



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA

"EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE BRONOPOL DURANTE UN PERIODO DE INCUBACIÓN DE 90 A 170 U.T.A EN OVA VERDE DE Salmo salar".

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

ROBERTO ANDRÉS PÉREZ SALDÍAS

VALDIVIA - CHILE

2002

PROFESOR PATROCINANTE: DR. ROBERTO MARTIN. _____

PROFESOR COPATROCINANTE: DR. RAFAEL BURGOS. _____

PROFESORES COLABORADOR: DR. FERNANDO FLORES. _____

PROFESORES CALIFICADORES: DR. ORLANDO GARRIDO. _____

DR. SANTIAGO ERNST. _____

FECHA DE APROBACIÓN: 28 DE AGOSTO DE 2002

INDICE

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSIÓN.....	22
7. CONCLUSIONES.....	26
8. BIBLIOGRAFÍA.....	27
9. ANEXOS.....	31
10. AGRADECIMIENTOS.....	41

1.RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia y seguridad de Bronopol* en ova verde de Salmón del Atlántico (Salmo salar) en un periodo de incubación de 90 a 170 Unidades Térmicas Acumuladas.

El ensayo que tuvo una duración de 14 días, se realizó en la piscicultura Río Sur ubicada en la X Región, comuna de Puerto Varas. Para ello se seleccionaron aleatoriamente ovas de igual cepa (stock genético) de diferentes estanques con igual fecha de desove y de aproximadamente 90 Unidades Térmicas Acumuladas; los que se dividieron en 2 grupos, uno de ellos mantenido como control sin tratamiento y el otro sometido a tratamiento con Bronopol.

El grupo sometido a tratamiento recibió baños con Bronopol por 30 minutos los días 1, 3, 5 y 7 del estudio en dosis de 50 ppm en un sistema abierto, de flujo continuo sin recirculación de agua.

Con el fin de calificar el grado de fungosis y mortalidad de ovas, se hizo una evaluación visual semanal de los 6 estanques destinados al ensayo, en los cuales para los grupos tratamiento y control se obtuvo una calificación de fungosis leve, al igual que para mortalidad, que solo en el control fue moderada, por lo que no se observaron diferencias notables a simple vista. Para determinar esta cantidad, se realizó un conteo directo, para obtener de esta forma porcentajes representativos de cada grupo.

En los resultados porcentuales se determinó que, el grupo sometido a tratamiento con Bronopol presentó una mortalidad total de 0,223% y un 0,095% por fungosis en comparación con el 0,321% y 0,180% obtenidos respectivamente en el grupo control. Estos resultados fueron analizados estadísticamente obteniéndose diferencias significativas entre ambos grupos.

Al finalizar el estudio se concluyó que Bronopol es eficaz y seguro para ser utilizado en el control de cuadros de fungosis durante un periodo de ova verde .

Palabras claves : Ova, Bronopol, fungosis, incubación, salmón

*Pyceze®, elaborado por Vericore Limited

2. SUMMARY

The present research objectives were to evaluate efficacy and safety of Bronopol* on Atlantic salmon green eggs (*Salmo salar*) from 90 to 170 degree days of incubation period.

The test which took 14 days, was developed at the Rio Sur Hatchery located in the X Region, near to Puerto Varas. Similar genetic stock eggs from different tanks, with the same spawning date and approximately 90 degree days were randomly selected. These were divided in 2 groups, one control group without any treatment and other was under treatment whit Bronopol.

The treatment group received baths with Bronopol by 30 minutes the days 1,3,5 and 7 of the trial at 50 ppm dose in a continuous flow open system (no water recirculation).

To qualify the fungus level and mortality of eggs, a weekly visual evaluation of the tanks was made, in which both treatment and control groups a low fungus qualification was observed. Also for mortality, that only in the control was moderated. No evident differences were established at simple sight. To quantify this, a direct count was done obtaining in this way representative percentages of each group.

The results determinate that the Bronopol treatment group presented a total mortality of 0.223% and 0.095% by fungus, comparing them whit the 0.321% and 0.180% obtained respectively in the control group. Those results were statistically analysed obtaining significant differences between both groups.

At the end of the research was concluded that Bronopol is effective and safe to be used on control of fungal infection during the period of green eggs incubation.

Keywords: Eggs, Bronopol, fungal, incubation, salmon

*Pyceze®, produced by Vericore Limited.

3. INTRODUCCIÓN

La industria acuícola se inició en Chile en la década de los 60, con los cultivos de ostras y de mitílidos. En los años 80 comenzó el despegue de la industria salmonera y desde entonces no se ha detenido, al punto que hoy Chile se empina como el segundo productor mundial de salmónidos (Fundación Chile, 2000).

El explosivo crecimiento que ha mostrado este sector durante esta última década no hubiera sido posible si el país no ostentara las condiciones naturales propicias con disponibilidad de amplias zonas costeras, lacustres y fluviales sin contaminación, el adecuado ambiente de una política económica orientada a un fuerte proceso exportador, la existencia de un contingente técnico y profesional capaz de responder las variadas demandas del sector, mano de obra calificada y de bajo costo, existencia de insumos y equipos de fabricación nacional (Fundación Chile, 1993).

La salmonicultura sigue siendo el sustento base de la acuicultura en el país, ya que por conceptos de exportación el sector acuícola produjo durante el 2001, la cantidad de 314.983 toneladas (US\$ 1.048.601.000) correspondiendo a la industria del salmón 300.304 toneladas (US\$ 964.000.000). En cuanto al mercado de destino, Japón ocupa el primer lugar con el 52% del volumen enviado, el segundo lugar lo ocupa EE.UU con un 29%, seguido de la Comunidad Económica Europea con un 7.3% y por último Latinoamérica con un 5.4% (Fundación Chile, 2002).

La salmonicultura en particular se desarrolla en un complejo ecosistema de mar interior, configurando archipiélagos, canales, fiordos, principalmente desde Puerto Montt al Sur. Estudios de la FAO preparatorios de la conferencia sobre medio ambiente y desarrollo sustentable, identifican la problemática de los mares interiores y entre las políticas se contempla la de manejar estos ecosistemas en una forma integral, que esté al servicio del hombre para su desarrollo actual y futuro (1).

(1)Proyecto D92S1005.1992

En Chile existe una amplia gama de empresas dedicadas al cultivo del salmón, las que presentan diferentes niveles organizacionales de acuerdo con su volumen de producción. Por lo general, todas poseen más de un centro de cultivo en aguas interiores o en el mar y cultivan más de una especie (Fundación Chile, 2000).

La temática medioambiental en la salmonicultura ha sido relevante desde los comienzos de esta actividad. En efecto, desde sus primeros años los cultivos de salmón han estado al permanente escrutinio de la autoridad, la que se ha reservado las acciones para resguardo ambiental. Los salmones son una especie introducida en el país y por otro lado, los mismos procesos involucrados como la alimentación, sacrificio y aspectos sanitarios, tienen un impacto en el medio ambiente. Incluso, no en pocas ocasiones la salmonicultura ha sido señalada como incompatible para el resguardo ambiental. Los productores no desconocen el impacto que su actividad produce en el ambiente, pero así también son los principales interesados en proteger el entorno en el cual se desarrollan sus cultivos, ya que éstos requieren imprescindiblemente de aguas puras, libres de todo tipo de contaminación (Fundación Chile, 2000).

Actualmente la acuicultura nacional cuenta con un Reglamento Ambiental para la Acuicultura (RAMA). Aspectos importantes de este Reglamento son por ejemplo que no pueden existir condiciones anaeróbicas en fondos lacustres, marítimos y fluviales. También hace referencia a los centros de cultivos en que se debe mantener una limpieza del área y los terrenos aledaños de todo residuo sólido generado por esta actividad. También el RAMA hace mención a la obligación de los centros de cultivo de tener un plan de contingencia, es decir de medidas a tomar en el caso de ocurrir acciones que causen daños ambientales, como por ejemplo: mortalidad y escapes de peces, así como también pérdidas accidentales de alimentos (Fundación Chile, 2002).

La producción de salmónidos se ve afectada por una amplia variedad de enfermedades, las cuales son producidas por bacterias, virus y protozoos (Coll, 1991). En el país debido a la importación de ovas se han introducido varias enfermedades exóticas que afectan principalmente a las especies salmonídeas y que eventualmente pueden traspasarse a la ictiofauna local (Claude y col., 2000).

