

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE EMBRIOLOGIA

“DETERMINACION DE LA MORTALIDAD Y POSIBLES EFECTOS TERATOGENOS DE LOS ANTIBIOTICOS ENROFLOXACINO, ERITROMICINA Y DE LA DESINFECCION CON YODO DE LAS OVAS DE SALMON COHO (*Oncorhynchus kisutch*) y SALMON DEL ATLANTICO (*Salmo salar*)”

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TITULO DE
MEDICO VETERINARIO

MARCELO RODRIGO GONZALEZ MIRANDA

VALDIVIA-CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE:

Esteban Molinari L. _____
Nombre Firma

PROFESOR COPATROCINANTE:

Oscar Goicoechea B. _____
Nombre Firma

PROFESORES CALIFICADORES:

Erika Gesche R. _____
Nombre Firma

Ricardo Enriquez S. _____
Nombre Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 24 de Marzo 2004.

*Con todo mi cariño a mis padres,
familiares y amigos.*

ÍNDICE

CAPÍTULO	Pagina
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	9
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSIÓN	19
7. CONCLUSIONES.....	24
8. BIBLIOGRAFÍA.....	25
9. ANEXOS.....	28

1.RESUMEN

“Determinación de la mortalidad y posibles efectos teratógenos de los antibióticos enrofloxacino, eritromicina y de la desinfección con yodo de las ovas de Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Salmón del atlántico (*Salmo salar*)”.

El crecimiento sostenido de la salmicultura en Chile y en especial el aumento de la producción de ovas nacionales, hace necesario el estudio del efecto en el desarrollo embrionario de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), cuyos reproductores fueron tratados con antibióticos y las ovas desinfectadas con yodo. También se realizó el estudio del efecto de la desinfección con yodo en el desarrollo embrionario de salmón del atlántico (*Salmo salar*).

Con el fin de llevar a cabo el estudio, se establecieron 5 grupos de ovas de salmón coho y 3 de ovas de salmón del atlántico. En S. coho el grupo 1, ovas provenientes de hembras tratadas con enrofloxacino, eritromicina y desinfectadas con yodo; grupo 2, ovas provenientes de hembras tratadas con enrofloxacino, eritromicina sin desinfección con yodo; grupo 3, ovas provenientes de hembras tratadas con enrofloxacino sin desinfección con yodo; grupo 4, ovas solamente desinfectadas con yodo; grupo 5, control sin antibiótico y sin desinfección con yodo. En S. del atlántico, grupo 6, ovas desinfectadas con yodo 10 minutos post fecundación; grupo 7, ovas desinfectadas con yodo 120 minutos post fecundación; grupo 8, control sin desinfección con yodo. Se realizaron tres muestreos, a las 150 UTA test de fertilidad, a las 290 UTA ovas con ojo y a las 470 UTA primera alimentación. En todos los grupos se determinó el porcentaje de mortalidad y malformaciones embrionarias macroscópicas de las ovas muestreadas.

Respecto a la mortalidad de las ovas y embriones en S. coho, los grupos 1 y 2 presentaron el mayor porcentaje con un 61,5% y 62,5%, respectivamente. El grupo 3 tuvo un porcentaje de 24,8%. La mortalidad en S. del atlántico fue mayor en el grupo 6 con un 63,1% y menor en el grupo 7 con un 43,4%. Respecto de las malformaciones embrionarias encontradas en S. coho, el grupo 1 presentó el mayor porcentaje con un 22,6 %, los grupos 2 y 3 presentaron un menor porcentaje 15,5% y 15,4%, respectivamente. En S. del atlántico el grupo 6 presentó el mayor porcentaje de malformaciones con un 22,5 % y el grupo 7 el menor porcentaje de malformaciones con un 10,3%.

Las malformaciones encontradas en ambas especies fueron clasificadas en aquellas que afectan el desarrollo ocular (microftalmía), las que afectan la columna vertebral (lordosis y xifosis) y las que afectan el saco vitelino (saco hidratado y saco estrangulado).

Se concluye que en S. coho, la mayor mortalidad y presencia de malformaciones embrionarias, se presentaron en el grupo (1) de reproductores tratados con enrofloxacino, eritromicina y ovas desinfectadas con yodo; en S. del atlántico la desinfección de las ovas con yodo 120 minutos post fecundación, reduce la mortalidad y el porcentaje de embriones malformados.

Palabras claves: Ovas, salmón coho, salmón atlántico, antibióticos, yodo.

2. SUMMARY

“Mortality decision and possible teratogenic effects of the antibiotics enrofloxacin, erythromycin and iodine disinfection in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs”.

The sustained growth of the salmon industry in Chile and most likely the increase of the national production of eggs makes it necessary of study the effect of the embryonic development of coho salmon (*Oncorhynchus. kisutch*) which breeders were treated with antibiotics and the eggs disinfected with iodine. I am made the study of the effect of disinfection with iodine the embryonic development of atlantic salmon (*Salmo salar*).

With the purpose to carry out this study 5 groups of coho salmon eggs and 3 atlantic salmon eggs were established. In group 1 coho salmon, eggs from female treated with enrofloxacin, erythromycin and disinfected with iodine; group 2, eggs from female treated with enrofloxacin, erythromycin and not disinfected with iodine; group 3, eggs from female treated with enrofloxacin not disinfected with iodine; group 4, eggs disinfected only with iodine; group 5, controlled without antibiotics and not disinfected with iodine. In group 6 atlantic salmon, eggs disinfected with iodine 10 minutes after fertilization, group 7, eggs disinfected with iodine 120 minutes after fertilization; group 8, controlled not disinfected with iodine. Three examples were made at 150 UTA fertility test, 290 UTA eggs that had eyes and at 470 UTA first food. In both species the mortality percentage was determined and also the macroscopic embryonic malformation of the tested eggs.

In respect to the mortality of the eggs and embryos in coho salmon, groups 1 and 2 had the highest percentage with 61,5% and 62,5% respectively. Group 3 had a percentage of 24,8%. The mortality of atlantic salmon was higher in group 6 with 63,1% and less in group 7 with 43,4%. In respect to the embryonic malformations found in the coho salmon, group 1 had the most higher percentage with 22,6%, groups 2 and 3 had the least percentage with only 15,5% and 15,4% respectively. With the atlantic salmon group 6 had the most highest percentage malformation with 22,5% and group 7 had the least percentage malformation with 10,3%.

Malformations found in both species were classified in those which have ocular growth problems (microphthalmia), which have backbone problems (lordosis and xifosis) and also those who have problems with the vitellin coat (strangled coat and hydrated coat).

Finally, in the coho salmon the most mortality and growth of embryonic malformations were in group (1) of breeding treated with enrofloxacin, erythromycin and iodine disinfection; in the atlantic salmon, in S. atlantic one the disinfection of the ovas with iodine 120 minutes post fertilization, reduces the mortality and the percentage of embryos malformation.

Key words: Eye eggs, coho salmon, atlantic salmon, antibiotics and iodine.

3. INTRODUCCIÓN

Chile es la quinta potencia pesquera mundial según el volumen de capturas y la segunda en producción de salmón y trucha cultivada, sólo después de Noruega y antes que el Reino Unido. La actividad de cultivo de los recursos hidrobiológicos es la alternativa más clara de proyección futura del sector pesquero, donde está inserta la salmonicultura (Achurra y col., 2000).

El crecimiento explosivo de los primeros años de la industria salmonera en Chile, se basó en la importación de ovas. Hoy en día la industria salmonera se basa fundamentalmente en la producción de ovas nacionales, entendiéndose por nacionales aquellas que no provienen directamente de la importación desde el hemisferio norte y que en algunos casos puede tener varias generaciones de cultivo en nuestro país (Estay y col., 1995). El aporte de las ovas importadas embrionadas en estado de ova con ojo, proviene desde países como Irlanda, Escocia, Estados Unidos y Noruega, para la especie salmón del atlántico o salmón atlántico (*Salmo salar*); de Estados Unidos, Dinamarca, Suecia, Noruega y Finlandia, para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y de Estados Unidos y Canadá, para el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Achurra y col., 2000). De acuerdo con los registros del Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) los 33.696.800 ovas ingresadas el 2001, representan sólo alrededor del 30% de las ovas que se importaron el año 2000, cuando ingresaron en el país 113.123.600 ovas. En tanto, respecto de las importaciones de ovas registradas durante el primer semestre del año 2000, éstas se redujeron a un 25%, en igual período del año 2001 y a un 16% en el primer semestre del año 2002. La producción nacional creció alrededor de un 15 % en el primer semestre de ese año (Sánchez, 2002).

En el país las especies que se manejan reproductivamente en cultivo son tres: salmón del atlántico, trucha arcoiris y salmón coho (Achurra y col., 2000). De estas, el salmón coho, es una de las principales especie producidas, convirtiendo a Chile en la actualidad en su primer productor mundial, debido a ello, esta especie fue una de las elegidas para trabajar en este estudio.

