

CONTROL DE SAPROLEGNIALES POR ACIDO ACETICO, CLORURO DE SODIO Y VERDE MALAQUITA EN HUEVOS DE TRUCHA ARCOIRIS

(Saprolegniales control by acetic acid, sodium chloride and malaquite green in eggs of rainbow trout)

Valia Vivar, M. & Fabian Bernal, L.

Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ciencias del Mar, Casilla 1020, Valparaíso, Chile.

Palabras clave: Control fúngico, Saprolegniales, huevos de trucha

Key words: Fungal control, Saprolegniales, trout eggs

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la eficacia, como agentes inhibidores del crecimiento fúngico de *Saprolegniales*, en ovas de trucha arcoiris, se procedió a la evaluación de tratamientos con ácido acético (100 ppm, 300 ppm y 500 ppm), cloruro de sodio (20 ‰) y verde malaquita (2,5 ppm). Los parámetros medidos fueron: la mortalidad total de los huevos hasta que éstos presentaran el ojo visible y la deformidad de alevines con saco. Los tratamientos se aplicaron utilizando la técnica de corte de flujo, efectuada día por medio y con tiempos de 60 minutos de duración. Este procedimiento abarcó desde la fecundación hasta la aparición de los ojos.

El verde malaquita, presentó la menor mortalidad total de huevos (12,95 %), seguido por el ácido acético a 500 ppm (16,96 %). En las ovas muertas con hongos adheridos a su superficie se registró un 6,76 % para verde malaquita y un 11,72 % para el ácido acético a 500 ppm. Con el cloruro de sodio se obtuvo la mayor proporción en ambos casos. Los huevos tratados con verde malaquita, registraron una alta incidencia de alevines con saco deformes (13,5 %), mientras para los restantes tratamientos, fueron inferiores al 7 %.

Es posible concluir que el ácido acético en concentraciones de 500 ppm puede ser utilizado como sustituto al verde malaquita para controlar infecciones micóticas en ovas, ya que no produce elevados niveles de mortalidad en los huevos y no induce a la formación de alevines con saco deformes.

INTRODUCCION

El potencial productivo de una piscicultura, está sustentado por la producción de ovas. En esta etapa, los principales obstáculos son: los problemas provocados

SUMMARY

In order to assess the efficiency as inhibiting agents of fungal growth of *Saprolegniales* in rainbow trout eggs, treatments with acetic acid (100 ppm, 300 ppm, and 500 ppm), sodium chloride (20 ‰) and malaquite green (2,5 ppm) were evaluated. Parameters taken into account were: total mortality of eggs until they made their eyes visible and showed their bags distorted.

Treatments were carried out in alternative days by using the flow cut off technique for a 60 min period. This procedure was accomplished since fecundation until the appearance of eyes.

The least total mortality of eggs (12,95%) was observed in malaquite green, followed by the acetic acid at 500 ppm (16,96%). As to dead eggs bearing fungi on their surface, 6,76% was recorder with malaquite green and 11,72% with acetic acid at 500 ppm. In both cases the highest date occurred with sodium chloride.

Eggs treated with malaquite green revealed a high incidence of fry having distorted bags (13,5%) whereas the remaining treatments were lesser than 7%.

It is concluded that the acetic acid in 500 ppm concentrations can be used as a substitute to malaquite green in order to control mycotic infections in trout eggs since it does not cause high levels of mortality in the latter nor induces the formation of fry with distorted bags.

por la alta densidad con la cual se trabaja, la manipulación de los huevos, las variaciones de temperatura y la presencia de agentes patógenos en el agua (Bailey, 1984). Todo esto hace que los huevos en desarrollo sean muy sensibles a la proliferación de infecciones micóticas, causadas

principalmente por hongos del género *Saprolegnia*.

Según Torroella (1988), estas infecciones se presentan frecuentemente en cultivos intensivos de salmónidos y generalmente son causadas por la combinación de un agente infeccioso y el estrés ambiental, situación que provoca la progresión de la enfermedad y a veces la muerte de los huevos. Es importante señalar que el acuicultor realiza variadas actividades que causan estrés en los peces, entre ellas destacan: la separación por tamaños, el transporte, la alimentación, los desdobles, las condiciones de desove, la incubación, etc. (Kitancharoen & Hatai, 1997).

