

**Determinación del efecto fungicida de diferentes
tratamientos en ovas de pejerrey *Odontesthes
bonariensis* infectados por Saprolegniales
(Saprolegniales-Oomycetes)**

Ing. SUANI GIOVANNA PACHECO-MARINO

Director: Dr. ALFREDO SALIBIÁN

Co-Directora: Dra. MÓNICA STECIOW

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Naturales

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata

2010

A Nico,

*la lucidez cuando no pienso, la voluntad cuando desisto,
la calma cuando enfurezco.*

Agradecimientos

- A mi director de tesis, Dr. Alfredo Salibián, por permitirme trabajar bajo su dirección y brindarme tan generosamente todo su conocimiento, experiencia y especialmente por confiar en mí.
- A mi codirectora la Dra. Mónica Steciow, por brindarme la codirección, y por la colaboración en la realización de esta tesis.
- A los doctores Darío Colautti, Claudia López-Lastra y Noemí Verrengia por la constructiva revisión crítica del manuscrito.
- Al CONICET por la financiación del doctorado a través de las becas otorgadas que me permitieron llevar a cabo este estudio.
- A las autoridades e integrantes del Instituto de Botánica Spegazzini, por la ayuda brindada.
- A la Dra. Nilda Fink, titular de la Cátedra de Hematología de la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme proporcionado el lugar de trabajo y las facilidades necesarias para la realización de los ensayos de la presente tesis.
- Al Lic. Gustavo Berasain de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, por la provisión de las ovas embrionadas utilizadas en los ensayos de esta tesis.
- A la Dra. Marta Cabello por su colaboración en la determinación morfológica de las especies fúngicas encontradas.
- Al Dr. Eduardo Jimeno, titular de la Cátedra de Patología General, por facilitarme el acceso a sus instalaciones. A la Lic. Rosa Villegas de Guido por

compartir sus conocimientos en técnicas histológicas y ayudarme en el procesamiento de las muestras. Al Lic. Nicolás García Romero por su amistad y ayuda desinteresada en múltiples aspectos, durante los inicios de esta travesía.

- En la Cátedra de Histología y Embriología animal al Dr. Claudio Barbeito, no sólo por su colaboración en la descripción histopatológica de las muestras, sino también por sus consejos y su buena predisposición para ayudarme cuando lo requerí. A Rubén por la colaboración en el procesamiento de las muestras y a la Lic. Silvia Plaul, por su amistad y oído.
- En la Cátedra de Hematología de la Facultad de Ciencias Exactas, a Mariana Gonzáles y Susana Tinelli por su amistad, cariño y paciencia a toda prueba.
- A mis compañeros y amigos del Instituto de Botánica Spegazzini: Natalia Alegruchi, María Luz Arellano, Ana María Busshinsky, Lorena Eliádes, Gabriela Irrazabal, Agustina Marano, Mario Saparrat y a Silvana Velásquez, por su presencia y ayuda en los momentos difíciles.
- A mis amigos/as Silvina Brocardo, Carlos Beghelini, Fernanda Ciocchi, Romina Della Vedova, Delfina Galleri, Alejandra Priani les agradezco su amistad sincera y desinteresada.
- A toda mi familia, a mi esposo, y especialmente a mis padres por haberme enseñado a no rendirme ante lo adversas que pueden llegar a ser las circunstancias.

Resumen

El objetivo principal de esta tesis es la evaluación de la capacidad fungicida de algunas sustancias ampliamente utilizadas en acuicultura como desinfectantes de superficie sobre ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Cuvier y Valenciennes) infectadas por Saprolegniales. En este trabajo se propone un modelo de investigación causal, en el que los resultados obtenidos en un primer capítulo son utilizados para plantear, formular y organizar el siguiente y así sucesivamente hasta llegar a las conclusiones finales. Para tales fines primeramente se realizó el aislamiento e identificación de los organismos y la microbiota asociada a las ovas de pejerrey (*O. bonariensis*), determinando el grado de patogenicidad de algunas de las cepas aisladas mediante el estudio histopatológico de las ovas infectadas. Se encontraron a diversos organismos de Reino Straminiplia (Oomycetes- Saprolegniales) llegando a identificar morfológica y molecularmente a *Saprolegnia ferax* (Gruith.) Thuret y *Achlya racemosa* Hildebrand y también se encontraron diversos representantes de Reino Fungi, más específicamente especies anamorfos de Ascomycota de los cuales *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenwebe emend. Snyder & Hansen, y *Fusarium semitectum* Berkeley & Rabenold, fueron seleccionados para la caracterización taxonómica. Posteriormente, mediante la realización de bioensayos de toxicidad agudos se evaluó el efecto del: Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, Formalina, Ácido Acético Glacial, Ácido Acético tamponado, Ioduro de Potasio y la Iodopovidona, sobre las ovas de pejerrey (*O. bonariensis*). El principal objetivo de estos ensayos fue determinar parámetros toxicológicos letales y subletales que nos permitieran conocer los efectos de la exposición a cada una de estas sustancias, para lograr categorizarlas según su nivel de toxicidad y en base a estos datos proponer rangos de concentraciones seguros para su utilización como quimioterapéuticos. Las ovas de pejerrey exhibieron distintos grados de sensibilidad a dichas sustancias, la que también estuvo influenciada por características físico químicas del entorno. En los ensayos de toxicidad agudos el punto final fue la sobrevivencia del embrión. El Verde de Malaquita, utilizado como Control, fue la sustancia que exhibió una mayor

toxicidad, y la Iodopovidona resultó ser la sustancia menos tóxica. Al determinar el efecto de dichas sustancias sobre la tasa de eclosión encontramos que la sustancia más tóxica fue nuevamente el Verde de Malaquita, y la menos tóxica fue el Cloruro de Sodio. Estas diferencias en la sensibilidad nos llevaron a establecer relaciones entre la sobrevivencia en los ensayos de toxicidad aguda, la tasa de eclosión y los parámetros toxicológicos obtenidos.

Finalmente, bajo la luz de los hallazgos toxicológicos se realizaron ensayos para evaluar la capacidad fungicida de las sustancias propuestas sobre cuatro de las especies fúngicas asiladas de ovas de pejerrey. Éstas fueron dos cepas de Saprolegniales: *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax*, y dos cepas de especies anamorfos de Ascomycota: *Fusarium semitectum* y *Fusarium solani*. Estas cuatro especies fueron seleccionadas para ser las especies blanco en la evaluación *in vitro* de la capacidad fungicida por sus antecedentes como patógenos de organismos acuáticos. Los Saprolegniales resultaron ser sensibles a casi todas las sustancias ensayadas, exceptuando al Ácido Acético Glacial y a ambos Iodóforos. El crecimiento de ambas especies fue totalmente inhibido en concentraciones seguras de las restantes sustancias para las ovas de pejerrey. Tanto la sensibilidad como las alteraciones morfológicas fueron caracterizadas en cada especie y sustancia; a diferencia de *Saprolegnia ferax*, en *Achlya racemosa* se observaron diferentes alteraciones morfológicas como resultado de la exposición a las sustancias fungicidas. Las pruebas de desafío indicaron que la Formalina y el Ácido Acético Tamponado son las sustancias más efectivas para el control de las infecciones por *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa* respectivamente. Las cepas *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum* utilizadas en estos ensayos fueron considerablemente más resistentes a las sustancias fungicidas ensayadas que los Saprolegniales. Ninguna de las sustancias exhibió un efecto inhibitorio a concentraciones seguras para las ovas de pejerrey. Estos resultados nos indican que las estrategias de control de este tipo de infecciones deben ser distintas a las empleadas para los Saprolegniales y merecen una investigación más profunda.

Consideramos que este trabajo brinda información sobre la composición de la microbiota asociada al pejerrey (*Odontesthes bonariensis*); la sensibilidad de esta especie durante su desarrollo embrionario a algunas sustancias microbicidas; y la aptitud de las mismas como agentes fungicidas. Esperamos que la información aquí presentada pueda ser de utilidad para continuar las investigaciones relacionadas con éste

y otros aspectos que contribuyan al conocimiento y desarrollo del cultivo de esta emblemática especie.

Abstract

The main objective of this thesis is the evaluation of the fungicide effect of some substances used as surface disinfectants in aquaculture on silverside *Odontesthes bonariensis* (Cuvier y Valenciennes) eggs infected by Saprolegniales. A causal research model is adopted in this work, in which the results of every chapter are used to formulate and organize the following, until reaching the final conclusions. The first stage was the isolation and identification of the organisms and mycobiota of silverside (*O. bonariensis*) eggs, and the determination of the degree of pathogenicity of some of the isolated strains by a histopathological study of the infected eggs. Several organisms of the Straminipilia Kingdom (Oomycetes - Saprolegniales) were found, and the morphological and molecular identification of *Saprolegnia ferax* (Gruith.) Thuret and *Achlya racemosa* Hildebrand was achieved. Several members of the Fungi Kingdom were also found, more specifically anamorphic species of Ascomycota, from which *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, and *Fusarium semitectum* Berkeley & Rabénle were selected for taxonomic characterization. Then, the effect of Malachite Green, Sodium Chloride, Formalin, Glacial Acetic Acid, Buffered Acetic Acid, Potassium Iodide, and Povidone-Iodine on silverside (*O. bonariensis*) eggs was evaluated by performing acute toxicity test. The main purpose of these essays was to determine lethal and sublethal toxicologic parameters to quantify the effect of exposure to these substances, and categorize them according to their toxicity level, in order to find safe concentration ranges for their use as chemotherapeutics. The silverside eggs showed different levels of sensitivity to these substances, and the sensitivity was affected by the physicochemical characteristics of the environment. In the acute toxicity tests the *end point* was the survival of the embryo. The Malachite Green, used as a Con-

trol, was the substance exhibiting the highest toxicity, and the Iodopovidone was the least toxic substance. When evaluating the effect of these substances on the hatching rate, again the most toxic substance was Malachite Green, and the least toxic was Sodium Chloride. These differences in sensitivity allowed us to establish relationships between the survival on the acute toxicity test, the hatching rate, and the obtained toxicological parameters.

Finally, and aided by the previous toxicologic findings, assays were carried out to determine the fungicide capability of the tested substances on four of the fungic species isolated from de silverside eggs. These were two strains of Saprolegniales: *Achlya racemosa* and *Saprolegnia ferax*, and two strains of anamorphic species of Ascomycota: *Fusarium semitectum* and *Fusarium solani*. These four species were selected as targets for the *in vitro* evaluation of the fungicide effect because of their antecedents as pathogens of aquatic organisms. The Saprolegniales were found to be sensitive to most of the tested substances, except the Glacial Acetic Acid and both Iodophors. The growth of both species was completely inhibited by the remaining substances in concentrations that are safe for the silverside eggs. The sensitivity and morphologic alteration were studied for both species and every substance. *Saprolegnia ferax* did not show morphologic alterations, while *Achlya racemosa* did show different morphologic alterations as result of exposure to the fungicide substances. The *in vivo* tests showed that the Formaline and the buffered Acetic Acid were the most effective substances for control of infections of *Saprolegnia ferax* and *Achlya racemosa* respectively. The strains of *Fusarium solani* and *Fusarium semitectum* used in these assays were much more resistant than the Saprolegniales to the tested fungicide substances. None of the substances exhibited an inhibitory effect at concentrations safe for the silverside eggs. These results indicate that the control strategies of infections with these organisms should be different that the ones employed for Saprolegniales, and deserve further investigation.

In conclusion, this work gives information regarding the composition of the mycobiota associated to the silverside *Odontesthes bonariensis*, the sensitivity of this species during its embrionary development to some disinfectant substances, and the capability of these substances as fungicide agents. We expect that the information in this work will be helpful for continuing the research in related subjects, that may lead to a better understanding and development of the culture of this species.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Hipótesis y Objetivos	7
 I Organismos miceliares asociados a ovas de pejerrey	 11
 2. Reino Straminipila (Oomycetes - Saprolegniales)	 13
2.1. Introducción	13
2.2. Materiales y Métodos	17
2.2.1. Origen del material	17
2.2.2. Aislamiento e identificación del agente causal	18
2.2.3. Análisis de la secuencia del ADN	19
2.2.4. Estudio Histopatológico	19
2.2.5. Tasa de Crecimiento	19
2.2.6. Formación de caracteres taxonómicos relevantes	20
2.2.7. Análisis Estadístico	20
2.3. Resultados	21
2.3.1. Descripción de las especies	21
2.3.2. Análisis de la secuencia del ADN	25
2.3.3. Estudio Histopatológico	26
2.3.4. Efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento	26
2.3.5. Formación de caracteres taxonómicos relevantes	34
2.4. Discusión	35
 3. Reino Fungi (Anamorfos Ascomycotes)	 43
3.1. Introducción	43

3.2. Materiales y Métodos	45
3.2.1. Origen del Material	45
3.2.2. Aislamiento e Identificación del agente causal	45
3.2.3. Estudio Histopatológico	46
3.3. Resultados	46
3.3.1. Aislamiento e Identificación	46
3.3.2. Estudio Histopatológico	57
3.4. Discusión	57
 II Toxicidad de los tratamientos profilácticos	 65
 4. Evaluación de la toxicidad en ovas de pejerrey	 67
4.1. Introducción	67
4.2. Materiales y Métodos	70
4.2.1. Especímenes de estudio	70
4.2.2. Condiciones experimentales	70
4.2.3. Ensayos Toxicológicos	71
4.2.4. Determinaciones cuantitativas	74
4.3. Resultados	79
4.3.1. Porcentaje de Supervivencia	79
4.3.2. Parámetros Toxicológicos	89
4.3.3. Evolución temporal de las CL ₅₀	101
4.3.4. Análisis de la pendiente	112
4.3.5. Tasa de Eclosión	114
4.3.6. Parámetros Toxicológicos Subletales	116
4.4. Discusión	125
4.4.1. Verde de Malaquita	125
4.4.2. Cloruro de Sodio	131
4.4.3. Formaldehído	138
4.4.4. Ácido Acético	145
4.4.5. Compuestos Iodados	149

III	Capacidad fungicida de tratamientos profilácticos	157
5.	Evaluación sobre <i>Achlya racemosa</i> y <i>Saprolegnia ferax</i>	159
5.1.	Introducción	159
5.2.	Materiales y Métodos	162
5.2.1.	Efecto de los Fungicidas sobre la Tasa de Crecimiento	162
5.2.2.	Efecto de los fungicidas sobre caracteres morfológicos	164
5.2.3.	Prueba de Eficacia en ovas de pejerrey	164
5.3.	Resultados	165
5.3.1.	Efecto de los Fungicidas sobre la Tasa de Crecimiento	165
5.3.2.	Efecto de los Fungicidas sobre los caracteres morfológicos	186
5.3.3.	Prueba de Eficacia	207
5.4.	Discusión	210
6.	Evaluación sobre <i>Fusarium semitectum</i> y <i>Fusarium solani</i>	231
6.1.	Introducción	231
6.2.	Materiales y Métodos	232
6.2.1.	Análisis Estadístico	234
6.3.	Resultados	234
6.3.1.	Verde de Malaquita	235
6.3.2.	Cloruro de Sodio	238
6.3.3.	Formalina	243
6.3.4.	Ácido Acético	246
6.3.5.	Compuestos Iodados	252
6.4.	Discusión	258
7.	Conclusiones	269
A.	Medios de cultivo	273
B.	Metodología empleada para la identificación molecular	277
C.	Ecotoxicidad en peces	279
	Bibliografía	285

Lisado de abreviaturas

AcH. Ácido Acético.

AcH T. Ácido Acético tamponado.

ADR. Agua dura reconstituida.

AEM. Agar extracto de malta.

APG. Agar Papa glucosado.

APS. Agar Papa sacarosado.

ASTM. American Society for Testing and Materials.

CEAN. Centro de Ecología Aplicada de Neuquén.

CIM. Concentración Inhibitoria Media.

CL. Concentración letal.

CL₁₀ D. Concentración Letal para el 10 % de los individuos expuestos calculada con el Programa Deb ToX del modelo Biológico.

CL₅₀ D. Concentración Letal para el 50 % de los individuos expuestos calculada con el Programa Deb ToX del modelo Biológico.

CL₁₀ P. Concentración Letal para el 10 % de los individuos expuestos calculada con el método de los Probits.

CL₅₀ P. Concentración Letal para el 50 % de los individuos expuestos calculada con el método de los Probits.

CM. Corn meal harina de maiz.

CMI. Concentracion inhibitoria Minima.

DAFF. Department of Agriculture Fisheries and Forestry.

DE. Desviación Estándar.

EHC. Estación Hidrobiológica de Chascomús.

F. Formalina.

- FAO.** Food and agriculture Organization United States.
- FDA.** Food and Drug administracion United States.
- GY.** Glucosa Yeast.
- GGL.** Glucosa Glutamato.
- IC.** Inhibicion del Crecimiento.
- IIB-INTECH.** Instituto de Investigaciones Biotecnológicas- Instituto Tecnológico de Chascomús.
- INIDEP.** Instituto Nacional de investigación y Desarrollo Pesquero.
- ITS.** Internal transcript spacer (Espaciador transcripto interno).
- JEFCA.** Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.
- JICA.** Agencia de Cooperación Internacional Japón.
- NEC.** Concentracion de No Efecto.
- NOEC.** Concentracion de No efecto Observable.
- PAN.** Pesticide action networks.
- PI.** Porcentaje de Inhibición.
- PMS.** Porcentaje medio de sobrevivencia.
- PVP.** Polivinilpirrolidona.
- OIE.** Office International des Epizooties o The World Organisation for Animal Health.
- OMA.** Oat meal agar. (Agar de narina de avena).
- SA.** Solución antibiotica **SM I.** Solución madre 1.
- SNA.** Synthetic nutrient agar.
- TC.** Tasa de Crecimiento.
- TSK.** Trimmed Spearman Karber.
- US EPA.** United states Environmental Protection Agency.
- US FWS.** United states Fish and Wildlife Service.
- VM.** Verde de Malaquita.
- VLM.** Verde de leucomalaquita.
- WHO.** World Health Organization.
- YpSs.** Yeast protein Soluble starch.

Capítulo 1

Introducción

El desarrollo de la acuicultura a nivel mundial en las últimas décadas ha cobrado importancia, al punto de que se estima que en los próximos años esta actividad proveerá el 50 % del pescado consumido por la población humana. Desde 1970 al 2006, la acuicultura creció a nivel mundial un 8,8 %, siendo Latinoamérica la región que presenta una mayor tasa de crecimiento durante este periodo (FAO, 2009a). En América Latina y el Caribe el crecimiento de la producción acuícola ha logrado triplicar el promedio mundial en el mismo período, con un aumento del 22 %. Esta creciente demanda pone en la mira a la explotación de recursos autóctonos, como una fuente de desarrollo de la pesquería e impulso a las economías locales. En este contexto es indiscutible la importancia social y económica del pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier y Valenciennes), como recurso pesquero y su potencial como recurso explotable, sobre todo considerando las condiciones favorables que la región ofrece para el desarrollo esta actividad productiva.

La acuicultura del pejerrey se inició hace más de un siglo. Durante los años 1891 y 1892 se realizaron las primeras experiencias, lográndose por primera vez la reproducción artificial en 1904. En la actualidad, la amplia distribución actual del pejerrey es consecuencia de las siembras de larvas y ovas que fueron realizadas desde entonces; tanto en cuerpos de agua de la provincia de Buenos Aires como en otras provincias de la Argentina, habiéndose realizado también la exportación de ovas a otros países del mundo. Posteriormente, Ringuelet (1943) publicó el documento denominado “Piscicultura del pejerrey o Atherinicultura”, que condensa valiosa información sobre las principales pautas a considerar en la implementación de una

estación de cría de pejerrey; más adelante Mac Donagh (1946) y González-Regalado & Mastrarrigo (1948) realizaron sus respectivos aportes en lo referido a técnicas de cultivo. En la década de los ochenta se realizaron las primeras experiencias de cultivo intensivo a bajas densidades con larvas de 5 a 7 días de edad, en estanques fertilizados con alimento balanceado (Luchini et al., 1984; Reartes, 1987); también se evaluó el uso de rotíferos como alimento durante el periodo larval, y de otros tipos de alimento en diferentes densidades de siembra (Reartes & Donati, 1987; Reartes et al., 1989).

En algunos países de Latinoamérica como Bolivia y Perú también se practica la piscicultura del pejerrey, aunque de manera incipiente (Berasain et al., 2004); en Brasil otras especies del género *Odontesthes* como *O. argentiniensis* y *O. humensis* han sido objeto de cultivo (Sampaio 1992; Sampaio & Pholnor 1996; Sampaio 2006). Pero, es en Japón, donde se ha desarrollado una tecnología de manejo intensivo de manera exitosa, convirtiendo al pejerrey *O. bonariensis* en una especie de valor comercial, con una producción anual de 30 a 40 toneladas (Toda et al., 1998; López & García 2001). Desde el año 2002 el Japón, mediante la Agencia de Cooperación Internacional (JICA), ha impulsado la transferencia de tecnología destinada al desarrollo de la piscicultura del pejerrey en la Argentina. Se ha otorgado financiamiento para la investigación en este rubro, en el marco del Proyecto denominado “Investigación y Desarrollo de la Acuicultura y propagación del pejerrey”. En este proyecto participan: el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), la Estación Hidrobiológica de Chascomús (EHC), el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) y el Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN). Producto de esta conjunción de esfuerzos, en la actualidad se informa periódicamente a la comunidad científica y pesquera los resultados de las experiencias de cría realizadas, tanto en las instalaciones de la Estación Hidrobiológica de Chascomús (Berasain et al., 2000; Berasain et al., 2001; Berasain et al., 2006; Berasain et al., 2008; Velasco et al., 2008), como en ambientes naturales (Espinach Ros & Dománico 2006) y experiencias de cría semi-intensiva en jaulas flotantes con aporte alimenticio natural (Colautti & Remes Lenicov 2001). El grupo de trabajo del IIB-INTECH se ha especializado en el estudio de la biología reproductiva sobre todo en la neuroanatomía, la determinación y diferenciación sexual, así como también el estudio del efecto de xenobióticos sobre la reproducción

de esta especie (Miranda & Somoza 2001; Miranda et al., 2005; Sciara et al., 2006; Fernandino et al., 2006; Karube et al 2007; Strobl Mazzulla et al., 2008; Miranda et al., 2009; Carriquiriborde et al., 2009).

Indudablemente el desarrollo de la acuicultura está encaminado a una intensificación de los sistemas de cultivo, en donde uno de los puntos críticos a superar es lograr el control de la reproducción que permita obtener una producción masiva de larvas y controlar a su vez la expresión de caracteres deseables, tales como la velocidad de crecimiento, tolerancia a la manipulación, y resistencia a enfermedades (Reartes, 1995; Strussman, 1989; Miranda & Somoza, 2001). Otro de los inconvenientes de la cría intensiva de peces es que las condiciones de hacinamiento los hacen más vulnerables a la presencia de patógenos, no sólo contribuyendo con el estrés y posterior debilitamiento del pez, sino también con el deterioro de la calidad del medio en el que se desarrollan. Las condiciones inadecuadas de manejo repercuten en toda la población; contribuyendo a que la gran mayoría de los peces sometidos a cultivo intensivo sean susceptibles a la colonización por algún microorganismo patógeno (Holliman, 1993; Farjer & Prieto 1997).

Durante el desarrollo embrionario, los peces son más susceptibles a la Saprolegniasis, enfermedad causada por los Saprolegniales, organismos pertenecientes al Reino Straminipila, erróneamente denominados “hongos”. Éstos pueden ser capaces de colonizar ávida y rápidamente a las ovas llegando a provocar en algunos casos elevados porcentajes de mortalidad. Una forma de contrarrestar estas infecciones es la eliminación manual de los focos de diseminación, que suelen ser las ovas muertas e infectadas. Esta práctica implica un gran esfuerzo humano y dedicación por parte del personal, y además repercute negativamente en el desarrollo embrionario (Celada et al., 2004). Otra alternativa es la aplicación de desinfectantes de superficie, una práctica muy difundida en Acuicultura. Se han realizado muchos estudios para determinar cuales son las sustancias más efectivas, los tiempos de exposición y las formas de tratamiento más adecuadas para su utilización en el control de enfermedades en peces y sus ovas. La mayor parte de esta información está referida a especies de importancia económica y de mayor difusión como salmónidos, ciprínidos, etc (Noga, 1999; Treves & Brown, 2000; Romero, 2003). Estas sustancias, en su mayoría no sólo son utilizadas como fungicidas, sino también en muchos casos como parasiticidas, bactericidas y desinfectantes. La falta de información sobre la

sensibilidad del pejerrey a sustancias utilizadas como desinfectantes de superficie, y más específicamente como fungicidas, puede inducir a la utilización de dosis empleadas en otras especies de peces, desconociendo no sólo su eficacia, sino también los efectos que puedan tener sobre el pejerrey. Este es el motivo que nos ha llevado a plantear esta problemática como principal objetivo de investigación de la presente. Las sustancias fungicidas seleccionadas para el presente estudio son de utilización frecuente en acuicultura, la evaluación de la capacidad fungicida de algunas de ellas (Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, Formalina) ha sido abordada anteriormente por diversos autores en otras especies de peces. Por el contrario lado, tanto el Ácido Acético Glacial y su versión tamponada, como los Iodóforos han sido más frecuentemente utilizados como desinfectantes, habiendo sido poco estudiados sus efectos fungicidas.

En esta tesis se presentan y discuten los resultados del estudio llevado a cabo con la finalidad de determinar el efecto fungicida de diferentes sustancias sobre ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis* infectadas por Saprolegniales y otras especies fúngicas. Con el objetivo de organizar y facilitar el manejo de la información aportada, este documento se ha dividido en tres Partes. En la Parte I se abordan aspectos referidos al aislamiento e identificación de la micobiota asociada a las ovas de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. En la Parte II se determinan parámetros toxicológicos relacionados a las respuestas de las ovas de pejerrey a diferentes sustancias que podrían utilizarse como fungicidas. Por último, en la Parte III se determina el efecto que dichas sustancias ejercen sobre las especies fúngicas mencionadas en la Parte I, con el fin de identificar los tratamientos más adecuados para controlar infecciones fúngicas en ovas de pejerrey.

Tal como se mencionó previamente, en la Parte I se abordan los aspectos referidos al aislamiento e identificación de la micobiota asociada a ovas de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, determinando el grado de patogenicidad de algunas de las cepas aisladas mediante el estudio histopatológico de las ovas infectadas. En un inicio se plantearon como especies de estudio únicamente a los organismos pertenecientes al Reino Straminipila (Oomycetes - Saprolegniales), debido a que estos organismos han sido frecuentemente asociados a las micosis en ovas peces. Sin embargo, durante el desarrollo de la investigación se aislaron organismos del Reino Fungi, grupo taxonómico diverso y complejo. Debido a las diferencias sistemáticas,

biológicas y fisiológicas existentes entre ambos grupos la Parte I se compone de dos Capítulos. En el Capítulo 2 se describe la metodología seguida para el aislamiento e identificación de las especies de Reino Straminipila. Se realizaron varios aislamientos, pero se hizo énfasis en la caracterización y descripción morfológica de dos especies: *Saprolegnia ferax* (Gruith.)Thuret y *Achlya racemosa* Hildebrand, debido a que ambas forman parte de dos de los géneros más representativos de Familia Saprolegniaceae y han sido previamente reportadas como patógenos de peces. La caracterización morfológica fue realizada en nuestro laboratorio, también se realizaron estudios moleculares, pero estos fueron llevados a cabo en colaboración con el Laboratorio de Micología y Fitopatología del Instituto Jules Guyot, en la Universidad de Bourgogne, Francia. Además, se realizaron ensayos para conocer las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro*, con la finalidad de determinar las condiciones de cultivo a utilizar en los ensayos subsiguientes. Por su parte, el Capítulo 3 incluye una serie de hallazgos que involucran a diversos representantes de Reino Fungi, y más específicamente a anamorfos de Ascomycota. De las numerosas especies aisladas: *Fusarium solani*(Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, y *Fusarium semitectum* Berkeley & Rabéenle, fueron seleccionados para la caracterización taxonómica, dados sus antecedentes como patógenos de peces y otros organismos acuáticos. Debido a la vasta información disponible sobre las otras especies encontradas, no se ha realizado una caracterización morfológica de cada una de ellas; sin embargo, el material se encuentra disponible para posteriores estudios en el cepario de cultivos del Instituto de Botánica Spegazinni.

La Parte II consta de un único capítulo, el Capítulo 4. En éste se abordan los principales aspectos toxicológicos que deben ser considerados para evaluación de tratamientos terapéuticos de uso en acuicultura; esto debido a que para establecer las concentraciones terapéuticas óptimas es necesario establecer los efectos tóxicos de dichas sustancias en los organismos en las que serán utilizados (Martin, 1968). Con esta finalidad, se realizaron ensayos de toxicidad aguda para determinar algunos parámetros toxicológicos que nos proporcionen información sobre la sensibilidad del pejerrey a las sustancias químicas en estudio. En el mencionado Capítulo se describen primeramente las características principales de los individuos que serán objeto de estudio, las ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*; posteriormente se definen las condiciones experimentales, mencionando los protocolos adoptados para

la realización de los bioensayos de toxicidad aguda de 96 horas. También se describen brevemente las diferentes metodologías empleadas para la determinación de los parámetros de toxicidad aguda de los compuestos en estudio: Concentración Letal 50 (CL₅₀) Concentración Letal 10 % (CL₁₀), Concentración de No Efecto (NEC) y la concentración de efecto no observable (NOEC). Los resultados se presentan en cuatro puntos separados según el efecto observado en: 1) Efecto sobre el porcentaje de sobrevivencia; 2) Parámetros toxicológicos letales; 3) Efecto sobre la tasa de eclosión y 4) Parámetros toxicológicos subletales. En este capítulo también, se mencionan las principales características de las sustancias fungicidas propuestas, junto con una breve revisión de los efectos deletéreos que estas provocan sobre los peces y sus ovas, y se interpretan los acontecimientos biológicos implicados en su toxicidad. En este punto, toda la información obtenida es discutida y comparada con escasos hallazgos realizados en pejerrey y los aportes encontrados de otros autores en diversas especies de peces. A su vez, se comparan los niveles de toxicidad de cada una de las sustancias y se establece una relación entre los porcentajes de sobrevivencia y los parámetros toxicológicos agudos, y entre la tasa de eclosión y las concentraciones subletales.

