

Nota Técnica

**Tratamientos profilácticos anti-saprolegniasis
para mejorar la sobrevivencia embrionaria en ovas
de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)**

José Torres^{1*} y Carlos Fajardo²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Estación Truchícola Experimental la Mucuy. Apartado 5101, Mérida, Venezuela. *Correo electrónico: chemi65@gmail.com

²Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental, Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Durante la fase de incubación de ovas de *Oncorhynchus mykiss*, uno de los mayores problemas que se originan lo constituye el ataque producido por hongos oportunistas presentes en el agua. Los hongos pertenecientes al género *Saprolegnia* son los patógenos que atacan más frecuentemente las ovas de salmónidos. La saprolegniasis se manifiesta mediante la formación de un revestimiento de hifas que se ubican sobre las ovas muertas, trasladándose rápidamente a las ovas sanas más cercanas, causando pérdidas que oscilan entre 20 y 100%. La implementación de medidas sanitarias y profilácticas en acuicultura, especialmente en la piscicultura, juegan un papel importante en la prevención y control de las enfermedades, impidiendo que agentes patógenos ataquen ovas, larvas y peces sanos. Con el fin de estudiar el efecto de los tratamientos profilácticos sobre la incidencia de saprolegniasis y la sobrevivencia a eclosión de ovas de *O. mykiss*, en instalaciones de cultivo: se implementaron tres tratamientos: limpieza manual, formalina (250 ppm) y sal (NaCl, 30.000 ppm). Una vez eclosionadas las larvas en cada bioensayo se determinó el porcentaje de sobrevivencia. Posteriormente se tomaron las larvas sometidas a cada tratamiento y se determinó la mortalidad larval después de 15 días. Los tratamientos profilácticos lograron mejorar entre 10 y 20% la sobrevivencia embrionaria a eclosión en relación al control. Los tratamientos de sal y formalina condujeron a una mejor respuesta. No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre los tratamientos en lo que respecta a la mortalidad larval a los 15 días de la eclosión. El tratamiento con sal es el más recomendable, no solo por los resultados obtenidos en relación a la sobrevivencia embrionaria y larval, sino también por ser de bajo costo y poco tóxico, tanto para peces como humanos.

Palabras clave: trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, *Saprolegnia*, saprolegniasis.

**Prophylactic treatments anti-saprolegniasis to improve embryo
survival in eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

ABSTRACT

During the incubation of eggs of *Oncorhynchus mykiss*, one of the biggest problems that arise is the attack caused by opportunistic fungi in the water. Fungi belonging to the genus *Saprolegnia* are the most common pathogens that attack the eggs of salmon. Saprolegniasis manifested by forming a coating of hyphae that are located on dead eggs, moving quickly to the nearest healthy eggs, cause losses between 20 and 100%. Implementing preventive health measures and in aquaculture, play an important role in preventing and controlling disease, preventing pathogens from attacking eggs, larvae and fish healthy. To study the effect of prophylactic treatments on the

incidence of saprolegniasis and hatching survival of eggs of *O. mykiss*, in culture facilities three treatments were implemented: manual cleaning, formalin (250 ppm) and salt (NaCl, 30,000 ppm). Once hatched larvae in each bioassay determined the survival rate. Later the larvae were taken under each treatment and larval mortality was determined after 15 days. Prophylactic treatments able to improve between 10 and 20% embryonic survival to hatching in the control. The salt and formalin treatments led to a better response. No significant differences ($P>0.05$) between treatments in terms of larval mortality at 15 days of hatching. The salt treatment is recommended, not only for the results obtained in relation to embryonic and larval survival, but also because of its low cost and low toxicity to both fish and humans.

Keywords: rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Saprolegnia*, saprolegniasis.

INTRODUCCIÓN

En el caso específico de la fase de incubación de ovas, uno de los mayores problemas que se presentan es el ataque producido por hongos oportunistas presentes en el agua, los cuales causan pérdidas que oscilan entre 20 y 100%. El hongo *Saprolegnia sp.*, es el patógeno más frecuente en atacar las ovas de salmónidos (Roberts, 2001). La infección provocada por *Saprolegnia* es llamada saprolegniasis, y es causada por varios géneros, como: *Saprolegnia*, *Achlya*, *Dictyuchus*, *Aphanomyces*, *Leptomitus* y *Pytium* (Beakes *et al.*, 1994).