La susceptibilidad de los huevos de peces a las infecciones micóticas dependen de varios factores, tales como: la alta densidad de cultivo que promueve la infección por hongos (Mendoza, 1994), el flujo de agua del sistema de incubación que no es suficiente para evitar la adhesión de las zoosporas a los huevos (Rach *et al.*, 1998) y la calidad del agua. Además, la presencia de huevos muertos y la materia orgánica disuelta en el agua provee un excelente sustrato para el asentamiento y desarrollo de los hongos lo que hace necesaria la adición de agentes antifúngicos (Willoughby & Roberts, 1992).

El verde malaquita se ha usado por muchos años como agente fungicida para combatir este tipo de infección, pero desgraciadamente diversos estudios han demostrado las características teratogénicas de este compuesto (Meyer & Jorgensen, 1984; Noga, 1993; Marking *et al.*, 1994; Rach *et al.*, 1997). Por lo anterior, investigadores como Taylor & Bailey, (1979); Alderman, (1982); Bailey, (1984); Bailey & Jeffrey, (1989); Schreck *et al.*, (1990); Edgell *et al.*, (1993); Dawson *et al.*, (1994); Marking *et al.*, (1994); Fitzpatrick *et al.*, (1995); Schreier *et al.*, (1996); Rach *et al.*, (1997), han realizado estudios para proyectar potenciales sustancias antimicóticas que reemplacen al verde malaquita.

No obstante, se hace necesario seguir investigando para determinar las medidas profilácticas a aplicar en las pisciculturas, para eliminar o minimizar las infecciones por hongos, como los procedimientos tendientes a facilitar el diagnóstico y la aplicación de terapias adecuadas y oportunas.

En el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica del ácido acético, cloruro de sodio y verde malaquita, en la mortalidad de ovas y en la deformidad de alevines con saco.

MATERIALES Y METODOS

La experiencia fue desarrollada en la Piscicultura de Río Blanco, situada a 1.420 m. de altura en la zona precordillerana de la comuna de los Andes, V región,

Chile, con temperaturas que fluctuaron entre 1 y 8°C.

Se utilizaron aproximadamente 15.000 huevos de trucha arcoiris, recién fecundados, que fueron depositados en canastillos de incubación con tres divisiones en su interior (45 x 20 x 25 cm), en cada una de las cuales se dispusieron aproximadamente 1000 huevos.

En la experiencia se utilizaron 5 canastillos de aluminio, a los que se les asignó uno de los siguientes tratamientos:

- Canastillo Nº 1: Verde malaquita (2,5 ppm)
- Canastillo Nº 2: Cloruro de sodio (20 ‰)
- Canastillo Nº 3: Acido acético (100 ppm)
- Canastillo Nº 4: Acido acético (300 ppm)
- Canastillo Nº 5: Acido acético (500 ppm)

Para la incubación de los huevos, los canastillos fueron distribuidos en bateas horizontales de fibra de vidrio con un volumen útil de 0,1056 m³. Las bateas se alimentaron con un flujo de agua ubicado en forma perpendicular a ellas por uno de sus extremos permitiendo así la independencia de los tratamientos en las mismas.

Los tratamientos se aplicaron cada 36 horas durante un lapso de 36 días, período en el cual las ovas presentaron los ojos visibles (ova con ojo). Los tratamientos comenzaron a aplicarse 3 días después de la fecundación, una vez realizado el "picking" (limpieza de huevos muertos). Consistieron en aplicar la solución respectiva en la batea de incubación y cortar el flujo del agua para reanularlo al cabo de una hora.

Seis días después de la aparición del ojo se realizó el "shocking" (caída desde 1m de alto) y posteriormente se procedió a contar y observar los huevos muertos. Con ayuda de una lupa estereoscópica se determinó el porcentaje de ovas muertas infectadas con hifas, según la siguiente proporción:

$$\% \text{ Mortalidad atribuida a hongos} = \frac{\text{Huevos con hifas} \times 100}{\text{Huevos muertos}}$$

Cuando la totalidad de las ovas sobrevivientes eclosionaron, se contó los alevines con saco que presentaban deformaciones. Para ello, se tomó una muestra aleatoria de 200 alevines con saco, desde cada una de las divisiones. Se observó a la lupa la presencia de individuos deformes, tomando como parámetros la curvatura de la columna vertebral y malformaciones de la mandíbula. Se usaron estos parámetros de deformidad debido a que son fácilmente distinguibles.