De las enfermedades virales que representan un peligro de transmisión por medio de reproductores portadores a través de las ovas (reporte obligatorio a la Oficina Internacional de Epizootias, OIE) existen algunas clasificadas como enfermedades exóticas, dentro las cuales están la necrosis hematopoyética epizoótica (E.H.N), necrosis hematopoyética infecciosa (I.H.N), herpesvirus del onchorynchus masou (O.M.V), septicemia hemorrágica viral (V.H.S), anemia infecciosa del salmón (I.S.A) y la enfermedad del páncreas (P.D). De las enfermedades que no representan un peligro de transmisión entre ovas se encuentran la furunculosis, vibriosis y enfermedad proliferativa renal (PKD) (Fundación Chile, 2000).

Sin embargo existen otras enfermedades que se han introducido al país no sólo a través de la importación de ovas, sino que a través de la introducción directa de especies de salmonídeos ajenos a estos hábitats. De éstas, las enfermedades bacterianas aparecen como las más ofensivas a los salmonídeos y eventualmente a la ictiofauna nativa. Las enfermedades más comunes que se diagnostican son: BKD, flavobacteriosis visceral (RTFS), flavobacteriosis externa, enfermedad entérica de la boca roja (ERM), piscirickettsiosis (SRS), anemia marina (nucleospora salmonis) y vibriosis (Claude y col., 2000).

Dentro de las patologías que afectan a los salmónidos están las enfermedades parasitarias, que son frecuentes y a menudo representan un factor limitante de producción (Heen y col.,1993). Éstas se manifiestan cuando las condiciones del medio ambiente permiten la proliferación del parásito (Kinkelin y col., 1985), como por ejemplo temperaturas elevadas y el estrés favorecen la invasión fúngica (Roberts, 2001). Otros factores que influyen en el desarrollo de las micosis son la virulencia de las cepas (Kinkelin y col.,1985).

Los hongos miembros de los Talófitos, que se distinguen principalmente por la completa ausencia de clorofila, son responsables de un número de enfermedades serias y de importancia económica en los peces teleósteos. Los Eumicota, también llamados hongos verdaderos, tienen varias subdivisiones. De estas los Mastigomicotina es el grupo que posee la mayor cantidad de patógenos frecuentes. Dentro de esta subdivisión, el grupo de los Oomicetes es el que posee la mayor importancia dentro de los patógenos de peces. Pese a que existen 4 órdenes dentro de este grupo, la mayoría de los hongos realmente patógenos para los peces pertenecen al orden Saprolegniales (Parra, 1996).

Saprolegnia parasítica y Saprolegnia diciclina son las especies de hongos que revisten la mayor importancia en cuanto a la patología de peces en agua dulce (Roberts, 2001). Saprolegnia comprende una diversidad de hongos acuáticos muy afines, que se hallan constantemente en el agua dulce, especialmente a temperaturas muy bajas (Roberts y Shepherd,1980). Roberts (2001) utiliza el término Saprolegniasis para describir la infección fúngica del complejo Saprolegnia parasítica-diciclina, ésta afecta a los peces y sus ovas (Post, 1983). Los saprolegniales se caracterizan por poseer micelios ramificados no septados reconociéndose en el agua como masas de algodón (Roberts, 2001). La infección se difunde por la liberación de esporas móviles que salen del esporangio y pasan al agua (Roberts y Shepherd,1980).

Dentro de los signos clínicos de saprolegniasis se observa en los peces masas de algodón, especialmente alrededor de la cabeza, la aleta adiposa y aleta caudal. (Hussein y col., 2001). Tales lesiones comienzan generalmente como infecciones pequeñas, focales que pueden extenderse rápidamente por toda la superficie del cuerpo (Stoskopf, 1992). Las hifas también penetran junto al músculo y vasos sanguíneos (Hatai y Hoshiai, 1992), en la cual se han descrito casos de trombosis, condición normalmente asociada a la infección causada por

Branchiomyces spp. (Roberts, 2001). Post (1983), describe también la presencia de masas algodonosas de color café-grisáceas en ovas de peces, especialmente sobre ovas infértiles (Schlotfeld y Alderman, 1995).

Según Alvarez y col (1988) en los peces afectados por saprolegniasis ocurre depleción del número de leucocitos circulantes y heterofilia. También hace mención a que células endoteliales del bazo y riñón de truchas infectadas contenían vesículas citoplasmáticas llenas con un material posiblemente de origen fúngico, lo cual sugiere alguna inmunodepresión en truchas infectadas con Saprolegnia, lo que favorecería el curso de esta enfermedad. Por su parte para el caso de las ovas, Stoskopf (1992) afirma que la infección se inicia en ovas infértiles o no viables, desde la cual se traspa a ovas sanas pudiendo llegar a producirse una pérdida total de ellas.

Para confirmar en laboratorio la presencia de Saprolegnia se puede hacer una preparación de un simple raspado de piel que al ser examinado microscópicamente con un aumento de 25x mostrará claramente las hifas del hongo y sus esporas (Schlotfeld y Alderman,1995).

Existen productos tales como la formalina, que es muy usada para el tratamiento de infecciones fúngicas en ovas de peces (Rach y col., 1997), esta a su vez ha demostrado ser efectiva en estos casos (Waterstrat y Marking, 1995). Como agente antimicótico actúa desactivando las proteínas protoplasmáticas y las enzimas (Hallu, 1990), pero tiene el inconveniente de poseer una acción irritante sobre las mucosas respiratorias del hombre y también de los peces (Roberts y Shepherd,1980) y además se ha demostrado que soluciones de formalina conteniendo paraformaldehído no son seguras para el control de fungosis, pues son tóxicas para las ovas de peces (Howe y col., 1995).

Los iodóforos también son muy usados para desinfección de equipos y como desinfectante de superficies en trucha y ovas de salmón (Stoskopf, 1992), pero tiene el inconveniente de que puede llegar a ser tóxico a concentraciones de 75 mg de yodo activo/ L en baños de 30 minutos, notándose un incremento en la mortalidad de ovas (Fowler y Banks, 1990). El modo de acción de los iodóforos es por medio de la inactivación de las proteínas plasmáticas del hongo (Hallú, 1990).

La sal común también se ha utilizado para el control de enfermedades fúngicas. Los datos obtenidos de una evaluación clínica para medir la efectividad de la sal para controlar enfermedades fúngicas arrojaron que usando concentraciones de 15.000 ppm de sal no se lograba eficacia en el control de infecciones fúngicas, pero que a concentraciones de 30.000 ppm se lograba controlar la infección. Pero la gran cantidad de sal que se requiere para el tratamiento de ovas más allá de los 35 días del período de incubación ocasionaron un incremento aparente de la mortalidad de ovas. Además que éstas 30.000 ppm de sal son de

alguna forma poco prácticas para ser usadas en un centro de cultivo (Waterstrat y Marking, 1995). La sal común tiene una acción similar a los iodóforos, es decir inactivan las proteínas plasmáticas (Hallú, 1990).

El oxalato de verde malaquita ha sido usado por décadas en pisciculturas para el tratamiento de peces y sus ovas en contra de infecciones de *Saprolegnia* y en alevines contra protozoos *Ichthyophthirius multifiliis*. (2) Actúa inactivando enzimas y provocando una desorganización de la membrana celular (Hallu, 1990). Este pigmento se caracteriza por ser de cristales de color verde con aspecto metálico, es muy soluble en agua, pero tiene el inconveniente que es altamente citotóxico en células de mamíferos de cultivo y también como un promotor de tumores al bazo (Mahudawala y col.,1999; Rao,1995; Panandiker y col.,1993).

También se ha descrito que el Verde Malaquita tiene efectos secundarios deletéreos, como la congestión sinusoidal y necrosis focal del hígado, además produce daño en el epitelio de las laminillas y región interlaminilar de branquias asociado en algunos casos a necrosis celular (lamelas) e infiltración leucocitaria. Estas alteraciones se evidenciaron cuando se expuso a los peces a 1.6 ppm por 40 minutos (baño) a intervalos semanales. Las lesiones aparecen posterior a la tercera semana de uso (Fundación Chile, 1992). Otras investigaciones lo asocian a la deformación de aletas, cabeza y /o columna en truchas fry cuando éstas en estado de ovas fueron tratadas con Verde Malaquita (Fundación Chile,1992).

El peróxido de hidrógeno se ha señalado como un efectivo fungicida (Dawson y col., 1994; Waterstrat y Marking, 1995; Howe y col.,1999). Actúa provocando una inactivación enzimática (Hallu, 1990), pero requiere estudios toxicológicos y de eficacia para hacer válido su uso (Pottinger,1999).

(2). Rakonen, R y Koski, P. 2001. Roundtable 3. Post malachite green: Alternative strategies for fungal infections and white spot disease.

Pyceze® es una solución al 50% de Bronopol, el cual ha sido desarrollado para el tratamiento y control de saprolegnias en ovas de salmónidos y peces. Bronopol es un halogenitro alifático que posee un amplio espectro de actividad antifúngica (*Saprolegnia* parasítica) y antibacteriana (3), actuando sobre la pared celular y membranas (4) a nivel de enzimas tiol deshidrogenasas (Pottinger, 1999).