La Parte III aborda nuevamente aspectos micológicos, pero en esta oportunidad desde un punto de vista experimental, con el objetivo principal de determinar cuáles son las sustancias que poseen un efecto letal o inhibidor y en que concentraciones éstos se manifiestan. La Parte III también se encuentra dividida en dos capítulos. En el Capítulo 5, las especies objeto de estudio fueron *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa*. Basándonos en los parámetros toxicológicos obtenidos en el capítulo anterior, se establecieron las concentraciones de ensayo, considerando como límite superior la CL₅₀ para ovas de pejerrey de cada una de las sustancias. Primeramente se presentan los resultados de los diversos “test de screening” llevados a cabo con la finalidad de conocer la sensibilidad de ambas especies a las sustancias fungicidas, mediante los cuales se evaluó el efecto sobre la tasa de crecimiento en medio agarizado. Se determinaron: el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Inhibitoria media (CIM) para ambas especies en cada sustancia. Además, se registraron las alteraciones morfológicas producidas por dichas sustancias y se evaluó su efecto sobre la producción y maduración de los órganos reproductores femeninos. Finalmente se realizaron test de eficacia *in*

vivo para corroborar la real capacidad funguicida o fungistática de las sustancias seleccionadas en medio acuoso. Esto fue realizado exponiendo a las ovas de pejerrey al micelio de ambas especies, en su fase de crecimiento activo con abundante liberación de esporas infectivas, en un medio con la concentración determinada como efectiva de alguno de los agentes fungicidas seleccionados en pasos anteriores. En el Capítulo 6 se evaluó la capacidad fungicida en *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum*. Si bien la metodología empleada para los ensayos difiere escasamente de la utilizada en el Capítulo 5, los resultados muestran notables diferencias en la respuesta a los fungicidas. Debido a que las concentraciones inhibitorias para estas especies superan ampliamente los valores de los parámetros subletales obtenidos para ovas de pejerrey no se realizaron ensayos de eficacia en estos organismos.

Finalmente, en un último Capítulo se presentan las principales conclusiones obtenidas a lo largo del desarrollo de la presente investigación. Se espera que los aportes realizados en la presente tesis doctoral sean de utilidad para quienes en la actualidad y en el futuro se dediquen a la acuicultura del pejerrey, o que también sirva de información de base para el estudio de nuevas alternativas de tratamiento de las micosis y otras enfermedades capaces de afectar al pejerrey y sus ovas.

1.1. Hipótesis y Objetivos

En base a la problemática descrita precedentemente se plantean las siguientes hipótesis:

1. Las infecciones ocasionadas por Saprolegniales son causa de mortalidad en los primeros estadios de desarrollo del pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Diversas especies de Saprolegniales están involucradas en dichos eventos. Estos organismos son capaces de provocar lesiones que pueden ser demostradas histológicamente.
2. Existen otros organismos que son capaces de conformar la microbiota asociada a los embriones del pejerrey. Éstos son capaces de infligir daño o de actuar como epibiontes.
3. Las ovas de pejerrey presentan variaciones en la respuesta a la exposición a los diferentes agentes químicos desinfectantes propuestos como fungicidas.

Éstos producen alteraciones de distinta naturaleza en el metabolismo de los embriones del pejerrey, provocando en éstos diferentes niveles de toxicidad.

4. Las características físico-químicas del agua inciden directamente en la toxicidad de algunos compuestos.
5. La tasa de eclosión puede verse afectada por la exposición a sustancias fungicidas, aún en concentraciones subletales para los embriones de pejerrey.
6. Las sustancias fungicidas ejercen un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento, la reproducción sexual y la morfología normal de las Saprolegniales.
7. La capacidad infectiva de las Saprolegniales varía según la especie. A su vez, la incidencia de micosis causadas por Saprolegniales en ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis* se verá influenciada por la sustancia elegida como tratamiento profiláctico.
8. Las sustancias fungicidas ejercen un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento de *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum*.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial fungicida de diversas sustancias de amplia utilización en acuicultura como desinfectantes de superficie, considerando sus efectos tóxicos sobre el desarrollo temprano del pejerrey *O. bonariensis*. A tal fin, se fijaron los siguientes objetivos específicos:

- Aislar e identificar a la micobiota asociada a ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*.
- Caracterizar histopatológicamente la infección fúngica por Saprolegniales y hongos anamórficos de Ascomycota en ovas.
- Evaluar las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* de las especies parásitas *Saprolegnia ferox* y *Achlya racemosa*.
- Realizar ensayos agudos con ovas de *O. bonariensis* con el objetivo de conocer la sensibilidad de esta especie a las distintas sustancias fungicidas propuestas.

- Determinar parámetros de toxicidad letales (CL_{50} 24-96h) y subletales (NOEC, NEC y CL_{10}), de las ovas de *O. bonariensis* expuestas a las distintas sustancias estudiadas.
- Determinar el efecto de las diferentes sustancias fungicidas sobre la tasa de eclosión del pejerrey *O. bonariensis*.
- Establecer, en base a los parámetros antes mencionados, una categorización de la sensibilidad a las distintas sustancias estudiadas.
- Evaluar, *in vitro*, el efecto fungicida sobre dos cepas autóctonas y patógenas de *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa*, determinando el efecto sobre la Tasa de Crecimiento (TC), la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), y el Porcentaje de Inhibición (PI).
- Describir las alteraciones morfológicas observadas en *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa* al ser expuestas a las sustancias fungicidas propuestas.
- Evaluar, *in vitro*, el efecto de determinados fungicidas sobre dos cepas autóctonas y patógenas de los Anamorfos de Ascomycota: *Fusarium semiectum* y *Fusarium solani*.

Parte I

Organismos miceliares asociados a ovas de pejerrey

Capítulo 2

Reino Straminipila (Oomycetes - Saprolegniales)

2.1. Introducción

Los denominados hongos acuáticos zoospóricos son organismos pertenecientes al Reino Straminipila, Clase Peronosporomycetes (=Oomycetes), Orden Saprolegniales (Dick, 2001b). Aunque son denominados “hongos”, estos organismos no presentan alguna relación filogenética que permita su inclusión en el Reino Fungi, puesto que poseen características morfológicas, reproductivas, genéticas, ultraestructurales, bioquímicas, y moleculares distintas a las de los hongos verdaderos (Alexopoulos et al., 1996; Milanez, 1997).

Dick (2001a), señala que las principales características morfológicas que diferencian a los Oomycetes de los hongos verdaderos son:

- Desarrollo de un talo cenocítico diploide, donde la meiosis tiene lugar en el interior de los respectivos gametangios.
- Reproducción sexual mediante contacto gametangial, produciéndose como resultado cigotas de paredes gruesas denominadas oosporas.
- Reproducción asexual mediante la formación de zoosporas heterocontas. Una zoospora primaria, con un flagelo anterior, tipo pincel, con dos hileras de mastigonemas tubulares y tripartitos; y otro posterior, tipo látigo, sin mastigone-

mas; la que luego se enquistas y da lugar a una espora secundaria reniforme con flagelos laterales.

Ultraestructuralmente se pueden observar diferencias a nivel de algunas organelas celulares, tales como: la presencia de un retículo endoplásmico, mitocondrias con crestas tubulares, un aparato de Golgi con múltiples cisternas, y la presencia de vacuolas electrodensas que contienen micolaminarias. Entre las características bioquímicas más representativas podemos mencionar: a) la pared celular esta compuesta por β 1-3 y β 1-6 glucanos, hidroxiprolina y celulosa, mientras que en los hongos verdaderos se compone principalmente por quitina; b) almacenan un polisacárido como sustancia de reserva denominado micolaminarina compuesta por β 1-3 glucanos; c) difieren en su composición de aldioles y polioles; c) utilizan rutas biosintéticas distintas a las de los Eumycota, (como la del ácido diaminopimélico para la biosíntesis de lisina y triptofano sintetasa) (Dick, 2001a, b).

Por tales razones, a lo largo de la historia, la taxonomía de estos organismos ha sufrido revisiones, habiendo sido ubicados primeramente en el Reino Protoctista y más adelante transferidos al Reino Chromista (Cavalier-Smith, 1986); Patterson (1989) y Dick (2001b), propusieron su inclusión en el Reino Straminipila, clasificación que es aceptada en la actualidad.

Las Saprolegniales, también conocidos como “mohos acuáticos” son organismos ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos continentales, estuarios y suelos húmedos. La mayoría de las especies son saprótrofas en detritos vegetales y animales; y pueden también ser encontrados como parásitos de algas, rotíferos, larvas de mosquito, crustáceos, peces y sus ovas, tanto en condiciones naturales como en sistemas de cultivo (Pickering et al., 1979; Hatai et al., 1990; Hatai & Hoshina, 1992; Kitancharoen et al., 1996; Dieguez-Urbeondo et al., 1996; Pires Zottarelli et al., 1996).

El término Saprolegniasis designa a las enfermedades causadas por organismos pertenecientes a la clase Oomycetes, denominados también Peronosporomycetes (Dick, 2001b) y más precisamente a los incluidos en el Orden Saprolegniales. De acuerdo con lo señalado por Pickering et al. (1979), no se puede inferir que todas las especies de Saprolegniales sean potenciales patógenos. Dado su carácter saprótrofo y su ubicuidad en el medio ambiente acuático, puede resultar difícil distinguir si son los agentes causales de una infección primaria o secundaria; y por ende, si estos

organismos cumplen un rol como parásitos o actúan como saprótrofos sobre una lesión preexistente.

A pesar de que muchas especies han sido implicadas en casos de Saprolegniasis, parece ser que *Saprolegnia parasitica* Coker, es la especie más frecuentemente asociada a enfermedades en peces; motivo por el cual ha sido objeto de numerosos estudios orientados a determinar los mecanismos que subyacen al desarrollo de la patogenicidad y la especificidad del hospedador.

Estos organismos son capaces de reconocer un sustrato específico, movilizarse hacia éste, a merced de sus zoosporas biflageladas, adherirse y, hasta en algunos casos, infligir daño mediante la liberación de enzimas proteolíticas que facilitan la penetración en el huésped. El quimiotaxismo, como mecanismo de reconocimiento específico del sustrato ha sido estudiado, por El-Feki et al. (2003) y Rand & Munden, (1993) quienes demostraron que las esporas de *Saprolegnia parasitica* y *Saprolegnia diclina* exhiben un quimiotaxismo positivo hacia extractos tisulares de *Oncorhynchus mykiss* y a extractos de membrana coriónica de ovas de trucha de arroyo *Salvelinus fontinalis*. Estrategias de adherencia y fijación al sustrato, tales como la ornamentación en las zoosporas secundarias, puede desempeñar un papel importante en la fijación (Pickering et al., 1979). Así mismo, la evidencia experimental presentada por Willoughby & Pickering (1977) demostró que las esporas secundarias se adhieren fácilmente a la superficie de los peces y a los pocos minutos son capaces de crecer y germinar vigorosamente pudiendo permanecer viables en estas condiciones hasta 24 horas. Aunque la espora secundaria es considerada por diversos autores como el agente infectante (Tifney 1939; Willoughby, 1977; Rand & Munden, 1993), no podemos descartar la posibilidad de que las esporas primarias, o los quistes cumplan algún rol en la infección ya que éstos estados pueden ser predominantes en determinadas condiciones ambientales (Willoughby & Pickering, 1977)

El pejerrey *Odontesthes bonariensis* Cuvier & Valenciennes 1835 (Osteichthyes, Atherinopsidae), es una especie emblemática de la región pampeana, valiosa no sólo como recurso natural sino también por su potencial para la pesca deportiva y la cría intensiva. Existe una vasta producción científica referida a aspectos bioecológicos y también sobre el desarrollado de experiencias de cultivo de esta especie (Grossman, 2001; Mancini & Grosman, 2009). No obstante, hay que destacar que

si bien existe información disponible sobre las enfermedades infecciosas que pueden afectar al pejerrey, esta es más bien de carácter general y principalmente relacionada a las parasitosis registradas en ambientes naturales de la Argentina (García Romero, 2001; Drago, 2004; Mancini et al., 2006). La mayor parte de la información sobre las afecciones y patologías en sistemas de cultivo ha sido generada en Japón, esto se debe principalmente a que los emprendimientos comerciales llevados a cabo en éste país desde 1966, han sido exitosos (Berasain et al., 1999; Mancini et al., 2000). Reportes de enfermedades bacterianas en pejerrey fueron realizados por Lawhavit et al. (1998) y Hatai & Lawhavit (1993); también se han registrado casos de “Saprolegniasis” (Lawhavit et al., 1986; Hatai et al., 1993; Kitanchaoen et al., 1995).

En la Argentina, una de las primeras menciones de enfermedades causadas por *Saprolegnia* spp. fue realizada por Ringuelet (1943); desde entonces hasta el momento los únicos estudios sistemáticos realizados, relacionados con Saprolegniales, fueron presentados por Pacheco Marino et al. (2006a), Mancini et al. (2008); Pacheco Marino & Steciow (2008); Pacheco Marino et al. (2008a); Pacheco Marino et al. (2009).

A pesar de que la presencia de estos “hongos” sobre el hospedante es fácilmente reconocida por su aspecto algodonoso, una correcta identificación a nivel de especie suele ser dificultosa, ya que ésta debe basarse principalmente en la observación, descripción y medición de caracteres morfológicos sexuales y asexuales (Seymour, 1970; Dick, 2001b; Johnson et al., 2002). Debido a que algunas especies se caracterizan por una lenta o escasa formación de dichas estructuras, diversos autores han orientado sus investigaciones a la búsqueda de otros atributos diferenciales que permitan una identificación más rápida. Es así que características morfológicas como la germinación y ornamentación de la espora (Pickering et al., 1979; Willoughby et al., 1983), o fisiológicas como la hidrólisis de la peptona, los perfiles de asimilación de carbohidratos, la hidrólisis de la urea (Wolf, 1937; Yuasa & Hatai, 1996), están siendo utilizados como parámetros adicionales para la clasificación e identificación a nivel específico. En la actualidad, se ha difundido el empleo de técnicas moleculares para la determinación y diferenciación de especies; en este contexto, la amplificación de la secuencia de nucleótidos de las regiones ITS1 e ITS2 (espaciador transcrita interno) del gen ribosomal, es utilizada como herramienta para la identificación genética de

muchos organismos, ya que abarcan secuencias con alto grado de variabilidad entre especies e incluso dentro de una misma especie (De Cock & Levesque, 2004; Paul, 2006; Paul & Bala, 2008; El Androusse et al., 2006).

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Origen del material

Para realizar la caracterización de la micobiota de ovas de pejerrey (*Odontesthes bonariensis* Cuv.), se emplearon ovas de 1-2 días post desove, las que fueron proporcionadas por la Estación Experimental de Piscicultura de Chascomús, ubicada en la ciudad de Chascomús (Provincia de Buenos Aires, Argentina); el procedimiento realizado para el aislamiento primario del agente patógeno se describe en la Figura 2.1. El material biológico se recolectó y trasladó en botellas de vidrio estéril, conteniendo agua de la estación de cría. En el laboratorio las ovas se colocaron en incubadoras de plástico de 2 L. con fotoperíodo natural, aireación y flujo constantes (recambio completo del medio cada 8 horas). Para la incubación se utilizó agua dura reconstituída (US EPA, 2002), cuyas características fueron: dureza ($160-180 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$); alcalinidad ($110-120 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) y pH, 7.6-8.0. El material empleado para la contención y transporte de las ovas fue previamente desinfectado con Cloruro de Benzalconio 1 % o esterilizado en autoclave por 20 minutos a 1 atm y 121°C . Durante la incubación, se procedió a retirar con una pipeta Pasteur descartable estéril las ovas infectadas, las que se observaron cubiertas de micelio blanco algodonoso. Este procedimiento se realizó diariamente para prevenir la propagación de la infección. Dos meses después de la incubación se observó, en un ejemplar juvenil, la presencia de una lesión en la región perianal cubierta por abundante micelio.

Tanto en el caso del juvenil como en las ovas de pejerrey, se tomaron muestras del micelio para la realización de preparados y la observación en el microscopio de características morfológicas generales de los taxa y proceder luego al aislamiento e identificación; para esto todas las ovas infectadas y las porciones de micelio provenientes del individuo infectado se mantuvieron por separado en placas de Petri estériles con agua destilada estéril.

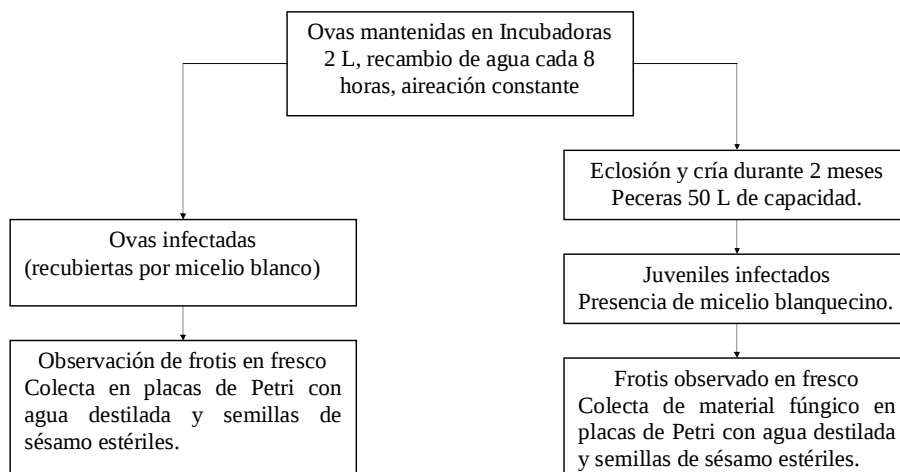


Figura 2.1: Flujograma del procedimiento realizado para aislamiento primario del agente patógeno.

2.2.2. Aislamiento e identificación del agente causal

Para el aislamiento de las cepas se siguió la metodología descrita por: Johnson (1956); Sparrow (1960); Seymour (1970) y Johnson et al. (2002). Todas las muestras fueron mantenidas en placas de Petri estériles, con agua destilada estéril empleando semillas de sésamo como sustrato de crecimiento y se mantuvieron a temperatura ambiente (15-20° C), fotoperíodo natural durante 7 a 10 días. Una vez que las semillas fueron colonizadas, una pequeña porción de micelio fue transferida asépticamente a placas de Petri con agar harina de maíz - CM -(del ingles *Cornmeal*).

Con la finalidad de obtener nuevas colonias libres de bacterias para la formación y maduración de estructuras reproductivas asexuales y sexuales, las cepas fueron purificadas mediante cultivos sucesivos de las colonias en agar harina de maíz con 1 ml de una solución antibiótica (0,5 g de Cloramfenicol y 1 g Sulfato de Estreptomicina en 200 ml de agua destilada). Luego de haber obtenido cultivos puros, un bloque de agar fue tomado del borde de la colonia en crecimiento e inoculado en una placa de Petri estéril con agua destilada y semillas de sésamo estériles, éste procedimiento se realizó por triplicado. La caracterización morfológica de las especies fue realizada mediante la descripción de las colonias formadas sobre la semillas parcialmente sumergidas en agua; se consideraron medidas tales como: el diámetro de las colonias, diámetro de los oogonios, número de oosporas por oogonio y diámetro de las oosporas; y características morfológicas relevantes como: tipo de oosporas, forma de los oogonios, disposición de las ramas anteridiales, proliferación del esporangio.

Se tomaron 50 registros de cada una de estas características en las tres repeticiones, utilizando un microscopio Olympus BX 40 equipado con la óptica de contraste de fase.

Finalmente, las cepas aisladas fueron depositadas en la colección de cultivos del herbario micológico del Instituto Spegazzini (LPSC).

2.2.3. Análisis de la secuencia del ADN de *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax*

Los estudios moleculares destinados confirmar la identidad de los aislamientos, identificados previamente en base a su morfología, como *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa*, fueron realizados por el Dr. Bernard Paul, en el laboratorio de Micología y Fitopatología, del Instituto Jules Guyot – Universidad de Bourgogne, siguiendo la metodología descrita por White et al. (1990) y El Androusse et al. (2006). Los detalles metodológicos del procedimiento se detallan en el Apéndice C.

2.2.4. Estudio Histopatológico

El estudio histopatológico se realizó siguiendo los procedimientos histológicos estándar. Se fijaron algunas ovas de pejerrey, sanas e infectadas, utilizando PBS-Formalina al 10 %, posteriormente fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes en secciones de (5 μ m), las que fueron montadas en portaobjetos de vidrio y teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E) y la tinción de Grocott (metenamina argéntica) tal como lo describe por Prophet et al. (1992).

2.2.5. Efecto del Medio de Cultivo y la Temperatura sobre la tasa de crecimiento

A partir de las cepas aisladas se realizaron subcultivos en placas de Petri de 90 x 20 mm conteniendo 20 ml de CM agar con el agregado de 1 ml de solución antibiótica mencionada anteriormente. Luego de 48 horas se tomaron, a partir del borde activo de crecimiento, inóculos de aproximadamente 2 mm de diámetro los que fueron colocados en centro de placas de Petri conteniendo 20 ml. de agar. Los inóculos fueron sembrados por triplicado en cuatro medios de cultivo agarizados: Extracto

de levadura-almidón de Emerson [YpSs] (Stevens, 1974), Glucosa Glutamato [GGI] (Seymour, 1970), Harina de maíz [CM] (Fuller & Jaworsky, 1987) y Glucosa Extracto de Levadura [GY] (Hatai & Hoshina, 1992). La composición de los medios de cultivo empleados se detalla en el Apéndice A. Las placas inoculadas fueron colocadas en cámaras de incubación a 5, 15 y 25 °C. El diámetro de la colonia en cada una de las condiciones ensayadas, se midió diariamente utilizando un calibre Vernier (precisión: 0,1 mm) hasta alcanzar el borde de la placa de Petri.

2.2.6. Efecto de la Temperatura sobre la formación de caracteres taxonómicos relevantes

Paralelamente se registró, con una frecuencia diaria y a la misma hora de la inoculación, la formación de estructuras reproductivas sexuales y asexuales (yemas), mediante la observación, a menor aumento, de las placas invertidas.

2.2.7. Análisis Estadístico

En base a los datos de crecimiento obtenidos se calculó la Tasa de Crecimiento (TC), mediante el cálculo de la pendiente empleando el método de regresión lineal para determinar el coeficiente de determinación R^2 , la ecuación de la recta y la línea de tendencia, ambas con origen en cero. Estos cálculos fueron realizados utilizando el Microsoft Excel 2002. Para determinar la existencia de diferencias significativas en las tasas de crecimiento se compararon las pendientes empleando un ANOVA de dos factores; paralelamente se analizó la interacción entre los factores Temperatura y Medio de Cultivo. Finalmente mediante el método de Tuckey HSD, del programa XL Stat 7.5., se determinó la Temperatura y el Medio de Cultivo óptimo para el desarrollo de ambas especies, considerándose como estándares de control a las placas de CM agar incubadas a 15°C.

2.3. Resultados

2.3.1. Descripción de las especies

Saprolegnia ferax (Gruith.) Thuret, Ann. Sci. Nat. Bot. 14: 229. 1850.
(Figura 2.2)

Conferva ferax Gruithuisen, Nova Acta Phys.-Med. Acad. Caes. Leop-Carol. Nat. Cur. 10: 445. 1821.

Saprolegnia molluscorum Nees von Esenbeck, Nova Acta Phys.-Med. Acad. Caes. Leop.-Carol. Natur. Cur. 11: 514. 1823.

Leptomitus ferax Agardh, Sistema Algarum, p. 49. 1824.

Achlya prolifera Pringsheim, Nova Acta Phys.-Med. Acad. Caes. Leop-Carol. Nat. Cur. 23: 399 et sqq. 1851.

Saprolegnia monoica Pringsheim, Jahrb. Wiss. Bot. 1: 292. 1858.

Achlya intermedia Bail, Amtl. Ver. Versamml. Deutsch. Natur. Aetrzte, Königsberg 35: 257. 1860.

Diplanes saprolegnoides Leitgeb, Jahrb. Wiss. Bot. 7: 385. 1869-70.

Achlya ferax (Kützing) Duncan, Proc. Roy. Soc. London 25: 253. 1876.

Saprolegnia thureti de Bary, Abh. Senckenberg Natur. Ges 12: 326. 1881. (también en de Bary & Woronin, Beitr. Morphol. Physiol. Pilze 4 1881).

Saprolegnia mixta de Bary, Bot. Zeitung (Berlin) 41: 56. 1883.

Saprolegnia monoica var. *montana* de Bary, *ibid* 46: 617. 1888.

Saprolegnia esocina Mauricio, Jahrb. Wiss. Bot. 29: 82. 1896.

Saprolegnia heterandra Mauricio, *ibid.*, p. 87. 1896.

Saprolegnia abodanica Mauricio, *ibid.*, p. 107. 1896.

Saprolegnia paradoxa Mauricio, Z. Fischerei und deren Hilfswiss. Deutsch. Fischerei-Vereins 7: 46 et seq. 1899; *non S. paradoxa* Petersen, bot. Tidsskr. 29: 379. 1909. (también en Petersen, Ann. Mycol 8: 520. 1910).

Saprolegnia floccosa Mauricio, *ibid.*, p. 50 et seq., 1899.

Saprolegnia semidioica Petersen, Bot. Tidsskr. 29: 378. 1909 (también en Petersen, Ann. Mycol. 8: 519. 1910)

Saprolegnia monoica var. *vexans* Pieters, Bot. Gaz. (Crawfordsville) 60: 489. 1915.

Saprolegnia mixta **var.** *asplundii* Gaumann, *Bot. Not.* 1918: 155. 1918.

Saprolegnia lapponica Gaumann, *ibid.*, p. 156. 1918.

Saprolegnia tokugawana Emoto, *Bot. Mag. (Tokio)* 37: 15. 1923.

Saprolegnia monoica **var.** *flocossa* (Mauricio) Cejp, *Oomycetes I, Flora CSR, Ser. B, Part 2, P. 234.* 1959.

Saprolegnia ferax **var.** *lapponica* (Gaumann) Cejp, *ibid.*, P. 245. 1959.

Saprolegnia ferax **var.** *escocina* (Maurizio) Cejp, *ibid.*, P. 246. 1959.

Saprolegnia monoica **var.** *acidamica* Suzuki, *J. Jap. Bot.* 36: 234. 1961.

Micelio robusto, hifas moderada a escasamente ramificadas, a las dos semanas sobre semillas de sésamo las colonias alcanzan un diámetro de 1-3.5 cm. Zoosporangios cilíndricos, clavados, fusiformes, o ligeramente irregulares, algunas veces casi esféricos; rectos, curvados o sinuosos; renovación interna por formación de esporangios secundarios dentro de los primarios ya descargados; raramente en sucesión basípeta o cimosa; (30-) 400-600 (-900) x 16-48 μm . Zoosporas dimórficas; descarga y comportamiento saprolegnioide; quiste de esporas primarias 9-12 μm diam. Yemas, cuando presentes, cilíndricas, irregulares, esféricas; terminales o intercalares, solitarias o catenuladas. Oogonios laterales, terminales o intercalares simples o catenulados, formados raramente sobre esporangios vacíos o sésiles; piriformes, esféricos o subesféricos, a menudo dolioformes cuando intercalares; (28-) 60-80 (-120) μm diam. Paredes del oogonio generalmente conspicuas y abundantes interiormente punteadas, ocasionalmente sin punteado interior; lisas o raramente con una o dos evaginaciones papiliformes cortas, o apiculadas. Pies del oogonio 20-300 μm en long.; robustos, rectos o curvados; muy raramente ramificados. Oosporas céntricas o subcéntricas, esféricas o elipsoidales; (1-) 10-35 por oogonio y ocupando casi todo el oogonio, 20-25 (-31) μm diam, originando un tubo de germinación o un esporangio clavado apical. Ramas anteridiales predominantemente monoclinas o andróginas, raramente diclinas; algunas veces ausentes; delgadas, irregulares, no ramificadas o muy poco ramificadas; persistentes. Célula anteridial simple; tubular o clavada, ocasionalmente irregular, infrecuentemente ramificada; persistente; adherida lateralmente, muy raramente apical; tubo de fertilización presente, no persistente.

Distribución: Cosmopolita. Agua dulce y suelo, ocasionalmente en aguas salobres; saprótrofo sobre insectos acuáticos, plantas o detritus; también encontrada como patógeno o parásito de una gran variedad de vertebrados acuáticos (Seymour, 1970).

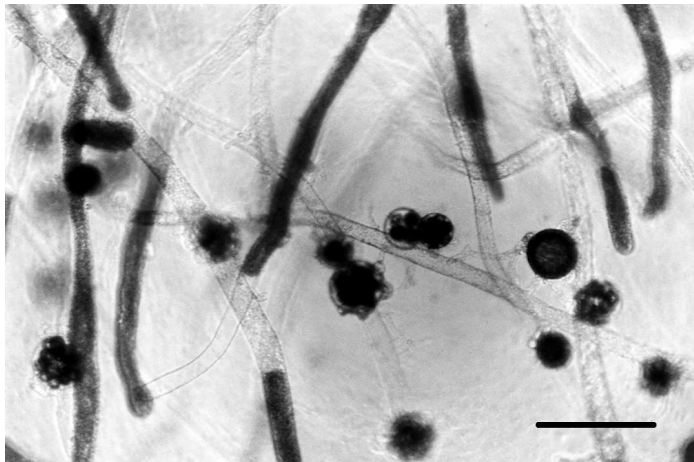


Figura 2.2: Aspecto del micelo de *Saprolegnia ferax* en cultivo en agua. Ramas anteridiales y oogonios conteniendo oosporas en su interior. Barra de escala = 50 μm .

Especimen examinado: Argentina. Buenos Aires. Partido de Chascomús: Estación Hidrobiológica Chascomús, Mayo 2006, parasitando a un ejemplar juvenil de pejerrey; *leg.* Pacheco Marino; *det.* Pacheco Marino & Steciow (LPSC N° 1020).

***Achlya racemosa* Hildebrand (Figuras 2.3 y 2.4)**

Achlya lignicola Hildebrand, Jahrb. Wiss. Bot. 6: 255. 1867-68.

Achlya racemosa forma *lignicola* (Hildebrand) Pringsheim, , Jahrb. Wiss. Bot. 9: 205. 1873-74.

Achlya colorata Pringsheim, Sitzungsber. Deutsch. Akad. Wiss. Berlin, Math.-Naturwiss. Kl. 1882-889. 1882.

Achlya racemosa f. *maxima* Minden, Kryptogamenfl. Mark Brandenburg 5: 548. 1912.

Achlya racemosa var. *lignicola* (Hildebrand) Coker, Saprolegniaceae, p. 107. 1923.

Achlya sparrowii Reischer, Mycologia 41: 339. 1949.

Achlya racemosa var. *maxima* (Minden) Cejp, Oomycetes I, Flora CSR, Ser. B, Part 2p. 186. 1959.

Micelio limitado a extenso, moderadamente denso; luego de dos semanas las colonias, sobre semillas de sésamo, alcanzan un diámetro de 1-2 cm. Hifas principales robustas 20-120 μm diam., moderadamente ramificadas en la base. Zoosporangios abundantes o escasos; cilíndricos o filiformes; rectos, curvos o sinuosos, adelgazándose hacia el extremo, los que pueden ser rectos o curvos; muy raramente ramificados; renovación simpodial o en sucesión basípeta; (200-) 300-400 (-900) x (14-) 20-35 (-45) μm . Zoosporas de comportamiento achlyoide; quiste de esporas primarias 8-12 μm diam. Yemas, cuando presentes, usualmente escasas o dispersas; cilíndricas, irregulares, o ramificadas; terminales o intercalares; solitarias o catenuladas. Oogonios laterales ocasionalmente terminales, muy raramente intercales; esféricos u obpiriformes; (-30) 36-70 μm diam., y usualmente con la característica disposición u organización en racimo. Pared exterior del oogonio lisa, ligeramente irregular en la superficie interior, o depositada de manera desigual, punteada o no internamente. Pies del oogonio delgados 100-300 μm long, o relativamente robustos; rectos, inclinados o curvos, a veces ramificados. Oosporas céntricas o subcéntricas; esféricas u ocasionalmente elipsoidales; (1-) 2-6 (-11) en número y usualmente no llenan el interior del oogonio; (14-) 15-26 (-32) μm diam. Ramas anteridiales predominantemente andróginas, infrecuentemente exíginas, raramente diclinas; cortas, delgadas, curvas o irregulares; raramente ramificadas; persistentes. Célula anteridial simple; clavada, inclinada o curva; persistente; adherida apicalmente, tubos de fertilización

no persistentes.

