CAPÍTULO X

Métodos de exposición no forzada en sistemas multi-compartimentados para incluir la selección de hábitat como respuesta a la contaminación

**Victoria Vera-Vera*^{1,3}, Luis Cedeño-Macias^{2,3}, Dayanara Macías-Mayorga³, Julián Blasco⁴, Matilde Moreira-Santos⁵, Rui Ribeiro⁵ y Cristiano V.M. Araújo^{4,5}

¹Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, Jaén, España.

²Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de la Rioja, Logroño, España.

³Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Manta, Manabí Ecuador. Ecuadorian Aquatic Ecotoxicology (ECUACTOX) Group.

⁴Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), Departamento de Ecología y Gestión Costera, Puerto Real, Cádiz, España.

⁵University of Coimbra, CEF-Centre for Functional Ecology-Science for People & the Planet, Department of Life Sciences, Coimbra, Portugal

*karolV-26@hotmail.com

<https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6-10>

RESUMEN

Las evaluaciones de riesgo basadas únicamente en análisis fisicoquímicos no contemplan los posibles efectos de las sustancias sobre la biota presente. Para ello, se hace uso de ensayos ecotoxicológicos que permiten determinar el potencial impacto de los contaminantes sobre los organismos, estableciendo límites de riesgo para sustancias tóxicas. Tradicionalmente, los organismos son expuestos de manera forzada a contaminantes, sin tener en cuenta su capacidad para percibir la contaminación y desplazarse (en el caso de organismos móviles) a un lugar menos contaminado. Este capítulo pretende mostrar la relevancia de los sistemas multi-compartimentados de exposición no forzada y su capacidad de simular escenarios reales de contaminación, sean éstos como gradiente lineal o como parches de contaminación. Además, este capítulo ofrecerá las directrices para la construcción de un sistema linear multi-compartimentado para estudios ecotoxicológicos. Esta aproximación permite mejorar las evaluaciones de riesgos en ecosistemas acuáticos sometidos a estrés ambiental, pues integra la dispersión espacial de organismos y el concepto de selección de hábitat como herramienta de diagnóstico ambiental.

Palabras-Clave: Exposición no forzada; Sistemas Multi-Compartimentados; Selección de Hábitat; Evaluaciones de riesgo; Estrés Ambiental

INTRODUCCIÓN

Los sistemas acuáticos representan ambientes de elevada diversidad biológica y, por tanto, de gran importancia ecológica. Sin embargo, la contaminación representa un factor inherente en casi todos los ecosistemas (Burton et al., 2002; Chapman, 2002; Depledge & Galloway, 2005), en especial para los ecosistemas de agua dulce, ya que éstos actúan frecuentemente como fuentes iniciales de depósito para los agentes tóxicos (Lotze et al., 2005) que dan lugar a alteraciones físicas, químicas y biológicas del agua, generando riesgos a la estabilidad del ecosistema e incluso para la salud humana (Rabalais, 2002; Capó, 2003). Por ello, los estudios ecotoxicológicos integran una de las importantes líneas de evidencia en las evaluaciones de riesgo ecológico (ERA – *Ecological Risk Assessment*) (Solomon & Sibley, 2002; Shea & Thorsen, 2012; Chapman, 2016). Debido a su carácter predictivo, este tipo de estudio representa una herramienta que permite identificar los posibles efectos aditivos y/o sinérgicos que puedan desencadenar los contaminantes (Lamberson & Swartz, 1988; Chapman, 1989; Van Gestel et al., 2001; Amin & Comoglio, 2002; Riba et al., 2004; Casado-Martínez et al., 2007), evaluando no solo el efecto potencial que puede causar en los ecosistemas, incluso antes de que sean vertidos (ERA prospectivo), sino además servir para evaluar/monitorear (ERA retrospectivo) la toxicidad de contaminantes autorizados y/o impactos ya existentes (Calow, 1989; Calow and Forbes, 2003).

La movilidad de los organismos acuáticos representa una función importante ante situaciones de estrés. El desplazamiento de los organismos en un ambiente contaminado evita exposiciones constantes al contaminante, disminuyendo el riesgo de sufrir efectos tóxicos letales o subletales (Wells et al., 2004; Amiard-Triquet, 2009; Tierney et al., 2010). Bajo este concepto, muchos organismos con movilidad propia son capaces de huir de ambientes con algún grado de estrés (Wells et al., 2004; Araújo et al., 2016a). Sin embargo, la migración por parte de los organismos a zonas menos perturbadas trae implícitas consecuencias para la estructura de la comunidad, tanto para el área evitada como para las zonas adyacentes (Hansen et al., 1999; Exley, 2000; Fleeger et al., 2003; Wells et al., 2004; Araújo et al., 2018a, 2019). Esta respuesta de evasión visible en condiciones reales es conocida como

huida/fuga/escape (*avoidance*). Este comportamiento refleja una primera señal de alerta, casi siempre temprana, sobre un posible deterioro del ecosistema (Hellou, 2011), y su relevancia está en que generalmente es apreciable a bajos niveles de toxicidad (Rosa et al., 2008; Araújo et al., 2016b). Varios autores mencionan que el comportamiento de fuga puede considerarse como una herramienta complementaria en la evaluación del riesgo ecológico, ya que es una respuesta fácilmente apreciable, fiable, rápida y de alta relevancia ecológica (Lopes et al., 2004; Rosa et al., 2008; Dornfeld et al., 2009; Araújo et al., 2012). La fuga integra el concepto de dinámica poblacional donde se considera el desplazamiento de los organismos "como una respuesta a la contaminación" (Worm and Duffy, 2003; Hellou et al., 2008; Schmitt-Jansen et al., 2008). En consecuencia, el desplazamiento lleva a los organismos evasores (*avoiders*) a seleccionar hábitats más favorables (preferencia de hábitat), desencadenando incluso procesos de recolonización en zonas adyacentes recuperadas que presenten mejores condiciones para la especie (Araújo et al 2018a). Este tipo de respuesta representa una importante línea de evidencia basada en los efectos claves a nivel ecotoxicológico, dado que el desplazamiento de un organismo que naturalmente no se encontraba en el hábitat condiciona las relaciones ecológicas a muchos niveles, como puede ser la presión competitiva por espacio y alimento en las nuevas áreas colonizadas (Hansen et al., 1999; Exley, 2000; Fleeger et al., 2003; Wells et al., 2004). Los ensayos de exposición forzada al ser comparados con sistemas ecológicos naturales pueden presentar un carácter reduccionista (si se considera organismos móviles en un ambiente químicamente heterogéneo) frente a la gran complejidad del ecosistema (Van Straalen, 2003). Por ello, resulta fundamental desarrollar nuevos enfoques que simulen escenarios más reales de exposición no forzada presentes en el ecosistema, así como integrar respuestas de alta relevancia ecológica que sean comparables al de su ambiente.

ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS: EXPOSICIÓN FORZADA FRENTE A LA NO FORZADA

Los ensayos de toxicidad surgen a finales de la década de 1950 (Zapp, 1980) y han ido evolucionando debido a las necesidades de conocer y predecir cómo los contaminantes se comportan dentro de un ecosistema. El principio básico de los ensayos toxicológicos implica la exposición continua de los organismos ante agentes de estrés (Lefcort et al., 2004), es decir, el organismo de prueba es obligado a estar sometido a una concentración específica del contaminante en condiciones controladas (Newman and Unger, 2002; Martínez-Haro et al., 2015), a lo que se considera "exposición forzada". Estas pruebas permiten detectar efectos tóxicos a diferentes niveles biológicos, desde efectos genéticos, moleculares, fisiológicos y de letalidad. Sin embargo, pese a su importancia, este tipo de ensayo excluye la capacidad innata de algunos organismos para desplazarse evitando los daños generados por la contaminación (Kimball and Levin, 1985). Uno de los primeros intentos en medir el potencial de los organismos evitando áreas contaminadas y escapar de los efectos tóxicos en condiciones de laboratorio, se realizó usando el pez *Pygosteus pungitius* y simulando un gradiente de contaminación en un tubo cilíndrico que contenía agua limpia en una extremidad del tubo y un contaminante (alcohol, cloroformo, sulfato de cobre, formaldehído, cloruro de mercurio y sulfato de zinc) en la otra extremidad (Jones, 1947). Posteriormente, Jones et al. (1956) estudiaron la capacidad de evasión de tres especies de salmones expuestos a residuos de sulfato y sulfito, resultantes del proceso de una planta de celulosa usando dos sistemas diferentes; uno consistía en un tanque con gradiente modificado con deflectores transversales y el segundo en un tanque dividido en cuatro canales paralelos en un extremo, en lo cual dos de los canales recibían residuos y dos de agua limpia.

A través del tiempo, varios sistemas de exposición no forzada se han ido desarrollando (Hartwell et al., 1989; Smith and Bailey, 1990; Svecevicus, 1999; Richardson et al., 2001), buscando simular situaciones potencialmente reales de contaminación, comparables a las de los sistemas naturales. Considerando que, en los ecosistemas acuáticos, principalmente en los sistemas lóticos, el origen de un gradiente de contaminación es formado

cuando los contaminantes son alejados y diluidos de su fuente original (excepto cuando una descarga abrupta forma una pluma de contaminación), un sistema de multi-compartimentos fue desarrollado por Lopes et al. (2004), buscando simular tal situación. El sistema de Lopes et al. (2004) consiste en la disposición lineal de varias cámaras o compartimentos conectados entre sí para que los organismos tengan acceso a todas las cámaras, simulando diferentes concentraciones a lo largo de un gradiente de contaminación y, por lo tanto, los organismos podrán elegir los compartimentos en función del nivel de su sensibilidad. Este mismo sistema fue posteriormente optimizado por Moreira-Santos et al. (2008), quienes expusieron el pez *Danio rerio* a un gradiente de contaminación de cobre y efluente ácido de mina, y por Rosa et al. (2008), quienes usaron el crustáceo *Daphnia magna* y lo sometieron a un gradiente de residuos de planta de celulosa. Posteriormente, Rosa et al. (2012) modificaron el sistema a condiciones estáticas, de forma que los ensayos resultaron más simples y prácticos. Desde entonces, varios estudios se han desarrollado utilizando el sistema de exposición no forzada con multi-compartimentos, en el que varias especies fueron expuestas a diferentes tipos de contaminantes, tales como: copépodos expuestos a mezcla de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Araújo et al., 2014a), anfibios expuestos a cobre (Araújo et al., 2014b) y al fungicida pirimetanil (Araújo et al., 2014c), peces de agua dulce como el pez *D. rerio* expuesto a residuos de mina ácida (Araújo et al., 2018b) y a cobre (Islam et al., 2019), tilapia (*Oreochromis* sp.) expuesta a efluentes de una planta procesadora de atún (Araújo et al., 2016a), el pez *Poecilia reticulata* expuesto a triclosán (Silva et al., 2017) y bisfenol (Silva et al., 2018), además de organismos marinos como el pez *Rachycenton canadum* y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* expuestos al cobre (Araújo et al., 2016c). Todos estos trabajos indican que la fuga es una respuesta sensible a la contaminación y puede ser utilizada en estudios ecotoxicológicos para la evaluación del riesgo ambiental. No obstante, este tipo de ensayo no pretende reemplazar los ensayos de exposición forzada, sino más bien pretende ser considerado un enfoque complementario a los ensayos forzados tradicionales como una herramienta adicional en la evaluación del riesgo ecológico (Rosa et al., 2012; Araújo et al., 2016b).

MANUAL DEL SISTEMA LINEAL MULTI-COMPARTIMENTADO

El sistema lineal de exposición no forzado para simulación de un gradiente de contaminación ha sido ampliamente descrito para estudiar la dinámica poblacional impulsada por la contaminación (Vasconcelos et al., 2016; Silva et al., 2018a; Araújo et al., 2019). Uno de los aspectos importantes a tener en cuenta en este tipo de sistema es que el número de compartimentos que lo integran dependerá del número de concentraciones que se quieran ensayar, es decir, cuánto más compartimentos posea el sistema, más niveles de contaminación será posible simular. Aunque el número de compartimentos no esté estandarizado, los estudios registrados suelen mantener entre 5 (Lopes et al., 2004; Moreira-Santos et al., 2008; Rosa et al., 2012) a 7 compartimentos (Araújo et al., 2014b, c, d; Vasconcelos et al., 2016; Silva et al., 2017, 2018) (Fig 1). La modificación del sistema en cuanto a longitud y, consecuentemente, número de compartimentos se encuentra asociada a que la prueba contemple el tiempo de exposición suficiente para el desplazamiento de los organismos dentro del sistema considerando las diferencias entre especies con movilidades diferentes, esperando así que los resultados sean iguales, tal como demostraron Araújo et al. (2018b).

Fig. 1. Sistema de exposición no forzada de múltiples compartimentos utilizado en las pruebas de fuga/avoidance (Araújo et al., 2016c).

Por ejemplo, en un estudio con renacuajos se observó que usaron un sistema con compartimentos más pequeños (14-15 cm de longitud) (Araújo et al., 2014c) y una exposición de 12 h, mientras que en un estudio con alevines

de peces que tienen mayor movilidad, para un tiempo de exposición menor de 3 h, usaron compartimentos más grandes (27 cm de longitud) (Araújo et al., 2016a, c). A continuación, el siguiente apartado describe un manual que indica los pasos para elaborar el sistema de exposición no forzada de multi-compartimentos.

El sistema que se presenta en este manual puede ser modificado según el tipo de estudio que se llevará a cabo. Por ejemplo, el número de compartimentos del sistema es ilimitado (al menos dos compartimentos serían requeridos), así mismo, el tamaño del compartimento debe ser definido en función del tamaño de los organismos que serán utilizados, pues la densidad de la población es un parámetro importante a considerar en un ensayo de toxicidad. A continuación, se detalla una guía de cómo se construye, calibra y realizan ensayos en el sistema lineal multi-compartimentado.

CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA MULTI-COMPARTIMENTOS DE EXPOSICIÓN NO FORZADA

Construcción de los compartimentos

Para elaborar un compartimento se necesitan dos botellas de plástico vacías de igual forma y tamaño, factores que deberán estar acordes al tamaño y cantidad de los organismos a testar. En el caso de la guía, se presenta un sistema con 7 compartimentos (14 botellas). Se deben usar botellas de agua que no hayan tenido contacto con ninguna sustancia química para garantizar que no haya ningún tipo de residuo. Si se desconoce su procedencia o se observa material extraño en las botellas, ésta debe ser descartada. Debido a que las botellas serán manipuladas, cortadas y pegadas, es recomendable usar botellas flexibles que permita su manipulación pero con un cierto grado de rigidez para evitar que se deformen, aunque si bien es cierto el tipo de plástico no requiere ninguna especificidad (excepto aquella relacionada a una posible adsorción del contaminante), generalmente las botellas con agua de gas suelen ser adecuadas ya que presentan una textura lisa y manejable, factores que además no generarían dificultades en el desplazamiento de los organismos al llevar a cabo los ensayos. Una vez obtenidas las botellas, se debe verificar el

buen estado de las mismas, retirar las etiquetas (en caso de tenerlas) y realizar un lavado previo con agua destilada. Posteriormente, se procederá a ejecutar los cortes para la creación de los compartimentos, tal como se describe a continuación:

Paso 1. Obtener las dos mitades de cada compartimento

Se cortan las botellas transversalmente de forma a obtener la porción equivalente a la mitad de un compartimento (formada por la parte superior de la botella), usando un objeto corto punzante (estiletes o tijeras) (Fig 2). Hay que tener en cuenta que cuanto más cerca de la base de la botella sea el corte, mayor tamaño tendrá el compartimento. Por el contrario, si se desea un compartimento más pequeño, el corte debe ser lo más cercano posible a la boca de la botella. Es importante considerar que cuanto menor el diámetro de la apertura de la boca de la botella mejor para mantener un gradiente de contaminación estable. De todas formas, este diámetro también va en función del tamaño de los organismos y de las botellas usadas; para organismos más grandes (por ejemplo, peces o camarón) se recomienda usar botellas de mayor tamaño, por lo contrario, si se utilizan organismos más pequeños (por ejemplo, copépodos o cladóceros) es preferible usar botellas de menor tamaño. Se descartan las bases de las botellas.

Fig. 2. Mitad de un compartimento (parte superior de la botella).

Paso 2. Preparar la apertura de cada compartimento

Se realiza sobre la mitad del compartimento un pequeño corte rectangular, tal como se representa en la Fig 3. El tamaño del corte va a determinar el área de acceso al compartimento. Para criterio de esta guía las medidas usadas en la apertura son: 2×7 cm para cada compartimento.

Fig. 3. Mitad de un compartimento con la apertura rectangular. La línea roja representa la zona del corte.

Paso 3. Montaje de cada compartimento

Se pegan dos mitades con sus respectivos cortes rectangulares alineados. En el borde de una mitad se aplica el pegamento (e.g. Sikaflex-E o Sikaflex 11FC+, no tóxicos a los organismos) por el parte externa y en la otra mitad se pone pegamento en el borde interno del corte rectangular, de tal forma que al unirse se adhieran ambas mitades con el pegamento, garantizando un buen sellado (Fig 4).

Fig. 4. Unión de las dos mitades para formar un compartimento.

Al unir ambas mitades para formar el compartimento, hay que tener en cuenta que los cortes rectangulares se conecten uniformemente y se alineen entre sí para permitir que se forme una apertura en el compartimento armado (Fig. 5); se deja secar el pegamento por 24 h. La apertura tiene la finalidad de permitir que se introduzcan las muestras y los organismos de ensayo en los respectivos compartimentos.

Fig. 5. Compartimento con su respectiva apertura bien definida.

Paso 4. Verificación de ausencia de fugas en cada compartimento

Se colocan las dos tapas en cada extremidad del compartimento, se llena con agua de grifo, y se deja en reposo por al menos 24 h. Si se observa fuga de agua en alguno de los compartimentos, se procederá a reforzar con pegamento la fisura donde surge la fuga; de seguido hay que esperar más 24 h para secar y más 24 h con agua del grifo para verificar una vez más la ausencia de fugas. Para facilitar la identificación de posibles fugas, colocar los compartimentos llenos de agua sobre papel absorbente.

Unión de los compartimentos

Paso 1. Conectar dos compartimentos

Se retira las tapas de los extremos de cada compartimento y se aplica pegamento cuidadosamente en los bordes de la boca de las botellas y en la parte externa (para ayudar la unión) (Fig. 6), evitando aplicar el pegamento internamente para no bloquear el paso entre los compartimentos. De seguido, unir los compartimentos asegurando que las respectivas aperturas

estén alineadas. Se deja secar el pegamento durante 24 h. Se recomienda unir los compartimentos primero en grupos de dos, después en grupos de cuatro, y así sucesivamente, de forma a evitar exceso de manipulación del sistema que dificultará el buen alineamiento de las aperturas y de todos los compartimentos de un sistema (ver Paso 3). Para facilitar este proceso, se sugiere montar los compartimentos utilizando una base para el sistema.

Fig. 6. Unión entre compartimentos

Paso 2. Reforzar la conexión de los dos compartimentos

Se aplica nuevamente pegamento en la parte externa donde se conectaron los compartimentos, con el fin de reforzar la unión entre ellos (Fig. 7). El objetivo es reducir el riesgo de fuga de líquidos entre conexiones.

Fig. 7. Refuerzo de las conexiones entre los compartimentos.

Paso 3. Conectar todos los compartimentos de un sistema

Unir los grupos de compartimentos necesarios para construir un sistema, siguiendo los procedimientos descritos en al paso 1 y 2 de esta sección. El número de compartimentos de un sistema de exposición no forzada no está estandarizado, aunque los estudios que lo han usado suelen crear entre 5 a 7 compartimentos; esta guía presenta un esquema ilustrativo de 7 compartimentos (Fig. 1).

Paso 4. Verificación de ausencia de fugas en cada sistema

Se cierra las dos extremidades del sistema con las tapas y se llena el sistema con agua y se espera 24 h. Si se observa fuga de agua entre las conexiones, seguir los procedimientos indicados en el Paso 4.

Sostén para el sistema

Armado el sistema de multi-compartimentos, es recomendable elaborar un sostén para darle estabilidad y evitar así movimientos bruscos o balanceos durante la ejecución del ensayo, provocando desequilibrios en el sistema y en consecuencia en el gradiente de contaminación. Se emplean tubos de plásticos (tipo policloruro de vinil-PVC), con dimensiones (acho x largo) semejantes a las del sistema, cortados longitudinalmente por el eje medio (Fig 8). El sostén puede ser elaborado de otro material, desde que ofrezca estabilidad al sistema.

Fig. 8. Sostén de policloruro de vinil (PVC) para dar estabilidad al sistema.

Tapones para establecer el gradiente

Paso 1. Hacer un tapón

Se forma una pequeña bola (tapón), usando plastilina no tóxica, que tenga un diámetro un poco mayor a la boca de las botellas. Será necesario un tapón para cada conexión entre compartimentos para evitar el paso de fluido de un compartimento a otro durante el montaje del experimento. Se envuelve cada tapón con cinta teflón no tóxica o parafilm, para evitar que la plastilina tenga contacto directo con el sistema y las soluciones testadas (Fig. 9).

Fig. 9. Tapón y procedimiento de envoltura con teflón.