Considerando que la experiencia fue realizada de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado a un factor, balanceado (Ostle, 1970), se efectuó un Análisis de Devianza para un modelo experimental a un factor, empleándose para ello, el software GUL (Modelos Lineales Generalizados).

RESULTADOS

La mortalidad total hasta la etapa de ova con ojo, fluctuó entre 12,95 y 29,92% en los tratamientos con verde malaquita y cloruro de sodio. En las ovas tratadas con ácido acético a 500 ppm, se aprecia una mortalidad media de 16,96 %, en cambio para los tratamientos a 100 ppm y 300 ppm las mortalidades medias observadas presentan una pequeña diferencia, alcanzando valores de 20,99 % y 21,64 % respectivamente. Al hacer el análisis estadístico, se pudo determinar que ninguna de las funciones de enlace propuestas permitió un ajuste satisfactorio de los modelos; a pesar de esto, pudieron ser usadas para hacer comparaciones entre tratamientos. El ácido acético a concentraciones de 100 ppm y 300 ppm no presenta diferencias significativas en la proporción de mortalidad, lo que hace a ambos tratamientos estadísticamente iguales entre si ($D=277,54$; $X^2_{\text{tabla}} = 9,487$ con $\alpha=0,05$ y $g,l=4$). Además se puede decir que el tratamiento con verde malaquita fue el más eficaz, ya que obtuvo la menor mortalidad total, seguido luego por el tratamiento de ácido acético a 500 ppm. Finalmente el cloruro de sodio, presentó la mayor

mortalidad total del período.

En cuanto al porcentaje de ovas muertas que presentaban hifas en su superficie, se pudo apreciar que los tratamientos con verde malaquita, ácido acético a 500 ppm y sal común, siguen la misma tendencia que la mortalidad total, presentando valores promedios de 6,76 %, 11,72 % y 22,45 %, respectivamente. Los tratamientos con ácido acético a 100 ppm y 300 ppm en cambio, no registran esta tendencia (Tabla 1).

Al igual que en el análisis estadístico antes realizado, se pudo determinar que ninguna de las funciones de enlace propuestas permitió un ajuste satisfactorio de los modelos. A pesar de ello, pudieron ser usadas para comparaciones entre tratamientos ($D=322,85$; $X^2_{\text{tabla}} = 9,487$ con $\alpha=0,05$ y $g,l=4$).

El tratamiento con verde malaquita obtuvo la menor proporción de ovas muertas por hongos, además se observó que el ácido acético a concentraciones de 100 ppm y 300 ppm no presentó diferencias significativas en la proporción de ovas muertas por hongos, lo que hace a ambos tratamientos estadísticamente iguales. Finalmente se observó que la sal común, presentó la mayor propor-

Tabla 1.
Porcentaje de mortalidad obtenidas en el total de los tratamientos empleados

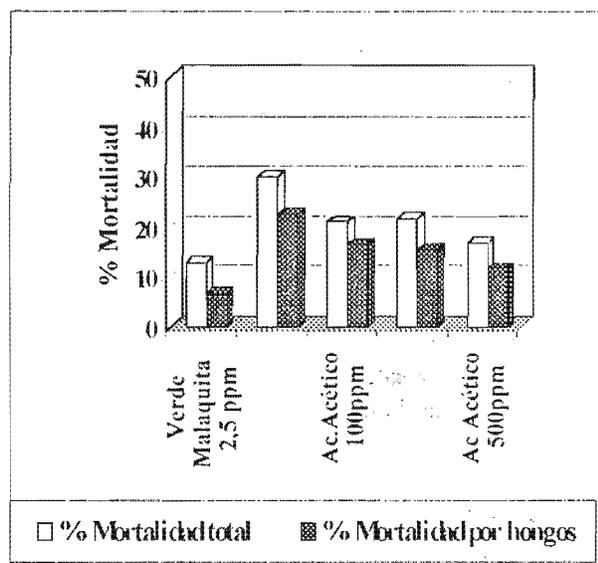
Tratamiento	Replica	%Mortalidad a ova con ojo	%Mortalidad atribuida a hongos	%Mortalidad Total a eclosión
Verde Malaquita 2.5 ppm	1	12.2	6.15	71.6
	2	12.91	6.72	39.8
	3	13.74	7.4	26.4
	Prom.	12.95(± 0.77)	6.76(± 0.62)	45.9 ((± 23.21))
Sal Común 20 o/oo	1	41.86	32.77	54.4
	2	23.26	16.95	39.9
	3	24.71	17.7	42.8
	Prom	29.92(± 10.34)	22.45 (± 8.92)	45.7 ((± 7.67))
Acido Acético 100 ppm	1	21.86	16.74	71.8
	2	20.93	17.35	54.3
	3	20.19	15.67	42.2
	Prom	20.99(± 0.83)	16.59(± 0.85)	63.0 ((± 14.88))
Acido Acético 300 ppm	1	21.53	15.86	42.6
	2	21.51	16.05	42.8
	3	21.86	14.75	42.6
	Prom.	21.64(± 0.19)	15.55(± 0.70)	42.6 ((± 0.11))
Acido Acético 500 ppm	1	14.38	9.02	30.0
	2	18.89	13.43	30.6
	3	17.63	12.7	51.1
	Prom	16.96(± 2.32)	11.72(± 2.36)	37.2 ((± 12.01))