S. coho corresponde a un teleósteo de la familia Salmonidae, especie anádroma debido a que desova en agua dulce, posterior a lo cual los reproductores mueren (Gordon y col., 1987). Normalmente los peces adultos retornan al agua dulce después de dos años de permanencia en el mar (Stickney y col., 2000).

El S. del atlántico, que es la otra especie incluída en este estudio, también corresponde a un teleósteo anádromo. Los adultos pesan entre 4 a 6 kilogramos y es normal que retornen al agua dulce luego de dos años de vida en el mar, los peces maduros que retornan después de sólo un año se les conoce como "grilse" y pesan entre 1,5 a 3,5

kilos, aunque hay una pequeña proporción que retorna a los tres años pesando entre 8 y 14 kilos. En líneas generales, sobre un 30% sobrevive para otro desove, siendo estos conocidos como "Kelts" (Gordon y col., 1987). Debido a la condición anádroma que poseen tanto el S. coho como el S. del atlántico, se distinguen en ambos dos etapas durante su proceso de producción, denominándose estas la fase de cultivo en agua dulce y la fase de cultivo en agua de mar (Edwards, 1978).

En la fase de cultivo de agua dulce se distinguen las siguientes etapas: **desove**, que consiste en la obtención de los gametos desde los peces adultos reproductores; **fertilización**, que consiste en asegurar que las ovas y espermatozoides entren en contacto; **incubación**, que incluye el desarrollo y eclosión de las ovas fecundadas; **alevinaje**, que incluye la formación de un alevín con saco vitelino y la posterior absorción de este y finalmente, la etapa de **crecimiento** (smolt) en que el pez se desarrolla hasta estar apto para su traslado al agua de mar (Edwards, 1978).

En la etapa de alevinaje es normal encontrar cantidades pequeñas de alevines constituidos anormalmente. Estos alevines denominados "monstruos" pueden ser gemelos, siameses o similares. En el caso de que su incidencia en un lote particular de ovas sea mayor al uno por ciento debe considerarse como sospechoso (Roberts y Shepherd, 1986).

Arias (1995 a) evaluó el efecto de distintas concentraciones de enrofloxacino en el desarrollo del tubo neural en embriones de trucha arcoiris, determinando microscópicamente alteraciones en la diferenciación del tubo neural y derivados de él, además en la estructura del ojo. Las alteraciones observadas se presentaron a los 31 días post-fecundación, existiendo una correlación lineal con la concentración de antibiótico administrado. También se ha demostrado experimentalmente que diferentes concentraciones de eritromicina, producen alteraciones del tubo neural en embriones de S. coho, consistentes en infiltración de neuroblastos en la capa marginal y en la estructura del globo ocular (Silva, 1999).

La presencia de distintos tipos de malformaciones no sólo es atribuible al uso de antibióticos, sino también se han asociado a: ovas sobremaduras o inmaduras, deficiencia de oxígeno, grandes variaciones de temperatura, acción de la luz antes de la eclosión, vibraciones violentas, afluentes industriales conteniendo hierro o debido a malas prácticas de manejo (Scharperclaus, 1991).

Es así, como la escoliosis y lordosis en embriones y alevines se atribuyen a deficiencias de triptofano, magnesio, fósforo, vitamina C, leucina, vitamina A, ácidos grasos esenciales, tóxicos como el plomo, cadmio y aceite de pescado oxidado (Tacon, 1995; Lovell, 1998), también el sistema inmune de los salmónidos puede ser afectado, ya que es sensible a sustancias tóxicas (Thuvander, 1990).

Con respecto a como influye la temperatura en la producción de malformaciones, Yamamoto y col. (1996) observaron como las diferentes temperaturas influyen sobre el desarrollo temprano de ovas y la ocurrencia de gemelos en alevines de salmón chum (*Oncorhynchus keta*). Los resultados enfatizan la fuerte influencia de la temperatura sobre la velocidad del desarrollo de las ovas, la cual se acelera a temperaturas mayores a 8° C.

Entre los diferentes tipos de malformaciones se encuentran las malformaciones congénitas, que se refieren a las características adquiridas durante el desarrollo embrionario, y que por lo tanto se encuentran presentes en el momento de la eclosión, es decir, una malformación congénita es una alteración que es originada en una falla en la formación de uno o más constituyentes del cuerpo durante el desarrollo embrionario (Adler, 1974). Anormalidades como embriones con microftalmía y ciclopía han sido observadas en salmones y ambas condiciones son consideradas de origen genético. Muchos factores hereditarios involucran también la columna vertebral resultando en xifosis y lordosis (Bruno y Poppe, 1996). En rigor, todas las malformaciones tienen una causa, por lo tanto, las malformaciones espontáneas no existen, es importante insistir en esto ya que el descubrimiento de las causas de malformaciones es imprescindible para su prevención (Adler, 1974).

Desde el descubrimiento de los antibióticos, el progreso de la industria farmacológica ha sido muy rápido, utilizándose los antibióticos en forma masiva e incluso a veces de manera indiscriminada, tanto en medicina humana como veterinaria (Mc. Kraken y col., 1976, Austin, 1984; Austin, 1988; Jacobsen, 1989). En el cultivo de salmones su uso también se ha masificado, a partir de 1970 cuando las sulfonamidas se potenciaron con trimetoprin (Karunasagar, 1999), utilizándose estos principalmente como:

- a) Profiláctico: para prevenir la aparición de algún brote de enfermedad (Midlen y col., 1998).
- b) Terapéutico: Para controlar las patologías bacterianas (Austin, 1988).
- c) Promotor de Crecimiento: Este uso es limitado a algunos antibióticos, y su finalidad es lograr mayor ganancia de peso por medio de una eficiente conversión del alimento (García y Galleguillos, 1990).

En S. del atlántico y S. coho, se han utilizado los antibióticos enrofloxacin y eritromicina para prevenir la incidencia de *R. salmoninarum* (BKD) y *Piscirickettsia salmonis* (SRS) (Stickney y col., 2000), las que son responsables de graves pérdidas económicas en las empresas salmoneras de nuestro país (Achurra y col., 2000). También con el mismo propósito de prevenir la transmisión de estas enfermedades a través de las ovas, se utiliza la desinfección con yodo, lo cual de acuerdo a las últimas investigaciones ha quedado en duda (Austin, 1999).

El antibiótico eritromicina es un miembro de la familia de las moléculas de cadena larga llamada macrólidos. La eritromicina ataca a la subunidad 50S de los ribosomas y bloquea la translocación de la síntesis de proteínas, de este modo evita la libre transferencia de RNA, después de ligar la formación de péptidos. Es el más activo antagonista de las infecciones provocadas por bacterias Gram-positivas como clamidias, rickettsias y micoplasmas. Administrado oralmente es rápidamente absorbida a pH neutro o alcalino (Stickney y col., 2000).

La eritromicina es el antibiótico de elección para combatir y prevenir las infecciones causadas por bacterias (Kinkelin y col., 1985; Evelyn y col., 1986 a) en sus formas de tiocianato o fosfato, siendo recomendado por la literatura en dosis de 100 mg/Kg vía oral en el alimento para tratamiento o inyectado en hembras pre-desove en dosis de 10-20 mg/Kg de peso y 25-100 ppm por 5 minutos para desinfección de ovas (Stickney y col., 2000). Al ser administrada por vía oral en individuos juveniles, es acumulada y retenida por varios días en el tejido (Moffitt y Bjorn, 1989). También se realiza desinfección con yodo de las ovas (Stickney y col., 2000), pero Evelyn y col. (1986 b), determinaron que el uso de yodo reduce la infección en la superficie de las ovas, pero no en el interior de estas, donde se encuentra la bacteria después de realizar un corto tratamiento (cinco a diez minutos).

En las pisciculturas de nuestro país la prevención de BKD se realiza rutinariamente desinfectando externamente las ovas fertilizadas con yodo (Inglis y col., 1993) y también por medio de la inyección de antibióticos en los reproductores (Stickney y col., 2000). En algunas pisciculturas, al tratamiento con yodo se ha agregado un tratamiento por inmersión de las ovas en una solución de antibióticos (Goicoechea y Molinari *).

El enrofloxacino pertenece a la familia de las quinolonas, que se caracterizan por una larga cadena de agentes sintéticos originados a partir del ácido nalidíxico, el cual fue descubierto como un producto de la síntesis de cloroquina, un compuesto antimalarial. Análogos del ácido nalidíxico incluyen el ácido oxolínico y fluoroquinolonas, tales como sarafloxacin y flumequin. Las quinolonas inhiben la actividad de la DNA girasa, una enzima involucrada en las fases de inicio, elongación y término de la replicación de DNA, inhiben la replicación de ciertos operones y aspectos de la reparación, recombinación, y transposición del DNA, inhiben también de manera específica a la girasa bacteriana y no afectan células similares de eucariontes (Stickney y col., 2000).