En ovas de *O. mykiss*, la saprolegniasis se manifiesta mediante la formación de un revestimiento de hifas que se ubican sobre las ovas muertas, trasladándose rápidamente a las ovas sanas más cercanas (Kinkelin y Ghithino, 1985). Es por ello, que la implementación de medidas sanitarias en acuicultura y en especial en piscicultura, es importante para prevenir y controlar enfermedades, impidiendo que agentes patógenos ataquen ovas, larvas y peces sanos.

En el caso de la industria salmonera, existen en el mercado una amplia variedad de anti-fúngicos, sin embargo, hay pocos productos aprobados para el uso en acuicultura por la FDA (Fitzpatrick *et al.*, 1995). Dentro de los químicos más usados como agente antimicótico en los últimos años se pueden señalar la formalina, el cual es uno de los pocos fungicidas acuáticos registrados en EE.UU. (Marking *et al.*, 1994), el cual actúa desactivando proteínas protoplasmáticas y enzimáticas (Hallu, 1990). También se ha utilizado la sal común como antimicótico (NaCl), la cual posee ventajas por el hecho ser muy poco tóxica y reducir el riesgo ambiental (Froelich y Engelhardt, 1996), esta tiene como mecanismo de acción la desactivación de las proteínas plasmáticas del hongo (Hallu, 1990).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Formaldehído al 37% y sal para uso industrial, cloruro de sodio al 99.5% en base seca.

Incubación

El proceso de incubación se realizó empleando contenedores de ovas de la siguiente forma: para los tratamientos, fueron utilizados 17.784 ovas de *O. mykiss*, contadas mediante volumetría y aplicando la tabla de von Bayer, de 14 días de desarrollo, distribuidas al azar en gavetas californianas con 1.482 en cada una. Se hicieron 3 réplicas por tratamiento y en la unidad experimental fue aplicado a las “ovas con ojo”. La respuesta a analizar fue mejorar la sobrevivencia embrionaria en la eclosión. En todas las gavetas se incubaron, en un sistema de tipo californiano con flujo continuo y caudal promedio de 977,4 L/min.

La temperatura promedio de incubación fue de $11\pm 0,37$ °C, llevando un registro diario. Una vez que las ovas alcanzaron el estado en el que podían observarse los ojos, específicamente ojos pigmentados (14 días de incubación, 154 UTA), se comenzaron a aplicar los tres tratamientos profilácticos. Esto se hizo cada 2 días, en total 6 veces, (24 días de incubación, 264 UTA), debido a que los embriones estaban muy activos (acto-reflejo a la luz y al tacto), por lo cual se acordó detener los tratamientos y esperar la eclosión.

Tratamientos

En el tratamiento a) Control: las 3 réplicas se incubaron con flujo de agua continuo durante todo el proceso (gavetas californianas), sin recibir tratamiento profiláctico. b) Limpieza manual o picado: las réplicas

se incubaron de igual forma que el control pero cada 2 días se extrajeron los huevos muertos o infértiles de forma manual con ayuda de una pinza y/o un seccionador. c) Formalina (250 ppm): las réplicas se incubaron con flujo continuo como se explicó anteriormente.

Luego, extrayendo el agua de las gavetas, las ovas se sometieron a un baño estático en la solución de formalina, dejándolas sumergidas durante 60 min. Transcurrido el tiempo se extrajo la solución de formalina y se restituyó el flujo de agua dulce hasta eliminar completamente los residuos del tratamiento. Posteriormente, se continuó su incubación y se aplicó cada 2 días el mismo procedimiento. d) Sal (NaCl, 30.000 ppm): el procedimiento de tratamiento de las 3 replicas fue igual al efectuado con la formalina, excepto que en este caso se empleó una solución de 30 g/L de sal para uso industrial. Una vez eclosionadas las larvas en cada bioensayo, a partir del día 25 (275 UTA) y hasta el día 27 (295 UTA), se determinó el porcentaje de sobrevivencia. Seguidamente, se tomaron las larvas sometidas a cada tratamiento, depositándolas en una jaula con flujo continuo y calculando la mortalidad larval después de 15 días. Esto permitió proyectar el efecto o influencia de los tratamientos, durante el desarrollo embrionario en la sobrevivencia de las larvas. Para la estimación de la mortalidad larval a los 15 días se contaron todas las larvas muertas de cada réplica.

Análisis estadístico

Para los resultados de los 3 bioensayos y de la sobrevivencia larval se aplicaron las prueba de homogeneidad de varianzas y normalidad en los errores de Bartlett, Cochran, Hartley y chi-cuadrado. Para establecer si existían diferencias significativas entre los tratamientos de cada bioensayo se aplicó un ANOVA y el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de fertilización promedio fue de 92,29% y el período de incubación transcurrió en un total de 24 días (264 UTA), durante los cuales el promedio de temperatura fue de $11 \pm 0,83$ °C, presentándose brotes de saprolegniasis en las ovas control sometidas a ensayo (Figura), mientras que las ovas sometidas a los tratamientos presentaron muy pocos brotes, ninguno en el caso de la sal.