Bronopol como efectivo agente antibacteriano es usado como preservante en shampoos, cosméticos y productos para baño (Bryce y col., 1978; Kumanova y col., 1989). También es usado actualmente para el control de varias enfermedades de organismos acuáticos, particularmente salmónidos y sus ovas. Principalmente contra infecciones protozoarias, flagelados (*Ichthyobodo necatrix*) o ciliados (*Ichthyophthirius multifiliis*); bacterias (*Flavobacterium branchiophilum*) y myxobacterias (*Flavobacterium psychrophilum*). También se puede usar para desinfectar estanques de peces y equipos (5).

Bronopol ha demostrado ser útil contra la infección de *Saprolegnia* en ovas de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando fue administrado diariamente en baños a concentraciones entre 30-100 mg /L. Bronopol demuestra ser seguro y efectivo en reemplazo del verde malaquita y formalina en la prevención de infecciones fúngicas en el área de la acuicultura (Pottinger, 1999).

Para tal efecto se plantean dos hipótesis alternativas:

1. Bronopol es eficaz en el control de cuadros de fungosis en ova verde de *Salmo salar* en el periodo del estudio comprendido de 90 a 170 U.T.A; en dosis de 50 mg de ingrediente activo por litro de agua.
2. Bronopol es seguro para ser utilizado en ova verde de *Salmo salar* en el periodo del estudio comprendido de 90 a 170 U.T.A; en dosis de 50 mg de ingrediente activo por litro de agua.

(3). Grant, A y col., Novartis Animal Vaccines Ltd (2001).

(4) Informativo proporcionado por Aqua-Health (Chile) S.A. (2000).

(5) Braidwood, J. Vericore Limited (2000).

El objetivo de este estudio es determinar la eficacia de Bronopol contra cuadros de fungosis y analizar mortalidad acumulada como una forma de evaluar su seguridad y determinar si es factible el uso de Bronopol como medicación antifúngica en ovas de salmónidos en reemplazo del verde malaquita durante la etapa de ova verde (es el estado de la ova, desde su fertilización, hasta la presencia de ojos, alcanzando aproximadamente 230 U.T.A). Willoughby (1999).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL:

4.1.2 Biológico: Se utilizaron 319.502 ovas en estado verde en un periodo de incubación de 90 a 170 U.T.A de la especie Salmón del Atlántico (Salmo salar).

4.1.3 Farmacológico: Bronopol a una concentración de 50% en frasco de 1 litro.

4.1.4 Instrumentos: 6 estanques de incubación con capacidad de 200 L cada uno, 7 canastillos por estanque, 4 contenedores de plástico de capacidad de 1 L, 4 bajadas de suero, medidor digital de concentración de Oxígeno y temperatura (Oxiguard ®), guantes y mascarillas desechables, botas, linterna, tijeras, jeringas desechables, baldes, vasos volumétricos, recipientes de plástico, pipeta y cronómetro.

4.1.5 Agua: Se utilizó agua de vertiente, captada en su origen. Su temperatura promedio medida en las unidades de incubación era de 5.5° C y su porcentaje de saturación y concentración de oxígeno fue de 103,6 % y 13,1 mg/ L respectivamente.

4.2 MÉTODOS:

El ensayo que tuvo una duración de 14 días, se realizó con ovas al estado verde de Salmo salar, las cuales estaban en un periodo de incubación de 90 a 170 U.T.A. las que debían estar sanas y visiblemente libres de infecciones por hongos.

De las 6 unidades de incubación, se asignaron 2 unidades como control con un total de 101.581 ovas, las que no recibieron tratamiento y 4 unidades con 217.921 ovas que recibieron tratamiento con Bronopol posterior a la fertilización. Los estanques contenedores de ovas cada uno de 200 L (Anexo 2) fueron aleatoriamente asignados a los grupos de tratamiento y control.

Previo al inicio del ensayo, se realizó un picking (día 0), para efectuar una limpieza de los estanques, removiéndose la totalidad de las ovas muertas y con fungosis (Anexo 1), la que era abundante, pues anteriormente las unidades de incubación eran surtidas por agua de río, la que fue cambiada por vertiente desde el día cero en adelante.

La administración del producto se realizó mediante baños de 30 minutos en dosis de 50 mg de Bronopol por litro de agua. Para la aplicación se utilizó en forma conjunta vasos volumétricos y goteo realizándose el cálculo correspondiente para la dosis de Bronopol, tomando en cuenta el volúmen total del estanque y el flujo de agua que ingresaba a este.

Para el caso de la aplicación con vasos volumétricos se consideró la capacidad total de cada estanque que tenían como promedio 200 L cada uno, por lo cual se utilizó una dosis práctica de 20 ml de Bronopol por estanque al que se agregó 1 ml adicional, porque había que considerar el volumen del balde en el que se diluyó Bronopol que era de 10 L. Para este caso se hicieron 10 aplicaciones de 1 litro cada una con el vaso volumétrico a cada estanque, los días 1, 3, 5 y 7.

Para calcular la dosificación de Bronopol por goteo se conectó un tubo de PVC a la llave, recolectando en un balde la cantidad de agua que fluía durante un lapso de tiempo de 1 minuto. El resultado de esto se multiplicó por 30 para obtener de esta manera el volúmen del flujo total de agua utilizada en cada baño. El flujo de agua promedio de los estanques fue de 9 L/ min. lo que dio como resultado un flujo total de 270 L para cada uno de ellos, con una dosis promedio de Bronopol de 27 ml. Esta dosis promedio se diluyó en 500 ml de agua para lograr una mejor homogenización. Posteriormente se depositó en partes iguales en cuatro contenedores de plástico con capacidad de 1 L cada uno agitando el contenido con una pipeta. Luego se procedió a llenar los contenedores hasta su máxima capacidad y se procedió a su aplicación por goteo, según lo calculado anteriormente (los valores señalados anteriormente corresponden a un promedio, pero la dosificación de Bronopol se hizo por separado para cada estanque). Anexo 3.

4.2.3 Variables a medir:

Como una forma de controlar el grado de fungosis y mortalidad en las ovas se realizó una evaluación visual semanal del grado de infección por hongos y de mortalidad. Esta fue hecha por una persona calificada de la piscicultura, que no tenía conocimiento de los estanques destinados al ensayo. La presencia de filamentos largos en forma de motas de algodón en las ovas fue utilizado como indicativo de la presencia de hongos. Las ovas que se infectaban durante el ensayo eran mantenidas en los estanques de incubación de manera de permitir que continúe el proceso de infección. Además para efecto de llevar un adecuado control del ensayo se registró la temperatura y la concentración de oxígeno del agua semanalmente, mediante el uso de un instrumento digital (Oxiguard®). Anexo 6.

Para calificar la evolución de la infección por hongos y el grado de mortalidad de las ovas de cada unidad de incubación se utilizaron las siguientes escalas de evaluación visual, confeccionadas por Novartis Chile S.A. Esta clasificación fue realizada para cada uno de los canastillos (anexos 4 y 5), para posteriormente asignar un promedio por estanque, con aproximación matemática al número entero.

Cuadro 1. Escala de Infección por Hongos y Clasificación de Mortalidad, aplicable a cada canastillo de las unidades de incubación.

Calificación	Grado de infección (Extensión de hongos)	Puntaje
Ausente	0 %	0
Leve	1-5 %	1
Moderado	6-10 %	2
Severo	11-50 %	3
Extremo	51-100 %	4

Calificación	Clasificación de mortalidad	Puntaje
Ausente	0 %	0
Leve	1-5 %	1
Moderado	6-10 %	2
Severo	11-50 %	3
Extremo	51-100 %	4

Una vez terminados los baños con Bronopol se realizaron 2 picking (método de selección, mediante el cual se separan ovas viables de las no viables por medio del uso de pinzas o por sifonaje) que tenían por objeto contar las ovas muertas y con fungosis presentes en cada canastillo de los seis estanques destinados al estudio. Estas fueron depositados en envases plásticos por separado, para posteriormente proceder a realizar el conteo directo. De esta forma se obtuvieron 2 conteos de ovas. El primero se hizo el día 8 del ensayo (día siguiente del último baño con Bronopol) y el segundo fue en el día 14 del ensayo (7 días del último baño con Bronopol).

Las ovas con presencia de masas algodonosas e hifas fueron consideradas con fungosis y aquellas ovas con coloración bipolar (anaranjada-blanca) y blancas se registraron como mortalidad (Pottinger, 1999).

4.2.4 Análisis estadístico de los datos:

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa Epi-Info 6.04b (1997), para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos controles comparados con los grupos de tratamiento. Se establecieron comparaciones mediante análisis Chi-Cuadrado. Se usó un nivel de significancia del 5%.