Los yodóforos son generalmente soluciones al 1%, que son utilizados para desinfectar la superficie externa de las ovas, siendo más efectivos en condiciones ácidas, pero comúnmente utilizados a pH neutro (Stickney y col., 2000). Su acción es muy rápida,

*Comunicación Personal: Dr. Oscar Goicoechea y Dr. Esteban Molinari, Instituto de Embriología. Universidad Austral de Chile.

pero en contacto con suero, sangre o tejidos precipita las proteínas y se vuelven insolubles. Su mecanismo de acción consiste en la precipitación de las proteínas bacterianas al combinarse con ellas *. La concentración de yodo para desinfección de ovas reportadas por la bibliografía es de 50 mg de ingrediente activo por litro de agua (50 ppm) y para equipos 250 ppm (Stickney y col., 2000). Fowler (1990), describe un incremento significativo (3 %) de la mortalidad de ovas, luego de realizar desinfección con yodo durante un lapso de 30 minutos.

Tomando en cuenta la transmisión vertical de las enfermedades BKD e IPN, las empresas salmoneras no sólo han configurado sus programas de prevención sanitaria con la realización de “screening” a los reproductores, sino que han sumado la realización de los tratamientos señalados anteriormente con antibióticos a los reproductores y desinfección con yodo de las ovas. Existe escasa información sobre el efecto de estos esquemas sanitarios sobre la sobrevivencia de las ovas y los posibles efectos teratogénicos que estos generan.

Teniendo en consideración los antecedentes expuestos, se plantearon las siguientes hipótesis:

- En ovas provenientes de reproductores de salmón coho tratados con enrofloxacino y eritromicina, se produce aumento de la mortalidad y malformaciones.
- En embriones de salmón coho y del atlántico la desinfección con yodo de las ovas produce aumento de la mortalidad y malformaciones.

Para corroborar las hipótesis planteadas se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Estudiar el efecto que produce en el desarrollo embrionario de salmón coho la utilización de los antibióticos enrofloxacino y eritromicina en hembras reproductoras y el efecto que produce en el desarrollo embrionario de salmón coho y salmón del atlántico la desinfección con yodo de las ovas fertilizadas.

*<http://www.agro.unipam.edu.ar/quimica2/Clase%208a.htm>.

Objetivos Específicos:

- Determinar el porcentaje de mortalidad y malformaciones producidas, desde la fertilización hasta primera alimentación en salmón coho y salmón del atlántico.
- Cuantificar y clasificar las malformaciones macroscópicas que pueden aparecer por el uso de los antibióticos enrofloxacino y eritromicina, en embriones de salmón coho.
- Cuantificar y clasificar la presencia de malformaciones atribuibles al uso de la desinfección con yodo de ovas fertilizadas de salmón coho y salmón del atlántico.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Material Biológico.

El trabajo experimental con *S. coho* fue realizado en la piscicultura "La Cascada", propiedad de la empresa Granja Marina Tornagaleones S.A., ubicada a 14 Km en el camino de Villarrica a Pucón en la IX región. Esta empresa autorizó la utilización de parte de sus ovas de producción de *S. coho*, además facilitó el uso de sus instalaciones y en particular su sala de incubación. Esta última consta de 18 atriles, cada uno con capacidad para 84 baldes, repartidos en cuatro niveles.

Las ovas de *S. atlántico* utilizadas en este estudio, fueron obtenidas de la piscicultura "Cuyamcó" de la Empresa Nisa, ubicada en la zona de Ralún (X región, Chile) y fueron trasladadas a la piscicultura "La Cascada" para su incubación.

El suministro del agua utilizada en el proceso de incubación de las ovas, que corresponde al período desde ova recién fertilizada hasta primera alimentación, proviene de los deshielos cordilleranos de la zona de Pucón (río Los Chilcos) y luego canalizada para ser distribuida hacia los baldes que contenían las ovas. Cada balde era mantenido con un flujo constante de agua de 1 lt/min, lo que era verificado cuatro veces al día. La temperatura promedio durante el proceso de incubación fue de 7,2° C y el pH de 7,2. Es importante señalar que el origen del agua era cordillerano y contiene sedimentos volcánicos, los que obstruían las cañerías de PVC que suministraban el agua a los baldes, las cuales debían ser limpiadas diariamente.

Para determinar la mortalidad y posibles efectos teratógenos de los antibióticos enrofloxacino y eritromicina, así como el uso de la desinfección con yodo se establecieron grupos de ovas de *S. coho* y *S. del atlántico*.

Las ovas de *S. coho* utilizadas para este estudio, correspondieron a un total de 245.955, las que fueron divididas en cinco grupos. La incubación de las ovas se realizó siguiendo el sistema productivo y el manejo de rutina usado normalmente en la Empresa.

Se realizaron muestreos al azar a las 150 UTA* (test de fertilidad) y a las 290 UTA (ova ojo) y muestreo dirigido a las 470 UTA (primera alimentación).

* UTA: Unidades térmicas acumuladas

En la especie S. del atlántico se utilizaron un total de 21.255 ovas, las que se dividieron en tres grupos, realizándose muestreos al azar a las 150 UTA (test de fertilidad) y a las 290 UTA (ova ojo) y muestreo dirigido a las 470 UTA (primera alimentación).

Salmón coho: Los tratamientos a los reproductores se realizaron con los antibióticos enrofloxacino* (10 mg/Kg I.M), aplicado en el mes de diciembre, es decir, cuatro meses antes del desove. Eritromicina ** en una dosis de 20 mg/Kg de pez/ día vía oral en el alimento por 21 días consecutivos, 40 días antes del desove. La desinfección de las ovas con yodo*** (100 ppm), se realizó 60 minutos post fecundación cuando la ova ya está hidratada y con una duración de 10 minutos.

Salmón del atlántico: Los tratamientos de desinfección de las ovas con yodo*** (100 ppm) se realizaron 10 minutos post fecundación y 120 minutos post fecundación, ambos durante 10 minutos.

Cuadro N° 1: Grupos experimentales formados de acuerdo a los tratamientos realizados a los reproductores y en las ovas de salmón coho y salmón del atlántico durante la temporada de desove 2003.

Grupo	Especie	N° de Reproductores	Tratamiento Reproductores		N° de ovas Iniciales	
			Eritromicina ¹ 20 mg/Kg	Enrofloxacino ² 10 mg/Kg	Desinfec. c/Yodo ³ 100 ppm	Sin desinfec.
1	S. coho	8	+	+	41.072	-
2	S. coho	7	+	+	-	45.424
3	S. coho	7	-	+	-	44.125
4	S. coho	10	-	-	67.542	-
5 (control)	S. coho	10	-	-	-	47.792
6	S. Atlántico	1	-	-	6.730 [^]	-
7	S. Atlántico	1	-	-	8.035 ^{^^}	-
8 (control)	S. Atlántico	1	-	-	-	6.490

+: con tratamiento, -: sin tratamiento.

1: Tratamiento realizado 40 días antes del desove, 2: tratamiento realizado cuatro meses antes del desove, 3: Desinfección realizada 60 minutos post fecundación (0,3 UTA/día.).

[^]: Desinfección realizada 10 minutos post fecundación (0,05 UTA/día.), ^{^^}: Desinfección realizada 120 minutos post fecundación (0,6 UTA/día.).

*Baytril®. Bayer, Carlos Fernández # 260, San Joaquín. Chile.

** Eritro- feed 200®. Veterquímica, camino a Melipilla # 5641, Santiago. Chile.

***Aqua-yodo®. Veterquímica, camino a Melipilla # 5641, Santiago. Chile.

Para la toma de muestras a las 150 UTA y 290 UTA, las ovas inmediatamente extraídas del balde de cultivo, fueron inmersas en solución "aclaradora" (Anexo 1, Protocolo N° 1), que permite visualizar los embriones existentes en el interior de éstas. Las ovas fueron separadas en base a la existencia en su interior de embriones vivos, muertos o deformes macroscópicamente. Algunos de estos últimos fueron post fijados, para ser incluidos en parafina y cortados para microscopía óptica. La técnica histológica usada se describe en el Anexo 1, Protocolo N° 2.

Las diferentes malformaciones fueron clasificadas según Adler (1974), en base a caracteres externos observables al microscopio estereoscópico y apoyados por el estudio histológico de los embriones que presentaron malformaciones.

4.2. Análisis estadístico.

Para comparar los diferentes porcentajes de malformaciones encontradas y evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los diferentes grupos estudiados, se aplicó el test estadístico Dócima de Hipótesis (Hanke, 1997). (Anexo 2).

5. RESULTADOS

5.1. Mortalidad de ovas y alevines de salmón coho y salmón del atlántico

En todos los grupos se determinó el porcentaje de mortalidad, es decir, el número de embriones muertos del total de ovas fertilizadas.