En el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de sobrevivencia a eclosión obtenido en cada tratamiento aplicado en los bioensayos. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) en lo que respecta a la magnitud de los porcentajes de eclosión obtenidos. Mediante un contraste múltiple de rango se determinó la existencia de 3 grupos homogéneos: a) control, b) limpieza manual, c) formalina y sal.

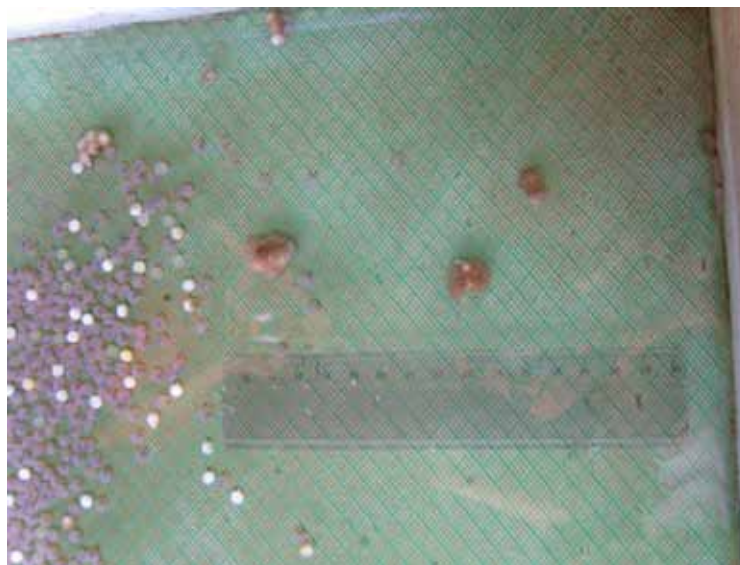


Figura. Agregado de ovas con saprolegniasis.

Cuadro 1. Porcentajes de eclosión (%) en ovas de *O. mykiss* sometidas a los diferentes tratamientos profilácticos.

Bioensayo	Replicas	Control	Limpieza manual	Formalina (250 ppm)	Sal (30.000 ppm)
1	3	69,50	80,97	84,54	86,43
2	3	67,27	79,82	84,27	85,15
3	3	69,70	82,18	87,78	87,78
Promedio	9	68,82	80,99	84,56	86,46

Se determinó que los 3 tratamientos profilácticos presentaron diferencias significativas en relación al control ($P < 0,05$), además todos los grupos presentaron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$), con la excepción de los tratamientos de sal y la formalina. Lo anterior parece indicar que tanto la aplicación de sal, formalina y en menor medida, la limpieza manual, son tratamientos profilácticos efectivos para mejorar la sobrevivencia embrionaria a eclosión en ovas de *O. mykiss*.

Este planteamiento difiere un poco de lo reportado por Edgell *et al.* (1993), quienes describieron que, en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), la aplicación de sal a concentraciones altas (20.000-30.000 ppm), es más efectiva que el yodo y la formalina para prevenir y atacar agentes fúngicos, principalmente *Saprolegnia sp.*

En un trabajo publicado por Kitancharoen *et al.* (1998), refieren que la aplicación de sal como tratamiento profiláctico es efectiva para prevenir y atacar agentes infecciosos, y que su utilización puede ser óptima en ovas de diferentes especies de agua dulce de interés comercial como bagres (Siluriformes), carpas (Cyprinidae) y trucha arco iris.

Por su parte, Froelich *et al.* (1996), señalan que la incubación de ovas usando sal como tratamiento, es poco tóxica, representa un bajo riesgo ambiental y no influye negativamente en el crecimiento de los peces, además de ser un compuesto de bajo costo y de fácil disponibilidad, agregando finalmente, que puede ser usado para reemplazar efectivamente al verde de malaquita, compuesto tóxico utilizado por largos años por la industria salmonera.

De igual forma, Marking *et al.* (1994), mencionan que ovas de trucha arco iris tratadas con sal a 30.000 ppm y formalina a 250 ppm, disminuyen los niveles de infección, mejorando los porcentajes de eclosión alrededor de 25% por sobre el control. Hay que

considerar que en el presente trabajo las ovas fueron sometidas a limpieza manual hasta los 14 días de incubación, momento en el cual se empezaron a implementar los tratamientos. Es posible que si se comienzan a emplear los tratamientos desde el inicio mismo de la incubación se obtendrían mejores resultados, si consideramos el efecto sinérgico que podría tener la combinación de la limpieza manual con la sal o la formalina.