Paso 2. Aislar los compartimentos

El aislamiento de los compartimentos se hace introduciendo un tapón en cada conexión, con la ayuda de unas pinzas, como está representado en la Fig. 10.

Fig. 10. Colocación de los tapones en los compartimentos.

Verificación del volumen de los compartimentos y del sistema

La determinación de los volúmenes de cada compartimento es crucial para comprobar que todos los compartimentos tienen el mismo tamaño y, a la vez, determinar el volumen total del sistema.

Paso 1. Medir el volumen de cada compartimento

Utilizando un recipiente graduado, se llena cada compartimento vertiendo agua del grifo por la apertura, hasta que el agua cubra la zona de paso entre los compartimentos, pero sin sobrepasar el límite de la apertura superior para evitar que se desborden (Fig. 11). Después de llenar cada compartimento se estima el volumen de cada uno de los compartimentos del sistema; la suma de todos los valores dará el volumen total del sistema.

Fig. 11. Medición de la capacidad del volumen del sistema.

Calibración del sistema

Calibrar el sistema consiste en verificar que el gradiente de contaminación permanezca estable en cada sistema replicado, es decir, que no haya una difusión brusca de las concentraciones entre cada compartimento que pueda alterar el gradiente de contaminación establecido durante el periodo de exposición estipulado a utilizar en los ensayos (i.e., en cada sistema y entre las réplicas de cada compartimento). La magnitud de la mezcla (diferencia entre las concentraciones iniciales y las finales) debe ser evaluada al final del

ensayo. El mínimo recomendable serían 3 réplicas, que es lo utilizado en esta guía. Para esto se puede utilizar cualquier sustancia no toxica que sea fácilmente cuantificada. Para la ilustración de esta guía se utilizó cloruro de sodio (NaCl) por la facilidad de medirlo indirectamente a través de la conductividad.

Generacion del gradiente de un sistema

Paso 1. Seleccionar la concentración a estudiar en cada compartimento

Se asigna un porcentaje de contaminación a cada compartimento, siendo que en los compartimentos extremos hay que asignar 0% que representa el control (compartimento sin contaminación) y 100% que representa el nivel máximo de contaminación. De acuerdo con el esquema ilustrativo de 7 compartimentos de esta guía (Fig. 1), se selecciona las siguientes concentraciones: 0, 17, 34, 50, 66, 84 y 100% (Fig. 12).

Fig. 12. Modelo de la distribución del gradiente de contaminación en cada compartimento de un sistema con 7 compartimentos.

Paso 2. Aislar los compartimentos

Se coloca un tapón en cada conexión entre compartimentos (Fig 10), para impedir que la solución vertida en cada compartimento pase al compartimento adyacente.

Paso 3. Preparación de las concentraciones para el gradiente

Se preparan las concentraciones de NaCl con agua del grifo o agua destilada para añadir a cada uno de los 7 compartimentos teniendo en cuenta los porcentajes de contaminación indicados en la Fig 13: 0, 17, 34, 50, 66, 84 y

100 mg/L. Se mide la conductividad de cada concentración de NaCl. Las concentraciones al igual que el compuesto salino referidos son ilustrativos, y pueden modificarse según el objeto de estudio, de modo que se puede usar otra sal fácilmente medible, así como otras concentraciones para el gradiente.

Paso 4. Formación del gradiente en el sistema lineal de exposición

Se vierte lenta y gradualmente cada concentración de NaCl en su respectivo compartimento y se retiran los tapones de forma cuidadosa con la ayuda de una pinza (Fig. 13), para que las concentraciones se mezclen naturalmente formando el gradiente. Todo el procedimiento debe ser realizado con extremo cuidado evitando balanceos del sistema, de forma a no incrementar la mezcla entre los compartimentos.

Fig.13. Retiro de los tapones para armar el gradiente lineal.

Paso 5. Cuantificar el gradiente inicial

Se mide la conductividad en cada compartimento 30 minutos después de retirar los tapones. Para ello, se debe introducir el electrodo por la apertura central de cada compartimento, iniciando la lectura y registro de valores desde el control hasta el compartimento con mayor concentración de NaCl. Mantener el sistema con este gradiente durante el periodo estipulado para la exposición en los ensayos, para comparar *i)* la variación entre las réplicas de las concentraciones de NaCl y *ii)* si el gradiente se mantiene.

Paso 6. Cuantificar el gradiente final

Se mide la conductividad en cada compartimento tras 24 h de iniciado el ensayo de calibración, siguiendo los procedimientos detallados en el paso 6. Este tiempo puede ser acortado o alargado, dependiendo del tiempo que se quiera desarrollar los ensayos.

Análisis estadístico de la calibración

Paso 1. Cuantificar el gradiente inicial y final

Se hace una regresión lineal entre las concentraciones nominales de NaCl (0, 17, 33, 50, 66, 84 y 100 mg/L) y sus respectivos valores de conductividad (Fig. 14). Se estiman las concentraciones iniciales (tras unos 30 minutos) y finales de NaCl en cada compartimento ($n = 3$) a partir del modelo de regresión entre ambas medidas. Por ejemplo, citando el ensayo de prueba, la conductividad obtenida inicialmente para la concentración 17, 33 y 50 mg/L (concentraciones nominales) dio un valor de 204, 396 y 600 ($\mu\text{S}/\text{cm}$), respectivamente. Después de dejar el experimento durante 24 horas, los valores de conductividad a las mismas concentraciones fueron de 1645, 1675, 1714 ($\mu\text{S}/\text{cm}$), respectivamente. Para conocer las concentraciones finales de NaCl, se utiliza la ecuación producida en la regresión establecida con los valores iniciales.

Aunque los valores de conductividad (o concentraciones finales) no sean los mismos que los iniciales, lo que se busca es asegurarse de que haya un gradiente de contaminación. Por lo tanto, la calibración debe comparar el gradiente inicial con el final a través de una prueba estadística (Statistica 7.0, StatSoft, Tulsa, OK, EE. UU.; ver referencia Araújo et al., 2018b).

Fig. 14. Curva de regresión lineal entre las concentraciones nominales de NaCl y los valores de conductividad.

Selección y aclimatación de los organismos

Para elegir una especie de ensayo, hay que tomar en cuenta la movilidad y el tiempo que les lleva a los organismos desplazarse por todo el sistema. Si los organismos que se van a experimentar tienen poca movilidad y tardan demasiado tiempo en recorrer todo el sistema, se puede extender el periodo del ensayo o reducir el tamaño del sistema con botellas más pequeñas. Los organismos a usar en los ensayos pueden ser cultivados en laboratorios (estandarizados) o ser especies locales, preferiblemente de lugares de baja o nula incidencia antrópica y sin indicios de contaminación. Eso evitaría usar organismos que hayan previamente expuestos a contaminantes. Los organismos deben ser sometidos a un periodo de aclimatación, el cual consiste en mantenerlos en condiciones óptimas y controladas en laboratorio, por un periodo mínimo de 48 h.

Ensayo control de distribución de los organismos

El ensayo control verifica que la distribución de los organismos dentro del sistema cuando expuestos solo a agua control (sin contaminación) es aleatoria, es decir, que no hay preferencia de los organismos por ninguno de los compartimentos, especialmente hacia los extremos del sistema. Este ensayo descarta la presencia de cualquier factor externo que pueda interferir en el desplazamiento del organismo. Este ensayo puede realizarse previo a los

ensayos con contaminante o en simultaneo y debe consistir en no mínimo 3 réplicas.