Cuadro N° 2. Resumen de la mortalidad en ovas y embriones en los grupos tratados de salmón coho, al test de fertilidad, ova con ojo y primera alimentación, durante la temporada desove 2003. T ° promedio del agua 7,2 °C.

Grupo	N° Ovas Iniciales	N° Ovas vivas al test de fertilidad 150 UTA	% de mortalidad	N° de ovas vivas con Ojo 290 UTA	% de Mortalidad	N° de alevines vivos a primera alimentación 470 UTA	% de mortalidad	% de mortalidad acumulada
1 enrofloxacino + eritromicina, desinfect. con yodo	41.072	32.447	21	24.660	24	20.591	16,5	61,5
2 enrofloxacino + eritromicina, sin desinfect. con yodo	45.424	35.885	21	27.273	24	22.500	17,5	62,5
3 enrofloxacino, sin desinfect. con yodo	58.660	53.909	8,1	48.410	10,2	45.263	6,5	24,8
4 sin antibióticos y desinfect. Con yodo	67.542	58.762	13	49.948	15	0*	-	-
5 (control) sin antibiót. y sin desinfect.	47.792	44.064	7,8	39.878	9,5	37.406	6,2	23,5

* El grupo 4, murió en su totalidad por asfixia entre el periodo de ova ojo a primera alimentación.

De los grupos tratados la mayor mortalidad se presentó en aquellos en que se realizaron tratamientos en los reproductores con los antibióticos enrofloxacino y eritromicina, sin variar su porcentaje con relación a si las ovas fueron o no desinfectadas con yodo. El grupo 3, que presentó la menor mortalidad fue tratado sólo con enrofloxacino.

Al evaluar estadísticamente los porcentajes de mortalidad de los distintos grupos se determinó que existe diferencia significativa entre ellos (Anexo 2.2.1).

Cuadro N° 3: Resumen de mortalidad en ovas y embriones en los grupos tratados de salmón del atlántico, al test de fertilidad, ova con ojo y primera alimentación, durante la temporada desove 2003. T° promedio del agua 7,2 ° C.

Grupo	N° Ovas Iniciales	N° Ovas vivas al test de fertilidad 150 UTA	% de mortalidad	N° de ovas vivas con Ojo 290 UTA	% de Mortalidad	N° de alevines vivos a primera alimentación 470 UTA	% de mortalidad	% de mortalidad acumulada
6 sin antib. y desinfección. 10 minutos post fecundación	6.730	4.105	39	3.658	10,9	3.175	13,2	63,1
7 sin antib. y desinfección. 120 minutos post. fecundación	8.035	6.267	22	5.878	6,2	4.985	15,2	43,4
8 (control) sin antibiót. y sin desinfección.	6.490	5.062	22	4.758	6	4.444	6,6	34,6

Los resultados obtenidos de mortalidad acumulada a primera alimentación, muestran que el grupo 6, desinfectado 10 minutos post fecundación, presenta el mayor porcentaje de mortalidad, 63,1 %.

Al evaluar estadísticamente los porcentajes de mortalidad de los distintos grupos se determinó que existe diferencia significativa entre ellos (Anexo 2.2.1).

5.2. Malformaciones embrionarias provocadas por los distintos tratamientos en salmón coho y salmón del atlántico

Se identificaron embriones deformes en muestras aleatorias y clasificación de las malformaciones en ambas especies y en los distintos grupos.

5.2.1. Observación macroscópica.

Cuadro N° 4. Número y porcentaje de embriones deformes encontrados en salmón coho. Muestreo al azar a las 290 UTA, durante la temporada desove 2003. T° del agua 7,2 ° C.

Grupo	N° Ovas vivas con ojo	N° Ovas Muestreadas	N° de embriones deformes	% de embriones deformes
1	24.660	437	99	22,6
2	27.273	503	78	15,5
3	48.410	441	68	15,4
5	47.792	455	8	1,7

En el cuadro N° 4, queda en evidencia que el porcentaje de embriones malformados en todos los tratamientos fue superior al control, siendo el grupo 1 el que presenta el mayor porcentaje.

Al evaluar estadísticamente los porcentajes de embriones deformes de los distintos grupos se determinó que existe diferencia significativa entre el grupo 1 y los grupos 2 y 3. (Anexo 2.2.2).

Cuadro N° 5. Clasificación y porcentaje de las malformaciones encontradas en salmón coho. Muestreo al azar a las 290 UTA, durante la temporada desove 2003. T° del agua 7,2 °C.

Grupo	N° de ovas muestreadas	N° total de embriones deformes	Tipos de Malformaciones					
			Xifosis	%	Lordosis	%	Microftalmía	%
1	437	99	29	6,34	25	5,72	45	10,3
2	503	78	12	2,39	30	5,96	36	7,16
3	441	68	15	3,40	13	2,94	40	9,07
5	455	8	0	0	2	0,43	6	1,3
Total	1.836	253	56	12,13	70	15,05	127	27,83

En el cuadro N° 5, se observa que el principal tipo de malformación encontrada corresponde a microftalmía, la que en el grupo 1 alcanzó un 10,3 %. En cuanto a las malformaciones de la columna vertebral, el mayor porcentaje encontrado en los grupos 1 y 3 correspondió a xifosis y en el grupo 2 a lordosis. En el grupo 5 control el mayor porcentaje de embriones deformes correspondió a lordosis.

Cuadro N° 6. Número y porcentaje de embriones deformes, encontrados en salmón del atlántico, durante la temporada desove 2003. Muestreo al azar a las 290 UTA. T° del agua 7,2 °C.

Grupo	N° Ovas vivas con ojo	N° Ovas Muestreadas	N° de embriones deformes	% de embriones deformes
6	3.658	120	27	22,5
7	5.878	145	15	10,3
8	4.758	137	6	4,4

Al observar los resultados de presentación de embriones deformes en los distintos tratamientos, queda en evidencia que el grupo 6 presenta el mayor número y porcentaje de éstos.

Al evaluar estadísticamente los porcentajes de embriones deformes de los grupos tratados, se determinó que existe diferencia significativa entre los grupos 6 y los grupos 7 y 8, pero no entre los grupos 7 y 8 (Anexo 2.2.2).

Cuadro N° 7. Clasificación y porcentaje de las malformaciones encontradas en salmón del atlántico, durante la temporada desove 2003. Muestreo al azar a las 290 UTA. T° promedio del agua 7,2 ° C.

Grupo	N° de ovas muestreadas	N° total de embriones deformes	Tipos de Malformaciones									
			Xifosis	%	Lordosis	%	Microftalmía	%	Saco hidratado	%	Saco estrangulado	%
6	120	27	3	2,5	6	5	14	11,6	4	3,3	0	0
7	145	15	0	0	2	1,4	10	6,9	2	1,4	1	0,7
8	137	6	0	0	0	0	1	0,7	4	2,9	1	0,7
Total	402	48	3	2,2	8	6,4	25	19,2	12	7,6	2	1,4

Los resultados del cuadro N° 7, muestran que la microftalmía es el tipo de malformación mayoritaria en ambos grupos tratados. En el grupo 8 control la malformación que aparece en mayor número es el saco hidratado.

Al evaluar estadísticamente los porcentajes de embriones deformes de los grupos tratados, se determinó que existe diferencia significativa entre el grupo 6 y los grupos 7 y 8, pero no entre los grupos 7 y 8 (Anexo 2.2.2).

5.2.2 Observación Microscópica

Se pudo determinar a partir de la observación detallada de los embriones a la microscopía óptica que existen malformaciones simples donde se incluyen todas aquellas que afectan a un solo individuo, tales como lordosis, xifosis y microftalmía.

5.2.2.1. Lordosis.

Estos embriones se distinguen por presentar una desviación angular en sentido dorsal, la que puede estar presente en diferentes zonas del cuerpo y en diferentes niveles de intensidad (Fig. N° 1).

Al observar cortes transversales de estos embriones, en la zona de la curvatura dorsal del tronco (Fig. N° 2) aparece el tejido muscular con atrofia y desorganización. Los niveles de atrofia y desorganización muscular están relacionados directamente con el grado de curvatura corporal, desde leves a graves. En la región lateral del cuerpo el tejido muscular presenta fusión de sus fibras (Fig. N° 2).

En relación, a los órganos internos estos no evidenciaron mayor cambio estructural, sino más bien de tipo posicional.