5. RESULTADOS

5.1. CALIFICACIONES DE FUNGOSIS Y MORTALIDAD POR ESTANQUE, OBTENIDAS MEDIANTE EVALUACIÓN VISUAL, AL DÍA 7 DEL ENSAYO.

En el cuadro 2, se presentan los puntajes promedios de hongos y mortalidad por estanques obtenidos a partir de los canastillos correspondientes a cada unidad, al día 7 del ensayo para el grupo tratamiento y control. Esta evaluación determinó las siguientes calificaciones:

Cuadro 2. Puntajes de hongos y mortalidad promedio por estanques (día7).

Grupo Tratamiento				
Estanque	Puntaje de hongos	Calificación	Puntaje de mortalidad	Calificación
56	1	Leve	1	Leve
57	1	Leve	1	Leve
58	0	Ausente	1	Leve
61	1	Leve	1	Leve
Promedio	1	Leve	1	Leve
Grupo Control				
Estanque	Puntaje de hongos	Calificación	Puntaje de mortalidad	Calificación
59	1	Leve	2	Moderado
60	1	Leve	2	Moderado
Promedio	1	Leve	2	Moderado

Tal como se aprecia, la calificación de hongos en ambos grupos al día 7 del ensayo fue similar (leve) y para mortalidad fue diferente (moderada para el grupo control y leve para el grupo tratado). Anexo 4.

5.2. CALIFICACIONES DE FUNGOSIS Y MORTALIDAD POR ESTANQUE, OBTENIDAS MEDIANTE EVALUACIÓN VISUAL, AL DÍA 14 DEL ENSAYO.

En el cuadro 3, se presentan los puntajes promedios de hongos y mortalidad por estanques obtenidos a partir de los canastillos correspondientes a cada unidad, al día 14 del ensayo para el grupo tratamiento y control, los cuales presentaron las siguientes calificaciones.

Cuadro 3. Puntajes de hongos y mortalidad promedio por estanques (día14).

Grupo Tratamiento				
Estanque	Puntaje de hongos	Calificación	Puntaje de mortalidad	Calificación
56	0	Ausente	2	Moderado
57	0	Ausente	2	Moderado
58	1	Leve	2	Moderado
61	1	Leve	3	Severo
Promedio	1	Leve	1	Leve
Grupo Control				
Estanque	Puntaje de hongos	Calificación	Puntaje de mortalidad	Calificación
59	1	Leve	2	Moderado
60	1	Leve	2	Moderado
Promedio	1	Leve	2	Moderado

De este cuadro se puede apreciar que ambos grupos obtuvieron una calificación de hongos leve, salvo los obtenidos de mortalidad, los que para el control fueron moderados, en comparación al grupo tratamiento que fueron leves. (Anexo 5).

5.3. NÚMERO, PORCENTAJE DE MORTALIDAD Y FUNGOSIS DE OVA VERDE POR ESTANQUE, OBTENIDOS POR CONTEO DIRECTO AL DÍA 8 DEL ENSAYO.

En el cuadro 4 se muestra el número de ovas muertas y con hongos obtenidas a partir de los conteos, estos se obtuvieron al día siguiente del último baño con Bronopol (día 8). El ítem del número de ovas con hongos consideraba ovas vivas y muertas con presencia de hongos, en cambio el ítem del número de ovas muertas consideraba sólo ovas muertas, no incluyendo las afectadas por hongos. Esto también es válido para el análisis del día 14 del ensayo.

Cuadro 4. Número y porcentaje de mortalidad y hongos de ova verde por estanque obtenidos al día 8 del ensayo.

GRUPO TRATAMIENTO					
Nº Estanque	Nº inicial de ovas	Nº ovas muertas	%	Nº ovas con hongos	%
56	55.378	132	0.238	17	0.030
57	63.757	185	0.290	29	0.045
58	48.880	12	0.024	19	0.038
61	49.906	126	0.252	109	0.218
TOTAL	217.921	455	0.208	174	0.079
GRUPO CONTROL					
Nº Estanque	Nº inicial de ovas	Nº ovas muertas	%	Nº ovas con hongos	%
59	51.390	183	0.356	71	0.138
60	50.191	76	0.151	82	0.163
TOTAL	101.581	259	0.254	153	0.150

A la observación del número de ovas afectadas por hongos se puede apreciar que en el grupo control, el porcentaje de hongos (0.150%) y mortalidad (0.254%) fueron más altos, que el grupo tratamiento, en el cual se observa un 0.079% y 0.208%, respectivamente.

5.4. NÚMERO, PORCENTAJE DE MORTALIDAD Y FUNGOSIS DE OVA VERDE POR ESTANQUE, OBTENIDOS POR CONTEO DIRECTO AL DÍA 14 DEL ENSAYO.

Cuadro 5. Número y porcentaje de mortalidad y fungosis de ova verde por estanques obtenidos al día 14 del ensayo.

GRUPO TRATAMIENTO					
Nº Estanque	Nº inicial de ovas	Nº ovas muertas	%	Nº ovas con fungosis	%
56	55.229	15	0.027	11	0.019
57	63.543	4	0.006	11	0.017
58	48.849	3	0.006	3	0.006
61	49.671	9	0.018	9	0.018
TOTAL	217.292	31	0.014	34	0.015
GRUPO CONTROL					
Nº Estanque	Nº inicial de ovas	Nº ovas muertas	%	Nº ovas con fungosis	%
59	51.136	31	0.060	12	0.023
60	50.033	37	0.073	18	0.035
TOTAL	101.169	68	0.067	30	0.029

Tal como se aprecia en el cuadro 5, los porcentajes de ovas con fungosis (0.029%) y de mortalidad (0.067%) son mayores en el grupo control, en relación al grupo tratamiento (0.015% y 0.014%; respectivamente).

5.5. NÚMERO, PORCENTAJE DE MORTALIDAD Y FUNGOSIS ACUMULADA DE OVA VERDE POR ESTANQUE, DURANTE EL PERIODO TOTAL DEL ENSAYO.

En el cuadro 6, se presenta la sumatoria de mortalidad y fungosis obtenidas al día 8 y 14 del ensayo, expresada en números y porcentajes.

Cuadro 6. Número y porcentaje de mortalidad y fungosis acumulada de ova verde por estanques obtenidos al día 14 del ensayo

GRUPO TRATAMIENTO					
Nº Estanque	Nº inicial de ovas	Nº ovas muertas	%	Nº ovas con fungosis	%
56	55.378	147	0.265	28	0.050
57	63.757	189	0.296	40	0.062
58	48.880	15	0.030	22	0.045
61	49.906	135	0.270	118	0.236
TOTAL	217.921	486	0.223	208	0.095
GRUPO CONTROL					
Nº Estanque	Nº inicial de ovas	Nº ovas muertas	%	Nº ovas con fungosis	%
59	51.390	214	0.416	83	0.161
60	50.191	113	0.225	100	0.199
TOTAL	101.581	327	0.321	183	0.180

En el cuadro 6 se observa que los porcentajes de mortalidad (0.321%) y fungosis (0.180%) acumulados fueron un poco más altos que los del grupo tratamiento (0.095% y 0.223%; respectivamente).

5.6. EFICACIA ANTIFÚNGICA DE BRONOPOL EN OVA VERDE DE *Salmo salar* EN UN PERIODO DE INCUBACIÓN DE 90 A 170 U.T.A, A UNA CONCENTRACIÓN DE 50 MG DE BRONOPOL POR LITRO, MEDIANTE TRATAMIENTOS CON BAÑOS DE 30 MINUTOS.

Se analizaron los grupos tratamiento y control para comprobar eficacia antifúngica de Bronopol. Para este caso las variables fueron ovas libres de fungosis y ovas infectadas por hongos. Se consideró ova libre de fungosis aquella ova viva o muerta con ausencia de fungosis. Para tal efecto se analizaron los resultados obtenidos de los dos conteos (día 8 y 14 del ensayo).

Cuadro 7. Efecto de Bronopol sobre el número de ovas libres y con fungosis al día 8 del ensayo.

Día 8			
	Ova libre de fungosis	Ovas con fungosis	Total
Tratamiento	217.747	174	217.921
Control	101.428	153	101.581
Total	319.175	327	319.502

Porcentualmente en el grupo tratamiento, el total de ovas con fungosis (0.079%) fue más bajo, en comparación al mismo índice de las ovas del grupo control (0.150%) de los datos obtenidos al día 8.

Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico para el día 8, demostraron que existieron diferencias significativas ($p= 0.000$) entre el grupo de ovas que recibió tratamiento con Bronopol y el grupo control, por lo que se demuestra que Bronopol es eficaz para controlar cuadros de fungosis (Anexo 7).