Paso 1. Llenar el sistema

Se llena todo el sistema con el agua control (agua de cultivo o de referencia).

Paso 2. Organismos para el ensayo

Se separa un número total de organismos a exponer en cada compartimento del sistema (Fig. 15), utilizando el mínimo posible de agua, para que al introducir los organismos en el sistema el volumen de agua de los compartimentos no aumente considerablemente; organismos pequeños y de fácil manipulación pueden ser colocados en el sistema con pipetas o redcillas para acuarios. El número de organismos por compartimento debe ser calculado de modo a que su densidad no influya en la selección del compartimento; es importante por eso considerar en el cálculo la posibilidad de que todos los organismos del sistema se desplacen hacia un único compartimento, sin que haya una sobrepoblación.

Paso 3. Exposición de los organismos

Se introducen los organismos de cada recipiente en el respectivo compartimento, transfiriendo el mínimo volumen de medio control posible, para cambios de los volúmenes por prueba (y de concentraciones por compartimiento en la prueba con contaminantes). El tiempo de exposición será igual al seleccionado para los ensayos con contaminación.

Fig. 15. Separación de los organismos test y su introducción en el sistema (n=3).

Paso 4. Condiciones de exposición

Se realiza el ensayo en ambiente cerrado, con temperatura controlada y en oscuridad, con el fin de eliminar cualquier factor externo tal como corriente de aire, luz, presencia humana u otro factor que interfiera en el desplazamiento de los organismos. El tiempo de exposición no debe ser superior al tiempo utilizado en la calibración del sistema.

Paso 5. Conteo de organismos

Se coloca cuidadosamente los tapones entre las conexiones de los compartimentos para cerrar el paso de los organismos y acto seguido se registra el número de organismos que se encuentran en cada uno de los compartimentos. En todos estos procedimientos se utiliza una luz roja, con el fin que los organismos no detecten la presencia del observador y así mantener las condiciones de exposición (Job and Shand 2001; Fisher and Bellwood., 2003; Widder et al., 2005) (Fig. 16).

Fig. 16. Conteo de organismos al final del experimento utilizando luz roja.

Análisis estadístico del ensayo control

El ejemplo de la Tab 1A indica primero el número de organismos que se introdujeron al inicio del experimento control en cada compartimento. Luego, al final del ensayo, se cuentan y registran la posición de los organismos en el sistema (Tab. 1B). Para determinar que en este ensayo control los organismos no presentaron preferencia por ninguno de los compartimentos, es procedente aplicar la misma estadística de calibración con NaCl.

Tab. 1. Datos de distribución de los organismos en los compartimentos del sistema de fuga. A) Número de organismos introducidos al inicio del experimento control en cada compartimento. B) Número de organismos visualizados en cada compartimento después del tiempo de conteo establecido.

A_DISTRIBUCION DE ORGANISMOS (0 horas)								
COMPARTIMENTO	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	TOTAL
Réplica #1	4	4	4	4	4	4	4	28
Réplica #2	4	4	4	4	4	4	4	28
Réplica #3	4	4	4	4	4	4	4	28
TOTAL	12	12	12	12	12	12	12	84

B_DISTRIBUCION DE ORGANISMOS (24 horas)								
COMPARTIMENTO	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	TOTAL
Réplica #1	2	3	5	4	6	4	4	28
Réplica #2	3	5	5	4	2	5	4	28
Réplica #3	5	4	3	3	4	4	5	28
TOTAL	10	12	13	11	12	13	13	84

Ensayos de fuga con contaminación

Los ensayos de fuga con contaminación deben realizarse bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para el calibrado y control de distribución, siendo la única diferencia la presencia de un gradiente de contaminación. Es imprescindible tener controlado todos los factores externos como luz, temperatura, corriente de aire, presencia humana, ruido u otra interferencia que pueda alterar la movilidad de los organismos en el sistema.

Paso 1. Definir el contaminante y el gradiente de concentraciones

La relación que se use entre las concentraciones dependerá de los objetivos del estudio. Las concentraciones descritas en la sección 3.3 (Fig. 12) pueden ser usadas como orientativas. Como la mortalidad en los ensayos de fuga no es deseada, se puede establecer como mayor concentración aquella que causa un efecto letal al 50% de la población expuesta (LC_{50}). A partir de esta concentración, se determinan las demás. El razonamiento para determinar las concentraciones es el mismo para compuestos químicos, efluentes o aguas naturales.

Paso 2. Preparación del volumen de cada concentración según el número de réplicas.

Se prepara el total de volumen necesario para las 3 réplicas de cada concentración; por ejemplo, si en cada compartimento se vierten 300 mL y se van a usar 3 réplicas, se tiene que preparar 900 mL (300 mL x 3 réplicas) por concentración. Si se desea realizar un análisis químico de las concentraciones preparadas antes del experimento, hay que preparar un volumen mayor de cada concentración.

Paso 3. Verter las disoluciones

Se colocan los tapones en el sistema cerrando el paso entre los compartimentos. A continuación, se añade cada concentración en su respectivo compartimento de modo a formar un gradiente de contaminación. Una vez

estabilizado el sistema (ausencia de turbulencia), se retiran cuidadosamente los tapones.

Exposición y finalización del ensayo de fuga

El procedimiento de separación de los organismos que serán usados en los experimentos debe ser tal como fue descrito anteriormente.

Paso 1. Definir el tiempo de exposición para los ensayos

El tiempo de exposición será definido de acuerdo a los objetivos del estudio, sin embargo, nunca debe superar el tiempo usado en la calibración, pues no se puede garantizar el mantenimiento del gradiente.

Paso 2. Conteo de los organismos

Se procede al conteo de los organismos en el final del ensayo de fuga, empleando la misma metodología descrita anteriormente.

Paso 3. Toma de muestras en cada compartimento

Se cierran los pasos entre los compartimentos con los tapones y se toman las muestras en cada uno de ellos; de este modo se evita una mezcla de las concentraciones por la turbulencia generada en el sistema al momento de tomar las muestras. Se recomienda empezar a tomar las muestras desde el control, siguiendo hacia la más contaminada, todo para su posterior análisis químico. Las muestras son tomadas con ayuda de una jeringa, colectando el volumen que sea necesario para análisis.

Lavado de los sistemas

Al culminar con el ensayo, los sistemas deben ser lavados con mucho cuidado para evitar que se rompan. El lavado debe asegurar que no queden restos de los contaminantes usados en los ensayos.

Análisis estadístico del ensayo con contaminación

Paso 1. Cálculo de los porcentajes de fuga

Para los cálculos del porcentaje de fuga (*avoidance*), se describe la metodología usada por Araújo et al. (2018b). A continuación, se presenta un ejemplo de cómo ordenar los datos y hacer los cálculos de los ensayos (Tab 2, 3 y 4).

Organismos Expuestos: Son los organismos que inicialmente se disponen en cada compartimento, teniendo en cuenta que todos los compartimentos deben tener la misma cantidad de organismos depositados. En este ejemplo el número de organismos expuestos es de 4 para cada compartimento (Tab. 2).