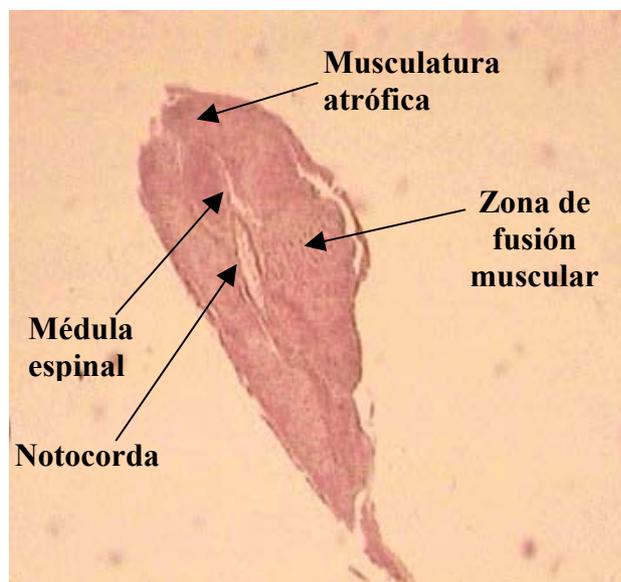


Figura N° 1: Embrión de salmón coho (470 UTA) que presenta lordosis. Tratamiento con enrofloxacino (grupo 3). 10 X. T ° promedio del agua 7,2 ° C.

Figura N° 2: Microfotografía de corte transversal de la región media del tronco, de alevín de salmón coho (470 UTA) que presenta lordosis. Tratamiento con enrofloxacino y eritromicina, desinfectado con yodo (grupo 1). 20 X. (Hematoxilina eosina).T ° promedio del agua 7,2 ° C

5.2.2.2. Xifosis.

Esta malformación se caracteriza, porque los embriones presentan el cuerpo con una curvatura ventral. Esta curvatura puede presentarse en diferentes regiones del tronco y con diferentes niveles de intensidad (Fig. N° 3).



Figura N° 3: Embrión de salmón del atlántico (320 UTA) que presenta xifosis. Tratamiento de desinfección con yodo a los 10 minutos post fecundación (grupo 6). 10 X. T ° promedio del agua 7,2 ° C.

5.2.2.3. Microftalmía.

Esta anomalía se caracteriza por presentación de ojos pequeños. Una de las causas es la inducción parcial del mesénquima encefálico sobre la vesícula óptica durante su desarrollo (Fig. N° 4). Embrión normal en igual etapa del desarrollo (Fig. N° 5), con ojos normales.

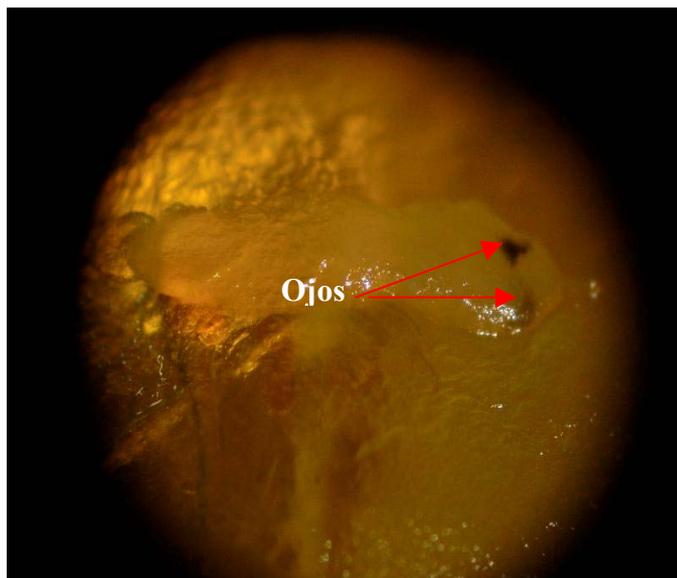


Figura N° 4: Embrión de salmón coho (290 UTA) con microftalmía. Tratamiento con enrofloxacino y eritromicina, desinfectado con yodo (grupo 1). 10 X. T ° promedio del agua 7,2 ° C.

Figura N° 5: Embrión de salmón coho (290 UTA) normal. Control (grupo 5). 10 X. T ° promedio del agua 7,2 ° C.

6. DISCUSIÓN

Cíclicamente en los últimos 10 años han ocurrido mortalidades significativas en distintos centros piscícolas del país, en las etapas de fecundación e incubación de las distintas especies de salmónidos, las cuales se han caracterizado por malformaciones embrionarias y baja fertilidad de las ovas. Al ser analizadas las ovas en laboratorio con distintos exámenes, se pudo determinar la presencia de antibióticos tanto en las ovas embrionadas y sin embrionar (Arias y col., 1995 a).

Un factor que se debe considerar durante el proceso de incubación de las ovas, es el flujo de agua entregado a cada balde. En nuestro estudio fue de 1 litro por minuto, lo que es considerado adecuado para suministrar al menos una concentración de 5 ppm de oxígeno, con una saturación del 95 % (Heen y col., 1993). Es importante señalar que durante nuestro estudio, el flujo de agua fue menor en algunos baldes e incluso llegó a cero, por obstrucción de los conductos con sedimento de origen volcánico, produciendo la muerte por asfixia de los embriones tanto en los grupos tratados como en el grupo control, en especial en salmón coho.

La temperatura de incubación promedio en este estudio fue de 7,2 ° C, la que al compararla con los resultados de Yamamoto y col. (1996), podríamos decir que está cercana al óptimo.

El pH del agua de incubación utilizada se mantuvo alrededor de 7,2, lo que corresponde a un pH neutro. Heen y col. (1993), concluyeron que un pH bajo (5,5), puede producir acidosis metabólica, lo que reduce la capacidad de la sangre de transportar oxígeno y cuando esta condición se hace crónica, reduce la resistencia a enfermedades. Por otro lado, un pH alto (8 ó 9), puede producir alcalosis metabólica lo que destruye las branquias y el tejido de las aletas.

En cuanto a las vitaminas, la vitamina C (ácido ascórbico) es necesaria para el desarrollo del tejido conectivo, hueso y cartílago, y en casos de deficiencia se produce una curvatura anormal de la columna vertebral de los peces, caracterizada por escoliosis y lordosis (curvatura lateral y ventral de la columna, respectivamente) en trucha arcoiris y salmón coho. La deficiencia de vitamina A deforma la columna, provoca una disminución en la tasa de crecimiento en peces, despigmentación de la piel y microftalmía (Lovell, 1998).

La presencia de diversas sustancias tóxicas como el cadmio, altera el desarrollo normal de los embriones retrasándolos y aumentando el tiempo en que logran la maduración, además de provocar un mayor número de embriones muertos (Witeska y col.,

1995). La deficiencia de magnesio en trucha arcoiris provoca alteraciones que incluyen reducción de la tasa de crecimiento, curvatura de la columna vertebral y degeneración de las fibras musculares (Lovell, 1998).

Es importante considerar que el porcentaje de malformaciones encontradas en alevines de salmón coho es generalmente bajo, pero hay que tener en cuenta que durante el período de incubación, gran parte de la mortalidad producida podría deberse a ovas que poseen en su interior embriones malformados, que por el daño que presentan no alcanzan a eclosionar, situación semejante a lo encontrado por Arias y col. (1995 b). Al examinar en cortes histológicos, embriones anormales de salmón coho, se pudo observar que presentaban un retraso en la formación del sistema nervioso, el cual comprometía vesículas encefálicas, médula espinal y ojos, en todos los grupos experimentales (Arias y col., 1995 b).

En este estudio, los efectos producidos por los antibióticos en los embriones de salmón coho, se hacen evidentes a partir del día 40 (290 UTA) post fecundación, lo cual es corroborado por Arias y col. (2002).

En la cuadro N° 2, referido a S. coho se puede observar que la mortalidad de ovas y embriones en el grupo (1) de reproductores tratados con enrofloxacino más eritromicina y ovas desinfectadas con yodo y el grupo (2) de reproductores tratados con enrofloxacino más eritromicina y ovas sin desinfección con yodo, superó el 60 %, siendo las más altas en todos los grupos tratados. Si se analizan los resultados de estos dos grupos, podríamos señalar que la desinfección o no con yodo, no produce diferencias en las mortalidades de estos dos grupos. El grupo (3) de reproductores tratados con enrofloxacino y ovas sin desinfección con yodo, presentó el menor porcentaje de mortalidad con 24,8 %. Si comparamos los tratamientos de los grupos 1 y 2 con el grupo 3, podríamos atribuir la diferencia de mortalidad entre estos grupos al antibiótico eritromicina aplicado 40 días antes del desove.

En el grupo (4) de reproductores sin antibióticos y ovas desinfectadas con yodo, se produjo la mortalidad de todas las ovas por asfixia debido a problemas de flujo de agua en la piscicultura. Dicha mortalidad ocurrió posterior a la aparición de ova ojo.