ción de ovas muertas por hongos del período (Fig. 1).

Con respecto a la presencia de alevines con saco que presentaron deformidad de la mandíbula y/o curvatu-

quita y de 17.9% para ácido acético a 500 ppm, esta diferencia aunque favorable a ácido acético, no es estadísticamente significativa al 5%.

Figura 1.
Porcentaje de mortalidad para los distintos tratamientos



ra de la columna vertebral, el verde malaquita presentó la mayor proporción de individuos deformes, con un promedio de 13.5%. También fue posible apreciar que los restantes tratamientos obtuvieron porcentajes de deformidad muy similares, no existiendo entre ellos diferencias de más de un 1%. El tratamiento que arrojó la menor cantidad de individuos deformes fue el ácido acético a 500 ppm, con un porcentaje promedio de 6.17%. La diferencia registrada por el verde malaquita con el resto de los tratamientos, supera el 90%. El análisis estadístico determinó que todas las funciones de enlace propuestas permitían un ajuste satisfactorio de los modelos ($D=27,95$; $X^2_{\text{libre}} = 9,487$ con $\alpha=0,05$ y $g, l=4$). El tratamiento de sal común y los de ácido acético a 100, 300 y 500 ppm, no presentaron diferencias significativas en cuanto a deformidad ($\alpha=0,05$) por lo que pueden ser considerados estadísticamente iguales entre sí, pero estadísticamente diferentes respecto al verde malaquita, que presentó los mayores porcentajes de deformidad (Tabla 2).

Si se evalúan en conjunto las pérdidas por mortalidad atribuida a hongos y porcentajes de deformidad, sumando los huevos muertos a los sobrevivientes que generan alevines deformes, se puede estimar una pérdida por cada 1000 atribuible a hongos de 20,3% para verde mala-

Tabla 2.
Número de alevines con saco deforme por tratamiento en muestra de 200 alevines

Tratamiento	Rep.	Def. en Mandíbula	Curvatura en columna	Nº Total deformes
Verde Malaquita 2.5 ppm	1	17	11	28
	2	16	11	27
	3	10	16	26
Sal Común 20 o/oo	1	5	10	15
	2	6	6	12
	3	5	8	13
Acido Acético 100 ppm	1	5	8	13
	2	3	12	15
	3	8	6	14
Acido Acético 300 ppm	1	7	7	14
	2	6	9	15
	3	9	4	13
Acido Acético 500 ppm	1	9	2	11
	2	10	4	14
	3	5	7	12

DISCUSION

El empleo del verde malaquita para minimizar la infección fúngica de ovas en las pisciculturas fue uno de los métodos más utilizados a nivel mundial, hasta que se comprobó su poder teratogénico (Meyer & Jorgensen, 1984; Schwaiger *et al.*, 1995). Además, este colorante contamina el caudal de salida de estos centros de cultivo siendo potencialmente tóxico para la salud de los animales (Bailey & Jeffrey, 1989; Marking *et al.*, 1994). Debido a estos efectos el US Fish and Wildlife Service y la Investigational New Animal Drug (INAD) prohibieron el uso del verde malaquita para el tratamiento de huevos en el año 1991.

En Chile, no existe una clara regulación sobre el uso de sustancias inhibidoras del crecimiento fúngico en estas factorías y aún se sigue empleando el verde de malaquita.