Tab. 2. Organismos expuestos en cada compartimento en ensayos de exposición no forzada.

ORGANISMOS EXPUESTOS (0 horas)								
NaCl mg/L	0	17	33	50	66	84	100	TOTAL
Réplica #1	4	4	4	4	4	4	4	28
Réplica #2	4	4	4	4	4	4	4	28
Réplica #3	4	4	4	4	4	4	4	28
TOTAL	12	12	12	12	12	12	12	84

Organismos registrados: es el registro de la posición de los organismos en cada compartimento tras el conteo en un tiempo determinado (Tab. 3).

Tab. 3. Registro de la posición de los organismos en cada compartimento tras cuatro horas de exposición.

ORGANISMOS REGISTRADOS (4 horas)								
NaCl mg/L	0	17	33	50	66	84	100	TOTAL
Réplica #1	11	7	5	2	2	1	0	28
Réplica #2	8	7	5	5	3	0	0	28
Réplica #3	12	5	6	3	1	1	0	28
TOTAL	31	19	16	10	6	2	0	84

Organismos esperados: Se espera que los organismos sean capaces de migrar a las zonas menos contaminadas. Partiendo de este principio, se espera

que los organismos migren al compartimento más cercano que esté menos contaminado, con lo cual, el número de organismos esperados representa el total de organismo expuestos en el compartimento, más aquellos organismos que deben venir de los compartimentos más contaminados. Esta consideración se realiza para todos los compartimentos, esperando que todos los organismos migrarán hacia el control (Tab. 4).

Este método de cálculo de los organismos esperados en un compartimento supone que todos los que huyeron de los compartimentos más contaminados se quedan ahí. Sin embargo, si se considera que los fugitivos se van a distribuir uniformemente en todos los compartimentos menos contaminados, entonces los cálculos deben realizarse de acuerdo con Araújo et al. (2018b).

Tab. 4. Organismos esperados en cada compartimento tras cuatro horas de exposición.

ORGANISMOS ESPERADOS (4 horas)							
NaCl mg/L	0	17	33	50	66	84	100
Réplica #1	28	24	20	16	12	8	4
Réplica #2	28	24	20	16	12	8	4
Réplica #3	28	24	20	16	12	8	4
MEAN	28	24	20	16	12	8	4

Organismos observados: Para el cálculo de los organismos observados, se mantiene el principio descrito anteriormente para organismos esperados, donde se consideran los organismos registrados en el compartimento (X), más aquellos organismos registrados en el compartimento adyacente más contaminado (Tab. 5).

Tab. 5. Organismos observados en cada uno de 7 compartimentos tras cuatro horas de exposición.

ORGANISMOS OBSERVADOS (4 horas)								
Organismos registrados en cada compartimento + Organismos migrantes de concentración adyacente más alta	COMPART.	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7
	Observados #1	28	17	10	5	3	1	0
	Observados #2	28	20	13	8	3	0	0
	Observados #3	28	16	11	5	2	1	0
	Promedio	28	18	11	6	3	1	0
	SD*	0.0	2.1	1.5	1.7	0.6	0.6	0.0

*SD: desviación estándar.

Para los cálculos de los fugados (*avoiders*) y el porcentaje de fuga/avoidance se emplean las siguientes fórmulas:

Avoiders (Organismos fugados):

$$Avoiders = N_E - N_O$$

N_E = Organismos esperados

N_O = Organismos observados

Avoidance: [fugados / esperados] * 100

$$Avoidance (\%) = \left(\frac{Avoiders}{N_E} \right) \times 100$$

Tab. 6. Modelo para cálculo del porcentaje de organismos fugados (*avoiders*) y de porcentaje de fuga (*avoidance*).

ORGANISMOS FUGADOS								
Organismos esperados - Organismos observados	COMPART.	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7
	Avoiders #1	0.0	7.0	10.0	11.0	9.0	7.0	4.0
	Avoiders #2	0.0	4.0	7.0	8.0	9.0	8.0	4.0
	Avoiders #3	0.0	8.0	9.0	11.0	10.0	7.0	4.0
	Promedio	0.0	6.3	8.7	10.0	9.3	7.3	4.0
	SD*	0.0	2.1	1.5	1.7	0.6	0.6	0.0

% FUGA								
[Org. Fugados / Org. esperados] * 100	COMPART.	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7
	Avoidance #1	0.0	29.2	50.0	68.8	75.0	87.5	100.0
	Avoidance #2	0.0	16.7	35.0	50.0	75.0	100.0	100.0
	Avoidance #3	0.0	33.3	45.0	68.0	83.3	87.5	100.0
	Promedio	0.0	26.4	43.3	62.3	77.8	91.7	100.0
	SD*	0.0	8.6	7.6	10.6	4.8	7.2	0.0

*SD: desviación estándar.

SISTEMA HeMHAS (Heterogeneous Multi-Habitat Assay System)

HeMHAS es un novedoso sistema de exposición no forzada desarrollado para simular diferentes escenarios de contaminación, ya sea en forma de gradiente lineal o como parches de contaminación, que ha sido implementado por Araújo et al. (2018c). El sistema fue construido en acetal (polioximetileno), para evitar la adsorción de contaminantes. HeMHAS tiene una dimensión de 70x30x7 cm (largo, ancho y alto) y es formado por 18 compartimentos circulares con 6 cm de altura, 10 cm de diámetro y capacidad hasta 320 mL. Los compartimentos se distribuyen en una disposición de 3x6 (3 compartimentos en un eje vertical y 6 compartimentos en eje longitudinal) (Fig 17A). Todos los compartimentos están interconectados entre sí. El fondo central de cada compartimento es cóncavo con una suave pendiente ascendente que llega a las compuertas de conexiones. Las compuertas están controladas por un sistema de apertura y cierre de las conexiones entre compartimentos, que permiten abrir o bloquear el paso entre conexiones (véase compuerta esquemática en la Fig 17B). Cada compartimento tiene una tapa para evitar que los organismos salten del sistema (véase la tapa esquemática en la Fig. 17C). HeMHAS ha sido patentado en España por la Oficina Española de Patentes y Marcas (ES2717145A1).

Fig. 17. Esquema ilustrativo de A) el sistema de ensayo de hábitat múltiple heterogéneo (HeMHAS) utilizado en los experimentos de selección de hábitat, B) la puerta utilizada para abrir o cerrar las conexiones entre los compartimentos, y C) la tapa utilizada para cubrir los compartimentos. Fuente: Araújo et al. (2018c).