Cuadro 8. Efecto de Bronopol sobre el número de ovas libres y con fungosis al día 14 del ensayo.

Día 14			
	Ova libre de fungosis	Ovas con fungosis	Total
Tratamiento	217.258	34	217.292
Control	101.139	30	101.169
Total	318.397	64	318.461

Porcentualmente en el grupo tratamiento el total de ovas con fungosis (0.015%) fue bajo, en comparación al mismo índice de las ovas del grupo control (0.029%) de los datos obtenidos al día 14.

Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico para el día 14, demostraron que existieron diferencias significativas ($p= 0.009$) entre el grupo de ovas que recibió tratamiento con Bronopol y el grupo control, por lo que se demuestra que Bronopol es eficaz para controlar cuadros de fungosis (Anexo 7).

5.7. SEGURIDAD DE BRONOPOL EVALUADA POR MEDIO DE TOXICIDAD AGUDA EN OVA VERDE DE *Salmo salar* EN UN PERIODO DE INCUBACIÓN DE 90 A 170 U.T.A, A UNA CONCENTRACIÓN DE 50 MG DE BRONOPOL POR LITRO, MEDIANTE TRATAMIENTOS CON BAÑOS DE 30 MINUTOS.

Se analizaron los grupos tratamiento y control para comprobar seguridad de Bronopol evaluadas por medio de toxicidad aguda (se comprobó si el producto inducía mortalidad a corto plazo en el grupo de ovas tratado). Para este caso las variables usadas fueron ovas vivas y ovas muertas. En el cuadro 9 y 10 se presentan los datos obtenidos al día 8 y 14 del ensayo, respectivamente.

Cuadro 9. Seguridad de Bronopol sobre el número de ovas vivas y muertas al día 8 del ensayo.

Resultados obtenidos al día 8 del ensayo			
	Ovas vivas	Ovas muertas	Total
Tratamiento	217.466	455	217.921
Control	101.322	259	101.581
Total	318.788	714	319.502

Porcentualmente en el grupo tratamiento el total de ovas muertas (0.208%) fue bajo en comparación al mismo índice de las ovas del grupo control (0.254%) de los datos obtenidos al día 8.

Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico para el día 8, demostraron que existieron diferencias significativas ($p= 0.010$) entre el grupo de ovas que recibió tratamiento con Bronopol y el grupo control, por lo que se demuestra que Bronopol es seguro para ser usado en el control de cuadros de fungosis (Anexo 7).

Cuadro 10. Seguridad de Bronopol sobre el número de ovas vivas y muertas al día 14 del ensayo.

Resultados obtenidos al día 14 del ensayo			
	Ovas vivas	Ovas muertas	Total
Tratamiento	217.261	31	217.292
Control	101.101	68	101.169
Total	318.362	99	318.461

Porcentualmente en el grupo tratamiento el total de ovas muertas (0.014%) fue más bajo, en comparación al mismo índice de las ovas del grupo control (0.067%) de los datos obtenidos al día 14.

Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico para el día 14, demostraron que existieron diferencias significativas ($p= 0.000$) entre el grupo de ovas que recibió tratamiento con Bronopol y el grupo control, por lo que se demuestra que Bronopol es seguro para ser usado en el control de cuadros de fungosis (Anexo 7).

6. DISCUSIÓN

Por varias décadas la acuicultura había confiado en el verde malaquita como tratamiento para las infecciones fúngicas en las pisciculturas. Actualmente el uso del verde malaquita está prohibido en EE.UU (8), así como también en el Reino Unido (9), por lo tanto se ha hecho necesario buscar un producto químico que lo reemplace .

Este estudio, debido a la importancia que a llegado a tener para la economía nacional el tema de la producción de salmónidos, centró sus objetivos en evaluar un producto de acción fungicida, el Bronopol, que reúna características de seguridad y eficacia, condiciones ideales de un buen desinfectante, que reemplace a los actuales productos farmacéuticos que se utilizan en nuestro país contra las fungosis, esto concuerda con lo que afirman Pottinger (1999), de que un buen agente terapéutico contra hongos debe tener la efectividad del verde de malaquita en combatir las infecciones micóticas de peces y sus ovas, pero a la vez debe ser seguro para el operador, los peces y el medioambiente. Por su parte Pylkkö y Eskelinen (8) afirman que un buen método para combatir la infección de *Saprolegnia sp*, debe ser seguro y ambientalmente inocuo.

Al analizar los valores obtenidos de la apreciación visual de fungosis y mortalidad de ovas con los resultados obtenidos por conteo directo, se puede afirmar que existe congruencia, pues en ambos casos se observa una baja incidencia de fungosis y mortalidad tanto en los controles como en los tratados. El análisis estadístico es útil en este caso para demostrar que si bien el nivel de desafío fue bajo existieron diferencias significativas entre ambos grupos.

Al establecer una relación entre ovas afectadas por fungosis y mortalidad, en los cuadros N° 7 y 8, se puede deducir que existe relación entre ambas, pues las ovas muertas son colonizadas por hongos (Bruno, 1996). Esto último se puede relacionar con los resultados obtenidos en este ensayo, en el cual se aprecia una relación directa entre mortalidad y fungosis; pues se encontró un porcentaje mayor de fungosis en los estanques que registraron mayor mortalidad.

(8). Rakonen, R y Koski, P, 2001.Roundtable 3. Post malachite green: Alternative strategies for fungal infections and white spot disease.

(9) Defra, 2002. Use of Malachite Green to end.

Al comparar los grupos tratados y controles de ambos periodos de tiempo (día 1-8 y 9-14) se puede evidenciar que los grupos del segundo periodo obtuvieron un menor porcentaje de fungosis y mortalidad. Un factor determinante para esto fue que en ambos periodos se usó agua de vertiente; que era obtenida desde su origen (napa subterránea) lo que trajo consigo una mejor calidad de agua, pero con la diferencia que las ovas del primer periodo a pesar de recibir agua de vertiente, tuvieron la influencia de una infestación fúngica mayor, favorecida por agua de río previo al ensayo, la que normalmente lleva una mayor carga de esporas y sedimentos, lo que favorecía un mayor porcentaje de fungosis y mortalidad. Otro factor a considerar fue la realización del picking al día cero; el cual contribuyó en alguna medida a la incidencia de mortalidad en ambos grupos del primer periodo. Esto se debe a que la ova verde no debe manipularse, porque se vuelve muy sensible a los choques mecánicos (Coll, 1991). Las ovas del primer periodo sufrieron mayor manipulación, pues había mayor cantidad de ova no viable que remover, pues como se dijo anteriormente ellas previo al ensayo recibían agua de río. Esta manipulación era necesario hacerla, asumiendo pérdidas porque para analizar correctamente el efecto de Bronopol, las ovas debían estar sanas y libres de infección por hongos.

Cabe señalar que la presión de infección por fungosis en este ensayo fue baja, por cuanto los niveles de pérdidas de ovas por hongos a la apreciación visual, así también al conteo directo en ambos grupos, tratados y controles fueron reducidas. Solamente por conteo directo se obtienen valores que en términos productivos no representan una gran pérdida, sin embargo estos índices al análisis estadístico arrojaron diferencias significativas.

Un reducido desafío en este ensayo, con un bajo porcentaje de fungosis y mortalidad, se pueden atribuir a varios factores: El más importante tiene relación con la captación del agua que fue en el origen de una vertiente lo que estaría relacionado con una mejor calidad de ésta, uso de un sistema abierto de flujo continuo sin recirculación de agua, con rangos de temperatura, concentración y saturación de oxígeno poco variables.

De los resultados obtenidos del análisis estadístico en este estudio, en que se analizó la eficacia y seguridad del Bronopol, se obtuvo que el producto es eficaz y seguro contra cuadros de fungosis en ovas de salmónidos lo que concuerda con los resultados de Pottinger (1999), que para su estudio utilizó una población de 108.000 ovas de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), repartidas en 12 estanques de incubación, dejando 2 grupos controles. El módulo de experimentación recibía un flujo de 5 litros de agua, con 6 tratamientos diarios, aplicando dosis por duplicado de 0, 5, 20, 30, 50 y 100 mg de Bronopol por litro, durante un lapso de 21 días. A diferencia del presente ensayo en el cual se utilizó la especie Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), con una población de ovas de 314.000 unidades. Se utilizaron 6 estanques en total dejando igualmente 2 grupos controles.

El promedio del flujo de agua fue de 9 litros por minuto, aplicando 4 tratamientos a una dosis única de 50 mg de Bronopol por litro, considerando un tiempo total del ensayo de 14 días. En ambos ensayos se obtuvo eficacia a concentraciones de Bronopol de 50 mg/ L de agua. A diferencia del experimento de Pottinger (1999) quien contabilizó la cantidad de esporas y concentración de Bronopol presentes en los estanques de su ensayo, el presente trabajo consideró también una evaluación semanal de fungosis, siendo la base de este trabajo la determinación de porcentajes de ovas infectadas por hongos y ovas muertas respecto del total de las ovas de los estanques y la evaluación visual semanal de fungosis y mortalidad.