Distribución: Cosmopolita. Saprotrófo sobre ramas sumergidas o materia orgánica; también patógeno o parásito de una variedad de peces de agua dulce (Johnson et al., 2002).

Espécimen examinado: Argentina. Buenos Aires. Partido de Chascomús: Estación Hidrobiológica Chascomús, Diciembre 2005, de ovas en pejerrey; *leg.* Pacheco Marino; *det.* Pacheco Marino & Steciow (LPSC N° 1019).

2.3.2. Análisis de la secuencia del ADN de *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax*

El análisis de la secuencia de la región ITS-2 de *Achlya racemosa* (LPSC 1019) muestra que está compuesta por 324 bases y tiene un 100 % de similitud con la cepa tipo de *Achlya racemosa* depositada en el GenBank, (número de acceso: AF218158), hecho que confirma nuestra identificación morfológica. La secuencia de la región ITS-2 de la cepa encontrada (LPSC 1019) ha sido depositada en el GenBank (número de acceso: EU551150).

La región ITS-2 y las regiones laterales del ADNr de *Saprolegnia ferax* (LPSC 1020) están compuestas por 723 bases. Al comparar la secuencia de la región ITS-2 de nuestra cepa (654 bases) se encontró un 100 % de similitud con otra cepa de *Saprolegnia ferax*, (número de acceso: EU124763) aislada de ovas de anfibios. Nuestra

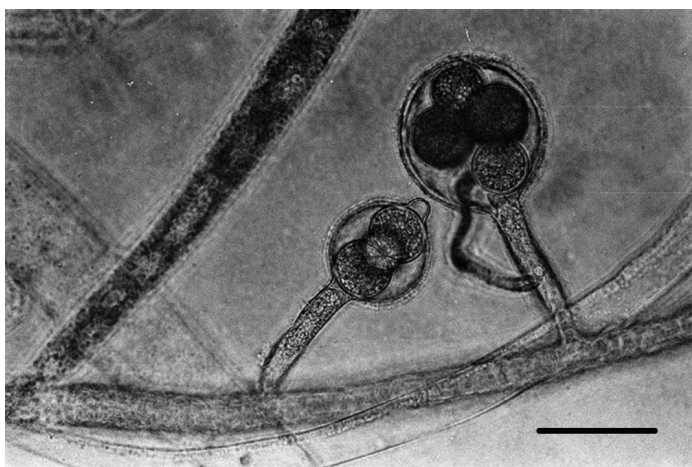


Figura 2.3: *Achlya racemosa*. Detalle del micelio con oogonio característicos, conteniendo oosporas en su interior y ramas anteridiales andróginas. Barra de escala = 10 μm .

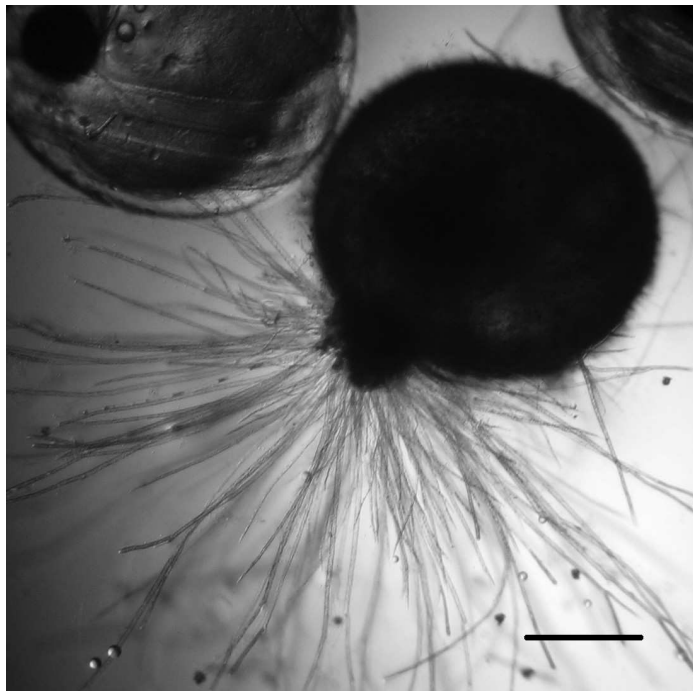


Figura 2.4: Ovas de *Odontesthes bonariensis* infectadas por *Achlya racemosa*. Barra de escala = 0,25 mm.

cepa fue depositada en el GenBank (número de acceso: GQ119935).

2.3.3. Estudio Histopatológico (Figura 2.5)

El estudio histopatológico evidenció, en los cortes con Hematoxilina Eosina, la presencia estructuras eosinófilas semejantes a hifas rodeando a las ovas infectadas; además se observó, una pérdida de la organización tisular embrionaria.

Mediante la tinción diferencial de Grocott se confirmó la presencia de hifas, alrededor y dentro de las ovas, observándose estructuras miceliares intensamente teñidas penetrando las ovas a través de zonas de discontinuidad en la superficie del corion, con un crecimiento expansivo dentro de las ovas afectadas.

2.3.4. Efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento vegetativo

En las Figuras 2.6 a 2.11 se observa que las Tasas de Crecimiento de ambas especies (Tabla 2.1) muestran una relación directa con la Temperatura de incubación.

Tabla 2.1: Valores de pendiente, Coeficiente de determinación (R^2), y Tasa de Crecimiento (TC) (cm/día), para *A. racemosa* y *S. ferax* cultivadas en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emerson (YpSs) y agar harina de maíz (CM), e incubadas a 25, 15 y 5°C. Unidas por corchete las concentraciones en las que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sus respectivas TC.

Especies	Temperatura	Medio de Cultivo	Coeficiente de Determinación R^2	Pendiente
<i>Saprolegnia ferax</i>	25 °C	GGI	0,98	2,01
		GY	0,91	2,32
		YpSs	0,95	2,03
		CM	0,81	2,25
	15 °C	GGI	0,93	1,35
		GY	0,97	1,70
		YpSs	0,98	1,47
		CM	0,99	1,63
	5 °C	GGI	0,86	0,36
		GY	0,87	0,50
		YpSs	0,89	0,45
		CM	0,96	0,46
<i>Achlya racemosa</i>	25 °C	GGI	0,99	1,13
		GY	1,00	1,35
		YpSs	0,99	1,24
		CM	0,92	1,37
	15 °C	GGI	1,00	0,86
		GY	0,99	1,04
		YpSs	1,00	0,90
		CM	0,97	1,06
	5 °C	GGI	0,97	0,28
		GY	0,97	0,35
		YpSs	0,98	0,32
		CM	0,98	0,37

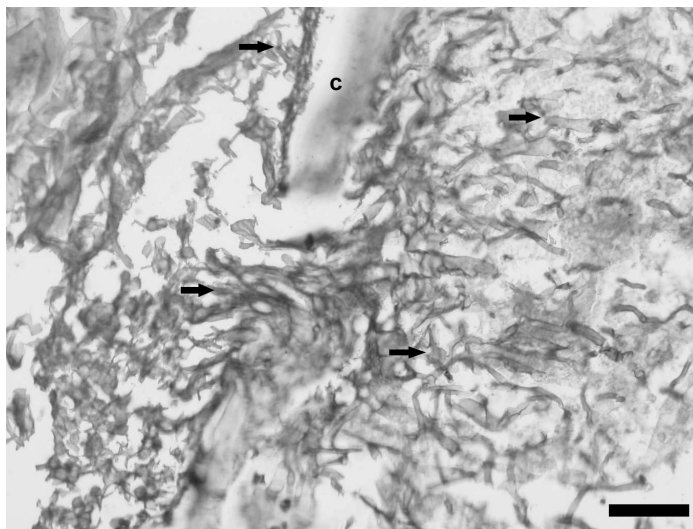


Figura 2.5: Sección transversal de una ova de *Odontesthes bonariensis* infectada, tinción utilizada: Grocott. Las flechas señalan la dirección de las hifas que penetran desde el exterior atravesando el corion (C) ocupando el interior de la ova. Barra de escala = 50 μm .

Determinación de la Tasa de crecimiento (TC)

Las Tasas de Crecimiento (TC), expresadas como la pendiente de la recta de regresión (cm/día), se presentan en la Tabla 2.1. Como podemos ver, en todas las condiciones ensayadas, la TC de *Saprolegnia ferax* es mayor que la de *Achlya racemosa*. Mediante el análisis de la varianza se confirmó que esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,05$); además se observó que ésta tiende a disminuir conforme decrece la Temperatura. También se encontró mediante análisis de las diferencias entre grupos de Tukey (HSD), que a un intervalo de confianza de 95,0 %, Las TC de *S. ferax* fueron significativamente diferentes entre las distintas Temperaturas; sin embargo, en *A. racemosa* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las TC de YpSs o GGI a 25°C y las TC en GY o CM a 15°C. Al parecer la influencia de la Temperatura sobre la TC es mayor *S. ferax* que en *A. racemosa*.

Saprolegnia ferax (Figuras 2.6 a 2.8)

En las Figuras 2.6 a 2.8 se ilustra el crecimiento de *Saprolegnia ferax* en los diferentes Medios de Cultivo y Temperaturas. Como se observa en la Figura 2.6, *Saprolegnia ferax* alcanzó el máximo diámetro de la colonia al cabo de 3 días en CM agar (TC: 2,25 cm/día); y a los 4 días en GY (TC: 2,32 cm/día), YpSs (TC: 2,03

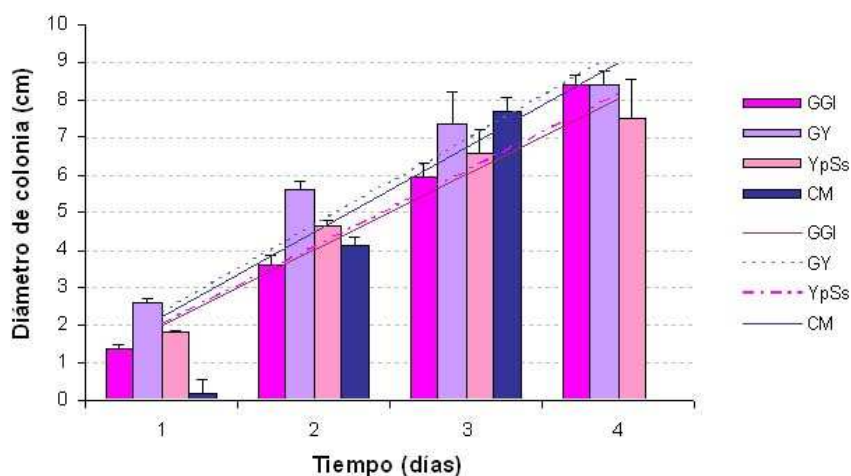


Figura 2.6: Crecimiento de *Saprolegnia ferax* a 25°C en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emerson (YpSs) y agar harina de maiz (CM).

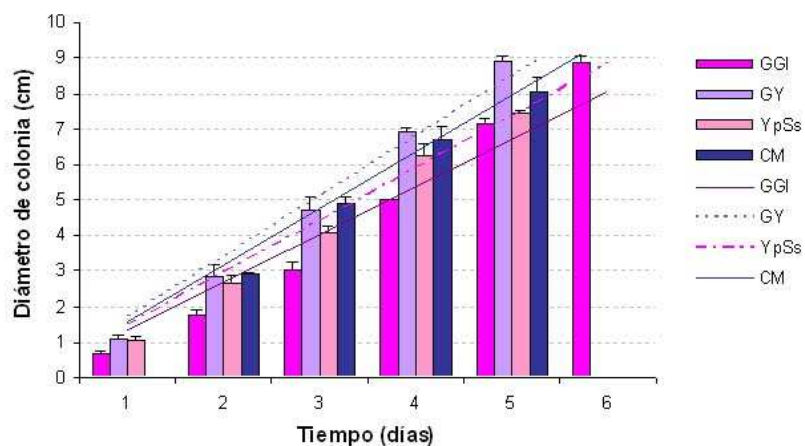


Figura 2.7: Crecimiento de *Saprolegnia ferax* a 15°C en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emerson (YpSs) y agar harina de maiz (CM).

cm/día) y GGI (TC: 2,01 cm/día), a una Temperatura de incubación de 25°C.

En la Figura 2.7 se muestra el crecimiento de *Saprolegnia ferax* a 15°C alcanzando un máximo diámetro de la colonia mensurable, luego de 5 días en CM agar (TC: 1,63 cm/día), GY (TC: 1,70 cm/día) e YpSs (TC: 1,47 cm/día), en GGI alcanza su máximo crecimiento al cabo de 6 días (TC: 1,35 cm/día).

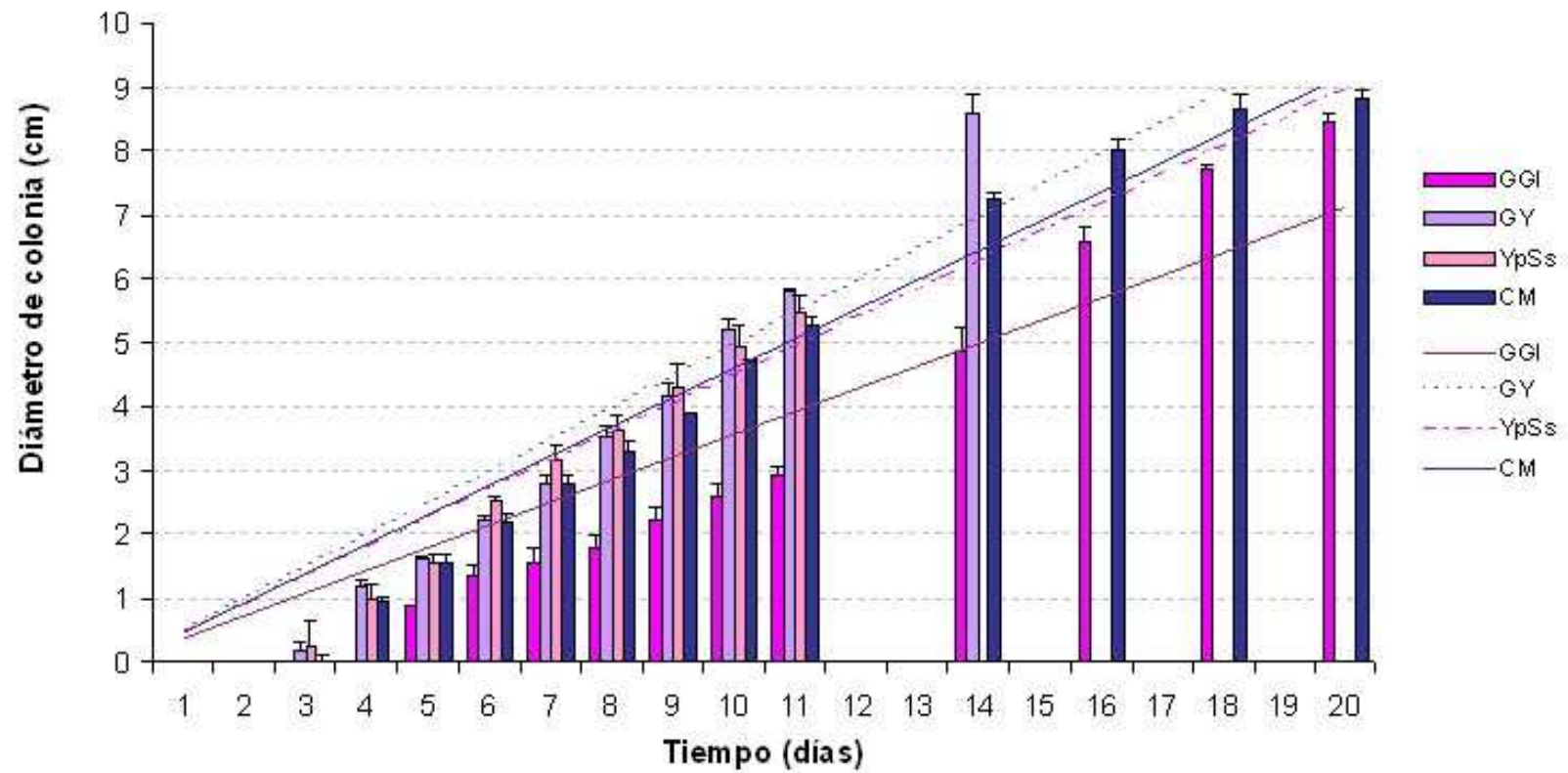


Figura 2.8: Crecimiento de *Saprolegnia ferax* a 5°C en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emerson (YpSs) y agar harina de maíz (CM).

A 5°C (Figura 2.8) *Saprolegnia ferax* alcanzó el máximo diámetro de la colonia mensurable al cabo de 12 días en YpSs (TC: 0,45 cm/día), 14 días en GY (TC: 0,50 cm/día) y 20 días en CM agar (TC: 0,46 cm/día) y en GGI (TC: 0,36 cm/día).

La TC de *Saprolegnia ferax* (Tabla 2.1) es mayor en CM, pero mediante análisis de las diferencias entre grupos de Tukey (HSD, IC = 95 %) se determinó que a esta Temperatura a 25°C sólo existen diferencias significativas en la TC entre GGI y GY ($p = 0,006$), GY y YpSs ($p = 0,015$) GGI y CM ($p = 0,046$). A 15°C CM es el medio en el que se observa una mayor TC, a esta Temperatura sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las TC de GY y GGI ($p = 0,001$), GGI y CM ($p = 0,006$); mientras que a 5°C no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las TC entre los diferentes medios de cultivo.

***Achlya racemosa* (Figuras 2.9 a 2.11)**

A 25°C (Figura 2.9) *Achlya racemosa* alcanzó el máximo diámetro de la colonia al cabo de 5 días en CM (TC: 1,37 cm/día), 6 días en GY (TC: 1,35 cm/día). El máximo crecimiento se alcanzó luego de 7 días de incubación en YpSs (TC: 1,24 cm/día) y GGI (TC: 1,13 cm/día).

A 15°C (Figura 2.10) se obtuvo un máximo diámetro de la colonia luego de 8 días en CM (TC: 1,06 cm/día) y GY (TC: 1,04 cm/día), 9 días en YpSs (TC: 0,90 cm/día) y 10 en GGI (TC: 0,86 cm/día).

A 5°C (Figura 2.11) se alcanzó el máximo diámetro de la colonia al cabo de 22 días en CM agar (TC: 0,37 cm/día), 24 días en YpSs (TC: 0,32 cm/día), 27 en GY (TC: 0,35 cm/día) y 31 en GGI (TC: 0,28 cm/día).

Como se observa en la Tabla 2.1, la TC a 25°C fue mayor en CM, esto quedo demostrado estadísticamente; además no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre CM y GY, ni entre GGI e YpSs; pero si entre GGI y CM ($p = 0,003$), GGI y GY ($p = 0,001$), GY e Ypss ($p = 0,013$) e YpSs y CM ($p = 0,040$). A 15°C es también CM el Medio en el que se observó una mayor TC, pero sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre GY y CM ($p = 0,009$) GY y GGI ($p = 0,023$). Al igual que en *Saprolegnia ferax* a 5°C no existen diferencias estadísticamente significativas en las TC en los diferentes medios de cultivo.

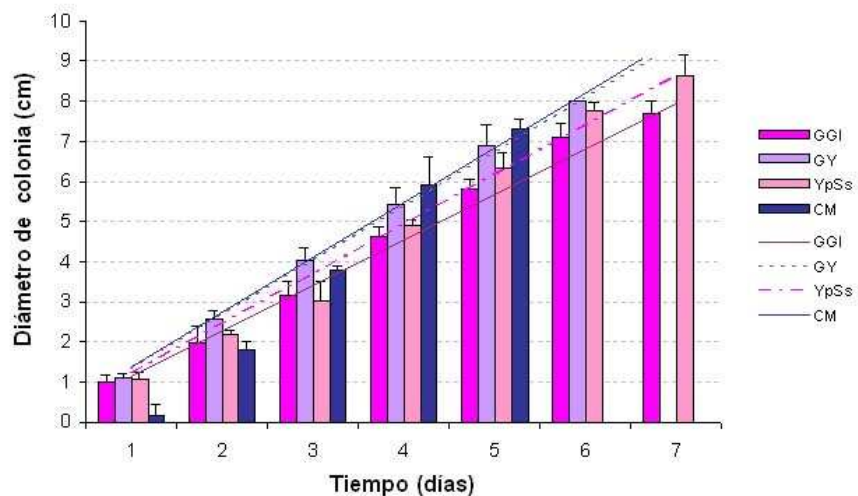


Figura 2.9: Crecimiento de *Achlya racemosa*. a 25°C en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emerson (YpSs) y agar harina de maíz (CM).

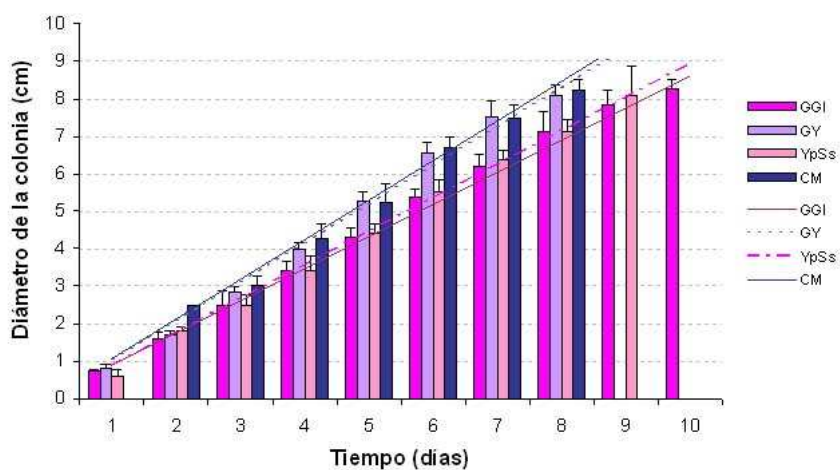


Figura 2.10: Crecimiento de *Achlya racemosa*. a 15°C en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emerson (YpSs) y agar harina de maíz (CM).

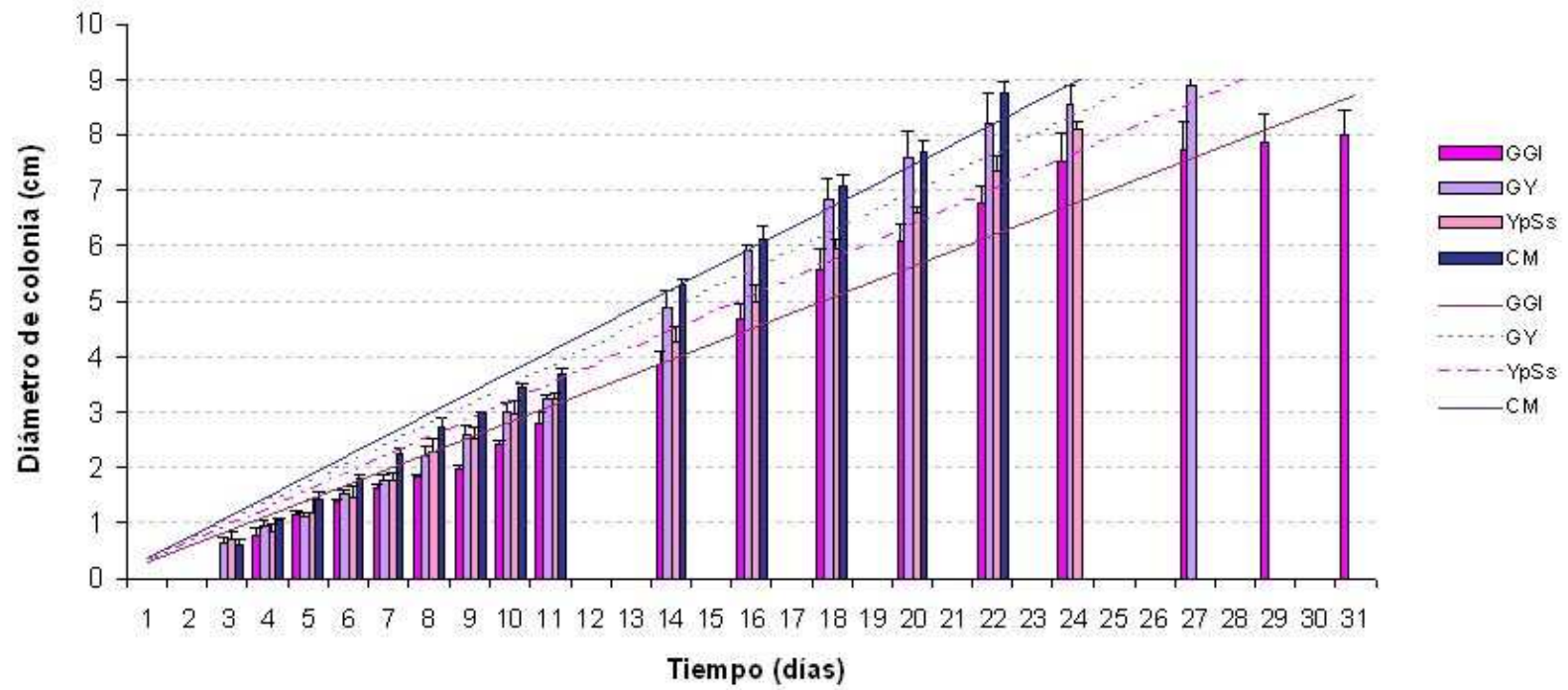


Figura 2.11: Crecimiento de *Achlya racemosa* a 5°C en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emersons (YpSs) y agar harina de maíz (CM).

Interacciones entre Factores Medio de cultivo - Especie - Temperatura

Como se observa en la Figura 2.12, las TC para ambas especies son mayores a 25 °C. Mediante el análisis de la varianza se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las TC en las distintas temperaturas ensayadas (IC 95 %, $p < 0,001$), posteriormente mediante el test de multicomparaciones de Dunnet se comprobó que la TC es mayor a 25°C (IC 95 %, $p < 0,001$).

La Figura 2.13 ilustra el comportamiento de la TC en los diferentes medios de cultivo. El análisis de la varianza demostró que existen diferencias significativas en las TC entre los diferentes medios de cultivo, excepto entre CM y GY; el análisis a posteriori de Dunnet confirmó que la TC es mayor en CM.

Como se observa en la Figura 2.13 A y B el efecto que tendría el Medio de Cultivo sobre el crecimiento de ambas especies se ve influenciado por la Temperatura de incubación; ya que estas diferencias desaparecen a 5°C. En la Figura 2.13B se observa también que el efecto del medio de cultivo sobre la TC es similar para ambas especies, y que existe una mayor TC en GY y CM.

2.3.5. Efecto de la Temperatura sobre la formación de caracteres taxonómicos relevantes

Como se observa en la Tabla 2.2, *Saprolegnia ferax*, a 15 y 25°C, formó oogonios más tempranamente en GGI. A 5°C la formación de oogonios fue más rápida en GY, y no logró la formación de oogonios a ninguna temperatura en CM. Por su parte a

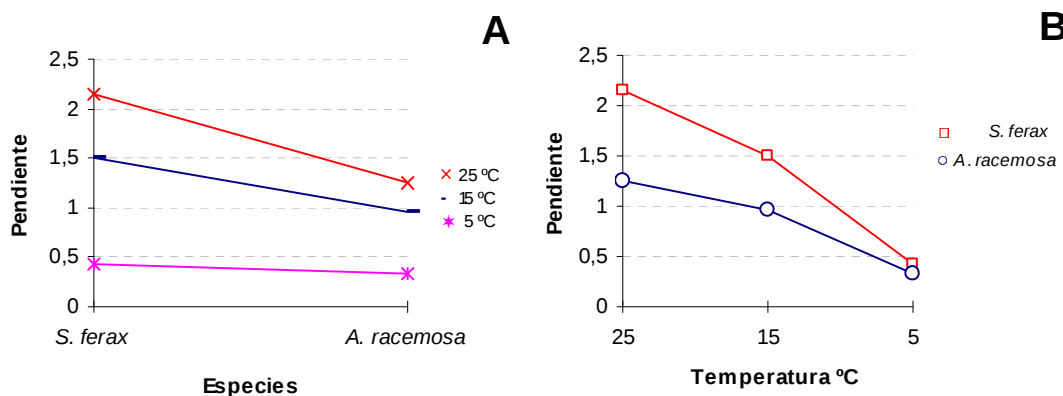


Figura 2.12: A-B Efecto de la interacción de los factores Temperatura y Especie sobre la tasa de crecimiento *S. ferax* y *A. racemosa*.

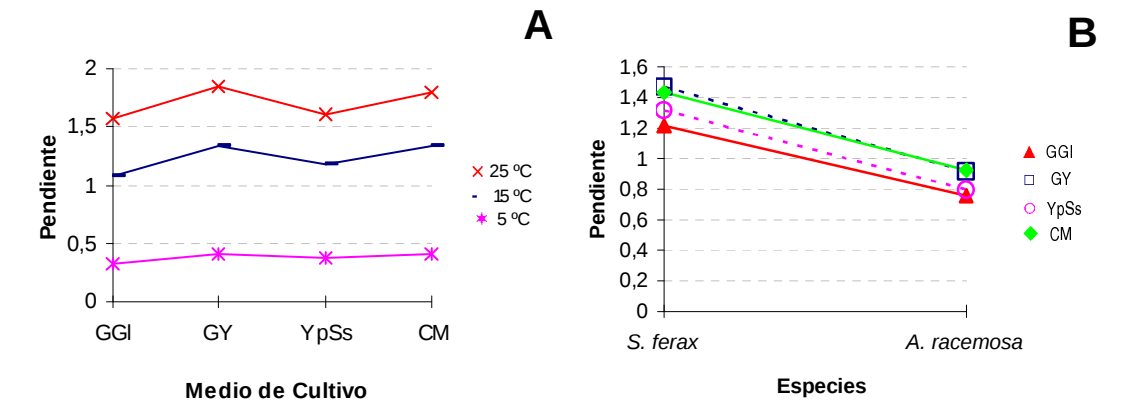


Figura 2.13: A-B Efecto de la interacción de los factores Medio de cultivo y Especie sobre la tasa de crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*.

Tabla 2.2: Tiempo de formación de estructuras de estructuras reproductivas *A. racemosa* y *S. ferax* cultivadas en Glucosa Glutamato (GGI), Glucosa extracto de levadura (GY), YpSs de Emerson (YpSs) y agar harina de maíz (CM), e incubadas a 25, 15 y 5°C.

Formación de oogonios (días)			
Temperatura	Medio de cultivo	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
25 °C	GGI	4	6
	GY	4	5
	YpSs	0	0
	CM	0	5
15 °C	GGI	5	6
	GY	9	4
	YpSs	8	6
	CM	0	4
5 °C	GGI	20	18
	GY	16	20
	YpSs	18	18
	CM	0	16

15 y a 25°C, *Achlya racemosa*, formó oogonios en GY y CM mientras que a 5°C la formación de oogonios se observó más tempranamente en CM.