Debido a las características de este sistema, es posible evaluar escenarios contaminados no solo de manera unidireccional en forma de gradiente lineal, sino también como parches de contaminación, integrando a su vez conceptos de preferencia y selección de hábitat en los estudios de impacto ambiental asociada a la heterogeneidad y conectividad entre hábitats. Se establecen las concentraciones a testar y la disposición en forma de gradiente lineal de contaminación, tal como evaluaron Araújo et al. (2018c). Como parche de contaminación, entran en juego no solo la contaminación, sino también la disposición de rutas de migración, pudiéndose definir diferentes niveles de contaminación. Vera-Vera et al. (2019) definieron tres niveles de contaminación identificados como: zona referencia (poco contaminada), mezcla (zona medianamente contaminada) y zona contaminada. Este estudio evaluó tres escenarios de contaminación, uno como gradiente lineal y dos escenarios como parches. El ensayo lineal mostró la capacidad de los organismos para detectar la contaminación y seleccionar zonas menos contaminadas. Para los escenarios como parches, el primer caso no presentó diferencia significativa en la distribución de los organismos, sin embargo, para el segundo escenario hubo una clara tendencia de los organismos para preferir la zona referencia, mostrando que en ambos casos la disposición y conectividad entre parches jugó un papel determinante. Este estudio destacó la gran importancia de conservar zonas limpias en sistemas afectados por la contaminación ya que éstas actúan como áreas de amortiguamiento y permiten el desplazamiento de los organismos entre parches a zonas menos afectados dentro de un sistema en situaciones de riesgo.

Pese al reciente uso de este sistema, los resultados obtenidos a partir de estos ensayos muestran un nuevo avance en evaluaciones de riesgo ecológico y sin duda promete ser una herramienta valiosa para realizar predicciones de riesgo ambiental. La descripción en detalle de los métodos y algunos resultados pueden ser encontrados en Araújo et al. (2018c) y Vera-Vera et al. (2019).

CONCLUSIONES

Los sistemas de exposición no forzada permiten obtener respuestas rápidas de elevada sensibilidad, considerando el desplazamiento temporal y espacial de los organismos en presencia de un gradiente de contaminación.

El sistema lineal de exposición no forzada se puede modificar y adaptar según las necesidades de estudio, y ha mostrado tener gran sensibilidad y complementariedad en estudios ambientales con relación a la respuesta de fuga, preferencia y/o selección de hábitats.

El HeMHAS, pese a ser un sistema nuevo y de uso reciente, está mostrando ser una herramienta valiosa para evaluaciones de riesgo ecológico presentando ventaja con respecto a los sistemas lineales en cuanto a simulación de otros escenarios de contaminación “parches”, que sin duda permitirá realizar futuras predicciones de riesgo ambiental.

Los sistemas multi-compartmentados son una herramienta capaz de integrar los conceptos de preferencia y selección de hábitat en los estudios de impacto ambiental, y representan un avance significativo en la evaluación de riesgos en los ecosistemas acuáticos sometidos a estrés ambiental por presencia de contaminantes físicos, químicos y biológicos.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Nikol Vera y David Salvatierra por el aporte en la elaboración del manual de ensayos ecotoxicológicos de fuga. M. Moreira-Santos agradece el fondo del programa COMPETE 2020 (proyecto SALTFREE II; referencia POCI-01-0145-FEDER-031022) y los fondos nacionales Centro 2020 (project ReNATURE; referencia Centro-01-0145-FEDER-000007) y de la Fundación Portuguesa de Ciencia y Tecnología (postdoctoral SFRH/BPD/99800/2014; contrato al alcance de la Norma Transitorio – DL57/2016/CP-1370/CT-71). C.V.M. Araújo agradece al Ministerio Español de Ciencia e Innovación por el contrato Ramón y Cajal (RYC-2017-22324). Julián Blasco agradece la financiación del proyecto CGL2017-92160-EXP del Ministerio de Ciencia Innovación y Universidades del gobierno de España. Este trabajo fue desarrollado dentro del marco del proyecto MultiCecotox (COOPB20444) de la convocatoria i-COOP-2019 del CSIC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioural disturbances: the missing link between suborganismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 87-110.

Amin, O., Comoglio, L., 2002. Toxicidad del petróleo diesel en el primer estado larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37, 139-144.

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* 21, 750-758.

Araújo C.V.M., Moreira-Santos, M., Sousa, J.P., Ochoa-Herrera, V., Encalada, A.C., Ribeiro, R., 2014a. Active avoidance from a crude oil soluble fraction by an Andean paramo copepod. *Ecotoxicology* 23, 1254-1259.

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

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

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

Araújo, C.V.M., Rodríguez, E.N.V., Salvatierra, D., Cedeño-Macias, L.A., Vera-Vera, V.C., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2016a. Attractiveness of food and avoidance from contamination as conflicting stimuli to habitat selection by fish. *Chemosphere* 163, 177-183.

Araújo, C.V.M., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2016b. Active and passive spatial avoidance by aquatic organisms from environmental stressors: a complementary perspective and a critical review. *Environment International* 92-93, 405-415.

Araújo, C.V.M., Cedeño-Macías, L.A., Vera-Vera, V.C., Salvatierra, D., Rodríguez, E.N.V., Zambrano, U., Kuri, S., 2016c. Predicting the effects of copper on local population decline of 2 marine organisms, cobia fish and whiteleg shrimp, based on avoidance response. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 405-410.

Araújo, C.V.M., Griffith D.M., Vera-Vera, V.C., Jentzsch, P.V., Cervera, L., Nieto-Ariza, B., Salvatierra, D., Erazo, S., Jaramillo, R., Ramos, L. A., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2018a. A novel approach to assessing environmental disturbance based on habitat selection by zebra fish as a model organism. *Science of the Total Environment* 620, 906-915.

Araújo C.V.M., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2018b. Stressor-driven emigration and recolonisation patterns in disturbed habitats. *Science of the Total Environment* 643, 884-889.

Araújo, C.V.M, Roque, D., Blasco, J., Ribeiro, R., Moreira-Santos, M., Toribio, A., Aguirre, E., Barro, S., 2018c. Stress-driven emigration in complex field scenarios of habitat disturbance: the Heterogeneous Multi-Habitat Assay System (HeMHAS). *Science of the Total Environment* 644, 31-36.

Araújo, C.V.M., González-Ortegón, E., Pintado-Herrera, M., Biel-Maeso, M., Lara-Martín, P., Tovar-Sánchez, A., Blasco, J., 2019. Disturbance of ecological habitat distribution driven by a chemical barrier of domestic and agricultural discharges: An experimental approach to test habitat fragmentation. *Science of the Total Environment* 651, 2820-2829.

Burton, Jr, G.A., Batley, G.E., Chapman, P.M., Forbes, V.E., Smith, E.P., Reynoldson, T., Schlegel, C.E., Den Besten, P.J., Bailer, A.J., Green, A.S., Dwyer, R.L., 2002. A weight-of-evidence framework for assessing sediment (or other) contamination: improving certainty in the decision-making process. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 1675-1696.

Calow, P., 1989. The choice and implementation of environmental bioassays. *Hydrobiologia* 188/189, 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*, 147-151.

Capó, M.A., 2003. La ecotoxicología, una ciencia de hoy. Área de Toxicología. Dpto. Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. *Medicina Balear* 18, 101-104.

Casado-Martínez, M., Forja, J., DelValls, T., 2007. Direct comparison of amphipod sensitivities to dredge sediments from Spain ports. *Chemosphere* 68, 677-685.

Chapman, P., 1989. Current approaches to developing sediment quality criteria (review). *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 589-599.

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

Chapman, P.M., 2016. Ecological Risk and Weight of Evidence Assessments. *Marine Ecotoxicology* 9, 257-271.

Dornfeld, C.B., Moreira-Santos, M., Espindola, E.L.G., Ribeiro, R., 2009. Do larvae and ovipositing *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) females avoid copper contaminated environments? *Human and Ecological Risk Assessments* 15, 63-75.