Otra diferencia encontrada con Pottinger (1999), fue que en su ensayo se detuvo el flujo de agua por los 30 minutos que duraban los baños, restableciéndose posteriormente. Esto podría traer ventajas en lo que se refiere a una mayor permanencia del producto en los estanques lo que traería consigo una mejor respuesta antifúngica. Cabe mencionar además que en el ensayo de Pottinger se indujo experimentalmente la infección por hongos en los estanques (desafío experimental), a diferencia de esta tesis en la cual la infección fue natural, bajo condiciones reales de terreno (desafío natural), lo que determina una comparación limitada entre ambos ensayos.

De acuerdo a los puntajes de evaluación visual de fungosis obtenidos por Pottinger (1999), comparándolo con la presente tesis, se obtuvieron algunas similitudes. Al día 7 en ambos ensayos se observó que los grupos controles tuvieron puntuación de 1.0, salvo los tratados que fueron de 0 puntos para Pottinger y de 1.0 punto para la tesis. Para el día 14 ambos grupos tratados tuvieron puntuación de 1.0, en cambio para los controles fue de 4.0 puntos para Pottinger y de 1.0 para la presente tesis. Tal como se observa no se aprecian grandes diferencias de puntajes entre ambos ensayos, siendo la evaluación visual una herramienta muy útil en el establecimiento de un nivel de infestación en el desarrollo de fungosis, en un proceso de incubación de ovas.

Para el caso de otro ensayo con Bronopol realizado en Finlandia por Pilkkö y Eskelinen (10), también se demostró eficacia de este producto, pero usando una concentración más alta de Bronopol (100 mg/ L) en lugar de 50 mg/ L que fue usada para esta tesis y usando fotografía digital para observar el crecimiento de hifas de *Saprolegnia sp.*

(10). Rakonen, R y Koski, P, 2001.Roundtable 3. Post malachite green: Alternative strategies for fungal infections and white spot disease.

A diferencia de los trabajos citados anteriormente en el presente ensayo no se usaron técnicas de laboratorio para determinar fungosis tanto en la evaluación visual como en el conteo. Esta se determinó por medio de un método sencillo como es la observación (Pottinger,1999).

De los factores que llevarían a mejorar este ensayo se podrían considerar varios factores, tales como: Lograr un mayor desafío del ensayo aumentando su duración a 30 días. Iniciar los baños con Bronopol con aproximadamente 10 U.T.A, pues en esta etapa habrían pocas ovas muertas y con fungosis que extraer, evitando así la manipulación por picking al día cero, pues como se dijo anteriormente se produce un choque mecánico en las ovas, lo que las afectaría, interfiriendo esto en el proceso natural de incubación.

7. CONCLUSIÓN

1. Bronopol, demostró ser eficaz para el control de cuadros de fungosis en ova verde de Salmo salar, cuando fue aplicado en la etapa de incubación de 90 a 170 U.T.A en dosis de 50 mg/ L.
2. Bronopol, demostró ser seguro para el control de cuadros de fungosis en ova verde de Salmo salar, cuando fue aplicado en la etapa de incubación de 90 a 170 U.T.A en dosis de 50 mg/ L.

8. BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, F., B. RAZQUÍN, A. VILLENA, P. LÓPEZ FIERRO, A. ZAPATA. 1988. Alterations in the peripheral lymphoid organs and differential leukocyte counts in Saprolegnia infected brown trout *Salmo trutta fario*. *Vet Immunol Immunopathol.* 18 (2): 181-93

BRUNO, D., T. POPPE. 1996. A colour atlas of salmonid diseases. Academic Press. London.

BRYCE, D., B. CROSHAW, J. HALL, V. HOLLAND, B. LESSEL. 1978. The Activity and Safety of the Antimicrobial Agent Bronopol (2-Bromo-2 nitropropan-1,2-diol. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists.* 29: 3-24, 31

CLAUDE, M., J. OPORTO, C. IBÁÑEZ, L. BRIEVA, C. ESPINOSA, M. ARQUEROS. 2000. La ineficiencia de la salmonicultura en Chile. Ed Terram publicaciones. Santiago.

COLL, J. 1991. Acuicultura marina animal. Ed Mundi-Prensa. Madrid España.

DAWSON, V., J. RACH, T. SCHREIER. 1994. Hydrogen peroxide as a fungicide for fish culture. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada.* 2: 54-56.

DIRECTORIO 2002. 2002. Compendio de la acuicultura y pesca de Chile. Techno Press S.A.

FOWLER, L., J. BANKS. 1990. Iodosphoros toxicity to eggs, and fry of fall Chinook salmon. *Prog. Fish. Cult.* 3: 176-8.

FUNDACIÓN CHILE. 2002_a. Aqvanoticias.65: 24

FUNDACIÓN CHILE. 2002_b. Aqvanoticias. 70: 7,13 y 83

FUNDACIÓN CHILE.2000. Compendio y directorio de la acuicultura y pesca de Chile. Editorial Antártica. Santiago.

FUNDACIÓN CHILE. 1993. Compendio acuícola de Chile. Editorial Antártica. Santiago.

FUNDACIÓN CHILE. 1992. Aqua noticias. 14: 39

HALLU, R. 1990. Curso de farmacología. 2nd ed; Prensa Veterinaria Argentina. Bs. Aires. Argentina.

HATAI, K., G. HOSHIAI. 1992. Mass mortality in cultured Coho Salmon (Oncorhynchus kisutch) due to *Saprolegnia parasitica* coker. *Journal Wildl Diseases.* 28 (4): 532-6

HEEN, K., R. MONAHAN, F. UTTER. 1993. Salmon aquaculture. Halsted. NewYork.

HOWE, G., L. MARKING, T. BILLS, T. SCHREIER. 1995. Efficacy and toxicity of formalin solutions containing paraformaldehyde for fish and eggs treatments. *Progressive Fish Culturist.* 57: 2, 147-152.

HOWE, G., W. GINGERICH, V. DAWSON, J. OLSON. 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health.* 11: 3, 222-230

HUSSEIN, M., K. HATAI, T. NOMURA. 2001. Saprolegniasis in salmonids and their eggs in Japan. *Journal Wildl Diseases.* 37 (1):204-7

KINKELIN, P., CH. MICHEL, P. CHITTINO.1985.Tratado de las enfermedades de los peces. Ed. Acribia. S. A. Zaragoza. España.

KUMANOVA, R., M. VASSILEVA, S. DOBREVA, S. MANOVA, L. KUPENOV. 1989. Evaluating Bronopol. *Manuf. Chem.* 60: 36-37

MAHUDAWALA, D., A. REDKAR, A. WAGH, B. GLADSTONE, K. RAO. 1999. Malignant transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells in culture by malachite green: an agent of environmental importance. *Journal Exp Biol.* 37 (9): 904-18

PARRA, O.1996. Estudio de la toxicidad del Verde malaquita en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y determinación de una dosis inhibitoria mínima sobre *Saprolegnia sp.* Tesis. M.V; Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

PANANDIKER, A., C. FERNANDES, T. RAO, K. RAO. 1993. Morphological transformation of Syrian hamster embryo cells in primary culture by malachite green correlates well with the evidence for formation of reactive free radicals. *Cancer Lett.* 74 (1-2): 31-6

POST,G.1983. Textbook of fish health. Ed. TFH publications, inc. Ltd.

POTTINGER, T. 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for Rainbow trout : Assesment of Pyceze as an antifungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms.* 36: 129-141

RACH, J., G. HOWE, T. SCHREIER. 1997. Safety of formalin treatments on warms and coolwater fish eggs. *Aquaculture.*149 (3-4): 183-191

RAO, K. 1995. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: A new liver tumor promoter. *Toxicol Lett.* 81 (2-3): 107-13

ROBERTS, R. 2001. Fish pathology. 3° edición. W.B. Saunders. Philadelphia.

ROBERTS, R., J. SHEPHERD.1980. Enfermedades de la trucha y el salmón. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza. España.

ROBERTS, R., J. SHEPHERD. 1997. Handbook of trout and salmon diseases. 3° ed; Fishing News Books. London.

SCHLOTFELD, H., D. ALDERMAN. 1995. What should i do?. A practical guide for freshwater diseases.

STICKNEY, R. 1991. Culture of salmonid fishes. CRS Press. Boca Ratón Ann Arbor. Boston London.

STOSKOPF, M. 1992. Fish medicine. W.B. Saunders Company. Philadelphia.

