. Vol. 33, pp. 339-347.

Santos, M.H.S; Cunha, N.T; Bianchini, A. 2000. Effects of copper and zinc on growth, feeding and oxygen consumption of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol. 247, pp. 233-242.

Scelzo, M. A. 1997. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decápoda, Penaeidae). *Investigaciones Marinas Valparaíso*, Vol. 25, pp. 177-185.

SEMARNAT (Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales). Ecotoxicología. Última actualización lunes, 17 de Agosto del 2009. En línea.

Soegianto, A; Irawan, B; Usman, N. 2013. Effects of Sublethal Copper Concentrations on Gills of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931). *Bull Environmental Contamination Toxicology*, Vol. 91, pp. 630-634.

Straalen, N. M. 2003. Ecotoxicology Becomes STRESS Ecology. Viewpoint. *Environmental Science & technology*, pp. 325 A- 330 A.

Svecevicus, G. 1999. Fish Avoidance Response to Heavy Metals and their Mixture, *Acta Zoologica Lituanica*. Vol. 9(2), pp. 103-113.

Svecevicus, G. 2007. The use of fish avoidance response in identifying sublethal toxicity of heavy metals and their mixture, *Acta Zoologica Lituanica*, Vol. 17:2, pp. 139-143

Tchernitchin, A. N & Herrera, L. 2006. Relaves Mineros y sus Efectos en la Salud, Medio Ambiente y Desarrollo Económico. Ejemplo de Relave en el Valle de Chacabuco-Polpaico. *Cuadernos Médicos Sociales*, Vol. 46, pp. 22-43.

Underwood, A. J; Chapman, M.G; Connell, S.D. 2000. Observations in ecology: you can't make progres on processes without understanding the patterns. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 250, pp. 97-115.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1991. Technical Support Document for Water Quality-Based toxics control. EPA 505/2-90-001. Washington, DC.

Wong, C. K; Cheung, J.K.Y; Chu, K. H. 1995. Effects of Copper on Survival, Development and Growth of *Metapenaeus ensis* Larvae and Postlarvae (Decapoda: Penaeidae).

ANEXOS



Foto 1. Creación del sistema de fuga



Foto 2. Mantenimiento de los organismos

Ensayos de fuga con larvas de *Litopenaeus vannamei*



Foto 3. Preparación de las soluciones de cobre



Foto 4. Separación de los organismos



Foto 5. Colocación de los tapones y formación del gradiente de contaminación



Foto 6. Introducción de las larvas del camarón blanco en el sistema



Foto 7. Organismos en el punto control



Foto 8. Toma de muestras de las diluciones de cobre en el sistema



Foto 9. Observación y conteo de los organismos con luz roja.