Depledge, M.H., Galloway, T.S., 2005. Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3, 251-258.

Exley, C., 2000. Avoidance of aluminum by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 933–939.

Fisher, R. and Bellwood, D.R., 2003. Undisturbed swimming behaviour and nocturnal activity of coral reef fish larvae. *Marine Ecology Progress Series* 263, 177-188.

Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317, 207-233.

Hansen, J.A., Marr, J.C.E., Lipton, J., Cacela, D., Bergman, H.L., 1999. Differences in neurobehavioral responses of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper and cobalt: behavioral avoidance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1972-1978.

Hartwell, S.I., Jin, J.H., Cherry, D.S., Cairns, J.J., 1989. Toxicity versus avoidance response of Golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*, to five metals. *Fish Biology* 35, 447-456.

Hellou, J., Cheeseman, K., Desnoyers, E., Jonhston, D., Jouvenelle, M., Leonara, J., Robertson, S., Walker, P., 2008. A non-lethally chemically based approach to investigate the quality of harbour sediments. *Science of the Total Environment* 389, 178-187.

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

Islam, M.A., Blasco, J., Araújo, C.V.M., 2019. Spatial avoidance, inhibition of recolonization and population isolation in zebrafish (*Danio rerio*) caused by copper exposure under a non-forced approach. *Science of the Total Environment* 653, 504-511.

Job, S.D and Shand, J., 2001. Spectral sensitivity, implications for feeding in a visually variable environment. *Marine Ecology Progress Series* 214, 267-277.

Jones, J.R.E., 1947. The reaction of *Pygosteus pungitius* L. to toxic solutions. *Experimental Biology* 24, 110-122.

Jones, B.B.F., Warren, C. E., Bond, C.E., 1956. Avoidance reactions of salmonid fishes to pulp mill effluents. *Water Environment Federation* 28, 1403-1413.

Kimball, K.D., Levin, S.A., 1985. Limitations of laboratory bioassays: the need for ecosystem-level testing. *Bioscience* 35, 165-171.

Lamberson, J., Swartz, R., 1988. Use of bioassays in determining the toxicity of sediment to benthic organisms. Evans M.S. (ed). Toxic contaminants and ecosystem health a great lake Focus, 257-279.

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.

Lefcort, H., Abbott, D.P., Cleary, D.A., Howell, D., Keller, N.C., Smith, M.M., 2004. Aquatic snails from mining sites have evolved to detect and avoid heavy metals. Arch Environmental Contamination and Toxicology 46, 478-484.

Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2004. Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 1702-1708.

Lotze, H.K., Reise, K., Worm, B., Van Beusekom, J., Busch, M., Ehlers, A., Heinrich, D., Hoffmann, R.C., Holm, P., Jensen, C., Knottnerus, O.S., Langhanki, N., Prummel, W., Vollmer, M., Wolff, W.J., 2005. Human transformations of the Wadden sea ecosystem through time: a synthesis. Helgoland Marine Research 59, 84-95.

Martínez-Haro, M., Beiras, R., Bellas, J., Capela, R., Pedro, J., Lopes, I., Moreira-Santos, M., Reis-Henriques, A.M., Ribeiro, R., Santos, M.M., Carlos, J., 2015. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? Ecological Indicators 48, 8-16.

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 27, 1576-1582.

Newman, M.C., Unger, M.A., 2002. Fundamentals of Ecotoxicology. 2nd ed. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, USA 458.

Rabalais, N.N., 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. Ambio 31, 102-112.

Riba, I., Casado-Martínez, M., Forja, J. & Del Valls, T., 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 271-282.

Richardson, J., Williams, E.K., Hickey, C.W., 2001. Avoidance behaviour of freshwater fish and shrimp exposed to ammonia and dissolved oxygen separately and in combination. N. Z. J. Marine and Freshwater Research 35, 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. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 81, 454-469.

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

Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G., Altenburger, R., 2008. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology* 9, 337-345.

Shea, D., Thorsen, W., 2012. Ecological risk assessment. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 112, 1877-1173.

Silva, D.C.V., Araújo, C.V.M., López-Doval, J.C., Neto, M.B., Silva, F.T., Paiva, T.C.B., Pampêo, M.L.M., 2017. Potential effects of triclosan on spatial displacement and local population decline of the fish *Poecilia reticulata* using a non-forced system. *Chemosphere* 184, 329-336.

Silva, D.C.V.R., Araújo, C.V.M., França, F.M., Neto, M.B., Paiva, T.C.B., Silva, F.T., Pampêo, M.L.M., 2018. Bisphenol risk in fish exposed to a contamination gradient: Triggering of spatial avoidance. *Aquatic toxicology* 167, 1-6.

Silva, D.C.V.R., Araújo, C.V.M., Marassi, R.J., Cardoso, S.S., Neto, M.B., Silva, G.C., Ribeiro, R., Paiva, T.C.B., Silva, F.T., Pampêo, M.L.M., 2018a. Influence of interspecific interactions on avoidance response to contamination. *Science of the Total Environment* 642, 824-831.

Smith, E.H., Bailey, H.C., 1990. Preference/avoidance testing of waste discharges on anadromous fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 77-86.

Solomon, K. R., Sibley, P., 2002. New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here? *Marine Pollution Bulletin* 44, 279-285.

Svecevicus, G., 1999. Fish avoidance response to heavy metals and their mixture. *Acta Zoologica Lituanica* 9, 103-113.

Tierney, K.B., Baldwin, D.H., Hara, T.J., Ross, P.S., Scholz, N.L., Kennedy, C.J., 2010. Olfactory toxicity in fish. *Aquatic Toxicology* 96, 2–26.

Van Gestel, C., Waarde, J., Derksen, J., Hoek, E., Veul, M., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., Stokman, G., 2001. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1438–1449.

Van Straalen, N.M., 2003. Ecotoxicology becomes STRESS Ecology. Viewpoint. *Environmental Science & Technology*, 325-330.

Vasconcelos, A.M., Daam, M.A., dos Santos, L.R.A., Sanches, A.L.M., Araújo, C.V.M., Espíndola, E.L.G., 2016. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. *Ecotoxicology* 25, 500-509.

Vera-Vera, V.C., Guerrero, F., Blasco, J., Araújo, C.V.M., 2019. Habitat selection response of the freshwater shrimp *Atyaephyra desmarestii* experimentally exposed to heterogeneous copper contamination scenarios. *Science of the Total Environment* 662, 816-823.

Wells, J.B., Little, E.E., Calfee, R.D., 2004. Behavioral response of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to forest fire-retardant chemicals in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 621-625.

Widder, E.A., Robison, B.H., Reisenbichler, K.R., Haddock, S.H.D., 2005. Using red light for in situ observations of deep-sea fishes. *Deep-Sea Research* 152, 2077-2085.

Worm, B., Duffy, J., 2003. Biodiversity, productivity and stability in real food webs. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 628-632.

Zapp J. A. Jr., 1980. Historical consideration of interspecies relationships in toxicity assessment. In: *Aquatic Toxicology* (Edited by Eaton J. G., Parrish P. R. & Hendricks A. C.), pp. 2-10. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.