WATERSTRAT, P., L. MARKING. 1995. Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride for the treatment of *Saprolegnia parasitica* on fall Chinook salmon eggs. *Progressive fish culturist*. 57: 287-291

WILLOUGHBY, S. 1999. Manual of salmonid farming. 1° ed; Blackwell Science Ltd. London.

9. ANEXOS

Anexo 1

CRONOGRAMA DEL ENSAYO

Fase experimental (periodo 1: días 1-7)

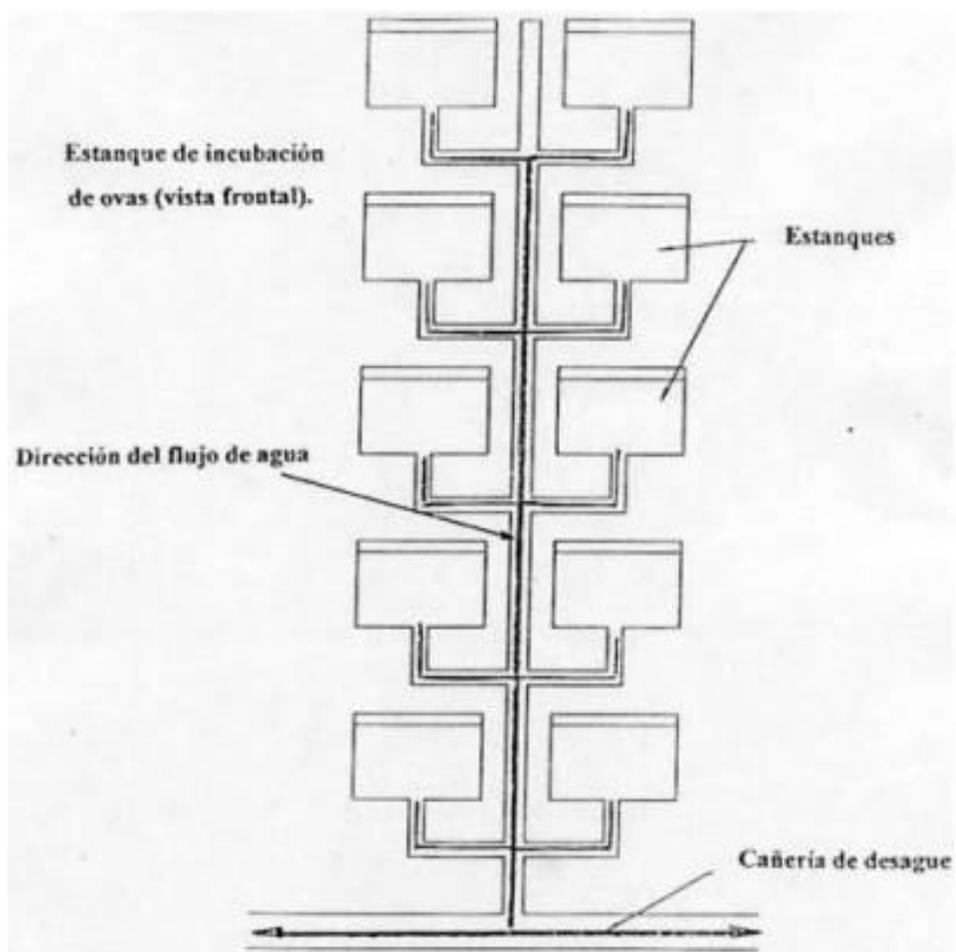
Días	Picking	Baños/ Bronopol	Evaluación fungosis/ mortalidad	Medición de T°/ O2
0	xxxxxxx			xxxxxxxxxxxxxxxxxx
1		xxxxxxxxxxxxxx		xxxxxxxxxxxxxxxxxx
2				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
3		xxxxxxxxxxxxxx		xxxxxxxxxxxxxxxxxx
4				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
5		xxxxxxxxxxxxxx		xxxxxxxxxxxxxxxxxx
6				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
7		xxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxx

Fase observacional (periodo 2: días 8-14)

Días	Picking	Baños/ Bronopol	Evaluación fungosis/ mortalidad	Medición de T°/ O2
8	xxxxxxx			xxxxxxxxxxxxxxxxxx
9				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
10				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
11				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
12				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
13				xxxxxxxxxxxxxxxxxx
14	xxxxxxx		xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxx

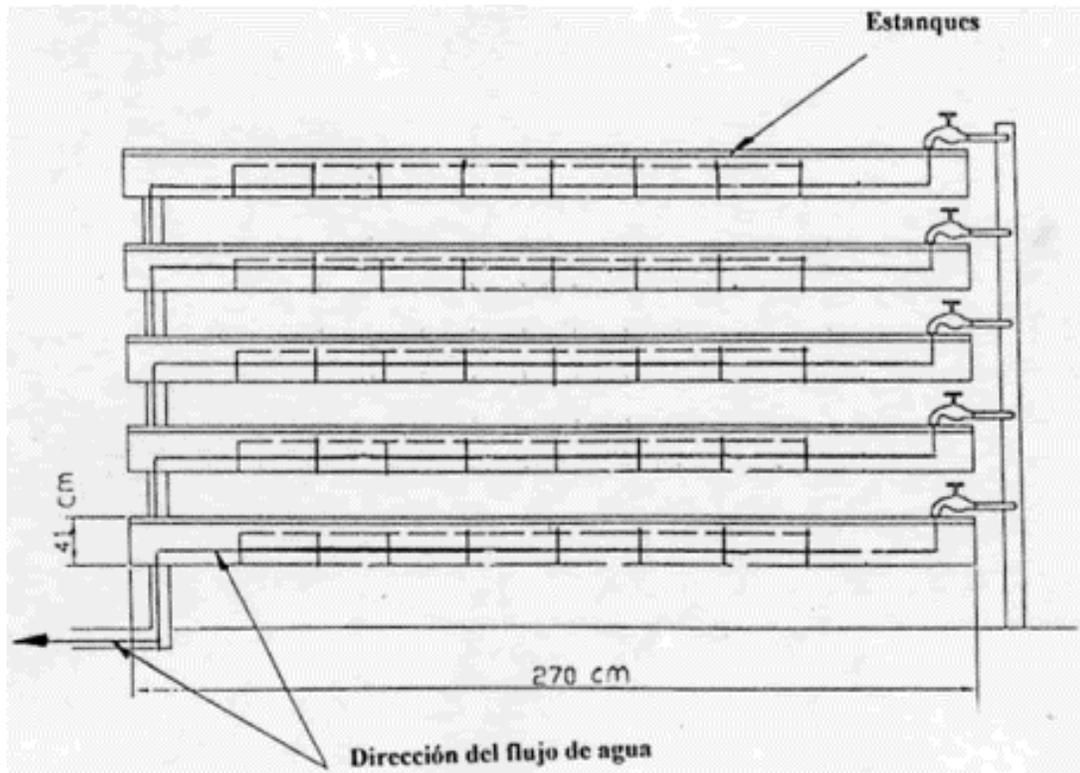
Anexo 2.

Croquis de estanques destinados a incubación de ovas



Sistema abierto de flujo continuo
Sin recirculación de agua

Estanque de incubación de ovas (Lateral).



Sistema abierto de flujo continuo
Sin recirculación de agua.

Anexo 3. Registro de aplicación de Bronopol.

1° Baño (día 1)

Número de estanque	Volumen de estanque (L)	Dosis de Bronopol por Estanque (cc)	Dosis de Bronopol para balde (10 L) (cc)	Dosis efectiva aplicada a estanque (cc)	Flujo de Agua		Dosis Aplicada por Goteo (cc)
					L/ min	L/ 30 min	
56	191	19.1	1.0	20.1	10	300	30
57	191	19.1	1.0	20.1	12	360	36
58	205	20.5	1.0	21.5	9	270	27
61	205	20.5	1.0	21.5	7	210	21
Promedio	198	19.8 cc	1.0 cc	20.8 cc	9.5 L	285 L	28.5 cc

2° Baño (día 3)

Número de estanque	Volumen de estanque (L)	Dosis de Bronopol por Estanque (cc)	Dosis de Bronopol para balde (10 L) (cc)	Dosis efectiva aplicada a estanque (cc)	Flujo de Agua		Dosis Aplicada por Goteo (cc)
					L/ min	L/ 30 min	
56	191	19.1	1.0	20.1	9	270	27
57	191	19.1	1.0	20.1	11	330	33
58	205	20.5	1.0	21.5	9	270	27
61	205	20.5	1.0	21.5	9	270	27
Promedio	198	19.8 cc	1.0 cc	20.8 cc	9.5	270	27 cc

3° Baño (día 5)

Número de estanque	Volumen de estanque (L)	Dosis de Bronopol por Estanque (cc)	Dosis de Bronopol para balde (10 L) (cc)	Dosis efectiva aplicada a estanque (cc)	Flujo de Agua		Dosis Aplicada por Goteo (cc)
					L/ min	L/ 30 min	
56	191	19.1	1.0	20.1	8	240	24
57	191	19.1	1.0	20.1	9	270	27
58	205	20.5	1.0	21.5	7	210	21
61	205	20.5	1.0	21.5	8	240	24
Promedio	198	19.8 cc	1.0 cc	20.8 cc	8	240	24 cc

4° Baño (día 7)

Número de estanque	Volumen de estanque (L)	Dosis de Bronopol por Estanque (cc)	Dosis de Bronopol para balde (10 L) (cc)	Dosis efectiva aplicada a estanque (cc)	Flujo de Agua		Dosis Aplicada por Goteo (cc)
					L/ min	L/ 30 min	
56	191	19.1	1.0	20.1	9	270	27
57	191	19.1	1.0	20.1	9	270	27
58	205	20.5	1.0	21.5	9	270	27
61	205	20.5	1.0	21.5	9	270	27
Promedio	198	19.8 cc	1.0 cc	20.8 cc	9	270	27 cc

Anexo 4. Puntajes de hongos y mortalidad de ova verde por estanque obtenidos mediante evaluación visual al día 7 del ensayo.