El efecto de los tratamientos en la deformidad de alevines con saco, indica que al emplear una dosis de ver-

de malaquita de 2.5 ppm. la proporción de deformes que se obtuvo (13,5 %), es mayor que en los restantes tratamientos, no obstante entre ellos la diferencia es mínima, alcanzando valores entre 6 % y 7 %. Esto confirma los resultados obtenidos por Edgell *et al.*, (1993) para salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), los cuales sostienen que el verde malaquita a 1 ppm tiene alta incidencia en la deformidad de alevines con saco (16 %), superando a tratamientos con soluciones salinas (9,3 %) y huevos sin tratar (10,3 %). Las diferencias en los porcentajes de deformidad registrados en nuestra investigación y la de estos últimos autores, podrían deberse a los parámetros de deformidad establecidos: Edgell *et al.* (1993), se basan en deformidades estructurales no especificadas y problemas asociados a coagulación de la yema y saco vitelino, mientras que nuestros resultados se basan solo en deformidades estructurales (curvatura de columna y deformidad de mandíbula).

Las semejanzas observada entre los diferentes tratamientos de ácido acético y cloruro de sodio a 20 ‰, podrían deberse a que estos elementos no inciden en la deformidad de alevines con saco y por lo tanto, podrían asociarse a porcentajes normales de deformidad para individuos que en estado de ova verde no hayan sido sometidos a ningún tratamiento.

El verde malaquita confirma en nuestros resultados lo sostenido por Meyer & Jorgensen (1984) en relación a que el uso de este elemento provoca efectos mutagénicos y teratogénicos que pueden ser apreciados por la presencia de alevines con anomalías en columna, cabeza, aletas y cola. Autores como, Alderman (1991), Schwaiger *et al.*, (1995), señalan que las deformidades se deben a que este elemento actúa a nivel cromosómico.

Las mayores mortalidades totales atribuidas a hongos, ocurrieron en los tratamientos con cloruro de sodio, no obstante la sal común, sal de mar y mezclas de cloruro de sodio y cloruro de calcio se han sugerido para controlar hongos durante la etapa de incubación, además el cloruro de sodio se ha utilizado ampliamente como agente terapéutico y para reducir el estrés de los peces en cautiverio (Schreier *et al.*, 1996).

Taylor & Bailey (1979) señalan que introduciendo los huevos de salmón rosado (*O. gorbuscha*) en agua de mar durante 2 a 3 horas diarias se puede controlar efectivamente *Saprolegnia diclina*. Marking *et al.*, (1994) encontraron, en huevos de salmón que soluciones salinas de 20 ‰ son tan efectivas en el control de hongos como 1 ppm de verde malaquita, similares resultados fueron reportados por Edgell *et al.*, (1993), quienes al tratar huevos de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), con cloruro de sodio a concentraciones de 15 ‰, 17,5 ‰ y 20 ‰ por 60 minutos y tres veces por semana, registraron mortali-

dades de 20,7 %, 17,1 % y 10,2 % respectivamente, este último porcentaje fue similar al que obtuvieron con verde malaquita, que presentó mortalidades de 8,8 %. En nuestra investigación, la mortalidad observada al 20 ‰ de cloruro de sodio, fue de 29,95 %, a pesar de contar con un tiempo de duración similar e igual periodicidad en la aplicación del tratamiento; la diferencia entre los resultados podrían deberse a las condiciones experimentales.

La eficacia del ácido acético se asocia con su acción antimicrobiana, que Fennema (1993), considera similar a la de otros ácidos usados en la preservación de alimentos, ya que esta aumenta al disminuir el pH. Además señala, que la propiedad de inhibir la reproducción, el crecimiento y por tanto la actividad de los microorganismos, se debe a que este elemento puede generar interferencias en las actividades enzimáticas y en la membrana celular. Schmidt-Hebbel (1979), sostiene que la molécula no disociada del ácido penetra la membrana celular de los microorganismos y se disocia dentro de las células, incrementando la acidez y produciendo niveles tóxicos. De los tratamientos con ácido acético empleados, el que presentó mejores resultados, fue a 500ppm, Marking *et al.*, (1994), señalan que el ácido acético a 300 ppm inhibe el crecimiento de hongos, a 400 ppm es efectivo para controlar su aparición y sobre 1000 ppm son tóxicos para los huevos, no obstante, estos autores no recomiendan su uso como fungicida por la acidificación del medio.