2.4. Discusión

Los representantes de los géneros *Saprolegnia*, *Achlya* y *Aphanomyces* son reconocidos como los patógenos de peces más importantes y frecuentes del Reino Staminiopila; éstos afectan principalmente a silúridos, salmónidos y ciprínidos y están

asociados a infecciones en poblaciones naturales y en sistemas de cultivo (van West, 2006).

Las infecciones por Saprolegniales se caracterizan por la presencia de abundante micelio blanco algodonoso sobre la superficie de peces y sus ovas. Estos organismos son considerados como patógenos persistentes debido a que las lesiones que provocan tienden a la cronicidad facilitando así la entrada de otros organismos patógenos. Los eventos pueden ocurrir en individuos aislados o en proporciones epidémicas, lo que ocurre generalmente en sistemas de cultivo, afectando grandes porcentajes de la población.

Una gran variedad de estímulos externos o internos son capaces de perturbar la homeostasis de los peces actuando como factores predisponentes de la enfermedad. Alteraciones del medio ambiente tales como cambios en la temperatura, pH, composición química y presencia de materia orgánica, son capaces de alterar las barreras inmunes externas como la piel y el mucus, actuando como irritantes. A su vez factores internos tales como, edad, alteraciones hormonales, deficiencias alimentarias, estrés y la presencia de lesiones externas preexistentes afectan directamente el desarrollo de la respuesta inmune, el que también está condicionado por el estadio de desarrollo (Goven-Dixon, 1993).

Las infecciones por Saprolegniales son más frecuentes en ovas que en adultos, debido a que éstos son capaces de promover una respuesta inmunitaria específica destinada a contrarrestar la infección. Además se ha demostrado, en salmónidos, que la presencia de mucus es capaz de inhibir la germinación de las esporas (Wood et al., 1988; Chacko, 1993).

La Saprolegniosis en ovas de peces ha sido ampliamente estudiada; el efecto sobre las ovas es mayor en condiciones de cría intensiva, ya que las condiciones de hacinamiento favorecen su diseminación. *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax* han sido encontradas como parásitos de una amplia variedad de ovas de peces, incluidos los miembros de las Familias Acipenseridae, Ciprinidae y Salmonidae; y dentro de esta última se han registrado casos en los géneros *Oncorhynchus*, *Salmo* y *Salvelinus*. Además, se han reportado infecciones causadas por *S. ferax* en especies de la Familia Clupeidae y la subfamilia Coregoninae. (Agersborg, 1933; Hoffman, 1949; Ogbonna & Alabi, 1991; Czczuga et al., 1995; El-Sharouny & Badran, 1995; Czczuga et al., 1996; Czczuga & Muszyńska, 1996; Czczuga & Muszyńska, 1997; Kitancharoen &

Hatai, 1997; Czczuga & Kiziewicz, 1999; Czczuga & Muszyńska, 1999; Czczuga et al, 2001). *Achlya racemosa* también ha sido reportada como parásito de varias especies de peces, tales como *Catla catla* (Mekrani, 1980) y *Anguila japonica* (Hoshina et al., 1960), y en ovas de salmónidos (Humphrey, 1893; Hine, 1878), *Tilapia* sp. y otras especies (Ogbonna & Alabi, 1991).

Contribuciones previas sobre casos de Saprolegniasis en *Odontesthes bonariensis* fueron realizadas por diversos autores. Lawhavinit et al. (1986) encontraron a *Saprolegnia* sp. asociada a una infección por *Aeromonas* spp. Otro de los casos de Saprolegniasis fue el registrado por Hatai et al. (1993) quienes aislaron e identificaron a *S. parasitica* en en la estación de cría de Kanagawa, Japón; en este caso se vieron afectados individuos adultos que presentaron lesiones alrededor de la boca, en aletas pectorales y en el pedúnculo caudal. Finalmente, Kitancharoen et al. (1995) estudiaron algunos aspectos morfológicos de *Saprolegnia diclina* de tipo 1, que afectó a más del 50 % de la población de pejerrey en la estación de cría de Tochigi; dicha especie fue aislada de lesiones hemorrágicas en la boca y la aleta caudal del pejerrey.

En Argentina, Ringuelet (1948) menciona a las Saprolegniales como patógenos de rápida propagación y frecuentemente asociados a ovas de pejerrey; García-Romero (2001) destaca la importancia de las infecciones por Saprolegniales en ovas de pejerrey señalando a estos organismos como la principal causa de mortalidad en ovas en sistemas de cultivo en Argentina. Más recientemente, Mancini et al. (2006) realizaron una investigación sobre la presencia de enfermedades en pejerrey en las provincias de La Rioja, Córdoba y Santa Fé, registrando un caso de Saprolegniasis, en el que si bien la tasa mortalidad fue moderada, la prevalencia alcanzó un 100 %; en los individuos afectados se observó una masa miceliar cubriendo la branquias y en algunos casos llegando fuera del opérculo, lo que provocó deficiencia respiratoria. Posteriormente como resultado de la investigación de un caso de mortandad masiva de peces en una laguna ubicada al sur de la provincia de Córdoba, (33°26' W, 64°50' S, 85 ha) Mancini et al. (2008) encontraron a *Saprolegnia parasitica* provocando lesiones externas que llegaron a comprometer hasta un 30 % de la superficie corporal de los peces afectados.

Uno de los puntos críticos del conocimiento de las enfermedades es la identificación del agente causal. En el caso de las Saprolegniales ésta se basa principalmente

en la observación y descripción de caracteres morfológicos característicos de un género o especie. Dada la importancia taxonómica de la formación de los mismos, uno de los objetivos planteados en este trabajo, fue conocer cuales son las condiciones de cultivo que facilitan su formación y permitan una rápida caracterización de la especie patógena.

El desarrollo de métodos para la obtención de cultivos puros, realizados por Chaze, (1925) demostró que es posible aislar y mantener en cultivo Saprolegniales aisladas de peces. Desde entonces varios autores abocaron sus esfuerzos a la formulación de medios de cultivo que permitieran tanto el crecimiento vegetativo como la producción de otras estructuras como esporangios o yemas (Crooks, 1937; Satour, 1967; Barksdale, 1962; Liles, 1969). Es así, que Kanouse (1932) logró por primera vez inducir la reproducción sexual en cultivo de *Saprolegnia parasitica*, especie considerada hasta ese momento como productora de micelio estéril.

Los ensayos realizados para determinar las condiciones de cultivo adecuadas para ambas especies nos condujeron a encontrar que *Saprolegnia ferax* tendría una mayor velocidad de crecimiento que *Achlya racemosa*, y a su vez, la misma tendencia a incrementar el crecimiento con la temperatura de incubación. Ambas especies son capaces de crecer a 5°C, pero las tasas de crecimiento fueron considerablemente más altas a 15 y 25°C. Éstos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas por Nolan (1976) en *Saprolegnia ferax*, aislada del tubo digestivo de “blackfly” *Simulium vittatum*, quien encontró que el rango de temperatura óptimo de crecimiento oscila entre los 15-26°C. Trabajos realizados en otras especies de Saprolegniales como el de Rakmanee et al. (2004), en *Saprolegnia diclina* y *Achlya ambisexualis*, especies parásitas de *Cyprinus carpio* L., muestran que la temperatura óptima para ambas especie es de 25°C; no obstante éstas son capaces e crecer en un rango de temperatura que oscilan entre 10-30°C y 15-30°C respectivamente. Por su parte Koeypudsa et al. (2005) estudiaron el crecimiento de varias cepas de *Saprolegnia* spp. provenientes de peces enfermos de Noruega y Chile, obteniendo en todos los casos un máximo crecimiento a 25°C y la inhibición total a temperaturas superiores a los 30°C.

Kitancharoen et al., (1996) encontraron que varios aislamientos de *Saprolegnia* mostraron un crecimiento similar entre 10 y 20°C. Sin embargo, a 30 °C observaron que los aislamientos provenientes de micosis viscerales mostraron un rápido crecimiento a diferencia de los aislados de micosis externa que presentaron un crecimiento

lento o ausencia del mismo, estableciendo así una relación entre la tolerancia a la temperatura y la fuente de aislamiento. Estos estudios muestran que los hongos acuáticos pueden sobrevivir en ambientes con temperaturas muy diversas sin ver afectadas sus capacidades de crecimiento, reproducción y diseminación. Esta cualidad favorece su capacidad infectiva en peces afectados por el "estrés" generado por las variaciones de la temperatura de su entorno (Olah & Farkas, 1978; Rakmanee et al., 2004; Kitancharoen et al., 1996).

Es importante resaltar las diferencias en las tasas de crecimiento encontradas en ambas especies, ya que diversos autores sugieren que estarían relacionadas con la especificidad del huésped y podrían tener un valor clasificatorio y contribuir a una rápida identificación de especies y subgrupos dentro de especies e indicarían diferencias entre distintas cepas (Hatai et al., 1990; Dieguez-Uribeondo et al., 1996; Kitancharoen et al., 1996).

Al respecto Wood et al., (1988) observaron diferencias en el crecimiento a 25°C entre *S. diclina* y *S. parasitica*, parásitas del salmón. Hatai & Hoshina (1992) notaron que las tasas de crecimiento a 30°C podrían ser utilizadas para una rápida identificación de *Saprolegnia* sp. Hussein & Hatai (1999) clasificaron a *Saprolegnia* sp. en base a sus tasas de crecimiento a temperaturas que oscilan entre los 3 - 33°C y Wolf (1937) encontró que a diferencia de *Achlya bisexualis*, *Saprolegnia ferax* era capaz de crecer a 2°C. En el presente estudio el análisis estadístico nos llevó a concluir que la Temperatura es el único factor que afecta de manera significativa la Tasa de Crecimiento vegetativo de nuestras cepas de *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax*.

Como muestran los resultados (Tabla 2.1), GGI y GY son los medios de cultivo más adecuados para la formación de oogonios en esta cepa de *Saprolegnia ferax*, a 15 y 25°C. La rápida formación de oogonios de *S. ferax* en GGI y GY podría deberse a que los fosfatos presentes en su composición actuarían estimulando la formación de estructuras reproductivas sexuales; esto ha sido comprobado en otras especies como *S. mixta* y *S. hypogina* (Klebs, 1899; Kaufman, 1908). Estos hallazgos también explicarían la ausencia de reproducción sexual en los ensayos realizados en CM agar. Al respecto Johnson et al. (2002) mencionaron que a pesar de que CM (Difco) es un excelente medio de crecimiento, éste no aporta los nutrientes requeridos para la formación de estructuras sexuales. Wolf (1937) encontró que otros medios de cultivo como PDA (Agar papa dextrosa) tampoco favorecieron la formación de yemas,

esporangios u órganos sexuales en *Achlya bisexualis* y *Saprolegnia ferax*, las que únicamente desarrollaron micelio vegetativo. Existe cierta controversia con respecto a si la abundancia de nutrientes favorece o no la reproducción sexual en especies de la familia Saprolegniaceae. Klebs (1899) sostenía que la abundancia de nutrientes sólo favorece el crecimiento vegetativo en *Saprolegnia mixta*. Sin embargo, Pieters (1915) demostró que el incremento en la disponibilidad de nutrientes no estaría relacionado con la estimulación del crecimiento vegetativo y la reproducción sexual de *S. ferax* y *A. racemosa*.

A diferencia de *Saprolegnia ferax*, *Achlya racemosa* formó oogonios en GY y CM a 15 y a 25°C, mientras que a 5°C la formación de oogonios ocurrió más rápidamente en CM agar. De acuerdo con los resultados obtenidos, existirían marcadas diferencias entre ambas especies en la utilización de nutrientes para la formación de caracteres sexuales. Las evidencias experimentales concuerdan con la hipótesis de la especificidad propuesta por Klebs (1899) y demostrada posteriormente por Kanouse (1932) en *Saprolegnia parasitica*: la que postula que la capacidad de asimilación de nutrientes para lograr la formación de estructuras sexuales es característica de cada especie.

Desde un punto de vista morfológico, *Achlya racemosa* es fácilmente reconocida por sus característicos pies del oogonio, cortos y dispuestos en racimo, por lo general acompañados de uno o dos ramas anteridiales andróginas, cortas y curvas. *Achlya colorata* es otra especie que tiene una configuración similar, pero los oogonios son generalmente papilados, como en *Achlya fueguiana* cuya característica diferencial es la presencia de un gran número de hifas secundarias cerca de los extremos de las hifas principales y la presencia de ramas anteridiales no funcionales (Steciow, 2001).

El aislamiento de *Achlya racemosa*, se caracteriza por presentar zoosporangios cilíndricos o filiformes, de paredes rectas, rectos, curvados o sinusos, con un característico adelgazamiento hacia los extremos, no observado por Johnson et al., (2002). Según Johnson (1973), *Achlya racemosa* se distingue de las otras especies por la ausencia de ornamentación en la pared de oogonio y el tamaño de las oosporas; no obstante la cepa aislada en el presente estudio posee oogonios papilados aunque éstos no son muy frecuentes; además las dimensiones de los oogonios y oosporas son menores a las descritas por Johnson et al., (2002). Los estudios moleculares confirmaron que la cepa aislada es *Achlya racemosa*, aunque la secuencia de nuestro

aislamiento presenta un alto grado de correspondencia con la secuencias de *Achlya colorata* (AF18159) 99 %, *A. radiosa* (AF218160) y *Saprolegnia turfosa* (AB219397), ambas con un 98 %. Esta estrecha homología es un fenómeno bastante conocido dentro de las especies del género *Achlya* y también en otros Oomycetes, (Johnson et al., 2002).

Por su parte, *Saprolegnia ferax* es una especie ubicua del medio ambiente acuático. Se reconoce en general por una combinación de caracteres predominantes como la presencia de oogonios grandes, con paredes internamente punteadas, que contienen oosporas céntricas y subcéntricas (a veces en el mismo oogonio), ocasionalmente se desarrollan sobre esporangios vacíos. Por otra parte, los oogonios de *Saprolegnia diclina* se asemejan a los de *Saprolegnia ferax*; pero *S. diclina* muestra una abundante producción de ramas anteridiales diclinas. mientras que la cepa aislada de *Saprolegnia ferax*, exhibe una gran variabilidad en el desarrollo de ramas anteridiales, las que en caso de estar presentes son escasas y predominantemente andróginas o monoclinalas (Johnson et al., 2002). Seymour (1970), propuso que *S. ferax* comprende un complejo de variantes morfológicas en el que se incluyen a *S. monoica* y *S. mixta* como variedades de *S. ferax*; esta agrupación fue previamente realizada por Forbes (1935), quien denominó al complejo *ferax-monoica-mixta* como *Saprolegnia ferax* f. *mixta*. La unión de estas tres especies en un taxón ha sido considerada demasiado amplia por diversos autores (Johnson et al., 2002; Seymour, 1970).

Luego de haber confirmado la identidad de las cepas aisladas de: *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa*, mediante el análisis molecular la región ITS, podemos concluir que éste es el primer reporte de Saprolegniasis en ovas y juveniles de pejerrey mantenidos en cautiverio en la Provincia de Buenos Aires, en el que las especies han sido caracterizadas morfológica molecularmente, constituyendo además la primera cita de ambas especies para este país. Mancini et al. (2008) también reportaron infecciones por *Saprolegnia parasitica* en poblaciones naturales de pejerrey en la provincia de Córdoba. Con nuestros hallazgos se amplía la lista de huéspedes registrados para ambos agentes patógenos y se extiende su distribución en el continente americano, ya que es el reporte más meridional de ambas especies.

A diferencia de *Achlya racemosa*, *Saprolegnia ferax* ha sido encontrada previamente en América del Sur, en diferentes regiones de Brasil, donde estos organismos fueron encontrados como saprótrofos en suelo, muestras de agua y hojas de *Alchor-*

nea triplinervia en descomposición (Pires-Zottarelli et al., 1996; Schoenlein-Crusius & Milanez, 1998). Los aislamientos de *Saprolegnia ferox* procedentes de Brasil, describen características morfológicas diferentes a las observadas en el presente aislamiento; los oogonios son más pequeños, alcanzan hasta 80 micras de diámetro, y menor número de oosporas: (1 -) 2 (-13); los zoosporangios también son más cortos, llegando hasta 280 micras de longitud (Pires-Zottarelli et al., 1996). Además estas especies no ha sido previamente reportadas como parásitas en América del Sur y a pesar de que los hallazgos histopatológicos son similares a los descritos por Panchani et al. (2007), en ovas de Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) infectadas por varias especies de la familia Saprolegniaceae; ésta es la primera descripción de las alteraciones histopatológicas en ovas embrionadas de pejerrey.

Capítulo 3

Reino Fungi (Anamorfos Ascomycotes)

3.1. Introducción

Los hongos anamorfos de Ascomycota, anteriormente agrupados bajo la denominación “Fungi Imperfecti”, son un grupo heterogéneo de organismos con características morfológicas disímiles, agrupados sobre la característica común de no presentar una fase sexual (Alexopoulos et al., 1996). Éstos, junto a los denominados “mohos acuáticos”, han sido reconocidos como importantes patógenos de peces y otros organismos acuáticos. Ambos grupos, a pesar de compartir una estructura miceliar, poseen características morfológicas y fisiológicas distintas y por ende han sido separados en dos Reinos distintos.

Aunque varios autores (Neish & Hughes, 1980; Alderman & Polglase, 1986) señalan a las Saprolegniales como los “hongos” patógenos más importantes de peces y sus ovas, Rand (1996) destaca la importancia de los hongos Anamorfos de Ascomycota como patógenos, debido a su excelente capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, a su importante caudal enzimático y sobre todo a su amplia distribución. Una gran variedad de Anamorfos de Ascomycota han sido implicados en enfermedades en peces, entre ellos podemos mencionar los miembros de los géneros *Aureobasidium* spp., *Cladosporium* spp., *Exophiala* spp., *Phoma* spp., *Ochroconis* spp., *Hormoconis* spp. *Verticillium* spp. (Neish & Hughes, 1980; Rand, 1996; Strongman et al., 1997; Faisal et al., 2007) Algunos de estos hongos son con-

siderados patógenos oportunistas, mientras que otros causan infecciones sistémicas, que suelen ser letales.

Los estudios realizados sobre el rol que cumplen los hongos verdaderos como patógenos de organismos acuáticos se limitan generalmente a reportes aislados, individuales o masivos, que en algunas oportunidades alcanzan elevados porcentajes de mortalidad, sobre todo en peces mantenidos en cautiverio. Por otro lado las investigaciones relacionadas con los métodos de diagnóstico, patogenia y taxonomía de las especies fúngicas involucradas en dichos eventos han sido abordadas con menor frecuencia, hecho que dificulta la elección de métodos de profilaxis y control adecuados.

Las enfermedades fúngicas pueden ser una grave amenaza en sistemas de cultivo, sobre todo en los primeros estadios de desarrollo. Las ovas son atacadas con mayor avidez y al ser colonizadas actúan como una fuente de diseminación del hongo, generando, en pocos días, una rápida propagación de la infección ya sea por contacto directo entre el micelio de las ovas infectadas o por la dispersión de conidios, los que germinan en la superficie de las ovas sanas (Rand, 1996). En individuos adultos, si bien son menos frecuentes, las infecciones causadas por hongos suelen ser de difícil diagnóstico, debido a que para realizarlo se precisa de la conjunción de una serie de herramientas diagnósticas, como la observación de los signos de la enfermedad, el estudio histopatológico y el aislamiento e identificación del agente. En micosis internas la signología suele ser escasa y debido a su carácter crónico las micosis suelen pasar desapercibidas; en caso de producir lesiones externas, éstas pueden ser enmascaradas por una infección o contaminación bacteriana secundaria.

Otro factor que dificulta el diagnóstico es la identificación taxonómica, la que requiere un amplio conocimiento sobre una gran diversidad de especies. Esto puede resultar confuso para quien no este familiarizado, puesto que en la mayoría de los casos se trata de infecciones por hongos oportunistas que incluyen a un amplio espectro de hongos saprótrofos, capaces de actuar como patógenos en condiciones desfavorables; situación que dificulta aún más la designación de su rol como patógeno primario.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Origen del Material

El origen del material así como las condiciones de traslado, y manutención en el laboratorio, fueron previamente descritos en la Sección 2.2.1.

Durante la realización de los ensayos preliminares con agentes fungicidas se detectó, por observación en el microscopio, la presencia de un micelio delicado cubriendo la superficie de algunas ovas, las que fueron separadas con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Con la finalidad de disminuir la posible carga microbiana que pudieran poseer, las ovas infectadas fueron sumergidas en una solución antibiótica SA (0,5 mg Estreptomicina y 0,25 mg Cloranfenicol en 100 ml. de agua destilada estéril) durante 5 minutos y enjuagadas, dos veces, en agua destilada estéril. Para realizar los aislamientos primarios de los hongos se utilizó Agar Papa Glucosado (APG) como medio de cultivo, (Kirk et al. 2001). Las ovas infectadas fueron colocadas, por separado a razón de una por placa, en placas de Petri conteniendo en su interior 20 ml de APG y 1 ml de una solución antibiótica antes descrita, e incubadas en una estufa de cultivo a 20-25°C durante siete días. Transcurrido este período, las placas fueron observadas para corroborar el desarrollo de las colonias.

3.2.2. Aislamiento e Identificación del agente causal

Todas las colonias obtenidas del aislamiento primario fueron purificadas, mediante repiques sucesivos en APG. Una vez obtenidos los cultivos puros, se hicieron preparaciones microscópicas para verificar la presencia de estructuras reproductivas que permitieran su identificación taxonómica. Para lo cual, porciones de micelio fueron montadas en portaobjetos y se empleó azul de algodón como tinción. En los casos en los que, en APG, no se observó la presencia de estructuras reproductivas que permitieran su identificación taxonómica, se realizaron subcultivos en medios selectivos, como Agar Extracto de Malta – AEM – Agar Harina de Maíz – CM – (Kirk et al., 2001), para facilitar su desarrollo.

La identificación de los aislamientos estuvo basada en la observación y descripción de las características macro y microscópica de los cultivos y en la medición de algunos caracteres morfológicos, para lo cual se seleccionaron al azar, un mínimo

de 50 conidios, fiálides, conidióforos y clamidosporas, los que fueron medidos para obtener un rango de dimensiones representativo.

La caracterización de las dos especies del género *Fusarium*: *F. semitectum* (Berkeley & Rabénel) y *F. solani* (Martius) fue realizada en Agar papa sacarosa – APS – (Kirk et al., 2001) y en un medio agarizado con nutrientes especiales – SNA – (Nirenberg, 1976). Para la observación de la disposición de los conidios y la medición de las fiálides, se prepararon microcultivos. La formación de clamidosporas fue estimulada realizando subcultivos en agar harina de avena – OMA – (Kirk et al., 2001). Los cultivos fueron incubados durante 7 días a 25°C en oscuridad. La composición de los medios de cultivo empleados para el aislamiento y la caracterización de las cepas encontradas se detalla en el Apéndice A. Finalmente, cada una de las cepas aisladas fue depositada en el cepario del Instituto de Botánica Spegazzini y se les otorgó un número de referencia.

3.2.3. Estudio Histopatológico

Para realizar el análisis histopatológico de las muestras se procedió tal como lo señalado en la Sección 2.2.4.

3.3. Resultados

3.3.1. Aislamiento e Identificación

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos, habiéndose encontrado un total de 16 Taxa fúngicos asociados a ovas de pejerrey, en diferentes condiciones de aislamiento; siendo mas frecuentemente aislados durante la exposición a sustancias como Ácido Acético, Cloruro de Sodio y Formalina.

Como se observa en la Figura 3.1, las infecciones fúngicas en ovas de pejerrey, causadas por hongos anamorfos de Ascomycota, se caracterizan por la presencia de finas hifas septadas que rodean la superficie de la ova, las que exhiben un crecimiento moderado o limitado a la periferia de la ovas infectadas; difícilmente comprometen a las ovas vecinas pudiendo pasar desapercibidas a simple vista. Esta presentación difiere de la observada en las ovas infectadas por organismos causantes de Saprolegniasis, en las que el mayor espesor y el conspicuo desarrollo del micelio son fácilmente

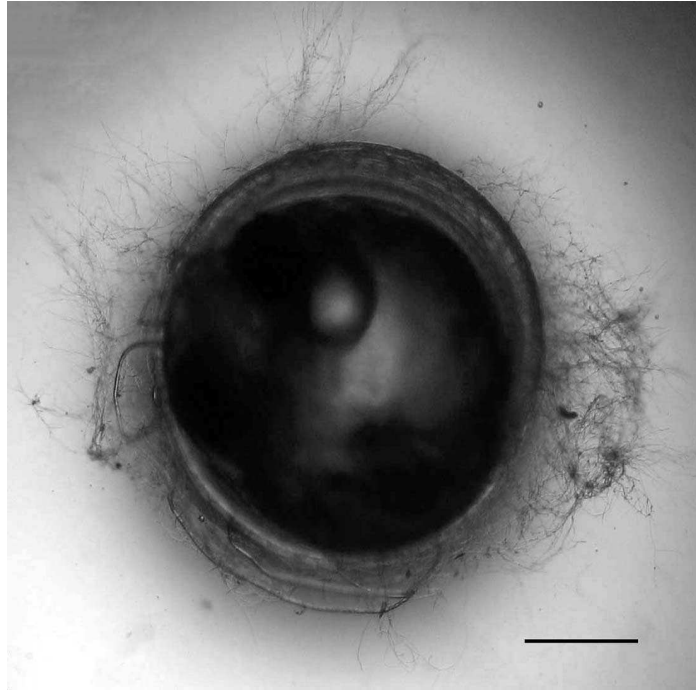


Figura 3.1: Aspecto microscópico de una ova infectada por un hongo amorfo de Ascomycota. Barra de escala = 0,25mm.

observados a simple vista en los sistemas de incubación.

En la Tabla 3.1 se presenta el listado de las especies encontradas, además se indica: el número de LPSC que identifica a cada cepa, la fecha de aislamiento, las características del medio de procedencia del mismo y la denominación del teleomorfo correspondiente.

Se aislaron e identificaron 17 Taxa fúngicos, de los cuales 16 son anamorfos de Ascomycota y uno perteneciente a los Zigomycota. En las Figuras 3.2 a 3.10 se muestran las características más representativas de cada uno de los géneros y especies aisladas.

Tabla 3.1: Taxa fúngicos aislados de ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*. LPSC: número de cepa. AcH: ácido Acético glacial. AcH + AcNa: ácido Acético tamponado.

LPSC	Especie	Procedencia	Fecha	Teleomorfo
1001	<i>Fusarium solani</i> (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen	CINa 25 g.L ⁻¹	12-05	<i>Haemanectria</i> <i>haematococca</i> Giberella Nectria
1002	<i>Fusarium semitectum</i> Berkeley & Rabéeenle	CINa 25 g.L ⁻¹	12-05	<i>Gibberella</i> Nectria
1030	<i>Trichoderma</i> sp. Pers. (1794)	CINa 25 g.L ⁻¹	12-05	
1031	<i>Acremonium</i> sp. Link (1809)	CINa 25 g.L ⁻¹	12-05	<i>Hypocreales</i>
1029	<i>Epicoccum nigrum</i> Link (1815)	AcH 30 mg.L ⁻¹	12-06	<i>Pleosporaceae</i>
1037	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)	AcH 30 mg.L ⁻¹	6-08	<i>Hypocrea</i>
1038	<i>Bipolaris</i> sp. Shoemaker (1959)	AcH 25 mg.L ⁻¹	12-06	<i>Cochliobolus</i>
1028	<i>Trichoderma koningi</i> Oudem.(1902)	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	12-07	<i>Hypocrea</i>
-	<i>Fusarium solani</i>	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	12-07	<i>Haemanectria</i> <i>haematococca</i>
1026	<i>Penicillium frequentans</i> Westling (1912)	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	12-07	<i>Eupenicillium</i> <i>Talaromyces</i>
1027	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson (1974)	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	3-08	<i>Byssoschlamys</i>
1025	<i>Aspergillus terreus</i> Thom (1918)	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	3-08	<i>Emericella</i> <i>Eurotium</i> <i>Neosartorya</i>
1039	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries (1952)	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	3-08	<i>Davidiella</i> <i>Mycosphaerella</i>
-	<i>Mucor</i> sp. Fresen (1850)	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	3-08	-
-	<i>Penicillium</i> sp. Link (1809)	AcH+AcNa < 600 mg.L ⁻¹	3-08	<i>Eupenicillium</i> <i>Talaromyces</i>
-	<i>Acremonium</i> sp. Link (1809)	Sin tratamiento	3-08	<i>Hypocreales</i>
1032	<i>Trichoderma</i> sp. Pers. (1794)	Formaldehido < 150 µg.L ⁻¹	3-07	<i>Hypocrea</i>

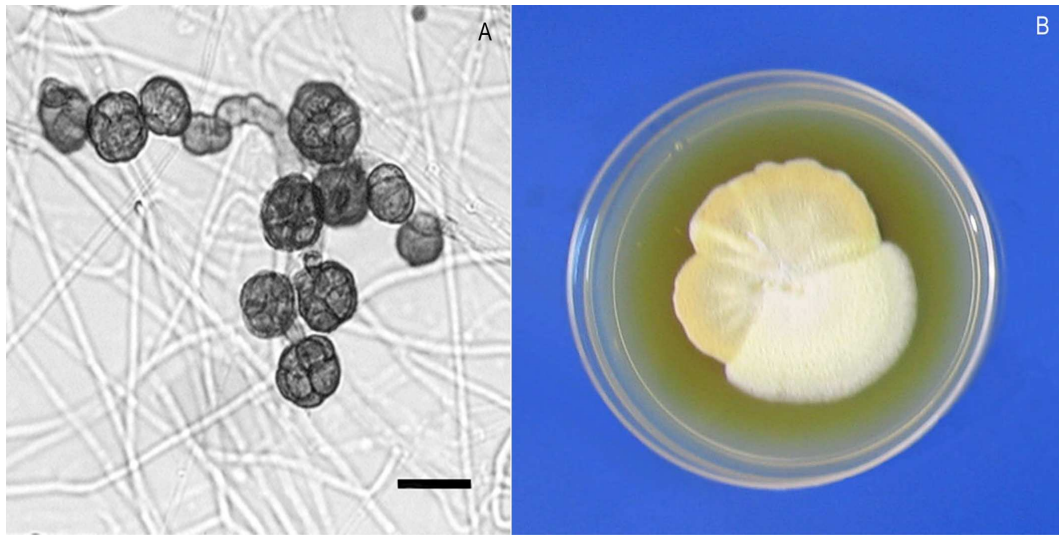


Figura 3.2: *Epicoccum nigrum*. A. Feoconidios muricados Barra de escala = 20 μ m. B. Aspecto general de la colonia.