Estanque 56						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
2	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
3	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
4	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
5	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
6	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
7	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
Promedio	1		Leve	1		Leve

Estanque 57						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	2	6-10%	Moderado	1	1-5%	Leve
2	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
3	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
4	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
5	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
6	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
7	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
Promedio	1		Leve	1		Leve

Estanque 58						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
2	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
3	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
4	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
5	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
6	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
7	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
Promedio	0		Ausente	1		Leve

Estanque 61						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
2	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
3	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
4	2	1-5%	Ausente	1	1-5%	Leve
5	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
6	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
7	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
Promedio	1		Leve	1		Leve

Estanque 59						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
2	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
3	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
4	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
5	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
6	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
7	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
Promedio	1		Leve	2		Moderado

Estanque 60						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
2	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
3	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
4	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
5	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
6	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
7	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
Promedio	1		Leve	2		Moderado

Anexo 5. Puntajes de hongos y mortalidad de ova verde por estanque obtenidos mediante evaluación visual al día 14 del ensayo.

Estanque 56						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
2	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
3	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
4	0	0%	Ausente	3	11-50%	Severo
5	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
6	0	0%	Ausente	3	11-50%	Severo
7	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
Promedio	0		Ausente	2		Moderado

Estanque 57						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
2	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
3	1	1-5%	Leve	4		Severo
4	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
5	0	0%	Ausente	3	11-50%	Severo
6	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
7	0	0%	Ausente	3	11-50%	Severo
Promedio	0		Ausente	2		Moderado

Estanque 58						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
2	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
3	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
4	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
5	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
6	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
7	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
Promedio	1		Leve	2		Moderado

Estanque 61						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
2	1	1-5%	Leve	4	51-100%	Extremo
3	1	1-5%	Leve	4	51-100%	Extremo
4	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
5	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
6	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
7	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
Promedio	1		Leve	3		Severo

Estanque 59						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
2	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
3	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
4	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
5	0	0%	Ausente	2	6-10%	Moderado
6	0	0%	Ausente	3	11-50%	Severo
7	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
Promedio	1		Leve	2		Moderado

Estanque 60						
Canastillo	Fungosis	Porcentaje	Calificación	Mortalidad	Porcentaje	Calificación
1	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
2	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
3	1	1-5%	Leve	2	6-10%	Moderado
4	1	1-5%	Leve	3	11-50%	Severo
5	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
6	0	0%	Ausente	1	1-5%	Leve
7	1	1-5%	Leve	1	1-5%	Leve
Promedio	1		Leve	2		Moderado

Anexo 6. Registro diario de Temperatura, Concentración y Saturación de Oxígeno por estanque durante el ensayo (Día 1-14).

Registro día 1-7

Estanques	56			57			58			61			59			60			
	Días	T°	O ₂		T°	O ₂													
			%	Mg/L															
1	5.2	108	13.5	5.5	106	13.4	5.7	110	13.3	5.1	101	13.8	5.3	106	13.8	5.3	105	13.3	
2	5.4	110	12.6	5.7	108	13.6	5.6	102	13.8	5.3	107	13.6	5.0	105	13.7	5.0	104	13.5	
3	5.3	111	13	5.4	105	13.8	5.4	105	13.6	5.5	102	13.6	5.1	102	13.8	5.0	102	13.8	
4	5.6	112	12.8	5.8	110	13.3	5.3	110	13.6	5.2	103	13.7	5.2	106	13.1	5.2	108	13.3	
5	5.1	110	13.3	5.6	105	13.7	5.8	110	13.1	5.0	106	13.3	5.0	108	13.2	5.1	101	13.8	
6	5.5	108	13.2	5.5	106	13.3	5.5	109	13.8	4.8	103	13.7	5.4	104	13.5	5.3	103	13.7	
7	5.3	112	13.5	5.4	107	13.1	5.6	108	13.7	5.2	104	13.4	5.1	109	13.8	5.2	107	13.5	
Promedio	5.3	110	13.1	5.6	107	13.5	5.6	108	13.6	5.2	104	13.6	5.2	106	13.6	5.2	104	13.6	

Registro día 8-14

Estanques	56			57			58			61			59			60			
	Días	T°	O ₂		T°	O ₂													
			%	Mg/L															
8	5.8	107	13.9	5.8	101	12.1	5.8	101	13.1	5.6	100	12.4	5.8	101	12.6	5.7	101	12.4	
9	5.5	103	13.7	5.4	100	12.2	5.8	101	13.3	5.4	101	12.1	5.2	102	12.8	5.6	100	12.1	
10	5.7	106	13.8	5.1	102	12.8	5.7	101	13.7	5.9	101	12.6	5.9	106	13.1	5.8	104	13.6	
11	5.8	105	13.6	5.8	103	12.3	6.3	100	13.5	5.4	101	12.5	5.3	101	13.8	5.9	102	12.8	
12	5.4	105	13.7	5.6	102	12.7	5.7	101	13.9	5.8	102	12.3	5.5	100	13.3	6.2	103	13.3	
13	5.7	104	13.8	5.5	101	12.3	6.1	101	13.6	5.5	103	12.6	5.5	101	13.5	5.4	101	12.4	
14	5.8	105	13.8	5.7	101	12.8	5.8	102	13.7	5.7	102	12.8	5.8	104	13.7	5.8	101	12.6	
Promedio	5.7	105	13.8	5.6	101	12.5	5.9	101	13.5	5.6	101	12.5	5.6	103	13.3	5.7	102	12.7	

Anexo 7.**VALORES OBTENIDOS AL APLICAR LA PRUEBA DE CHI-CUADRADO.**

Cuadro 12. Valores de Chi-cuadrados para eficacia al día 8 del ensayo

	Valores de Chi-cuadrados	Valores de p
No corregido	33.95	0.0000000
Corrección de Yates	33.26	0.0000000

Cuadro 13. Valores de Chi-cuadrados para eficacia al día 14 del ensayo

	Valores de Chi-cuadrados	Valores de p
No corregido	6.74	0.0094291
Corrección de Yates	6.06	0.0138229

Cuadro 14. Valores de Chi-cuadrados para seguridad al día 8 del ensayo

	Valores de Chi-cuadrados	Valores de p
No corregido	6.63	0.0100503
Corrección de Yates	6.42	0.0112811

Cuadro 15. Valores de Chi-cuadrados para seguridad al día 14 del ensayo

	Valores de Chi-cuadrados	Valores de p
No corregido	62.27	0.0000000
Corrección de Yates	60.58	0.0000000

10. AGRADECIMIENTOS

Una eterna gratitud a mis padres Sra. Hilda Saldías y Sr. Orlando Pérez por su incondicional apoyo en mi educación.

Agradecimientos a mi patrocinante Sr. Roberto Martin por su valiosa colaboración y al Sr. Fernando Flores por permitir desarrollar mi tesis en Novartis Chile S.A.

A los Sres. Patricio Chiguay , Moisés Miranda, Jaime Leyton, y todas las personas de la piscicultura Río Sur que me prestaron su valiosa cooperación para desarrollar la parte experimental de mi tesis.

Especial agradecimiento a la Dra. Perttu Koski del National Veterinary and Food Research Institute (Finlandia), por su valioso aporte de información para esta tesis.

Al Dr. Tom G. Pottinger del NERC Centre for Ecology and Hydrology (Reino Unido), por su importante entrega de material bibliográfico, que fue de gran utilidad.

A la Srta. Ana Cayul por su importante apoyo y colaboración para esta tesis.