Basándonos en Fennema (1993) y Schmidt-Hebbel (1979), consideramos que esta reducción del pH explicaría la efectividad del ácido acético a 500 ppm; en cambio las menores, resultaron ser estadísticamente iguales. Nuestras diferencias en los resultados, pueden deberse a las condiciones experimentales en que se realizaron los estudios; la investigación de Marking *et al.*, (1994), se efectuó a temperatura de 12°C, en bateas verticales de incubación y flujos de agua constantes, inoculando los huevos con hongos. En cambio en nuestro estudio, se utilizaron bateas horizontales, flujos de agua variables y temperaturas entre 1°C y 8°C.

Es posible concluir que el ácido acético en concentraciones de 500 ppm puede ser utilizado como sustituto al verde malaquita para controlar infecciones micóticas en ovas.

REFERENCIAS

- Alderman, D. (1982). In vitro testing of fisheries chemotherapeutants. *Journal of Fish Diseases* 5:113-123
- Bailey T.A. (1984). Effects of twenty-five compounds on four species of aquatic fungi (Saprolegniales) pathogenic to fish. *Aquaculture* 38:97-104
- Bailey, T.A. & Jeffrey, S.M. (1989). Evaluation of 215 candidate

- fungicides for use in fish culture. U.S. Fish and Wildlife Service. Investigations in Fish Control 99
- Dawson, V.K.; Rach, J.J.; Schreier, T.M. (1994). Hydrogen peroxide as a fungicide for fish culture. Bull. Aquacult. Assoc. Canada. 94:54-56
- Edgell, P.D.; Lawsett, D.; McLean, W.; Britton, E. (1993). The use salt solutions to control fungus (*Saprolegnia*) infestations on salmon eggs. Progressive fish-culturist. 55:42-48
- Fennema, O. (1993). Química de los alimentos. Editorial Acribia S.A.Zaragoza.
- Fitzpatrick, M.C.; Schreck, C.; Chitwood, R. (1995). Evaluation of tree candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. Progressive fish-cult. 57:153-15
- Kitancharoen, N. & Hatai, K. (1996). Experimental infection of *Saprolegnia* spp. In rainbow trout eggs. Fish-Pathol. 31:49-50
- Marking, L.L.; Rach, J.J.; Schreier, T.M. (1994). Evaluation of antifungal agents for fish culture. Progressive fish-culturist 56:225-231
- Mendoza, J. (1994). Efecto de la alta densidad de incubación, con y sin antifúngicos, sobre la mortalidad de ovas verdes de trucha arcoiris, variedad donaldson. Memoria de título presentada a la facultad de medicina veterinaria de la Universidad de Concepción para optar al título de Médico veterinario, Chillán, Chile.
- Meyer, F.P. & Jorgenson, T.A. (1983). Teratological and other effects of malachite green on development in rabbits and rainbow trout. Trans. of the Amer. Fish. Soc. 112:818-824
- Ostle, B. (1970). Estadística aplicada. Técnicas de la estadística moderna. Editorial Limusa_Wiley, S.A. Ciudad de México.
- Rach, J.J.; Gaikowski, M.P.; Howe, G.E.; Schreier, T.M. (1998). Evaluation of the toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm-and-coolwater fishes. Aquaculture 165:11-25
- Schreck, C.; Fitzpatrick, M.; Marking, L.L.; Rach, J.J.; Jeffrey, S.M. (1990). Research to identify effective antifungal agents. Bonneville Power Administration, Portly, Oregon.
- Schreier, T.M.; Rach, J.J.; Howe, G.E. (1996). Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. Aquaculture 140:323-331
- Schwaiger, J.B.; Worle, B.; Wahl-Geiger, R.; Negele, R.D. (1995). Evaluation of genotoxic effects of malachite green oxalat by two in vivo test using adult fish eggs. Institute for Water Research, Bavarian State.
- Taylor, S.G. & Bailey, J.E. (1979). *Saprolegnia*: control of fungus on incubation eggs of pink salmon by treatment with seawater. Progressive fish-culturist. 41:181-183
- Torroella, J.J. (1988). Aspectos generales de patología infecciosa. Departamento de Microbiología. Universidad de Barcelona.
- Willoughby, L.F. & Roberts, R.J. (1992). Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia* in salmonid fish hatcheries. Journal of Fish Disease 15:1-13