En el Cuadro 2 se observan los resultados de la mortalidad de las larvas provenientes de las ovas tratadas después de 15 días de la eclosión. La mortalidad de ovas embrionadas después de aplicar los tratamientos, fue muy baja, además no se observó la presencia de hifas de hongos, por acción de la saprolegniasis.

Aunque no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$), el menor porcentaje de mortalidad se registró en las larvas provenientes de ovas tratadas con sal (0,702%), esto parece indicar que en relación a la sobrevivencia larval todos los tratamientos utilizados en este ensayo fueron inocuos. No se observaron efectos colaterales negativos con la aplicación de ninguno de los tratamientos.

Las larvas provenientes de las ovas tratadas no presentaron mortalidades significativas, en relación al control, a los 15 días después de la eclosión. Esto último, es corroborado por Edgell *et al.* (1993), que al aplicar sal como tratamiento en ovas de salmón chinook, no provocó elevados porcentajes de larvas anormales (9%), con relación a otros compuestos como el verde de malaquita (16%) y a lo obtenido por Barnes *et al.* (2000), en relación a la formalina.

La aplicación de sal como tratamiento profiláctico resulta altamente efectiva y aconsejable desde el punto de vista de beneficiar la obtención de grandes cantidades de ovas con el objetivo de producir alevines de interés comercial.

Cuadro 2. Porcentaje de larvas muertas (%) de *O. mykiss* sometidas a los diferentes tratamientos profilácticos después de 15 días de la eclosión.

Bioensayo	Replicas	Control	Limpieza manual	Formalina (250 ppm)	Sal (30.000 ppm)
1	3	0,610	0,653	0,718	0,572
2	3	0,762	0,771	0,611	0,728
3	3	0,823	0,890	0,877	0,806
Promedio	9	0,731	0,771	0,735	0,702

Además, por las características de las ovas de *O. mykiss* y por la tecnología de incubación utilizada, resulta indispensable desarrollar una metodología profiláctica que resguarde la producción de ovas, y que a la vez sea de fácil aplicación y bajo costo.

CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos, se puede concluir que los tratamientos profilácticos utilizados en el presente trabajo logran mejorar entre 10 y 20% la sobrevivencia embrionaria en ovas de *O. mykiss*.

De igual forma puede concluirse que con la aplicación de los tratamientos de sal (NaCl) y formalina se obtienen resultados similares y que dadas las ventajas económicas y ecológicas que tiene el uso de sal común, esta resulta en un tratamiento más deseable.

LITERATURA CITADA

Barnes, M., K. Wintersteen, R. Cordes, y W. Saylor. 2000. Use of Formalin during Incubation of Rainbow Trout Eyed Eggs. North American Journal of Aquaculture., 62: 54-59.

Beakes, G., S. Wood and A. Burr. 1994. Features which characterize Saprolegnia isolates from salmonid fish lesions? A review. In Salmon Saprolegniasis. Ed. by G. J. Mueller. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration., Portland., EE.UU.

Edgell, P., D. Lawseth, W. McLean and E. Britton. 1993. The Use of Salt Solutions to Control Fungus (Saprolegnia) Infestations on Salmon Eggs. The Prog. Fish-Cult., 55: 48-52.

Fitzpatrick, M., C. Schreck, R. and L. Chitwood. 1995. Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. Prog. Fish-Cult., 57: 153-155.

Froelich, S. and T. Engelhardt. 1996. Comparative effects of Formalin and Salt Treatments on Hatch Rate of Koi Carp Eggs. The Prog. Fish-Cult., 58: 209-211.

Hallu, R. 1990. Curso de farmacología. Prensa Veterinaria Argentina., Buenos Aires., Argentina. 2° ed.

Kinkelin, M. y P. Ghithino. 1985. Tratado de las enfermedades en peces. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza., España.

Kitancharoen, N., A. Yamamoto and K. Hatai. 1998. Effects of Sodium Chloride, Hydrogen Peroxide and Malachite Green on Fungal Infection in Rainbow Trout Eggs. Biocontrol Science., 3(2): 113-115.

Marking, L., J. Rach and T. Schreier. 1994. Evaluation of Antifungal Agents for Fish Culture. The Prog. Fish-Cult., 56(4): 209-211.

Roberts, R. 2001. Fish pathology. W.B. Saunders., Philadelphia. 3° ed.