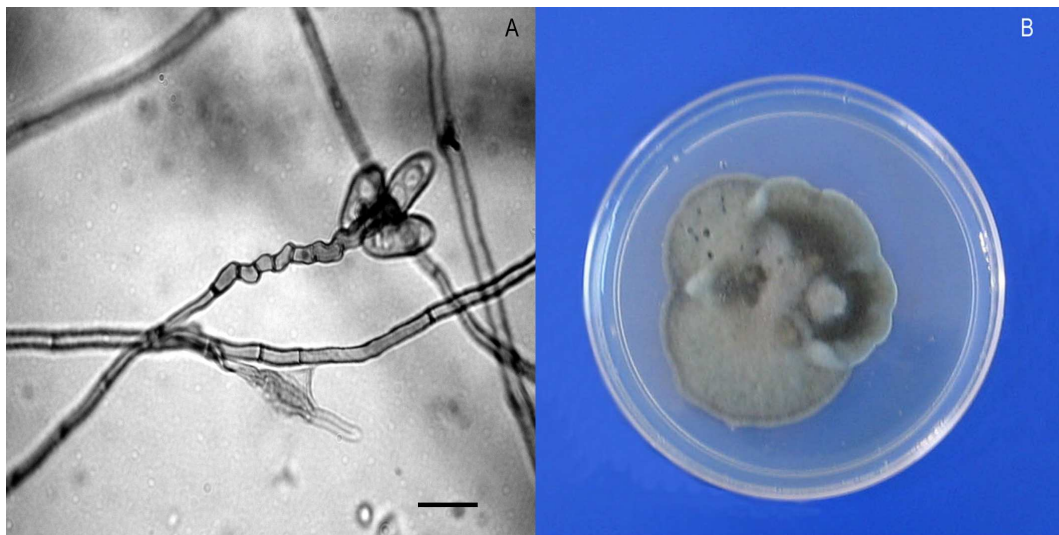


Figura 3.3: *Bipolaris* sp. A. Aspecto microscópico de célula conidiógena con proliferación simpodial. Barra de escala = 20 μ m. B. Aspecto general de la colonia.

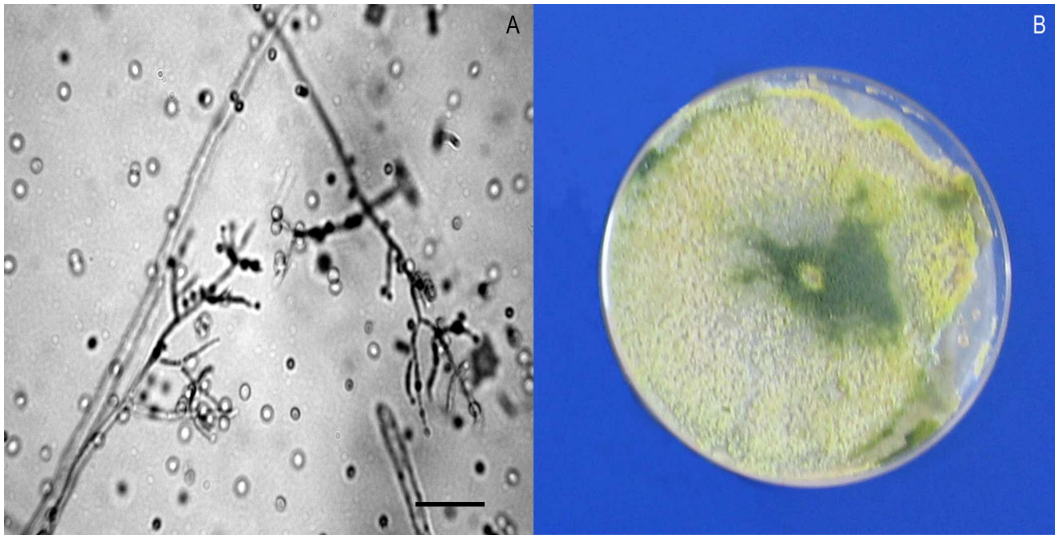


Figura 3.4: *Trichoderma harzianum* A. Fiálide. Barra de escala = 10 μm . B. Aspecto general de la colonia.

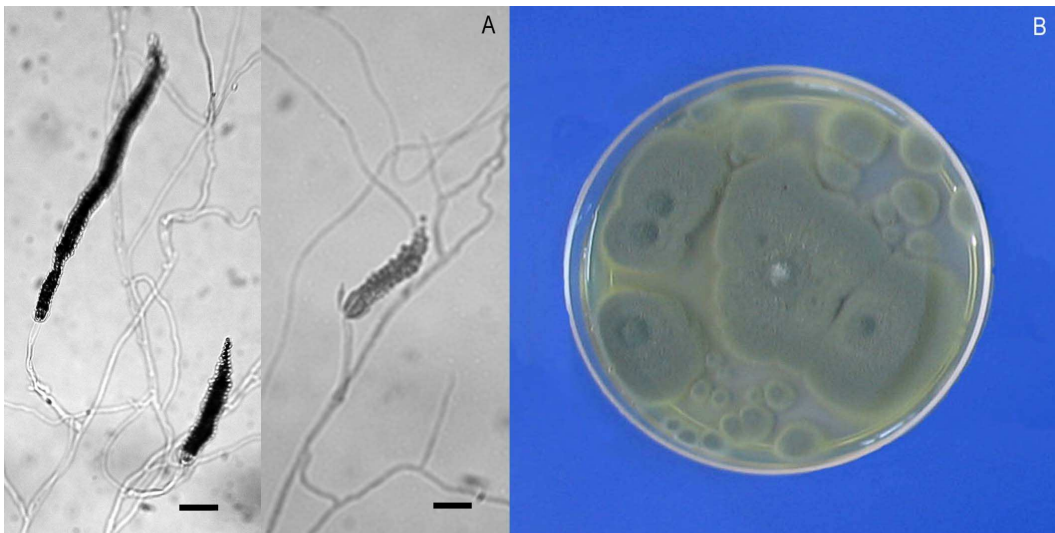


Figura 3.5: *Penicillium frequentans*. A. Fiálide con largas cadenas de conidios. Barra de escala = 20 μm . B. Aspecto general de la colonia.

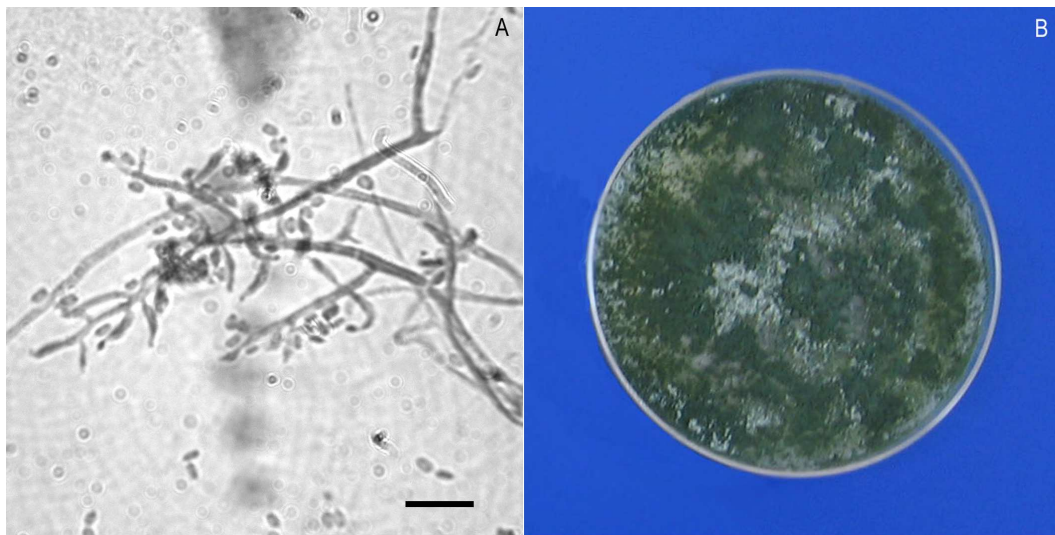


Figura 3.6: *Trichoderma koningii*. A. conidióforos ramificados lateralmente con fiálides cortas y conidios ovoides acumulados en el ápice. Barra de escala = 10 μ m. B. Aspecto general de la colonia.

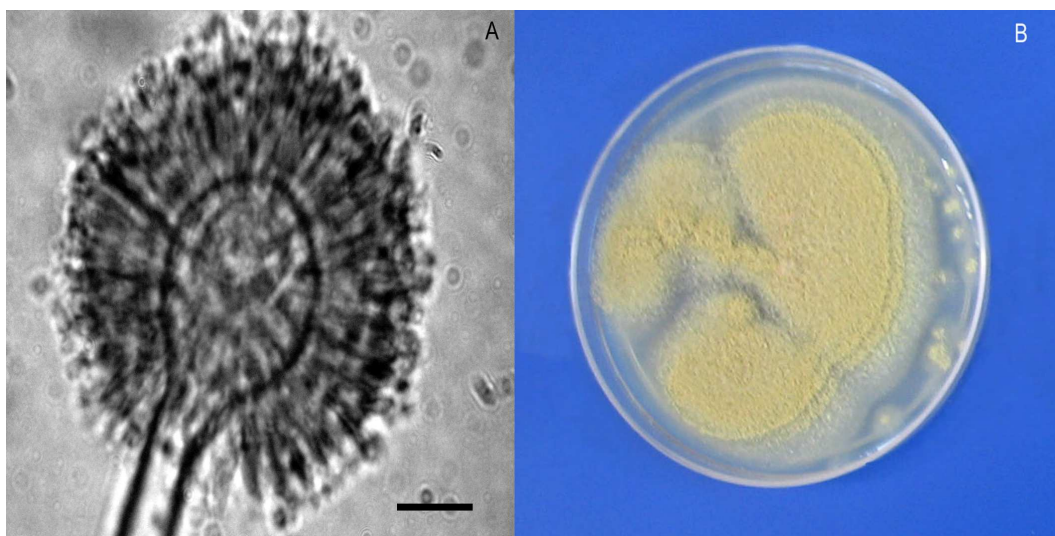


Figura 3.7: *Aspergillus terreus*. A. Cabeza conidial densa. Barra de escala = 20 μ m. B. Aspecto general de la colonia.

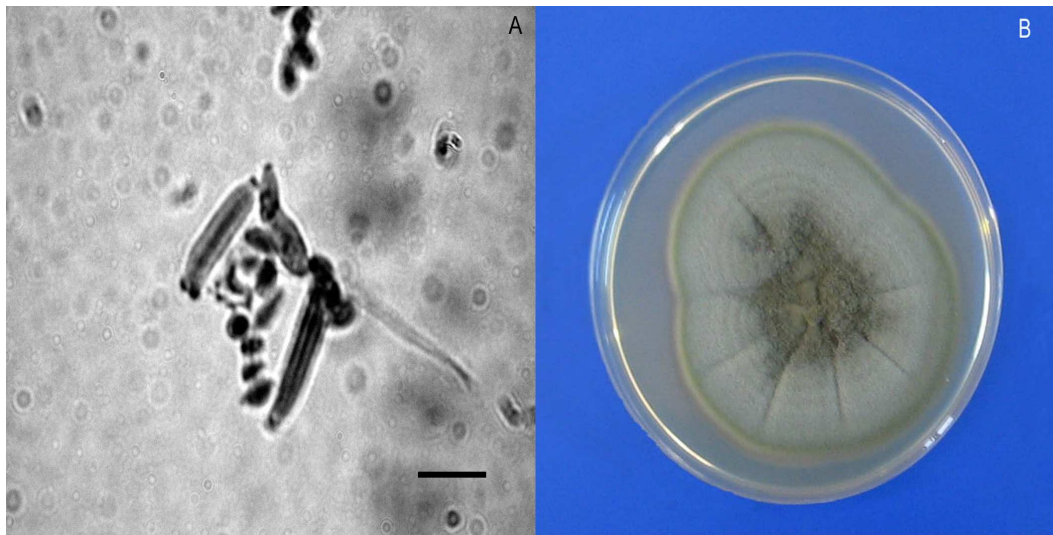


Figura 3.8: *Cladosporium cladosporioides*. A. Ramoconidios característicos. Barra de escala =10 μm . B. Aspecto general de la colonia.

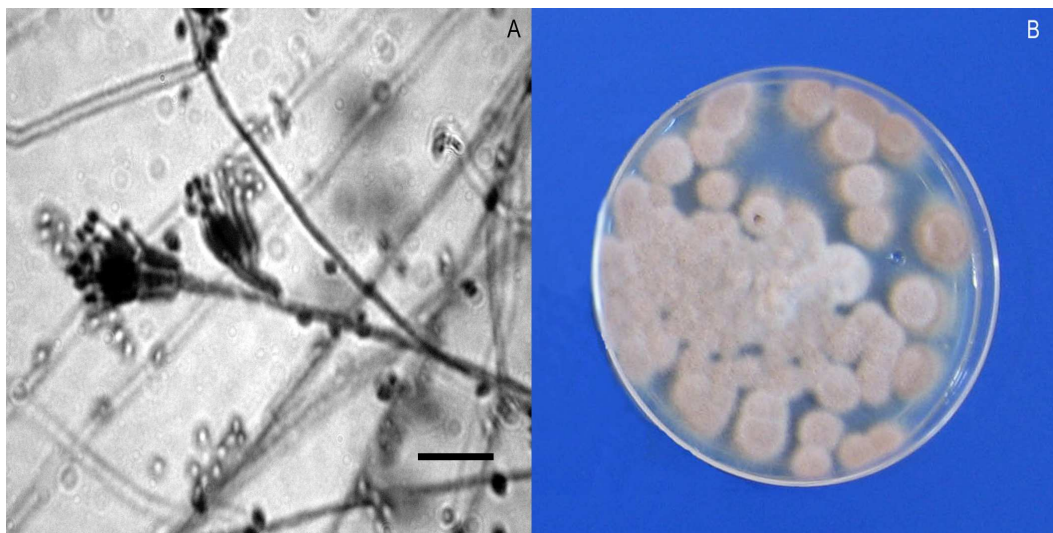


Figura 3.9: *Paecilomyces lilacinum*. A. Conidióforos ramificados en fiálides densamente agrupadas y de extremos apicales delgados con conidios elipsoidales. Barra de escala = 20 μm . B. Aspecto general de la colonia.

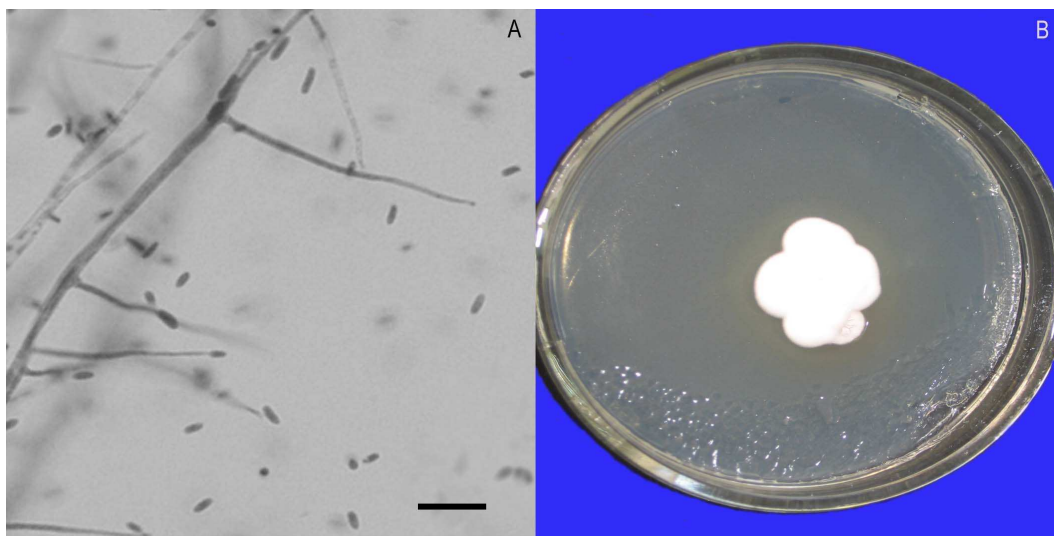


Figura 3.10: *Acremonium* sp. A. Fiálide simple erecta de extremo ahusado. Barra de escala = $10\mu\text{m}$. B. Aspecto general de la colonia.

En la Figura 3.11 se puede apreciar que del total de hongos aislados los del género *Trichoderma* spp. (25,00 %) *Fusarium* spp. (18,75 %) y *Penicillium* spp. y *Acremonium* spp. (12,50 %) presentaron una mayor frecuencia de aparición, abarcando un 68,75 %. Mientras que las especies de los géneros *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., y *Bipolaris* sp., representan el restante 31,25 % del total de aislamientos.

Como se muestra en la Figura 3.12 un 43,75 % de los taxa fúngicos fueron aisladas de ovas incubadas en soluciones de Ácido Acético tamponado a concentraciones de hasta $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un 25,00 % fueron aisladas de ovas sometidas a concentraciones de ClNa de hasta $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un 18,75 % fueron aislados de medios con contenidos de

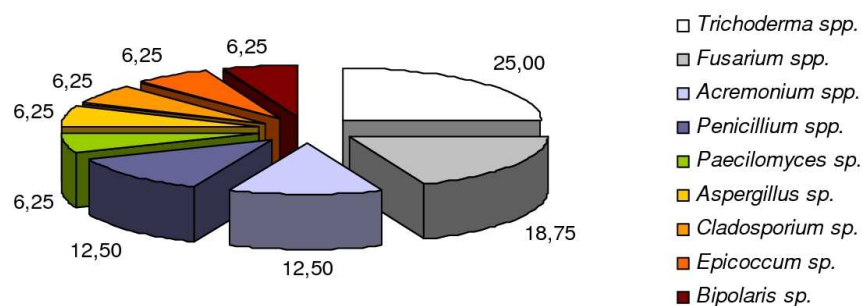


Figura 3.11: Análisis de la frecuencia de aislamientos fúngicos por género.

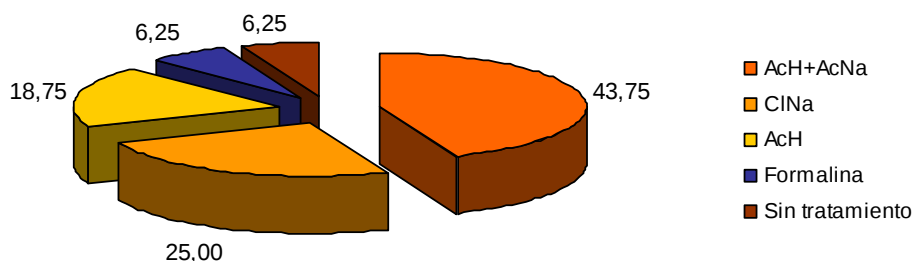


Figura 3.12: Análisis de la frecuencia de aislamientos fúngicos por medio de aislamiento.

Ácido Acético Glacial de hasta 25 mg. L⁻¹; finalmente sólo un 6,25 % se aislaron de soluciones de Formalina y en ovas incubadas en agua dura reconstituida sin agente fungicida.

Debido a que estos organismos pertenecen a un grupo caracterizado por su complejidad taxonómica y puesto que se trata de especies previamente descritas y extensamente estudiadas, no se pretende realizar un estudio descriptivo detallado y crítico de cada especie encontrada. Sin embargo, se incluye la caracterización morfológica de dos especies del género *Fusarium*: *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum*, que fueron posteriormente incluidas en la batería de ensayos para determinar el efecto de las sustancias fungicidas propuestas sobre su tasa de crecimiento.

***Fusarium semitectum* Berkeley & Rabéenle (Figura 3.13)**

Sinónimos: *Fusarium pallidroseum* Cooke Sacc. (1886)

Fusarium incarnatum (Desm) Sacc. (1886)

El aspecto macroscópico varía significativamente según el medio de cultivo; las descripciones están basadas en el crecimiento en PSA a 25°C en oscuridad. Micelio aéreo abundante, denso, flooso, un tanto pulverulento en cultivos maduros, margen entero, algunas veces ondulado. El color del micelio es característicamente blanco a anaranjado con reverso de color marrón. La tasa de crecimiento en APS fue de 0,44 cm. por día. En SNA se observa una pigmentación ligeramente anaranjada debido a la agrupación de pionotes,

Hifas septadas, hialinas. Fiálides elongadas 2,20 - 9,98 x 1,05 - 1,57 µm, en su mayoría de 4,20 - 1,57 x 1,05 - 1,57 µm, con forma de botella, posicionadas directamente sobre una hifa o en conidióforos ramificados de dimensiones que oscilan entre 22 - 100 x 2,00 - 3,50 µm. Microconidios ausentes en SNA y completa oscuridad,

macroconidios abundantes, con el ápice puntiagudo y con forma de cuña o truncado en la base, (-1) 3 - 5 septados, la mayoría con 3 septos, 11,90 – 26,66 x 2,60 μm . Clamidosporas únicamente observadas en OMA (Kirk et al., 2001), amarronadas y dispuestas en cadenas 5,33 - 15,99 x 3,99 - 10,68 μm , mayormente 9,32 x 5,33 μm .

Material examinado: Argentina, Buenos Aires, Chascomús, Estación Hidrobiológica, XII-2005, aislado de ovas de *Odonthestes bonariensis*. leg. Pacheco Marino; det. Cabello & Pacheco Marino (LPSC N° 1001).

***Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen** (Figura 3.14)

Sinónimos: *Nectria haematococca* (Berk & Broome) Kuntz

Colonias de rápido crecimiento hasta 0,45 cm. por día, alcanzan el borde la placa luego de 4 días de incubación a 25°C en APS. Micelio aéreo estriado, pulverulento, escaso a denso y flooso, grisáceo blanquecino, con regiones verde azuladas a grises y reverso color crema.

Conidióforos elongados, con el extremo apical ahusado, verticilados, 26-55 x 1,57 - 1,05 x 0,52 μm , la mayoría de 31,71 x 1,57 x 0,52 μm . Esporodoquios producidos en completa oscuridad, ocasionalmente azules o verdeazulados y se convierten fácilmente en pionotes. Macroconidios 3 - 5 septados, mayormente 5 septos, 19,90 - 35,98 x 3,99 - 5,13 μm mayormente 27,99 - 3,99 μm , con células apicales cortas y romas y células basales indistintamente pediciladas. Microconidios abundantes, 2,66 - 13,33 x 1,33 - 3,99 μm , la mayoría de 7,99 x 2,66 μm , agrupados en una cabezuela mucosa en el ápice de una monofiálide. Clamidosporas no observadas en APS, mientras que en OM aparecen después de 10 días de incubación a 25°C, solas o en pares, con dimensiones que varían entre 5,33 - 10,65 x 5,33 - 10,65 μm mayormente 6,66 μm diam.

Material examinado: Argentina, Buenos Aires, Chascomús, Estación Hidrobiológica, XII-2005, aislado de ovas de *Odonthestes bonariensis*. leg. Pacheco Marino; det. Cabello & Pacheco Marino (LPSC N° 1002)

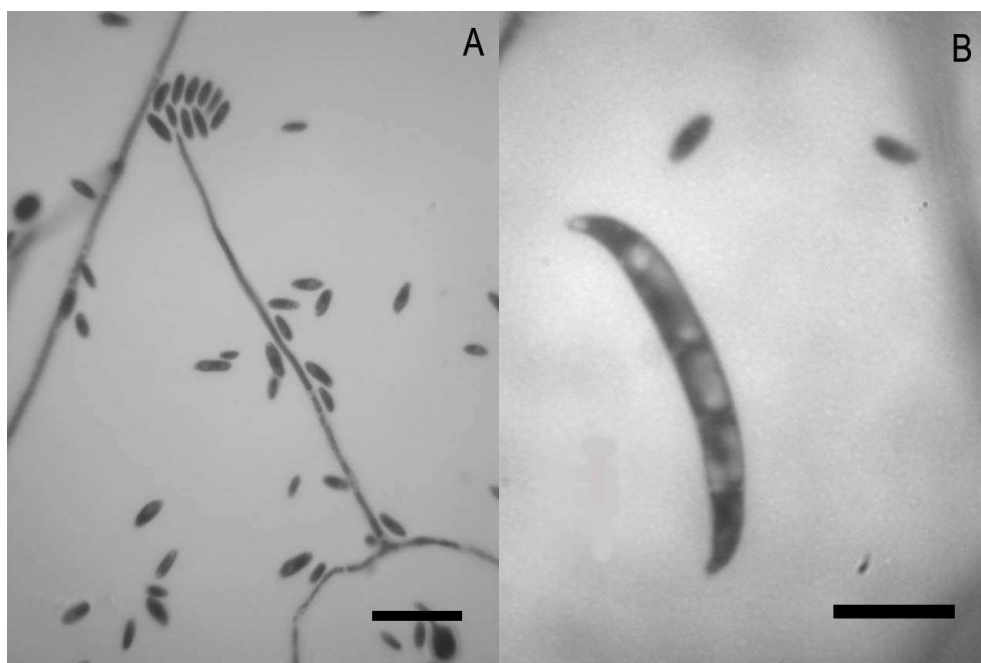


Figura 3.13: *Fusarium solani*. A.- Microconidios agrupados en el extremo apical de la fíalide. Barra de escala = 20 μm . B.- Macro y microconidios. Barra de escala = 10 μm .

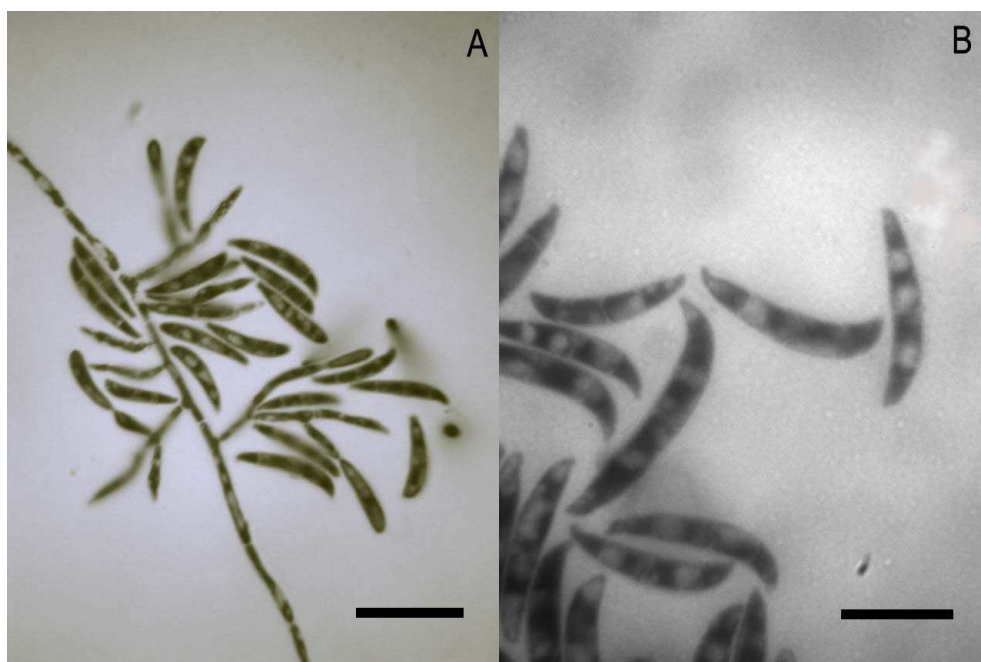


Figura 3.14: *Fusarium semitectum*. A.- Detalle de una fíalide con numerosos macroconidios. Barra de escala = 20 μm . B.- Macroconidios. Barra de escala = 10 μm .

3.3.2. Estudio Histopatológico

La observación de los cortes histológicos teñidos con H&E evidenció la presencia de micelio tabicado en la periferia de las ovas. Por su parte la coloración de Grocott proporcionó un diagnóstico definitivo de la infección fúngica, observándose mediante ésta micelio en el exterior e interior de la ova, tal como puede verse en la Figura 3.15.

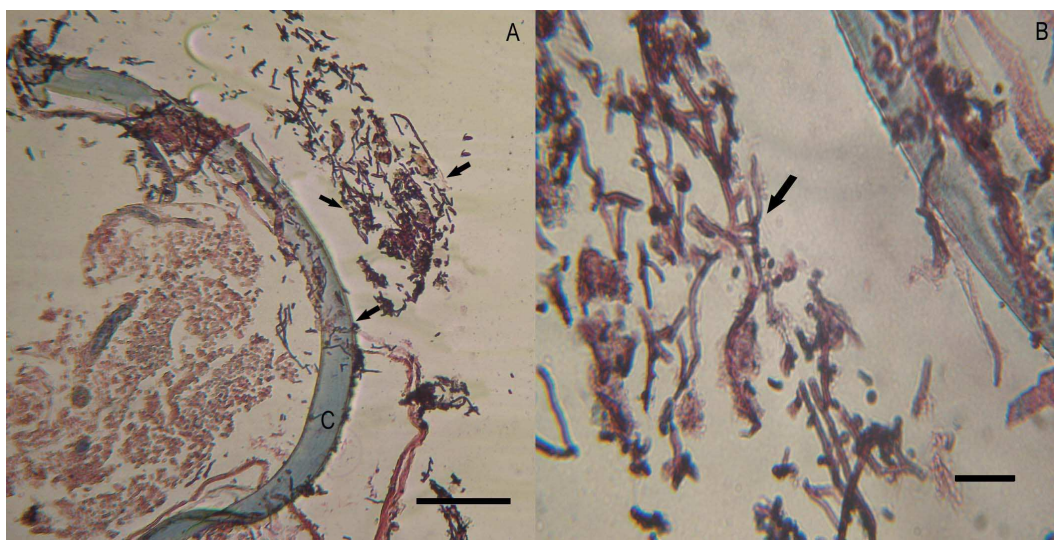


Figura 3.15: Cortes histológicos de las ovas infectadas teñidas con Grocott. A. Aspecto de la ova con micelio alrededor del corion (C), Barra de escala = 50 μm . B. Detalle del micelio en la periferia de la ova. Barra de escala = 20 μm .

3.4. Discusión

Los géneros encontrados, mencionados en la Tabla 3.1, comparten características comunes, todos ellos son hongos característicos del suelo, tienen una amplia distribución, son saprótrofos ubicuos capaces de actuar de actuar como patógenos facultativos de plantas, aunque en la mayoría de los casos también se los ha encontrado asociados a animales, vertebrados e invertebrados, y el hombre (Domsch et al., 1993).

La biodiversidad de los hongos en hábitats de agua dulce es muy compleja e incluye a una gran variedad de anamorfos de Ascomycota. Alrededor de 450 especies de Ascomycetes han sido registrados en hábitats dulceacuícolas, lóticos y lénticos,

como parásitos y endófitos de macrófitas acuáticas y algas; y como saprótrofos sobre material vegetal. (Shearer et al., 2004). No es inusual que hongos saprótrofos característicos del suelo, y de la materia orgánica en descomposición, puedan estar presentes en el medio ambiente acuático, tal como lo demostró Ranković (2005). Este autor estudió la micobiota presente en 5 embalses Serbios, encontrando con mayor frecuencia a representantes del “Fungi Imperfecti” de los géneros *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., y también, pero con menor frecuencia, a *Cladosporium* spp. y *Acremonium* spp. Estos organismos fueron denominados por Ranković (2005), transitorios accidentales debido a que, si bien son típicos hongos del suelo suelen participar en los procesos microbiológicos en los cuerpos de agua.

En las últimas tres décadas, una serie de infecciones sistémicas letales causadas por hongos verdaderos, han sido descritas en peces de América del Norte, Canadá y otros países; afectando principalmente a especies mantenidas en cautiverio como salmónidos e ictalúridos (Faisal et al., 2007). A diferencia de las Saprolegniasis, que por lo general se establece en los estratos más superficiales del epitelio y únicamente en casos severos invade los tejidos subyacentes; las infecciones micóticas han sido encontradas en diversos órganos internos y tejidos, como el hígado, riñón, vejiga natatoria, tejido muscular y cartílago. Este hecho ha llevado a diversos autores a establecer que la vía de ingreso de estos organismos es gastrointestinal y no cutánea; lo que nos hace suponer que los hongos verdaderos poseen una mayor capacidad invasiva, ya que son capaces de atravesar la barrera gástrica y acceder al torrente sanguíneo diseminándose por todo el organismo hasta establecerse en un determinado órgano.