En la cuadro N° 3 correspondiente al resumen de la mortalidad de ovas y embriones de S. atlántico se puede observar que la mortalidad en el grupo (6) proveniente de ovas desinfectadas con yodo 10 minutos post fecundación, presenta el mayor porcentaje de mortalidad acumulada 63,1%. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Fowler (1990), el que indica un incremento significativo de la mortalidad de las ovas al realizar desinfección a los 30 minutos post fecundación utilizando una concentración de 75 ppm por 30 minutos. La alta mortalidad en el grupo 6, se podría explicar por el hecho de que las ovas tuvieron un corto período de hidratación post fecundación, solo 10 minutos, tiempo en el cual, la ova no alcanza un estado máximo de turgencia. Durante los 10 minutos de

desinfección con yodo, la ova está en proceso de hidratación, por lo que podría ingresar el yodo junto al agua. El grupo (7) de ovas desinfectadas con yodo 120 minutos post fecundación, presentó una mortalidad del 43,4%. En este grupo, a las ovas se les realizó una hidratación de 120 minutos, tiempo en el cual se alcanza el máximo de turgencia de las ovas, por lo que al realizarles la desinfección con yodo, éste solo actúa a nivel superficial del corion. Al comparar la mortalidad entre el grupo 6 y 7, esta resulta significativa (Anexo 2.2.1). Al comparar la mortalidad entre el grupo 7 (43,4 %) y el grupo control (34,6 %), esta resulta significativa (Anexo 2.2.1).

La presencia de malformaciones, son fáciles de observar en peces de mayor tamaño, no así en embriones pequeños, en los cuales se debe recurrir a la lupa o microscopio para su detección. En general, los peces con malformaciones que mueren en etapas tempranas, son retirados con la mortalidad general, eliminándose sin un recuento adecuado, situación semejante a lo encontrado por Arias y col. (1995 b).

En el cuadro N° 4, referido a S. coho se puede observar que el grupo (1) de reproductores tratados con enrofloxacino más eritromicina y ovas desinfectadas con yodo presenta el mayor porcentaje de embriones deformes, con un total de 99 embriones deformes del número de ovas muestreadas (437), lo que determina un 22,6 %. En los grupos 2 y 3, el número de embriones deformes alcanza a 78 y 68 respectivamente, del total de ovas muestreadas (503 y 441), lo que determina un 15,5 % y 15,4 % de embriones deformes, respectivamente.

Al comparar el número de embriones deformes entre el grupo 1 y los grupos 2 y 3, éstos presentan diferencias estadísticamente significativas (Anexo 2.2.2). Al comparar el número de embriones deformes entre los grupos 2 y 3, éstos no presentan diferencias estadísticamente significativas (Anexo 2.2.2). Al comparar el grupo 5 control, con los grupos 1,2 y 3, se presentan diferencias estadísticamente significativas con todos ellos.

Al analizar el tipo de malformaciones encontradas en salmón coho (cuadro N° 5) se observa que los embriones con microftalmía se presentan en mayor número en todos los grupos, 127 en total con un 27,83%, del total de las ovas muestreadas (Fig. N° 4 y N° 5). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Arias y col. (2002), quienes utilizando diferentes concentraciones de oxitetraciclina en ovas de trucha arcoiris, encontraron también embriones microftálmicos. Por otro lado, Silva (1999), al evaluar el efecto de la eritromicina en ovas recién fecundadas, observó que en todos los grupos se presentaban embriones con microftalmía.

Otro tipo de malformaciones encontradas en embriones de salmón coho (cuadro N° 5), corresponden a malformaciones de la columna vertebral, las que pueden clasificarse en xifosis y lordosis. Estas malformaciones se presentan en todos los grupos tratados, incluyendo el grupo control. El número de embriones que presentan este tipo de

malformaciones alcanza en nuestro estudio a 127, lo que corresponde a un 27,18 % del total de ovas muestreadas.

Al comparar los porcentajes de embriones de salmón coho que presentan microftalmía con aquellos que presentan malformaciones de la columna, podemos observar que los porcentajes están prácticamente igualados, para todos los grupos del estudio.

Al analizar las malformaciones de la columna vertebral en salmón coho (cuadro N° 5), se puede observar que el grupo 1 es el que presenta la mayor cantidad de embriones deformes con 29 embriones deformes con xifosis (6,34 %) y 25 embriones con lordosis (5,72 %); en segundo lugar el grupo 2, presenta 12 embriones con xifosis (2,39%) y 30 embriones con lordosis (5,96 %); en tercer lugar el grupo 3, presenta 15 embriones con xifosis (3,4 %) y 13 embriones con lordosis (2,94 %) (Fig. N° 1 y N° 2).

Es interesante destacar, en S. coho, que se presenta una relación entre los tratamientos de los diferentes grupos y las malformaciones de la columna vertebral encontradas, así tenemos que el grupo 1 cuyos reproductores fueron tratados con enrofloxacino, eritromicina y desinfección con yodo de las ovas, presentaron el mayor número de embriones malformados.

En relación con las malformaciones de la columna vertebral, Bruno y Poppe (1996), señalan que estas malformaciones pueden tener muchas formas y se reportan tanto en salmón silvestre como cultivado. Es posible observar, desviaciones en el plano horizontal como escoliosis y en el plano vertical como lordosis y xifosis.

En el cuadro N° 6, se puede observar que el grupo (6) de ovas de S. atlántico desinfectadas 10 minutos post fecundación, presenta el mayor número y porcentaje de embriones deformes, que corresponde a un 22,5 % del total de ovas con ojo muestreadas (120 ovas). En el grupo (7) desinfectado 120 minutos post fecundación, se presenta un total de 15 embriones deformes, lo que corresponde a un 10,3 % del total de ovas muestreadas (145 ovas).

Al comparar el número de embriones deformes del grupo 6 con los grupos 7 y 8, este presenta diferencias estadísticamente significativas. Al comparar el número de embriones deformes del grupo 7 con el grupo 8 (control), no se presentan diferencias estadísticamente significativas (Anexo 2.2.2).

Al analizar el tipo de malformaciones encontradas en salmón atlántico (cuadro N° 7), se observa que del total de embriones deformes (48), los que presentan microftalmía aparecen en mayor cantidad (25 embriones), lo que corresponde a un 19,2 % del total de ovas muestreadas.

Otros tipos de malformaciones encontradas en embriones de salmón atlántico (cuadro N° 7), corresponde a malformaciones de columna vertebral y saco vitelino. Las malformaciones de columna, las podemos clasificar en xifosis y lordosis y las del saco vitelino en saco hidratado y saco estrangulado. Estas malformaciones se presentan en ambos grupos tratados y en el grupo control solamente las malformaciones del saco vitelino.

El número de embriones que presentaron malformaciones de columna vertebral, correspondió a 11 embriones, lo que equivale a un 8,6 % del total de ovas muestreadas. El número de embriones que presentan malformaciones del saco vitelino, corresponde a 14 embriones, lo que equivale a un 9,0 % del total de ovas muestreadas.

Al analizar las malformaciones de columna vertebral en salmón atlántico (cuadro N° 7), se puede observar que el grupo 6, es el que presenta la mayor cantidad de embriones deformes con 3 embriones con xifosis (2,5 %) (Fig. N° 3) y 6 embriones con lordosis (5 %); en el grupo 7, solo se presentan 2 embriones con lordosis (1,4 %); y en el grupo control no se presentaron embriones con malformaciones de columna vertebral.

Al analizar las malformaciones del saco vitelino en salmón atlántico (cuadro N° 7), se puede observar que los grupos 6 y 8 control, son los que presentan la mayor cantidad de embriones con saco hidratado, 8 en total, lo que corresponde a un 6,2 % y el grupo 8 control presenta 1 embrión con saco estrangulado (0,7 %). El grupo 7, presenta 2 embriones con saco hidratado (1,4 %) y un embrión con saco estrangulado (0,7 %). Es importante aclarar que las malformaciones encontradas del saco vitelino, no son producidas por el tratamiento con yodo, sino más bien a un problema de manejo.

Es interesante destacar que se presenta una relación entre el tiempo de hidratación de la ova post fecundación y el número de malformaciones encontradas en salmón atlántico. Podemos observar que el grupo 6, en que se realizó una corta hidratación, presenta la mayor cantidad de malformaciones en general, microftalmía, xifosis, lordosis y saco hidratado. En cambio en el grupo 7, en el que se realizó una hidratación completa, se presenta una menor cantidad de embriones malformados, microftalmía, lordosis, saco hidratado y saco estrangulado.

7. CONCLUSIONES

- En la totalidad de los grupos estudiados tanto de la especie salmón coho como salmón del atlántico se produjeron mortalidades y malformaciones, causadas por el tratamiento de los reproductores con enrofloxacino, eritromicina y desinfección de las ovas con yodo.
- En salmón coho la mayor mortalidad y malformaciones embrionarias, se presentaron en el grupo, en que los reproductores recibieron el tratamiento con los antibióticos enrofloxacino, eritromicina y las ovas fueron desinfectadas con yodo.
- Dentro de las malformaciones embrionarias en la especie salmón coho, el mayor porcentaje correspondió a microftalmía, existiendo además malformaciones de columna vertebral que se clasificaron como xifosis y lordosis.
- La realización de desinfección de las ovas 120 minutos post fecundación, reduce la mortalidad y el porcentaje de malformaciones en embriones de salmón del atlántico.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- ACHURRA, M.; H. BACIGALUPO; P. BUSTOS; M. CAMPOS; P. HERRERA; C. JELVEZ; E. LARRAIN; A. REYES; C. SALAZAR. 2000. Compendio y Directorio de la Acuicultura y La Pesca de Chile.
- ADLER, R. 1974. Biología del desarrollo y malformaciones congénitas. Editorial El Ateneo Pedro García S.A., Buenos Aires.
- ARIAS, P.; P. BECKER y A. MORALES. 1995 a. Efecto de las distintas concentraciones de enrofloxacin en el desarrollo del tubo neural de embriones de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*. Departamento de patología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción.
- ARIAS, P. 1995 b. Reporte del desarrollo anormal del salmón coho. *Aq. Intern.* 7 (25): 50-51.
- ARIAS, P.; L. F. PINOCHET; A. DISI. 2002. Study of nervous tissue development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos treated with oxitetracycline. *J. Vet. Med.* Series C. 31(3):144-147.
- AUSTIN, B. 1984. The control of bacterial diseases by antimicrobial compounds. In M. Woodbine (ed), *Antimicrobials and Agriculture, benefits and Malefits*. Sevenovaks, Butterworths, London. Pp. 255-268.
- AUSTIN, B.; D.A. AUSTIN. 1988. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases in farmed and wild fish*.
- AUSTIN, B. and D.A. AUSTIN. 1999. *Bacterial fish Pathogens: Diseases of farmed and wild fish*.
- BRUNO, D.W. and T. T. POPPE. 1996. *A colours Atlas of Salmon diseases*. Academic Press, London.
- EDWARDS, D.J. 1978. *Salmon and trout farming in Norway*. Fishing News Books, Farnham, England.
- ESTAY, F.; N.F. DIAZ; L. VALLADARES; G. DAZAROLA. 1995. Manejo reproductivo de salmónidos. Bases biológicas y manejo de un stock de peces reproductores. (serie de publicaciones para la acuicultura).
- EVELYN, T. P. T.; J. E. KETCHESAN and L. PROSPERI-PORTA. 1986 a. Use of erythromycin as means of prevention vertical transmission of *Renibacterium salmoninarum*. *Dis. Aqua. Org.* 2:7-11.

- EVELYN, T.P.T.; L. PROSPERI-PORTA and J.E. KETCHETSON. 1986b. Persistence of the kidney-disease bacterium, *Renibacterium salmoninarum*, in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), eggs treated during and after water-hardening with povidone-iodine. *J. Fish Dis.* 9, 461-464.
- FOWLER, L.G. and J.L. BANKS. 1990. Iodophoro toxicity to eggs and fry of fall Chinook Salmon. *The Progr. Fish Cult.* 52.176-178.
- GARCIA, C.; C. GALLEGUILLOS. 1990. Estudio preliminar de los efectos del antibiótico Flavomicin en la productividad de la Trucha arco iris. Arch. Med. Vet. Número extraordinario. Resúmenes de trabajos del congreso de Medicina Veterinaria. Resumen n° 137. Valdivia. Chile.
- GORDON, M. R.; K. C. KLOTINS; V. M. CAMPBELL; M. M. COOPER. 1987. Farmed salmon broodstock management. Sea-1 Aquafarms, Vancouver B.C.
- HANKE, J. 1997. Estadísticas para negocios. 2da Ed. McGraw-Hill.
- HEEN, K.; R.L. MONAHAN; F. UTTER. 1993. Salmon Aquaculture. Great Britain by Fishing New Books, and Division of Balckwell Scientific. Publications: Osney Mead, Oxford OX2 OEL.
- INGLIS V.; N.R. BROMAGE; R.J. ROBERTS. 1993. Bacterial diseases of fish. Great Britain by Blackwell Scientific: Osney Mead, Oxford OX2 OEL.
- JACOBSEN, M. D. 1989. Whit drawl times of fresh water rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, after treatment whit oxolinic acid, oxitetracycline and trimetroprin. *J. Fish Dis.* 12: 29-36.
- KARUNASAGAR I.; I KANUSAGAR; A. REILLY. 1999. Aquaculture and biotechnology. Enfield, U.S.A: Science Publishing.
- LOVELL, T. 1998. Nutrition and feeding of fish. Boston: Kluwer Academic.
- Mc. KRACKEN, A.; J. J. O'BRIEN and N. CAMPBELL. 1976. Antibiotic Residues and their Recovery from Animal Tissues. *J. Appl. Bacteriol.* 41:129-135.
- MIDLEN, A and T. REEDING. 1998. Environmental management for aquaculture Dordrecht; the Netherlands: Kluwer Academic.
- MOFFIT, C.M. and T.C. BJORNN. 1989. Protection of Chinook salmon smolts with oral doses of erythromycin against acute challenges of *Renibacterium salmoninarum*. *J. Aqua. Anim. Healt.*
- ROBERTS, R.J. , SHEPERD. 1986. Handbook of trout and salmon diseases. 2nd. Ed., Fishing News Books, Oxford.

- SANCHEZ,V. 2002. Salmonicultura: Nacionalización de la producción de ovas. *Aquanoticias* (Dic. 2002): 6-9.
- SILVA, R. 1999. Efecto de la eritromicina en el desarrollo del tubo neural en embriones de salmón coho (*O. kisutch*). Tesis M V. Universidad de Concepción. Facultad Cs.Vet. Chillán. Chile.
- SCHARPERCLAUS,W. 1991. Fish diseases, Vol. .2. 5th Ed., Amerind Publishing Co., New Delhi.
- STICKNEY, R. R.; S. S. JOHNSON; M. RUST; G. TREECE; G. WEDEMEYER. 2000. Encyclopaedia of Aquaculture.
- TACON, G.J. 1995. Ictiopatología nutricional: Signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados. FAO. Documento técnico de pesca.
- THUVANDER, A. 1990. The immune system of salmon fish: Establishment for assessing effects of aquatic pollutants on the immune response.
- WITESKA, M. ; B. JEZIERSKA; J. CHABER. 1995. The influence of cadmium on common carp embryos and larve. *Aquaculture*. 129 (1-4):129-132.
- YAMAMOTO, T. S.; KOBAYASHI W. y KURAMOTO T. 1996. Twin malformation induced in chum salmon eggs by elevated water temperature, whit a suggestion as to its mechanism. *Can. J. Zoo-Revue Canadiense Zoologie*.

9. ANEXOS

ANEXO 1.

Protocolo N° 1.

Solución aclaradora del Corion:

1/3 Ácido acético.
1/3 Glicerol.
1/3 Etanol.

MICROSCOPIA OPTICA:

Los embriones de salmón fueron fijados en BOUIN, que corresponde a una mezcla de ácido pícrico al 1,3 %, formalina al 10% y ácido acético glacial al 5%.

Protocolo N° 2:

Deshidratación de las muestras fijadas.

1.- Alcohol 50°

Las muestras fueron mantenidas en alcohol de 50° por un tiempo de 6 días hasta que en él último recambio se notaba el alcohol casi transparente.

Alcohol 70° por 30 minutos.
Alcohol 80° por 30 minutos.
Alcohol 90° por 30 minutos.
Alcohol 96° por 30 minutos.
Alcohol 100° por 20 minutos.

2.- Alcohol 100° + butanol (1:1) por 30 minutos.

Butanol por 15 minutos.
Butanol por 15 minutos.

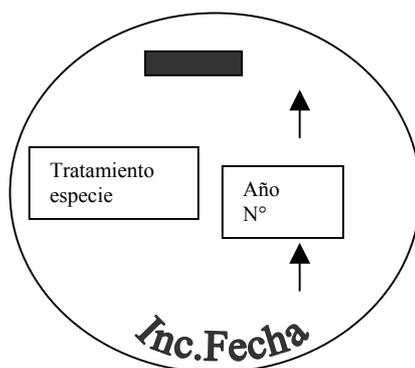
3.- Butanol + Paraplast (se calienta a 56° - 57° C, para mezclarlo con el butanol, en una proporción 1:1) por 30 minutos. Luego se les da un lavado en paraplast.

Paraplast 1 por 30 minutos a 56°- 57° C.

Paraplast 2 por 30 minutos a 56°- 57° C.

4.- Inclusión en Paraplast.

Utilizamos placas petri chicas plásticas, se les unta con vaselina sólida en el fondo para pegar un papel con él rotulo de la muestra y para que no se pegue el paraplast a la placa petri. En el rótulo del papel, el rectángulo pintado de negro (lápiz grafito), es el lugar de ubicación de la muestra dispuesta según el corte que se le hará (corte sagital). En la zona media izquierda (bajo la flecha, que indica la dirección de la muestra) se coloca el nombre de la especie a trabajar y en la zona media derecha, el año de extracción de la muestra y él numero o letra según la cantidad del mismo año. Abajo se escribe Inclusión y la fecha de esta.