Las unidades infectivas de los hongos verdaderos son denominadas conidios, a diferencia de las zoosporas, éstos carecen de flagelos y por ende de movilidad propia. Germinan formando tubos germinales o apresorios, a partir de los cuales las hifas penetran en los tejidos mecánicamente y por medio de enzimas, que pueden ser queratinasas, quitinasas, lipasas o proteinasas. A pesar de que en la presente investigación no se ha determinado el grado de patogenicidad de las especies encontradas sobre ovas de pejerrey; y se desconoce si éstas infligen daño al hospedador o únicamente lo utilizan como sustrato de crecimiento actuando como epibiontes; la mayoría de las especies encontradas poseen enzimas proteolíticas que les permitirían atravesar el corion de las ovas (Domsch et al., 1993; Eliades, 2009).

Las micosis provocadas por hongos filamentosos han sido clasificadas, por la presencia o no de pigmento en la pared micelial y conidios, en Hialohifomicosis y Faeohifomicosis. Esta es una clasificación que no obedece a criterios taxonómicos, sino más bien es empleada con fines puramente prácticos, didácticos e integradores; de acuerdo a la cual podemos observar que en los aislamientos descritos existe claro predominio de las Hialohifomicosis (81,25 %) sobre las Faeohifomicosis (18,75 %). La Figura 3.11 esquematiza las frecuencias de aislamientos a nivel de género en orden decreciente, los taxones más frecuentemente aislados fueron las pertenecientes a los géneros *Trichoderma* spp. (25,00 %), *Fusarium* spp. (18,75 %), *Acremonium* spp. (12,50 %), *Penicillium* spp. (12,50 %), *Aspergillus* sp. (6,25 %), *Cladosporium* sp. (6,25 %) *Epiccocum* sp. (6,25 %), *Bipolaris* sp. (6,25 %).

Si bien *Trichoderma* fue el género más frecuentemente aislado no existen reportes previos que vinculen a esta especie con micosis en peces u otros organismos acuáticos. Sin embargo, Ali (1994) aisló a *T. harzianum* de huevos de nematodos y demostró los efectos nocivos de esta especie sobre la eclosión de *Meloidogyne incognita*.

Existen claras evidencias del rol que cumplen algunas especies del género *Fusarium* como patógenos de peces y otros organismos acuáticos Hörter (1960) informó los primeros brotes de Fusariosis masiva en carpa, aunque el papel de *Fusarium culmorum* como agente patógeno primario no fue determinado. Hatai & Kubota (1986), describieron un caso de micosis renal en besugo *Pagrus* sp., causada por *Fusarium oxysporum*. Ferguson (1989) describió la presencia de un micetoma en *Cyprinodon macularius*, causado por *Fusarium solani*. También se han registrado casos de Fusariosis en peces marinos; Muhvich et al. (1989) describe una micosis crónica causada por *F. solani* en la que se observa la penetración de las en el cartílago de *Sphyrna tiburo*; similares hallazgos fueron descritos por Smith et al. (1989). Crow et al. (1995) presentaron evidencia histológica de una dermatitis micótica provocando una lesión granulomatosa exudativa, localizada en el sistema de canalicular de la línea lateral del tiburón martillo (*Sphyrna lewini*).

El único informe en la literatura que menciona a *Fusarium semitectum* (como *F. incarnatum*) como patógeno de organismos acuáticos, es el realizado por Khoa et al. (2004) quienes lo encontraron como un parásito del camarón tigre negro (*Penaeus monodon*). Esta especie también ha sido encontrada parasitando huevos de *Toxocara canis*, como causante del reblandecimiento del caparazón en tortugas, asociado

a enfisema pulmonar en bovinos, y en el hombre ha sido implicado en casos de endocarditis e infecciones diseminadas en piel en pacientes inmunocomprometidos o quemados (Leslie & Summerell, 2006).

Las características morfológicas del presente aislamiento de *Fusarium semitectum* coinciden con la descripción realizada por Sutton et al. (1998) y Nelson et al. (1983) quienes lo describieron originariamente como *Fusarium incarnatum*. En el presente aislamiento se observaron mayormente macroconidios triseptados y de menor tamaño que *F. semitectum* var *majus* descrito por Booth (1971) y *F. incarnatum* descrito por Khoa et al. (2004). También se observaron fiálides más delgadas que las reportadas por otros autores. En cuanto a *Fusarium solani*, el tamaño de los microconidios concuerda con la descripción realizada por Booth (1971), mientras que los macroconidios y las fiálides del presente aislamiento, son más cortos que los reportados por otros autores.

Por su parte, las especies del género *Acremonium* están muy extendidas en el suelo y materia orgánica en descomposición, este género incluye más de 100 especies reconocidas como patógenos oportunistas de animales y el hombre, provocando en éste onicomycosis, micetomas y hialohifomicosis en humanos. También han sido encontradas asociadas a dípteros fitófagos (Hernández et al., 2007), huevos de nematodos (Ali & Barakat, 1994) y afectando a poblaciones naturales del crustáceo decápodo *Astacus leptodactylus* en Turquía (Seğer & Özkul, 1988; Diler & Bolat, 2001).

Los primeros hallazgos de *Penicillium* como patógeno de peces han generado controversia, debido a que Reichenbach Klinka (1956) agrupara bajo la denominación de *Penicillium piscium* a *Nefromyces piscium* caracterizado por Plehn en 1916, y otras especies de hongos parásitos reportados por Verdum en 1903 y Shaperklaus en 1954. La validez de este taxón ha sido cuestionada por Neish & Hughes (1980) debido a que las caracterizaciones morfológicas fueron realizadas en material preservado. No obstante, Blaylock et al. (2001) aisló a *Penicillium corylophilum* en vejiga natatoria del Pargo rojo (*Lutjanus campechanus*) y Pacheco Marino (2004) aisló a *Penicillium* spp. de lesiones externas y branquias de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

El hongo entomopatógeno *Paecilomyces lilacinus* ha sido aislado de una diversidad de insectos cimícidos, triatómidos, gorgojos, gusanos de seda (Martti et al., 2006), y nematodos (Cabanillas et al., 1988; Ali & Barakat, 1994). Recientemente se

ha registrado un incremento en el número de casos de micosis humanas, en pacientes sanos e inmunocomprometidos, causadas por *P. lilacinus*; razón por la cual ha sido considerado por la National Foundation for Infectious Diseases como patógeno emergente (Goettel et al., 2001). También se lo ha encontrado como parásito de tortugas, lagartos, cocodrilos, caimanes y víboras (Austwik, 1983; Maslen et al., 1988). Otras especies de este género como *P. farinosus* y *P. marquandii* han sido encontradas como agentes patógenos del salmón atlántico (*Salmo salar*) y de la Tilapia roja, (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis mossambicus*) (Chacko, 1991; Rand et al., 2000).

Las especies del género *Aspergillus* son de amplia distribución, considerados saprótrofos asociados a la materia orgánica en descomposición y más raramente como patógenos oportunistas de animales; estando generalmente asociado a infecciones del sistema respiratorio en vertebrados superiores. Los primeros registros de *Aspergillus* sp. fueron realizados por Olufemi et al.(1983) en *Sarotherodon* spp., posteriormente Olufemi (1985) describieron un evento de aspergillomicosis provocando lesiones granulomatosas en órganos internos de Tilapia. Finalmente, Olufemi & Roberts (1986), demostraron la patogenicidad de *Aspergillus flavus*, inoculado por vía intragástrica, en *Oreochromis niloticus*. Hasta entonces todos los aislamientos provenían de Tilapia, hasta que Bhattacharya et al. (1988) aislaran a *Aspergillus terreus* a partir de lesiones externas hemorrágicas de *Channa gachua* y *Heteropneustes fossilis* y confirmaran su patogenicidad en ambas especies y además en *Clarius batrachus*. Otros aislamientos de especies de este género, fueron los realizados por Dubey & Bhattacharya (1995), quienes aislaron a *A. niger* del pez gato africano *Clarias batrachus* y Pacheco Marino (2004), que aisló a *A. flavus* y *A. niger* de lesiones externas y branquias de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) Además, de su rol como patógenos, Roberts (2001) señala la importancia de estos organismos como contaminantes de los piensos y productores de metabolitos hepatotóxicos capaces de inducir el desarrollo de de hepatomas en peces.

La ocurrencia de casos de micosis causadas por hongos dematiaceos, o Feohifomicosis, han sido reportadas en una gran variedad de peces (Neish & Hughes 1980; Chacko, 1991). Representantes del género *Cladosporium* han sido asociados más comúnmente a infecciones cutáneas en ambientes marinos. *C. spharospermum* fue aislado de lesiones cutáneas del pulpo leiser (= *Eleodone cirrhosa*)(Polglase et al.,

1984); una especie no determinada de este género fue aislada del pez payaso rojo “tomato clownfish” *Amphiprion frenatus* (Silphaduang et al., 2000); *Cladosporium* sp. también fue encontrando parasitando el epitelio branquial del bacalao *Gadus morhua* (Reichenbach-Klinke, 1956); finalmente Strongman et al. (1997) describieron un aislamiento de *Horrmocoris* (= *Cladosporium resinae*) a partir de lesiones epiteliales del pez marino *Hippoglossoides platessoides*, o platija americana, mantenida en cautiverio. Por otro lado, el único hallazgo de micosis sistémica causada por *C. sphaerospermum* en pargo rojo (*Lutjanus campechanus*) fue descrito por Blaylock et al. (2001). La prevalencia de este género en aguas marinas y su diversidad metabólica sugieren que podría ser un patógeno oportunista de animales marinos, pero el impacto sobre las poblaciones silvestres es aún desconocido. De las otras dos especies de hongos dematiáceos aisladas, sólo se ha encontrado reportes previos de actividad parasitaria en organismos acuáticos en: *Epicoccum purpurascens* (= *Epicoccum nigrum*) aislado de branquias de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Pacheco Marino, 2004) y parasitando a la medusa marina *Aurelia aurita* (Wright et al., 2003) esta especie también ha sido asociada a dípteros fitófagos (Hernández et al., 2007). Las especies del género *Bipolaris* sólo han sido vinculadas en feohifomicosis cutáneas en vertebrados superiores, incluyendo al hombre (Domsh et al., 1993). Por otra parte, la única referencia encontrada que relacione a alguno de los miembros de Phylum Zigomycota con peces, es el episodio en el que se describe un caso de Zigomicosis sistémica, causada por *Rhizomucor* sp., en Tilapia, afectando principalmente al riñón de individuos en condiciones de cría (Wolf & Smith, 1999)

Como se observa en la Figura 3.12, la mayor diversidad de especies fue aislada de ovas expuestas a soluciones de Ácido Acético en solución tamponada (43,75 %), Cloruro de Sodio (25,00 %), Ácido Acético Glacial (18,75 %), Formaldehído y ovas sin tratamiento (6,25 %). Si comparamos la cantidad y diversidad de especies que fueron aisladas de soluciones de Ácido Acético tamponado [AcH+AcNa] (43,75 %), con las aisladas de soluciones de Ácido Acético [AcH] (18,75 %); podemos inferir que el descenso del pH registrado en las soluciones de Ácido Acético Glacial, que alcanzó valores ubicados en un rango de 3,9 - 6,7, actuó como factor limitante y selectivo para el desarrollo de ciertas especies fúngicas. Mientras que en las soluciones de Ácido Acético tamponado sólo se observó un ligero descenso de los valores de pH (5,5 - 5,7) que no ejerció un efecto inhibitor o selectivo sobre la microbiota, debido

a que la mayoría de los hongos del suelo desarrollan perfectamente en ambientes ligeramente ácidos (Domsh et al., 1993). Resultados similares fueron obtenidos por Kang et al. (2003) en tres especies del género *Colletotrichum* spp., quienes observaron que la inhibición del crecimiento se aceleró con la disminución del pH de 6 a 4, lo que sugiere que el efecto puede ser mayor al aumentar la cantidad de AcH en su forma no disociada. El efecto tóxico del Ácido Acético serán discutidos con mayor detalle en capítulos posteriores.

Especies de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Acremonium* fueron aisladas de soluciones de ClNa de hasta 25 mg.L⁻¹. No es extraño que se logren aislar a este tipo de microorganismos de ambientes sometidos a condiciones extremas, ya que la mayoría de los hongos que se encuentran en ambientes extremos como: manglares, suelos salinos, sedimentos marinos, agua de mar, marismas, dunas y arena, suelen ser anamorfos de Ascomycota (Adler, 1996). Los organismos con capacidad de tolerar concentraciones de ClNa superiores a 0,2 M son denominados Halotolerantes, entre los que podemos citar se encuentran algunas especies de los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Chaetomium*, estas especies también son frecuentemente aisladas del suelo y aire (Zak & Wildman, 2004; Cantrell et al., 2006). Mientras que los organismos que requieren elevadas concentraciones de ClNa (1,5-4,0 M) para su desarrollo son denominados Halófilos. Elevadas concentraciones de Sodio no sólo ejercen un efecto negativo alterando la presión osmótica, sino que también pueden afectar estructuras proteicas y alterar la función enzimática (Cooke & Whipps, 1993).

Fusarium solani se encuentra ampliamente distribuido como patógeno de crustáceos peneídos, y también ha sido implicado en infecciones en otros organismos marinos (Alderman & Polglase, 1986; Chacko, 1991). Esta especie ha sido aislada de organismos que habitan ambientes marinos y salobres, siendo también capaz de ocurrir y producir infecciones similares en organismos de ambientes dulceacuícolas. Tanto *Acremonium* spp. como *Trichoderma* spp., también han sido previamente aislados de ambientes salinos (Zak & Wildman, 2004)

Trichoderma spp. fue la única especie aislada de soluciones de Formalina entre (0 y 200 µl.L⁻¹). La capacidad que tienen algunas especies de hongos levaduriformes como, *Trichosporum* spp., *Debaryomyces* sp. y *Hansenula* spp., de utilizar y asimilar

el Formaldehído ha sido demostrada por diversos autores (Kato et al., 1982; Kaszycki et al., 2006). A pesar de que son pocos los estudios realizados para determinar la capacidad de los hongos filamentosos de degradar estos compuestos, Mc Fadden & Sutton (1975), desarrollaron un medio selectivo para el aislamiento de especies del género *Trichoderma*, basados en su capacidad de crecer en medios que contienen Formaldehído. Sawada et al. (2006) asilaron a *Trichoderma virens* de suelos expuestos a Formaldehído y comprobaron que las cepas aisladas eran capaces de degradar concentraciones de esta sustancia de hasta 0.6 % (=6000 $\mu\text{l.L}^{-1}$).

Parte II

Evaluación de la toxicidad de los tratamientos profilácticos

Capítulo 4

Evaluación de la toxicidad de los tratamientos profilácticos en ovas de pejerrey

4.1. Introducción

El pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, es un pez óseo que pertenece a la Clase: Actinopterygii; Orden Atheriniformes, Familia: Atherinopsidae. Los numerosos géneros y especies de esta Familia se encuentran distribuidos por todo el mundo. El género *Odontesthes* está conformado por varias especies de aguas continentales, tales como: *O. hatcheri* (Eigenmann) *O. humensis* (De Buen) *O. bonariensis* (Valenciennes) y *O. argentinensis* (Valenciennes) (Dyer, 2006). El pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, es un organismo bentopelágico, eurihalino que habita aguas continentales de la cuenca del Río de la Plata, el río Paraná y aguas bonaerenses vinculadas con la cuenca del Salado entre otras (Ringuelet, 1967; Mancini & Grosman, 2009). Presenta un cuerpo fusiforme de coloración plateada, boca pequeña y maxilares protráctiles, cabeza cónica y alargada, línea lateral doble e irregular y una aleta dorsal doble. A pesar de que su crecimiento es lento bajo condiciones naturales, se han registrado ejemplares de hasta 60 cm de longitud estándar (Dyer & Chernoff, 1996). Esta especie alcanza su primera madurez sexual aproximadamente al primer año de vida. El período de desove se inicia cuando la temperatura del agua alcanza 13°C como promedio diario y se extiende entre Agosto y Noviembre en Argentina, Uruguay y

Chile; además existe un segundo periodo de desove durante los meses de Marzo y Abril (Calvo & Dadone, 1972; Grosman, 2001). Según Ringuelet (1967), la temperatura óptima para el desove y desarrollo embrionario es de 17°C. El porcentaje de fecundidad mantiene una relación exponencial con la longitud, peso y edad; y el número de oocitos oscila entre 1.170 en las hembras más pequeñas a 30.300 en los ejemplares más grandes.

Las ovas son translúcidas de color verde esmeralda. Al tomar contacto con el agua se hidratan tornándose turgentes, las variaciones en el tamaño dependerán de la talla y edad de las hembras. Los diámetros de las ovas hidratadas provenientes de hembras de 3 y 7 años de edad suelen ser de 1,68 y 1,72 mm respectivamente. La cápsula externa o corion, presenta varios filamentos adhesivos de 3 a 5 cm de longitud. La duración del período embrionario está condicionada por la temperatura de incubación, la que a su vez también tiene efecto en la posterior diferenciación sexual (Strussman et al., 1996).

Esta especie ha sido objeto de numerosos estudios; muchas de las contribuciones están relacionadas con aspectos: taxonómicos (Campos, 1984; Dyer, 2006) ecológicos (Grosman, 2001; Quirós et al., 2002; Mancini & Grosman, 2009) de comportamiento alimenticio (Escalante, 2001) y biología reproductiva (Strussman et al., 1996; Somoza et al., 2002). Desde que en 1904 se iniciaron los primeros emprendimientos para adaptar esta especie a sistemas de cultivo, se ha generado una vasta información sobre técnicas de cría (Ringuelet, 1943; Luchini et al., 1984; Reartes, 1995). Posteriormente esta especie fue exportada a diversos países de Latinoamérica y al Japón, en donde el desarrollo de la “Atherinicultura” cobró mayor énfasis.

El cultivo del pejerrey puede verse afectado por agentes patógenos (parásitos, bacterias, hongos, virus); estas afecciones suelen verse exacerbadas durante su manutención en cautiverio, de modo tal que para ser evitadas y controladas se recurre al uso de sustancias químicas, las que pueden ser de uso general (como los desinfectantes) o de uso específico (antibióticos, parasiticidas, fungicidas, etc). En Acuicultura, el uso de dichas sustancias como agentes profiláctico-terapéuticos en la prevención y control de las infecciones micóticas superficiales que afectan frecuentemente a los huevos de peces, es recomendada por diversos Organismos y Agencias regulatorias (por ej., FAO, 2007; OIE, 2000; US.FDA, 2008)

El Verde de Malaquita ha sido considerado como uno de los agentes fungicidas

más eficaces; no obstante, luego de que en 1994 la United States Food and Drug Administration (US. FDA) prohibiera su utilización en el tratamiento de especies destinadas a consumo humano, otros países (Alemania, Noruega, Reino Unido, Filipinas, Japón) incorporaron esta medida regulatoria (Treves & Brown, 2000). De allí surgió la necesidad de evaluar otras sustancias que reemplacen al Verde de Malaquita.

Dentro de la gran variedad de sustancias que fueron consideradas para estos fines, podemos mencionar: Cloruro de Sodio, Formalina, Permanganato de Potasio y Sulfato de Cobre. Se dispone de abundante información sobre la eficacia de dichas sustancias como agentes fungicidas; sin embargo, en su mayoría se refiere a especies de interés económico cultivadas en países del hemisferio Norte, como salmónidos, ciprínidos y acipenséridos. Debido a la insuficiente información específica, es práctica frecuente la utilización de dichos agentes considerando sus propiedades terapéuticas y concentraciones o dosis efectivas, por extrapolación de la información referida a otras especies. Por otro lado, la mayoría de los ensayos de evaluación de la capacidad fungicida encontrados en la bibliografía, no se basaron en protocolos estandarizados considerando paralelamente la eficacia como fungicidas y los efectos deletéreos que dichas sustancias pueden provocar en exposiciones a corto y largo plazo sobre los organismos que serán objeto de tratamiento. La falta de información específicamente referida a la toxicidad y riesgos ambientales asociados a la aplicación de sustancias químicas utilizadas en el control de enfermedades es una de las principales dificultades en la implementación, desarrollo e intensificación de la acuicultura de especies nativas.

Por las razones antes expuestas se eligió abordar el estudio comparativo de los efectos de la exposición de las ovas de pejerrey a cinco sustancias fungicidas ampliamente utilizadas en otras especies: Verde de Malaquita (empleado como control positivo de eficacia y toxicidad), Formaldehído, Cloruro de Sodio, Ácido Acético e Iodo. Ninguno de estos productos han sido estudiados en nuestro medio en relación a su posible utilidad terapéutica en el control de infecciones micóticas del pejerrey en las fases iniciales de su desarrollo posfecundación, en condiciones de laboratorio.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Especímenes de estudio

Se utilizaron ovas embrionadas de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835), provistas por la Estación de Piscicultura de Chascomús (Pcia. Bs. As), procedentes de desoves de diferentes hembras, coincidentes en su momento de fecundación. Éstas fueron trasladadas al laboratorio en botellas de vidrio estériles con agua proveniente de la estación de cría; luego de un proceso de selección y limpieza se acomodaron en incubadoras con 2 L de agua dura reconstituida (ADR), aireación constante y recambio total del medio cada 6 horas, durante las cuales se retiraron las ovas no viables. En dichas condiciones permanecieron durante 72 horas hasta alcanzar la organogénesis, 120 h post fecundación; este estadio fue elegido debido a que se puede apreciar claramente el estado general de las ovas. Antes de iniciar los ensayos los huevos fueron seleccionados, verificando su viabilidad mediante la observación, bajo lupa estereoscópica, de la contracción del pulso cardíaco, presencia de movimientos y circulación sanguínea. También se verificó la uniformidad en el estadio de desarrollo (organogénesis), entre los estadios 17 y 18 del desarrollo embrionario descrito por Chalde (2009), así como también la ausencia de infección fúngica o alguna otra alteración. Con la finalidad de contemplar las variaciones estacionales en la condición biológica de los huevos mencionada por Marking et al. (1994), los ensayos fueron realizados durante los dos períodos de desove del pejerrey de agua dulce (primavera y verano).

4.2.2. Condiciones experimentales

Los ensayos fueron realizados con ADR preparada según las recomendaciones de US EPA (2002). Se utilizaron 19 L de agua desionizada a los que se les adicionó: 2,4 g de MgSO_4 , 3,84 g de NaHCO_3 y 0,16 g de KCl ; simultáneamente se disolvió 2,4 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua, solución que fue agregada posteriormente completando 20 litros. Al finalizar la preparación se corroboró que los parámetros de dureza y pH de la solución resultante se hallaran dentro del rango esperado: pH 7,6 a 8,0 dureza de 160 a 180 $\text{mg CO}_3\text{Ca} \cdot \text{L}^{-1}$, alcalinidad de 110 a 120 $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Para los ensayos se utilizaron frascos de vidrio de 350 ml, conteniendo 150 ml de ADR; los mismos

se mantuvieron dentro de una cámara de incubación a temperatura constante ($16,5 \pm 2^\circ\text{C}$) y fotoperíodo constante (12 D: 12 N). El material usado (pipetas, placas de Petri, vasos de precipitado y frascos), fue previamente desinfectado y esterilizado; la desinfección se efectuó lavando el material con una solución al 1 % de Cloruro de Benzalconio y la esterilización fue realizada en autoclave durante 20 minutos a 1 PSI y 121°C . Cabe señalar que durante todos los procedimientos se adoptaron las recomendaciones indicadas por US EPA (1996) y la ASTM (1991).

4.2.3. Ensayos Toxicológicos

Bioensayos de toxicidad agudos para la determinación de la CL_{50} a 96 horas

Se realizaron ensayos de toxicidad aguda para cada uno de los agentes químicos estudiados. Todos los ensayos realizados fueron de tipo estático con renovación de las soluciones cada 24 horas. Previamente, con la finalidad de determinar el rango de concentraciones a utilizar en los ensayos, se realizaron bioensayos preliminares, de 24-48 horas, para determinar el rango máximo de respuesta.

Las baterías de soluciones de ensayo tuvieron un mínimo de 7 concentraciones más un grupo Control con ADR. En todos los casos los ensayos fueron realizados por triplicado utilizando 10 individuos por réplica. El punto final evaluado fue la mortalidad, considerando a un individuo muerto al no apreciar movimiento o al observar falta de circulación sanguínea o ausencia de pulso cardíaco; la mortalidad se registró cada 24 horas durante 4 días.

Verde de Malaquita Se utilizó Verde de Malaquita (VM) (Anedra; para microscopía). Se preparó una solución madre de 1 g.L^{-1} , a la que se denominará solución Madre I.

Para la realización del bioensayo preliminar se prepararon cuatro diluciones de la solución Madre I en ADR, disminuyendo la concentración de éstas en proporción geométrica. Las concentraciones a ensayar fueron 0,01; 0,1; 1 y 10 mg.L^{-1} . Se utilizaron un total de 10 ovas por concentración, las que fueron expuestas durante 24 horas. Los resultados obtenidos permitieron establecer el rango de concentraciones a utilizar en los ensayos agudos.

Una vez obtenido un rango de concentraciones a ensayar a partir de la solución madre I, se preparó una solución madre II, con una concentración de 150 mgVM.L^{-1} . Se verificó que el pH de las soluciones se mantuviera en un rango de 6,5-7,5. El diseño experimental consistió en siete concentraciones en mg.L^{-1} : 0,38; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00 y un grupo Control, utilizando un total de 300 individuos por ensayo.

Cloruro de Sodio En este caso no se realizaron ensayos previos puesto que existe información bibliográfica (Sampaio & Phonlor 1996; Berasain et al., 2008) sobre ensayos realizados con esta especie, la que permitió definir el rango de concentraciones a ensayar. Se preparó una solución madre de 60 g.L^{-1} de ClNa (Anedra, reactivo analítico); con ésta se prepararon 8 soluciones de las siguientes concentraciones: 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 y 40 g ClNa.L^{-1} , y un Control con ADR.

Formalina Se preparó una solución madre de Formalina (Anedra, Formaldehído 36 %; con 12 % de Metanol Proanálisis, Merck). En el ensayo previo de orientación se testearon 7 concentraciones en $\mu\text{L.L}^{-1}$: 1; 5; 10; 50; 100; 500 y 1000; al cabo de 24 horas de exposición se registró una mortalidad del 100 % en $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$. En los bioensayos agudos se utilizaron las siguientes concentraciones: 150; 300; 400; 600; 800; 1200 y $1600 \mu\text{L.L}^{-1}$ y un Control con ADR.

Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (AcH) Se utilizó Ácido Acético Glacial (Anedra, reactivo analítico; pureza de 99.7 %). Se preparó una solución madre a 1000 mg.L^{-1} a partir de la cual se realizaron diluciones con ADR para obtener las siguientes concentraciones: 10, 50, 100 y 500 mg.L^{-1} . Al cabo de 24 horas de exposición sólo se observó mortalidad en 500 mg.L^{-1} . Se determinó la escala de concentraciones de ensayo entre 50 y 350 mg.L^{-1} . Se testearon 8 concentraciones en mg.AcH.L^{-1} : 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300; 350 y un Control con ADR.

Ácido Acético Tamponado (AcH+AcNa) Se utilizó una solución tamporada de Ácido Acético Glacial (Anedra, Reactivo analítico; pureza de 99.7 %). Se preparó una solución I de 0,4 M de Acetato de Sodio Anhidro (Anedra, Proanálisis),

luego una solución II de Ácido Acético Glacial 0,4 M. Finalmente la solución madre es el resultado de la mezcla en proporción 9:91 de la solución I con la solución II. La concentración final de Ácido Acético en la solución madre fue de 2167 mg.L⁻¹. A partir de ésta se realizaron diluciones en ADR para obtener las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 500 y 1000 mg.L⁻¹, empleadas para la realización del ensayo previo en el que se registró mortalidad en 1000 mg.L⁻¹ al cabo de 48 horas. Se determinó el rango de ensayo entre 600 y 1600 mg.L⁻¹. En los ensayos agudos se testearon 6 concentraciones en mg.L⁻¹: 600; 800; 1000; 1200; 1400; 1600 y un Control con ADR.

Compuestos Iodados Se utilizaron dos presentaciones de Iodo; 1) Ioduro de Potasio puro -IK- (Merck, Proanálisis) y 2) Iodopovidona, en una presentación comercial denominada Pervinox (Phoenix, Iodopovidona 10 %). Ambos fueron ensayados a las mismas concentraciones. Para otorgar estabilidad al IK se preparó una solución madre al 1 % de IK, en 0,9 % ClNa en agua destilada, a la que denominaremos Solución madre I (SM I). Para establecer el intervalo de concentraciones que se empleó finalmente en los ensayos agudos, se realizaron ensayos preliminares utilizando dos medios de dilución: ADR y ClNa 0,9 % en agua destilada.

En ClNa 0.9 % (en agua destilada) Las concentraciones de IK y Iodopovidona empleadas en el ensayo preliminar fueron: 10, 20, 50, 100, 200 y 500 mg.L⁻¹; al cabo de 24 horas de exposición sólo se observó mortalidad en 200 y 500 mg.L⁻¹, determinándose el rango de ensayo entre 25 y 200 mg.L⁻¹. En los ensayos agudos se testearon 6 concentraciones en mg.L⁻¹: 25; 50; 75; 100; 150 y 200, y un Control con ClNa 0,9 % en agua destilada.

En agua dura reconstituida Los ensayos preliminares se realizaron diluyendo la Iodopovidona y la SM I de IK en ADR hasta obtener las siguientes concentraciones: 75, 150, 300, 450 y 600 mg IK/Iodopovidona.L⁻¹. Al cabo de 48 horas, en ambos casos, se observó mortalidad en 600 mg.L⁻¹. El rango de ensayo seleccionado para la realización de los bionesayos agudos a 96 horas se ubicó entre 50 y 500 mg.L⁻¹; se testearon 6 concentraciones: 50; 100; 150; 200; 300; 400; 500 mg.L⁻¹; y un Control con ADR.

4.2.4. Determinaciones cuantitativas

Determinación de las Concentraciones Letales 50 a 96 h

A partir de las mortalidades registradas se calcularon los valores de CL_{50} para cada uno de los tratamientos; la determinación de la concentración letal 50 a 96 horas (CL_{50} 96 h), fue realizada según: 1) el método de los Probits utilizando el US EPA Probit Program versión 1.5; 2) mediante el método no paramétrico de Trimmed Spearman-Kärber y 3) mediante el uso de Modelo Biológico con el Programa DEBtox v. 2.0.1. Cada uno de estos softwares realizó automáticamente las correcciones en las sobrevivencias que no alcanzaron el 100 % en los controles. A pesar de que en general los resultados obtenidos con los diferentes métodos resultaron ser similares, cada uno puede ajustarse mejor a un determinado tipo de análisis. La calidad de los resultados de cada método empleado dependerá del grado en que los datos de mortalidades registrados cumplan las hipótesis de cada uno de los métodos.

Método de los Probits El Probit es un método estadístico paramétrico de amplia utilización en la evaluación de la toxicidad aguda. Consiste en la conversión de los parámetros obtenidos a partir de bioensayos, e incluye una serie de transformaciones; en la primera, las concentraciones son convertidas a una escala logarítmica lo que resultará en una curva sigmoidea de dosis-respuesta. Posteriormente se realiza una segunda conversión, mucho más compleja, en la que los porcentajes de respuesta son convertidos a unidades Probit, es así que a cada porcentaje de respuesta le corresponde un valor de unidad Probit de acuerdo a una tabla propuesta por Finney (1971). Finalmente se obtiene una distribución de puntos aproximadamente lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico.

Para evaluar el grado de ajuste de los datos a la ecuación de regresión, se aplica una prueba de Chi cuadrado con $N-2$ grados de libertad, considerando a N como el número de concentraciones diferentes. La versión 1.5 del programa Probit de la United States Environmental Protection Agency (US EPA) estima los valores CL_1 a CL_{99} y los correspondientes intervalos de confianza al 95 %, y proporciona el valor de χ^2 calculado, el que deberá ser menor que el χ^2 tabulado ($p > 0,05$), para poder inferir si los datos se ajustan a la recta de la regresión lineal, indicando que el empleo del método Probit es adecuado para la determinación de las concentraciones

de respuesta. Además, este programa calcula la pendiente de la recta de regresión, que indica la amplitud en la distribución de la respuesta letal en la población de organismos frente al tóxico en cuestión.

El análisis con el método de los Probits podrá realizarse siempre y cuando se cumpla las siguientes premisas:

- Haya al menos dos concentraciones de mortalidad parcial (es decir mayor a 0 y menor a 100 %).
- Un grado de ajuste razonable a la recta de regresión Probit.

Aún cuando los datos obtenidos no puedan ser utilizados para la determinación de la CL_{50} con el método de los Probits, existen otros métodos estadísticos no paramétricos y mucho más robustos como el Spearman-Karber y el Trimmed Spearman-Karber, que permitirán el cálculo de la CL_{50} .

Método de Spearman-Karber y Trimmed Spearman-Karber (TSK) El método de Spearman-Karber es un procedimiento estadístico no paramétrico utilizado para estimar la CL_{50} y su intervalo de confianza del 95 %. Según este método la CL_{50} resulta del antilogaritmo de la media de la distribución del logaritmo de la concentración. Es decir, primeramente se transforman las concentraciones a una escala logarítmica, posteriormente se calcula la media de la distribución de estas concentraciones transformadas, y este valor de la media corresponde al logaritmo de la CL_{50} .

El método Trimmed Spearman-Karber es similar al Spearman-Karber, pero puede utilizarse cuando en ninguna de las concentraciones se alcanza un 100 % de mortalidad o supervivencia. La versión 1.5 del programa TSK calcula mediante este procedimiento el valor de la CL_{50} con su respectivo intervalo de confianza del 95 %, y el porcentaje de recorte empleado para esta determinación.

Análisis de la toxicidad basado en el Modelo Biológico Como mencionamos anteriormente, los métodos de Probits y TSK determinan los parámetros de toxicidad manipulando matemáticamente los datos para poder aplicar luego un análisis de regresión o un *test* estadístico. Estas manipulaciones matemáticas de los datos que no intentan explicar el por qué de la mortalidad, sino simplemente cuantificar

los parámetros toxicológicos de interés. El hecho de que el uso de estas aplicaciones matemáticas y estadísticas para la determinación de la toxicidad sea cuestionable, se debe a que éstos *tests* no consideran que: 1) el parámetro seleccionado para determinar y expresar la toxicidad (por ej., mortalidad, crecimiento, reproducción, etc.) no suele afectar al 100 % de los individuos, 2) sus efectos no se ejercen de manera uniforme y 3) su efecto se reduce con el tiempo de exposición, el resultado de la evaluación se normaliza a un tiempo determinado.

El Modelo Biológico, en cambio, es un modelo dinámico que, a diferencia de los Probits o del TSK, integra el factor tiempo en el cálculo de la toxicidad (Péry et al., 2002; Jager et al., 2006; Baas et al., 2009). Este modelo explica la mortalidad de una especie test asociada a su exposición a un medio conteniendo uno o varios tóxicos en solución, pero incorporando la consideración de un parámetro biológico dinámico expresado en el flujo neto (J_n) del tóxico, esto es, la diferencia entre el influjo (J_{in}) y el eflujo (J_{out}) del mismo (o tasa de eliminación). Las magnitudes de los flujos unidireccionales son proporcionales a la concentración en el medio (que será prácticamente constante) y a la concentración interna alcanzada (que es temporalmente variable, desde cero en adelante, hasta superar umbrales que desencadenan los efectos tóxicos) siguiendo una cinética de primer orden. Además, dependerá también de otros factores tales como estado nutricional, edad, talla, etc. Obviamente, el monitoreo en los medios de ensayo incluye y considera las respuestas de los individuos “control”.

En otras palabras, el Modelo Biológico postula que los efectos adversos de un tóxico (o una mezcla de ellos) se pondrá de manifiesto cuando el mismo haya penetrado, al cabo de un tiempo, en el organismo de cada individuo y que la probabilidad de que muera en un intervalo de tiempo dado es proporcional a la duración de este intervalo (que casi nunca es uniforme) y a la diferencia entre las dos concentraciones: la interna y una concentración externa. Es por considerar el conjunto de los elementos antedichos que el Modelo se conoce como “Biológico”.

El programa DEBtox (por abreviatura de Dynamic Energy Budget) por su parte permite estimar, a partir de la mortalidad a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, diferentes parámetros toxicológicos a diferentes tiempos de exposición, las Concentraciones Letales y sus intervalos de confianza, así como las constantes de proporcionalidad y, en particular las NEC, como se explicará más adelante.

Determinación de la tasa de eclosión

Con la finalidad de conocer el efecto de la exposición durante 96 horas sobre la tasa de eclosión, las ovas fueron mantenidas en la última solución y en las mismas condiciones experimentales durante 48 horas adicionales, luego de las cuales se procedió a realizar la primera verificación del número de larvas eclosionadas, y de ovas vivas. Posteriormente las ovas vivas no eclosionadas se mantuvieron por un periodo adicional de 48 horas luego del cual fueron censadas, cuantificando el número total de larvas eclosionadas vivas. El porcentaje de eclosión fue calculado con la siguiente formula:

$$\text{Tasa de eclosión} = \frac{N_e}{N_i} \cdot 100.$$

Donde:

N_i = Número inicial de individuos por tratamiento.

N_e = Total de larvas eclosionadas vivas luego de 96 horas post tratamiento.

Determinación de Parámetros subletales

Concentración letal 10 (CL₁₀) Se calcularon los valores de CL₁₀ 96 h para cada uno de los tratamientos; los datos analizados fueron obtenidos a partir del registro de mortalidades. La determinación de la CL₁₀ 96 h fue realizada según el método de los Probits mediante el US EPA Probit Program versión 1.5 como se detalló en el punto 4.2.4

Concentración de No efecto (NEC) La concentración de No efecto es la concentración asociada al Modelo Biológico, a la cual la concentración externa y la concentración interna alcanzan un equilibrio sin que se observe ningún efecto en los organismos expuestos. Así, la NEC, a diferencia de la NOEC, teóricamente no depende de la duración del bioensayo y generalmente su valor no coincide exactamente con ninguna de las concentraciones ensayadas. Este parámetro fue calculado mediante el uso de Modelo Biológico con el Programa DEBtox v 2.0.1 tal como se explica en el punto 4.2.4

La subletalidad (como NOEC) o la letalidad (expresada en sus presentaciones incipientes, como LOEC o CL10), o de mayor efecto adverso (por ej. CL50, CL99), tienen que ver más con las manipulaciones de los datos experimentales (de carácter

cuántico), siendo desacopladas de interpretaciones mecanísticas del efecto registrado. Por otra parte, tanto las LOEC como las NOEC se basan en un supuesto que es difícil de sostener: que la probabilidad de sobrevivencia es idéntica en todos los individuos de la cohorte utilizada en los bioensayos de toxicidad.

Así, a diferencia de la NOEC, se determina la NEC (concentración de no efecto) como la que no desencadenará efectos adversos sobre el organismo, independientemente del tiempo de exposición (hasta extenderse a lo largo de toda su vida). En cambio, la NOEC es tiempo-dependiente y no exhibe un intervalo de confianza. Cabe señalar, por último, que el MB no requiere conocer el mecanismo de acción del medio tóxico ensayado.

Concentración de Efecto No observable NOEC - LOEC La NOEC es la más baja concentración ensayada en la que la supervivencia no es significativamente diferente a la del Control. El cálculo de la NOEC se realiza mediante un test de hipótesis para multiconcentraciones, como el test de Dunnet. Éste requiere el cumplimiento de requisitos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Para la realización de este análisis, las variables de respuesta deberán transformarse por el arcoseno para estabilizar la varianza y satisfacer la exigencia de la normalidad. La prueba de Shapiro Wilk se puede utilizar para probar la hipótesis de normalidad y el test de Bartlett para determinar la homogeneidad de la varianza. Luego de haber comprobado los requisitos para el test de Dunnet, el mismo permitirá establecer la existencia de diferencias significativas en la variable de respuesta del Control y los tratamientos. En caso de que las variables no cumplan los requisitos de normalidad y homogeneidad de la varianza, se utilizará el test no paramétrico de rangos únicos o múltiples de Steel (Steel, 1959), en el que se compara individualmente cada uno de los tratamientos con el Control, para determinar si las diferencias entre ambos son estadísticamente significativas. Ambos métodos nos llevan a obtener una concentración (NOEC) para la cual, y para todas las concentraciones menores a esta, no se observarán efectos adversos estadísticamente significativos en la población expuesta comparada con el Control. La concentración inmediata superior será la LOEC, concentración ensayada más baja del agente tóxico a la cual se registran efectos adversos estadísticamente significativos en la población expuesta cuando se la compara con el Control.

4.3. Resultados

4.3.1. Porcentaje de Supervivencia

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda, que permitieron determinar la evolución del porcentaje diario de supervivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a los fungicidas estudiados. En términos generales se observó que en todos los casos el porcentaje de supervivencia disminuyó al aumentar la concentración y el tiempo de exposición.

Verde de Malaquita (Figura 4.1)

Para el del Verde de Malaquita (VM), el porcentaje de supervivencia alcanzó su valor más bajo (0 %) en la concentración más elevada (4 mg.L⁻¹) al cabo de 72 horas de exposición. No obstante, los porcentajes de supervivencia en los grupos expuestos a 0,375; 0,50 y 0,75 mg.L⁻¹ (80,00; 87,40; 72,20 %), alcanzaron valores muy cercanos a los del grupo Control (83,20 %) a 96 h.

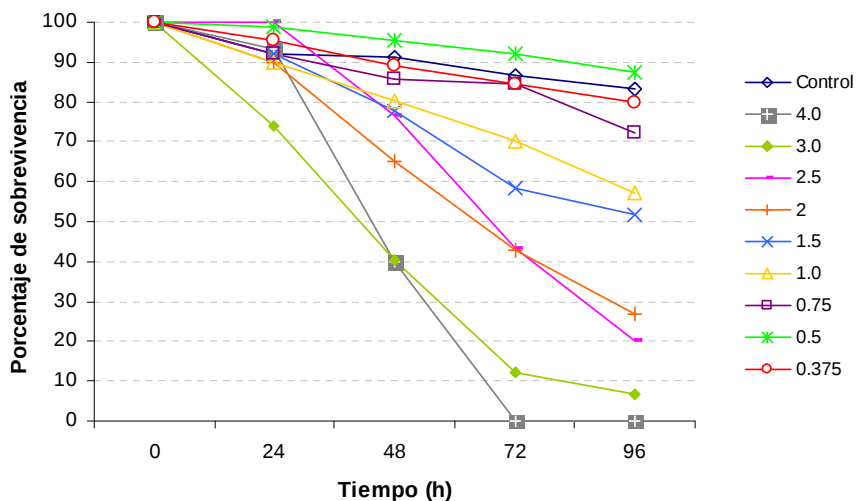


Figura 4.1: Evolución temporal del porcentaje de supervivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con Verde de Malaquita, concentraciones expresadas en mg.L⁻¹.

Cloruro de Sodio (Figura 4.2)

Se comprobó la tolerancia, de la ovas de pejerrey, a elevadas concentraciones de ClNa, como se observa en la Figura 4.2. El porcentaje de sobrevivencia alcanzó su valor más bajo (17,50 %) en las ovas expuestas a 40 g.L⁻¹, concentración que supera la salinidad del agua de mar, y alcanzó valores de sobrevivencia muy cercanos a los del grupo Control (86,70 %) en concentraciones de hasta 15 g.L⁻¹ (84,30 %).

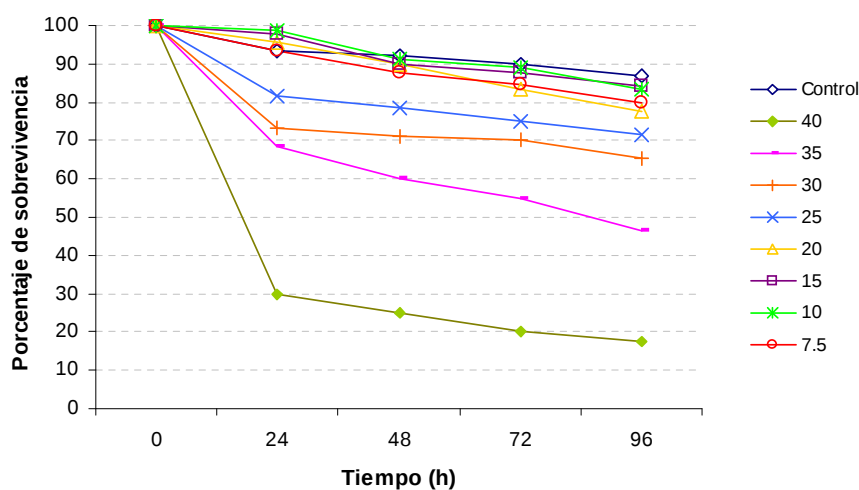


Figura 4.2: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con ClNa, concentraciones en g.L⁻¹.

Formalina (Figura 4.3)

Como se observa en la Figura 4.3, en las ovas expuestas a 150 y 300 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de formalina los porcentajes de sobrevivencia fueron 97,90 y 90,00 %, respectivamente, ambos son cercanos al grupo Control (94,40 %); mientras que a concentraciones superiores a los 400 $\mu\text{L.L}^{-1}$ los porcentajes de sobrevivencia disminuyen drásticamente; finalmente, al cabo de 48 horas de exposición a 1600 mg.L⁻¹ se observó un 100,00 % de mortalidad.

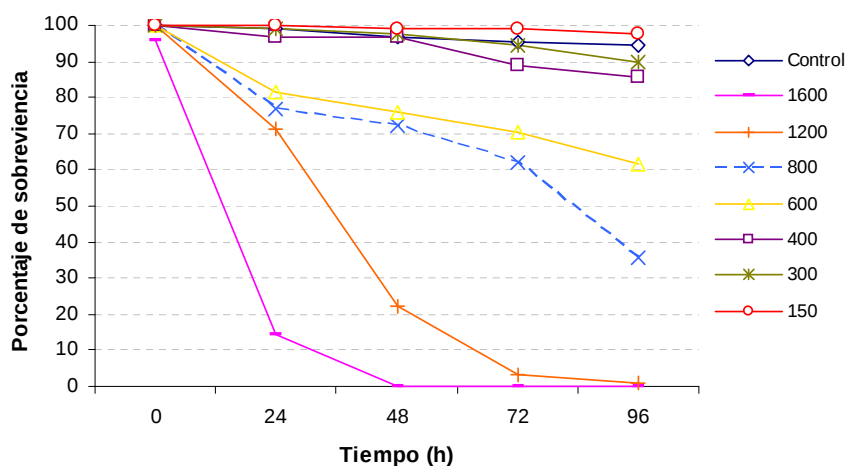


Figura 4.3: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con Formalina; concentraciones en $\mu\text{L.L}^{-1}$.

Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Figura 4.4) Luego de 96 horas de exposición al Ácido Acético (AcH) se registraron porcentajes de sobrevivencia inferiores al 10,00 % en 300 y 350 mg.L^{-1} . Porcentajes de sobrevivencia similares al del grupo Control (96,70 %) fueron registrados en concentraciones entre 75 y 150 mg.L^{-1} (88,50-95,00 %); sin embargo, los valores registrados en la concentración más baja (50 $\mu\text{L.L}^{-1}$) no superaron el 76,90 %.

En la Tabla 4.1 se presentan valores de pH de las soluciones de Ácido Acético registradas al inicio y al final de los ensayos; en ambos casos se observa un considerable descenso del pH al incrementar la concentración de esta sustancia.

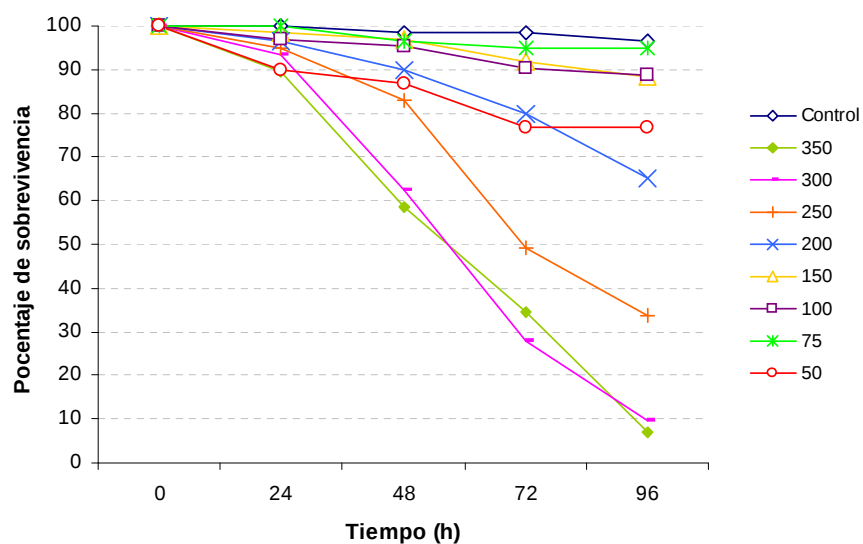


Figura 4.4: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con ÁcH, concentraciones en mg.L⁻¹.

Tabla 4.1: Evolución temporal del pH en las soluciones empleadas para los bioensayos con AcH.

Concentración de AcH (mg.L ⁻¹)	pH	
	Inicial	Final
Control	6,20	6,50
50	6,10	6,70
75	6,00	6,70
150	5,30	6,30
200	4,70	4,70
250	4,50	4,30
300	4,30	4,00
350	4,20	3,90

Ácido Acético Tamponado (Figura 4.5, Tabla 4.2) La respuesta al Ácido Acético tamponado (AcH+AcNa) fue gradual, alcanzándose un 100,00 % de mortalidad en las concentraciones más altas (1400-1600) luego de 72 horas de exposición. No se registraron porcentajes de sobrevivencia cercanos a los del grupo Control (90,80 %); la tasa de sobrevivencia más elevada fue registrada en el grupo expuesto a 600 mg.L⁻¹ siendo de 62,90 %.

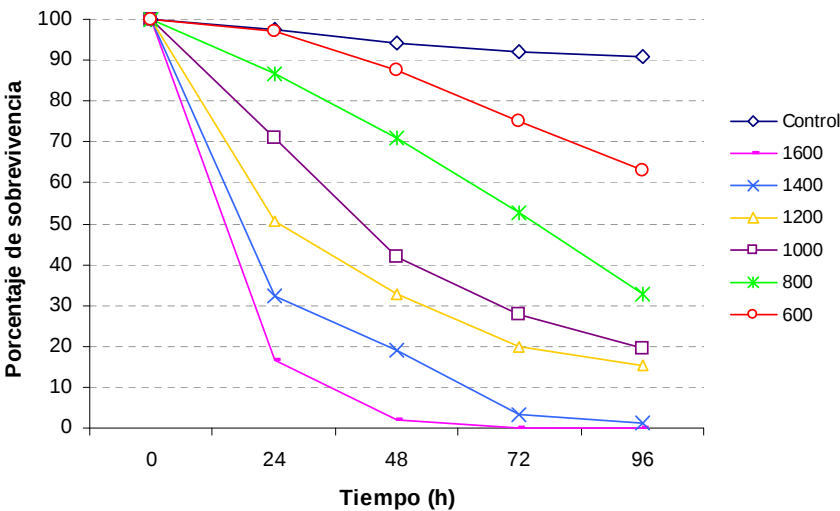


Figura 4.5: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con AcH+AcNa; concentraciones en mg.L⁻¹.

En la Tabla 4.2 se presentan los valores de pH de las soluciones de Ácido Acético tamponado; a diferencia de los ensayos realizados con Ácido Acético, el pH se mantuvo estable e independiente del incremento de la concentración.

Tabla 4.2: Evolución temporal del pH en las soluciones con AcH+AcNa.

Concentración AcH+AcNa (mg.L ⁻¹)	pH	
	Inicial	Final
Control	7,80	7,80
600	5,60	5,60
800	5,60	5,60
1000	5,60	5,60
1200	5,60	5,60
1400	5,60	5,70
1600	5,50	5,70

Compuestos Iodados

Ioduro de Potasio (Figuras 4.6 y 4.7)

En solución de 0,9 % ClNa En los ensayos realizados con Ioduro de Potasio (IK) se observó un bajo porcentaje de sobrevivencia en el grupo Control (37,36 %). Los valores de sobrevivencia del grupo Control fueron superados en los tratamientos con 25 mgIK.L⁻¹ (48,40 %). En los grupos expuestos a 200, 150 100 y 75 mg.L⁻¹ de IK se registraron mortalidades del 100,00 % entre las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente.

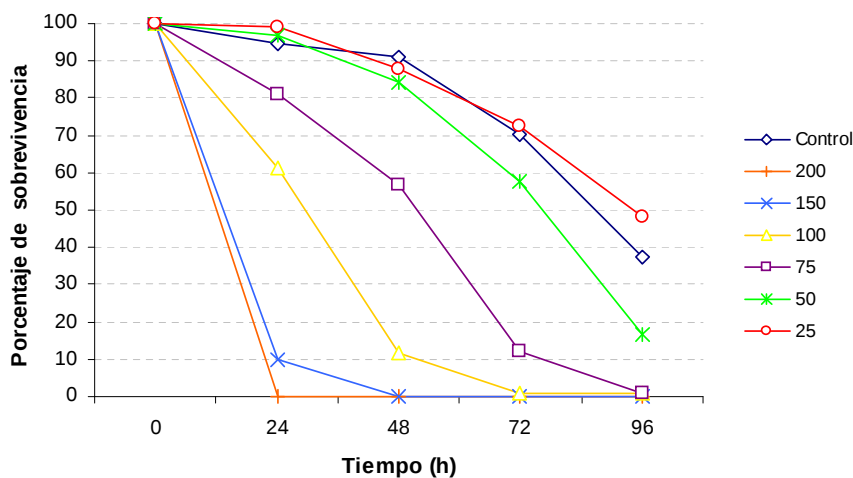


Figura 4.6: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con IK, en solución de ClNa 0,9 %; concentraciones en mg.L⁻¹.

En la Tabla 4.3 se presentan los valores de pH de las soluciones de IK en agua destilada con ClNa 0,9 %, registradas al inicio y al final de los ensayos.

Tabla 4.3: Evolución temporal del pH en las soluciones empleadas para los bioensayos con IK en ClNa 0,9 %.

Concentración de IK (mg.L^{-1})	pH	
	Inicial	Final
Control	5,51	5,60
25	5,12	5,11
50	4,74	4,70
75	4,33	4,39
100	4,18	4,20
150	3,83	3,99
200	3,65	3,80

En agua dura reconstituida (ADR) (Figura 4.7) En los ensayos realizados con agua dura reconstituida, el rango de concentraciones es mayor que en lo ensayos realizados utilizando la solución de ClNa 0,9 % como medio de dilución. También podemos observar que utilizando ADR como medio de dilución se restablecen los porcentajes de sobrevivencia habituales en los grupos Control, alcanzando valores de 76,90 %.

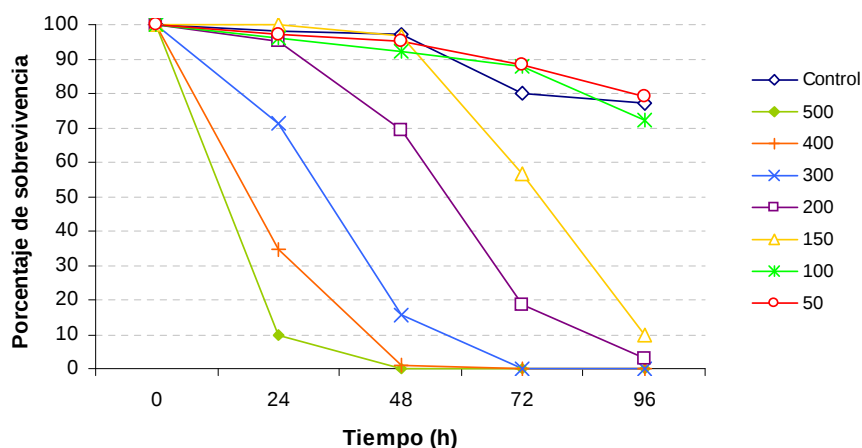


Figura 4.7: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con IK, en agua dura reconstituida (ADR), concentraciones en mg.L^{-1} .

Luego de 48 h de exposición se obtuvo un 100,00 % de mortalidad en los grupos expuestos a las más elevadas concentraciones, 500 y 400 mg.L⁻¹, mientras que los expuestos a 300 mg.L⁻¹ se alcanzó un 100,00 % de mortalidad al cabo de 72 h horas de exposición. Se registraron bajos porcentajes de sobrevivencia en los grupos expuestos a concentraciones de IK entre 150 y 200 mg.L⁻¹, mientras que en los grupos expuestos a 100 y 50 mg.L⁻¹ se observaron valores de sobrevivencia similares a los del grupo Control (78,90 y 72,40 %).

En la Tabla 4.4 se presentan valores de pH de las soluciones de IK en ADR registradas al inicio y al final de los ensayos.

Tabla 4.4: Evolución temporal del pH en las soluciones empleadas para los bioensayos con IK en ADR.

Concentración de IK (mg.L ⁻¹)	pH	
	Inicial	Final
Control	7,36	7,35
50	7,43	7,54
100	7,47	7,61
150	7,56	7,80
200	7,39	7,64
300	7,34	7,63
400	7,26	7,60
500	7,2	7,64

Iodopovidona (Figuras 4.8 y 4.9)

En solución 0,9 % ClNa Al igual que en los ensayos realizados con Ioduro de Potasio (IK), en los realizados con Iodopovidona, se observó una baja tasa de sobrevivencia en el grupo Control (37,60 %). Estos valores de sobrevivencia del grupo Control fueron superados en los tratamientos con 25 y 50 mg Iodopovidona.L⁻¹ (57,90 y 43,60 % respectivamente). En los grupos expuestos a 200, 150, 100 y 75 mg.L⁻¹ de Iodopovidona, se registraron mortalidades del 100,00 % entre las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente.

En la Tabla 4.5 se presentan valores de pH de las soluciones de Iodopovidona en agua destilada con ClNa 0,9 %, registradas al inicio y al final de los ensayos.

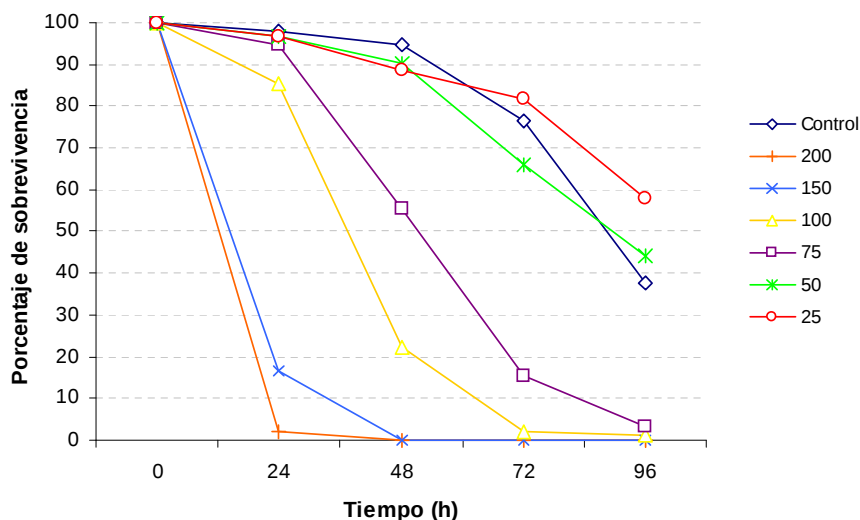


Figura 4.8: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con Iodopovidona en solución de ClNa 0,9 %; concentraciones en mg.L⁻¹.

Tabla 4.5: Evolución temporal del pH en las soluciones empleadas para los bioensayos con Iodopovidona en ClNa 0,9 %.

Concentración de Iodopovidona (mg.L ⁻¹)	pH	
	Inicial	Final
Control	5,85	5,87
25	5,30	5,42
50	4,96	5,26
75	4,66	4,43
100	4,48	4,53
150	4,09	4,54
200	4,02	4,05

En agua dura reconstituida (ADR) Mediante el empleo del ADR como medio de dilución se logró restablecer los valores normales de sobrevivencia en los grupos Control (90,50 %). Los grupos expuestos a las más elevadas concentraciones de Iodopovidona, 500 y 400 mg.L⁻¹, alcanzaron un 100,00 % de mortalidad al cabo de 72 horas de exposición; mientras que en los expuestos a 300 mg.L⁻¹, ésta se alcanzó a las 96 h. Los porcentajes de sobrevivencia en los ensayos realizados con

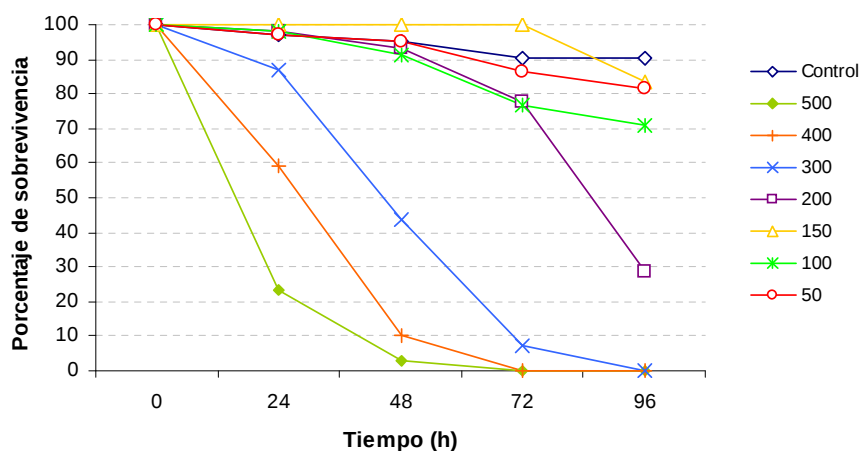


Figura 4.9: Evolución temporal del porcentaje de sobrevivencia de ovas de *Odontesthes bonariensis* en medios con Iodopovidona en agua dura reconstituida (ADR), concentraciones en mg.L⁻¹.