Una vez listas las placas petri con vaselina y el papel rotulado, se trabaja bajo la campana con un mechero encendido. Previamente se pone a calentar el paraplast a 56°- 57° C y se disponen de una cantidad de pocillos con paraplast igual a la cantidad de muestras a incluir que van a estar dentro de los pocillos, estos se mantienen encima de la estufa. Por mientras se llenan las placas petri con paraplast y cuando se nota que se pone blanco el fondo donde se encuentra el papel con el rótulo, se toma la muestra que está en los pocillos con una pinza y se pasa en un rápido lavado en otro pocillo con paraplast puro y luego se ubica en la placa petri y se deja enfriar. Una vez frío y endurecido se retira la muestra incluida de la placa petri (despegando los bordes con un "tip top") y con la palma de la mano se rota la muestra incluida para despegarla totalmente.

Posteriormente procedemos al tallado de la muestra en forma de cuadrado. Posteriormente se realizan cortes de 7 µm en el micrótopo Spencer 820, las tiras de cortes de la muestra se toman con pinceles los que se llevan a un baño con agua temperada (Electrothermal) a 47° C. Aquí los cortes flotan en el agua y se pueden manipular u ordenar con los pinceles para montarlos en un portaobjetos los que llevan tiras de 8 muestras aproximadamente. Los portaobjetos previamente se untan con una mezcla que

lleva albúmina de huevo, que sirve tanto para acomodar las muestras en el portaobjetos cuando se monta como para su fácil adherencia. Estos portaobjetos con las muestras lo guardamos en el horno para que se sequen (hasta 2 días) y posteriormente ser teñidas.

Protocolo N° 3:

Batería de tinción corriente (Hematoxilina-Eosina).

En un canastillo de vidrio se disponen 19 portaobjetos como máximo con muestras.

1. - Desparafinar

Xilol I por 15 minutos	}	En esta fase se debe ir observando a la luz los portaobjetos para verificar que el Xilol extrajo el paraplast de las muestras.
Xilol II por 15 minutos		

1. - Hidratación.

Alcohol absoluto por 5 minutos.

Alcohol 96° por 5 minutos.

Alcohol 80° por 5 minutos.

Alcohol 70° por 5 minutos.

3. - Lavado en agua corriente por 5 minutos.

4. - Tinción Nuclear (Hematoxilina de Harris) por 3 minutos.

5. - Lavado en agua corriente por 20 minutos.

6. - Tinción Citoplasmática (Eosina alcohólica por 2 minutos).

7. - Deshidratación.

Alcohol 80° (lavado).

Alcohol 96° (lavado).

Alcohol 96° por 2 a 5 minutos (3 minutos aprox.).

Alcohol 100° por 2 a 5 minutos.

Alcohol 100° por 5 minutos.

8. - Transparencia (refringencia).

Xilol fenicado por 5 minutos.

Xilol I por 5 minutos.

Xilol II por 5 minutos ó más.

9. – Montaje en Permout. En un cubreobjeto se coloca una gota de Permout y luego se coloca sobre el portaobjeto con muestra teñida, extendiéndolo desde una esquina y se empuja con la pinza para que no queden burbujas atrapadas al interior de la muestra y si quedasen burbujas atrapadas hay que tratar de empujarlas hacia fuera.

ANEXO 2

2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Supuestos:

Todas las muestras tienen distribución normal y son independientes.

Varianza desconocida.

Nivel de confianza: 95%, es decir el nivel de significación es 5 %.

Décima de Hipótesis:

$H_0: P_1 = P_2$ $P_1 - P_2 = 0$ Es decir las proporciones son iguales
 $H_1: P_1 \neq P_2$ $P_1 - P_2 \neq 0$ Es decir las proporciones son distintas

z de la tabla al 95 % = 1,96

Estadístico de prueba Z

$$Z = \frac{(\hat{p}_1 - \hat{p}_2) - (P_1 - P_2)}{\text{sigma estimado}}$$

$$\text{Sigma estimado} = \text{raíz} (\hat{p}_1 - \hat{p}) \times \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

$$\hat{p} = \frac{X_1 + X_2}{n_1 + n_2}$$

x_i : número de malformados en la muestra i ; $i=1,2,3,4$.

N_i : tamaño de la muestra i ; $i=1,2,3,4$.

Criterio de rechazo:

Se rechaza el estadístico de prueba Z si es menor que -1,96 (Z de tabla) o mayor que 1,96 (Z de tabla).

2.2.1. Análisis Mortalidad de ovas de salmón coho y salmón del atlántico

Cuadro 8: Grupos de ovas de salmón coho a comparar usando un test estadístico.

Grupo	1	2	3	4	5
Nº de ovas iniciales	41.072	45.424	58.660	67.542	47.792

Proporción (p)	0,615	0,625	0,248	1	0,235
Nº ovas muertas	20.481	22.924	13.397	0	10.386

Comparación grupos 1 y 2

Bajo Ho, el estadístico de prueba =2,94
 Valor de tabla al 95 % =1,96

Por lo tanto se rechaza Ho, es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 1 y 3.

Bajo Ho, el estadístico de prueba =12,3
 Valor de tabla al 95 % =1,96

Por lo tanto se rechaza Ho, es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 1 y 4.

Bajo Ho, el estadístico de prueba =50,6
 Valor de tabla al 95 % =1,96

Por lo tanto se rechaza Ho, es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 1 y 5.

Bajo Ho, el estadístico de prueba =0,37
 Valor de tabla al 95 % =1,96

Por lo tanto se rechaza Ho, es decir existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto no existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 2 y 3

Bajo Ho, el estadístico de prueba =13
 Valor de tabla al 95 % =1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 2 y 4

Bajo H_0 , el estadístico de prueba =15,6
 Valor de tabla al 95 % =1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 2 y 5

Bajo H_0 , el estadístico de prueba =7,3
 Valor de tabla al 95 % =1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Cuadro 9: Grupos de ovas de salmón atlántico a comparar usando un test estadístico.

Grupo	6	7	8
Nº de ovas iniciales	6.730	8.035	6.490
Proporción (p)	0,631	0,434	0,346
Nº ovas muertas	3.555	3.050	2.046

Comparación Grupos 6 y 7:

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 24,6
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación Grupos 6 y 8:

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 33,92
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación Grupos 7 y 8:

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 11,28
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

2.2.2. Análisis estadístico de embriones deformes de salmón coho y salmón del atlántico:

Cuadro 10: Grupos de embriones de salmón coho a comparar usando un test estadístico.

Grupo	1	2	3	5
Muestra	437	503	441	455
Proporción (p)	0,226	0,155	0,154	0,017
Malformados	99	78	68	8

Comparación grupos 1 y 2

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 2,79
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 1 y 3.

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 2,72
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 1 y 5.

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 9,63
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación grupos 2 y 3

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 0,04
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto no existen diferencias estadísticamente significativas.

Comparación grupos 2 y 5

Bajo H_0 , el estadístico de prueba =7,54
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 11: Grupos de embriones de salmón del atlántico a comparar usando un test estadístico.

Grupo	6	7	8
Muestra	120	145	137
Proporción (p)	0,225	0,103	0,044
Malformados	27	15	6

Comparación Grupos 6 y 7:

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 1,97
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación Grupos 6 y 8:

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 4,41
 Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir no existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas

Comparación Grupos 7 y 8:

Bajo H_0 , el estadístico de prueba = 1,9
Valor de tabla al 95 % = 1,96

Por lo tanto se rechaza H_0 , es decir existe evidencia muestral suficiente con una confianza del 95 %, para determinar que las proporciones son iguales. Por lo tanto no existen diferencias estadísticamente significativas.

AGRADECIMIENTOS

A través de las siguientes palabras quisiera agradecer a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo para lograr la culminación de este trabajo. En especial a mi profesor patrocinante el Dr. Esteban Molinari, por su gran entrega y comprensión.

Al Dr. Oscar Goicoechea por su apoyo, sus consejos y su importante colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A los doctores Orlando Garrido y Roberto Jaramillo por su gran ayuda y disposición.

A don Valentin Peña, don Luchito, Magali y Claudio Guzmán por su colaboración y amistad.

A las empresas que hicieron posible la realización de este trabajo (Empresa Granja Marina Tornagaleones y Nisa), en especial a don Daniel Contreras gerente de la Empresa Granja Marina Tornagaleones y a don Julio Bahamonde Jefe de centro “La Cascada” de la misma empresa. A Don Boris Contreras D. Gerente de la Empresa Nisa y a don Julio del Río Jefe de centro de “Cuyamcó” propiedad de esta empresa.

Finalmente agradecer a todas aquellas personas que creyeron en mi y me han dado su amistad y fuerza para finalizar con éxito este trabajo. En especial a mi familia pilar de mi vida.