Iodopovidona a concentraciones de 50, 100 y 150 mg.L⁻¹, resultaron en 83,30; 70,90 y 81,70% respectivamente; estos resultados son semejantes a los obtenidos en el grupo Control.

En la Tabla 4.6 se presentan valores de pH de las soluciones de Iodopovidona en ADR registradas al inicio y al final de los ensayos.

Tabla 4.6: Evolución temporal del pH en las soluciones empleadas para los bioensayos con Iodopovidona en ADR.

Concentración de Iodopovidona (mg.L ⁻¹)	pH	
	Inicial	Final
Control	7,40	7,71
50	7,40	7,80
100	7,31	7,72
150	7,06	7,68
200	7,27	7,78
300	7,20	7,73
400	7,13	7,65
500	7,10	7,61

4.3.2. Parámetros Toxicológicos

Mediante el método de los Probits, el método no paramétrico de Trimmed Spearman-Kärber y el Modelo Biológico, se calcularon los parámetros toxicológicos de los agentes fungicidas para ovas de pejerrey, expresados como valores de CL₁₋₉₉ a diferentes tiempos de exposición de 24 hasta 96 h. Para ilustrar los niveles de letalidad de la población expuesta en función de la concentración y el tiempo de exposición se utilizaron gráficos de superficie de respuesta, (Figuras 4.10 a 4.27). Las matrices de datos correspondientes se muestran en las Tablas 4.7 a 4.4.

Verde de Malaquita (Figuras 4.10 y 4.11, Tablas 4.7 y 4.9)

Como se observa en la Figura 4.10, las concentraciones letales (CL) disminuyen con el aumento del tiempo de exposición, mostrando una amplitud de respuesta que oscila entre 0,44 mg.L⁻¹ (CL₁) a 96 horas, y 21,80 mg.L⁻¹(CL₉₉) a 48 horas. La misma figura muestra que en valores de letalidad inferiores al 15 % la superficie de respuesta describe una trayectoria horizontal con valores similares, tanto a 48 como a 96 horas. A partir de la CL₅₀ la concentración empieza a incrementar su valor y los valores correspondientes a 48 horas se incrementan de forma más pronunciada, abarcando un amplio rango de concentraciones (0,50 - 21,80 mg.L⁻¹), en las que el

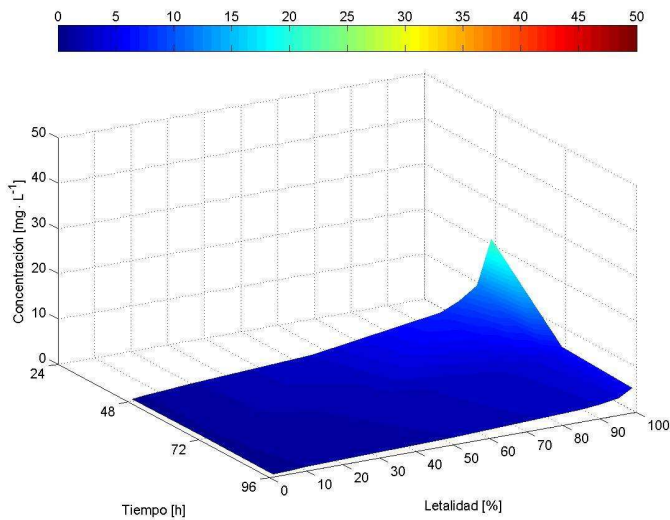


Tabla 4.7: Matriz de valores de CL, para VM, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	-	0,5	0,6	0,4
5	-	0,8	0,8	0,6
10	-	1,1	1,0	0,8
15	-	1,4	1,2	0,9
50	-	3,2	1,9	1,5
85	-	7,5	3,2	2,7
90	-	9,2	3,6	3,1
95	-	12,1	4,4	3,7
99	-	21,8	6,2	5,4

Figura 4.10: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al Verde de Malaquita. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

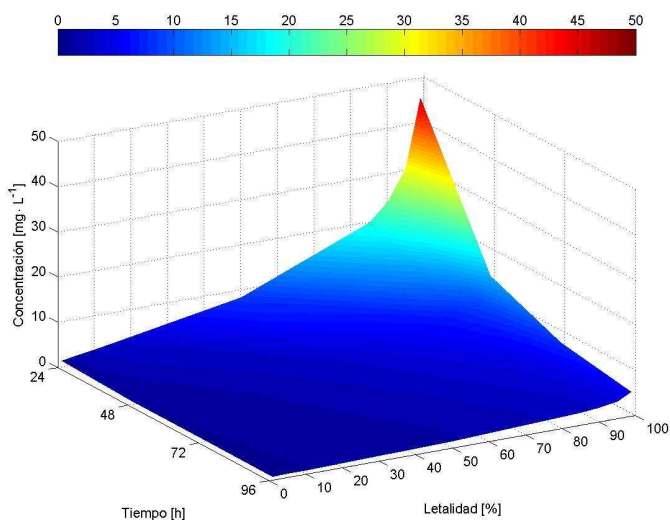


Tabla 4.8: Matriz de valores de CL, para VM, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	1,3	0,8	0,6	0,6
5	1,9	1,0	0,8	0,7
10	2,5	1,2	0,9	0,7
15	3,1	1,4	1,0	0,8
50	8,3	3,0	1,9	1,4
85	19,8	6,6	3,7	2,6
90	23,7	7,7	4,4	3,1
95	30,3	9,7	5,4	3,8
99	45,6	14,4	7,9	5,4

Figura 4.11: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al Verde de Malaquita. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

porcentaje de letalidad es directamente proporcional a la concentración. Mientras que la curva de respuesta a 96 horas abarca un pequeño rango de concentraciones (0,40 - 5,40 mg.L⁻¹).

Si bien, el gráfico de superficie de respuesta obtenido mediante el Modelo Biológico (Figura 4.11) muestra una tendencia similar al elaborado con los datos aportados por el método de los Probits; este último permite observar una respuesta más completa, que incluye las CL a 24 horas de exposición, y comprende un rango de respuesta mucho más amplio, que oscila entre 0,60 mg.L⁻¹, valor obtenido para la CL₁ a 96 horas de exposición, y 45,60 mg.L⁻¹ valor correspondiente a la CL₉₉ a 24 h de exposición, (Tabla 4.4).

Cloruro de Sodio (Figuras 4.12 y 4.13, Tablas 4.9 y 4.10)

La Figura 4.12 permite analizar la superficie de respuesta de las ovas del pejerrey a la exposición al ClNa durante 96 horas. En ésta podemos observar un rango de respuesta que oscila entre 22,20 y 71,00 g.L⁻¹, para la CL₁ a 96 h y la CL₉₉ a 24 h respectivamente. Además, se observa que las concentraciones que exhiben bajos niveles de letalidad (menores al 10 %), oscilan entre 19,00 y 27,00 g.L⁻¹ de ClNa. Posteriormente, se observa un leve ascenso en la curva de respuesta pero ésta permanece sin ser alterada por el tiempo de exposición. Sólo a concentraciones superiores

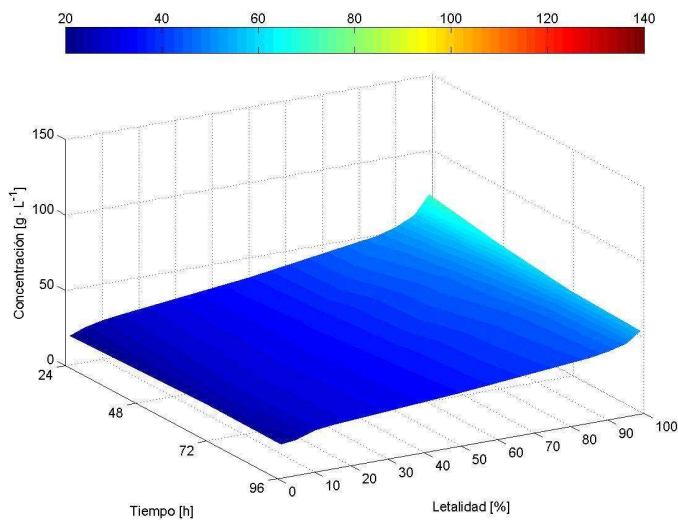


Tabla 4.9: Matriz de valores de CL, para CINA, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	19,1	20,8	22,2	22,2
5	23,1	24,4	25,5	23,4
10	25,6	26,6	27,4	27,2
15	27,4	28,2	28,8	28,6
50	36,8	36,2	35,6	35,0
85	49,3	46,3	44,0	42,9
90	52,8	49,1	46,2	45,0
95	58,5	53,5	49,8	48,4
99	71,0	62,9	57,2	55,3

Figura 4.12: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a CINA. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

a 40,00 g.L⁻¹, correspondientes al 85,00 % de letalidad; se puede apreciar el efecto del tiempo de exposición sobre el porcentaje de letalidad.

El análisis de la superficie de respuesta del CINA con los datos obtenidos mediante el Modelo Biológico (Figura 4.13), nos muestra un amplio rango de respuesta que oscila entre 28,90 y 141,00 g.L⁻¹, correspondientes a la CL₁ 96 h y la CL₉₉ 24

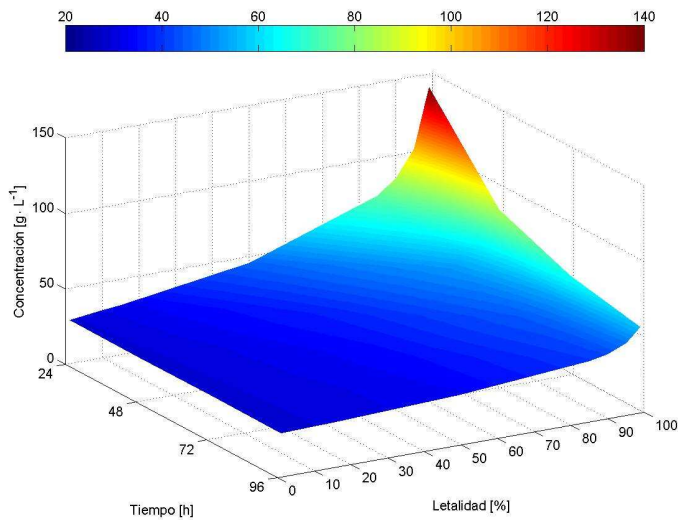


Tabla 4.10: Matriz de valores de CL, para CINA, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	28,9	28,8	28,8	28,7
5	29,9	29,3	29,1	29,0
10	31,3	30,0	29,5	29,3
15	32,6	30,7	30,0	29,7
50	45,6	37,1	34,3	33,0
85	75,0	51,8	44,1	40,3
90	84,9	56,8	47,4	42,7
95	102,0	65,2	53,1	47,8
99	141,0	84,9	66,2	56,8

Figura 4.13: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a CINA. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

h respectivamente. Además, a diferencia del gráfico realizado con el método de los Probits, en éste se observa que las CL superiores a la CL_{50} disminuyeron al aumentar el tiempo de exposición sugiriendo que, tal como lo propone el Modelo Biológico, el efecto tóxico es acumulativo. Además podemos apreciar que la concentración de máxima letalidad a 24 h de exposición (CL_{99}) duplica el valor obtenido con el método de los Probits. No obstante esto, las concentraciones de baja letalidad obtenidas con ambos métodos son similares

Formalina (Figuras 4.14 y 4.15, Tablas 4.11 y 4.12)

Las Figuras 4.14 y 4.15 muestran las superficies de respuesta de las ovas de pejerrey expuestas a la Formalina, determinadas mediante el método de los Probits y el Modelo Biológico respectivamente. Se observa que con ambos métodos se obtienen superficies de respuesta similares, con valores para CL_{50} que disminuyen al aumentar el tiempo de exposición y oscilan entre 600 y 1200 $\mu\text{L.L}^{-1}$. Todos los porcentajes de letalidad, desde el 1 al 99 %, abarcan un rango de respuesta que oscila entre 325,60 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (CL_1 96 h) y 4469,60 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (CL_{99} 24 h) según el método de los Probits; y entre 532,00 y 4590,00 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para la (CL_1 96 h) y la (CL_{99} 24 h) respectivamente, según el Modelo Biológico.

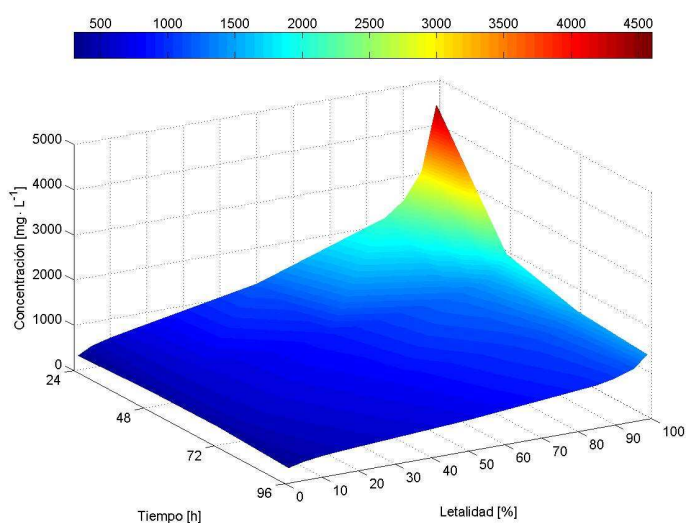


Tabla 4.11: Matriz de valores de CL, para Formalina, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	319,8	396,3	402,6	325,6
5	470,6	502,1	490,6	404,3
10	578,2	569,6	545,1	453,7
15	664,4	620,2	585,3	490,4
50	1195,6	888,6	790,5	681,4
85	2151,4	1273,4	1067,7	946,8
90	2472,2	1386,5	1146,4	1023,5
95	3037,5	1572,8	1273,8	1148,5
99	4469,6	1992,5	1552,1	1425,8

Figura 4.14: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a Formalina. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

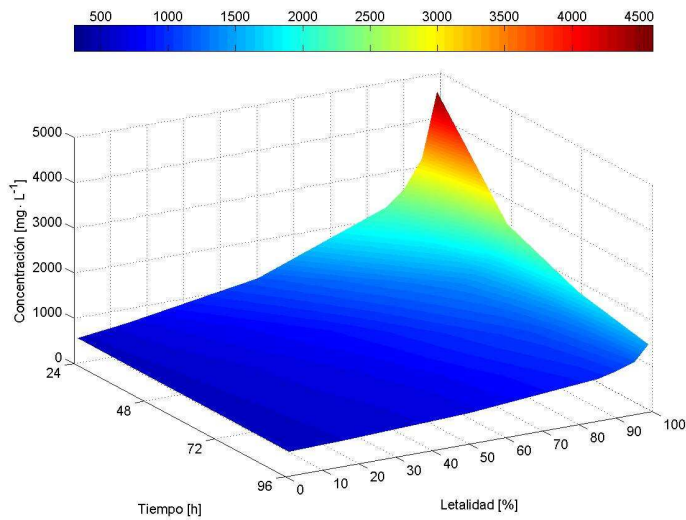


Tabla 4.12: Matriz de valores de CL, para Formalina, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	541	535	533	532
5	582	554	545	541
10	633	578	561	553
15	686	604	578	565
50	1160	833	729	678
85	2220	1350	1070	932
90	2570	1520	1180	1020
95	3180	1820	1380	1160
99	4590	2500	1830	1500

Figura 4.15: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a a Formalina. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Figuras 4.16 y 4.17, Tablas 4.13 y 4.14) En el caso del Ácido Acético, el método de los Probits no permitió el cálculo de las concentraciones letales correspondientes a las 24 horas de exposición (Tabla 4.13). Sin embargo, en la Figura 4.16 se observa una amplitud de respuesta que abarca desde 130,40 mg.L⁻¹ (CL₁ 96 h) a 863,10 mg.L⁻¹(CL₉₉ 48 h). Además observamos un moderado descenso del valor de CL₅₀ en relación con el tiempo de exposición, de 365,20 mg.L⁻¹ en 48 horas a 229,70 mg.L⁻¹ luego de 96 horas de exposición.

Según los valores de CL obtenidos mediante el Modelo Biológico (Tabla 4.10), en la Figura 4.17 observamos que el rango de respuesta es más amplio que el obtenido mediante el método de los Probits, y abarca un rango de concentraciones de 164,00 mg.L⁻¹ (CL₁ 96 h) a 2820,00 mg.L⁻¹ (CL₉₉ 24 h). Además se observa que en niveles de letalidad inferiores a la CL₁₅, el efecto del tiempo de exposición sobre las CL es más evidente entre las primeras 24 y 48 horas; posteriormente, entre las 48 y 96 horas la respuesta se mantuvo moderadamente influenciada por el tiempo de exposición. En niveles de letalidad superiores a la CL₅₀, se mantiene esta tendencia, pero las diferencias entre las concentraciones a 24 y 48 horas se tornan más acentuadas.

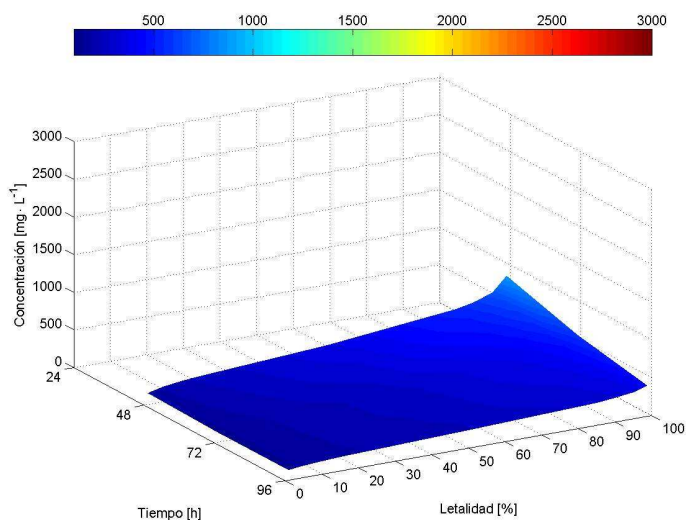


Figura 4.16: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al AcH. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

Tabla 4.13: Matriz de valores de CL, para AcH, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	-	154,5	126,4	130,4
5	-	198,8	157,9	154,0
10	-	227,4	177,8	168,2
15	-	249,0	192,6	178,5
50	-	365,2	270,3	229,7
85	-	535,8	379,2	295,5
90	-	586,6	410,9	313,6
95	-	670,9	462,7	342,6
99	-	863,1	578,1	404,4

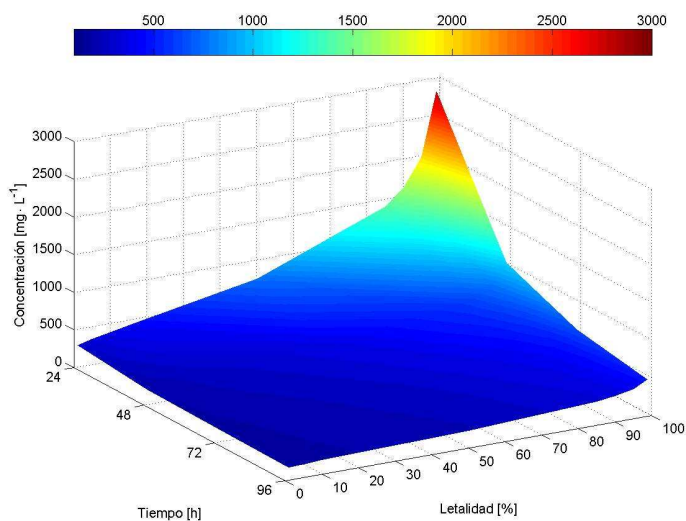


Figura 4.17: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al AcH. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

Tabla 4.14: Matriz de valores de CL, para AcH, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	287	196	173	164
5	337	215	183	171
10	384	232	193	178
15	426	248	202	184
50	747	360	266	227
85	1400	577	388	311
90	1610	647	428	338
95	1980	766	494	384
99	2820	1040	646	487

Ácido Acético tamponado (Figuras 4.18 y 4.19, Tablas 4.15 y 4.17) En los ensayos realizados con Ácido Acético tamponado (AcH+AcNa), el rango de concentraciones ensayadas es más elevado, debido a que se suprime el efecto del descenso del pH (Tabla 4.1). En términos generales el (AcH+AcNa) presenta un rango de respuesta que se encuentra entre 303,90 mg.L⁻¹ (CL₁ 96 h) y 2516,70 mg.L⁻¹ (CL₉₉

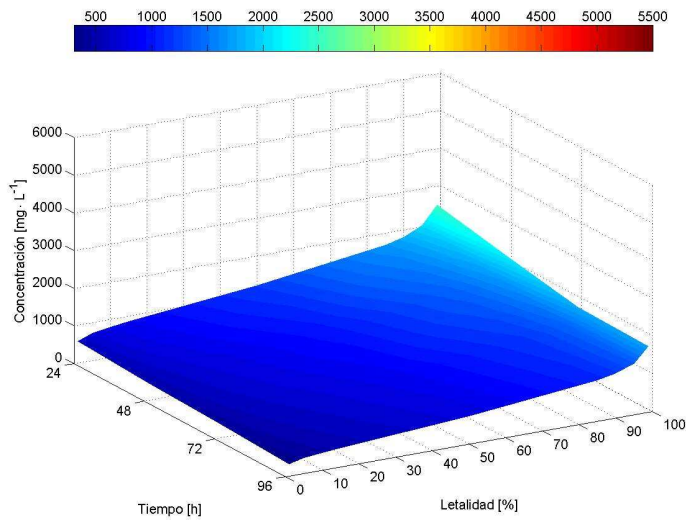


Tabla 4.15: Matriz de valores de CL, para AcH+AcNa, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	575,2	467,4	402,6	303,9
5	714,0	583,8	501,0	392,6
10	801,2	657,3	562,9	450,0
15	866,5	712,0	609,0	493,4
50	1203,2	998,5	849,2	728,2
85	1671,5	1400,3	1184,2	1074,3
90	1806,8	1516,9	1281,1	1178,5
95	2027,5	1707,8	1439,5	1350,9
99	2516,7	2133,0	1791,2	1744,9

Figura 4.18: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a AcH+AcNa. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

24 h). Al incrementar el tiempo de exposición se observa un descenso gradual de las CL, que es moderado en los porcentajes de letalidad bajos y se incrementa en valores superiores a la CL₅₀.

Con los datos obtenidos mediante el Modelo Biológico se observa una superficie de respuesta que comprende concentraciones entre 353,00 mg.L⁻¹ (CL₁ 96 h) y

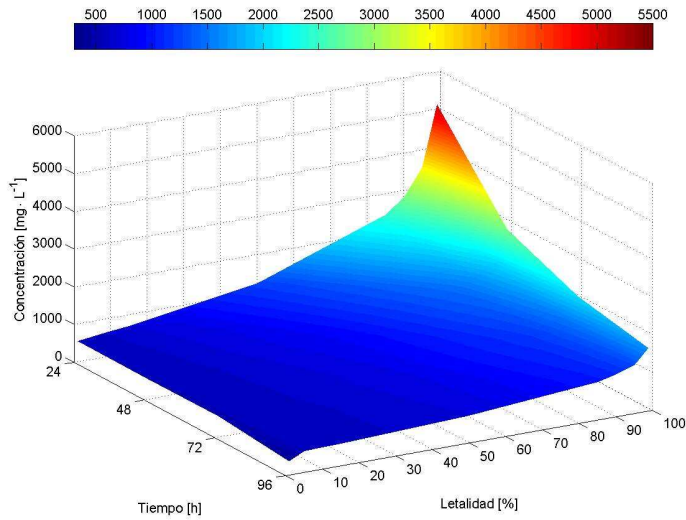


Tabla 4.16: Matriz de valores de CL, para AcH+AcNa, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	544	538	536	353
5	586	559	550	546
10	641	586	568	559
15	699	615	587	573
50	1230	878	762	704
85	2430	1470	1160	1000
90	2830	1670	1290	1100
95	3520	2010	1520	1270
99	5130	2810	2040	1660

Figura 4.19: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a AcH+AcNa. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

5130,00 mg.L⁻¹ (CL₉₉ 24 h); este incremento en el rango de concentraciones se debe a que se incluyen los valores de CL correspondientes a 24 horas. Por debajo de la CL₁₀ no se observa una influencia muy pronunciada del tiempo sobre la toxicidad; esta diferencia se acentúa en niveles de letalidad superiores al 50 %. Es importante destacar que los valores de CL₅₀ no difieren de los obtenidos con el método de los Probits.

Compuestos Iodados: Ioduro de Potasio y Iodopovidona

Ioduro de Potasio (Figuras 4.20 a 4.23, Tablas 4.17 a 4.20)

En solución de ClNa 0,9 % A pesar de que el método de los Probits no permitió el cálculo de las CL a 96 horas, se observa que los rangos de CL₁₋₉₉ obtenidos con éste método, luego de 72 horas de exposición (35,90 - 102,60 mg.L⁻¹), son comparables con los obtenidos con el Modelo Biológico (44,60 - 93,40 mg.L⁻¹). Los datos aportados por el método de los Probits nos proporcionan una superficie de respuesta que comprende un rango que oscila entre 35,90 (CL₁ 72h) y 233,60 mg.L⁻¹ (CL₉₉ 24h); mientras que ésta, según el Modelo Biológico, resultó entre 43,00 (CL₁ 96 h) y 313,00 mg.L⁻¹ (CL₉₉ 24 h). En ambos casos los descensos de las concentraciones son más pronunciados entre las 24 y 48 horas de exposición. Debido a que la tasa de sobrevivencia en los grupos control fue muy baja se debe considerar que el efecto letal de esta sustancia no puede ser únicamente atribuido a la misma.

En Agua Dura Reconstituida (ADR) La superficie de respuesta al IK, (Figuras 4.22 y 4.23) muestra un rango de concentraciones que oscila entre 78,80 - 678,20 mg.L⁻¹ (CL₁ 96 h- CL₉₉ 24 h); y 126,00 - 914,00 mg.L⁻¹(CL₁ 96 h-CL₉₉ 24 h) para el método de los Probits y el Modelo Biológico, respectivamente. En ambos casos, al incrementar el tiempo de exposición se observa una clara tendencia decreciente en las CL, llegando a disminuir hasta aproximadamente en un 30 % de su valor inicial a 24 horas.

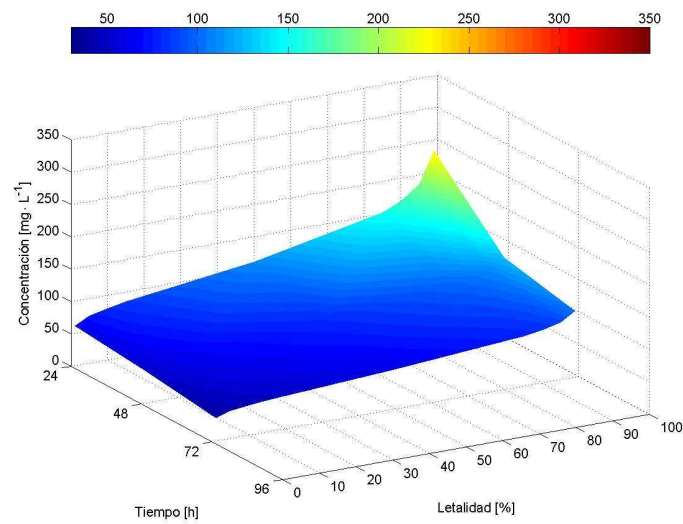


Tabla 4.17: Matriz de valores de CL, para IK en ClNa 0,9 %, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	61,7	50,7	35,9	-
5	72,8	58,0	41,9	-
10	79,6	62,3	45,5	-
15	84,5	65,4	48,1	-
50	110,9	80,2	60,7	-
85	152,1	98,5	76,7	-
90	164,8	103,4	81,1	-
95	185,9	111,1	88,0	-
99	233,6	127,1	102,6	-

Figura 4.20: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al IK en ClNa 0,9 %. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

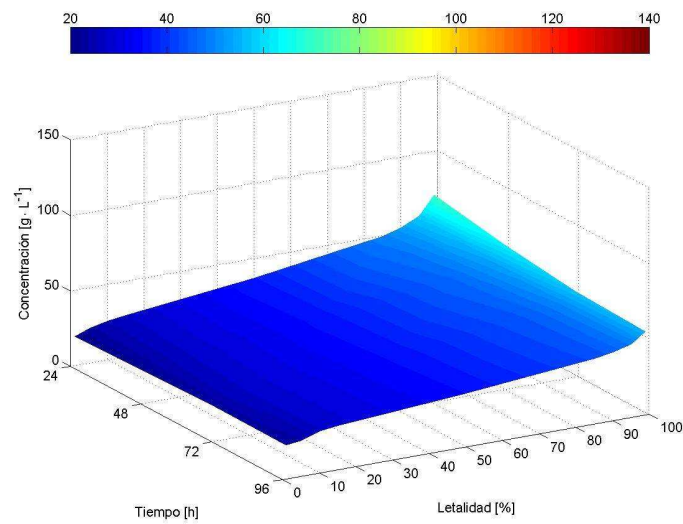


Tabla 4.18: Matriz de valores de CL, para IK en ClNa 0,9 %, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	68,9	49,4	44,6	43,0
5	75,5	51,9	46,0	43,9
10	81,3	54,1	47,2	44,6
15	86,3	55,9	48,3	45,3
50	121,0	68,6	55,5	50,2
85	184,0	90,7	68,3	59,0
90	204,0	97,6	72,2	61,7
95	237,0	109,0	78,8	66,3
99	313,0	135,0	93,4	76,4

Figura 4.21: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al IK en ClNa 0,9 %. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

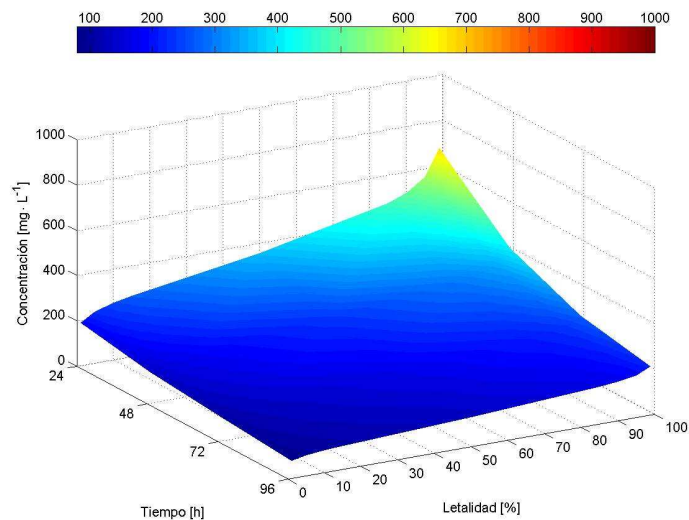


Tabla 4.19: Matriz de valores de CL, para IK en ADR, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	188,0	134,6	104,9	78,8
5	226,8	158,2	120,6	91,3
10	250,7	172,5	129,9	98,7
15	268,3	182,9	136,6	104,0
50	357,1	234,1	168,9	129,9
85	475,2	299,5	208,9	162,3
90	508,4	317,5	219,7	171,1
95	562,0	346,2	236,7	185,0
99	678,2	407,1	272,2	214,1

Figura 4.22: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al IK en ADR. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

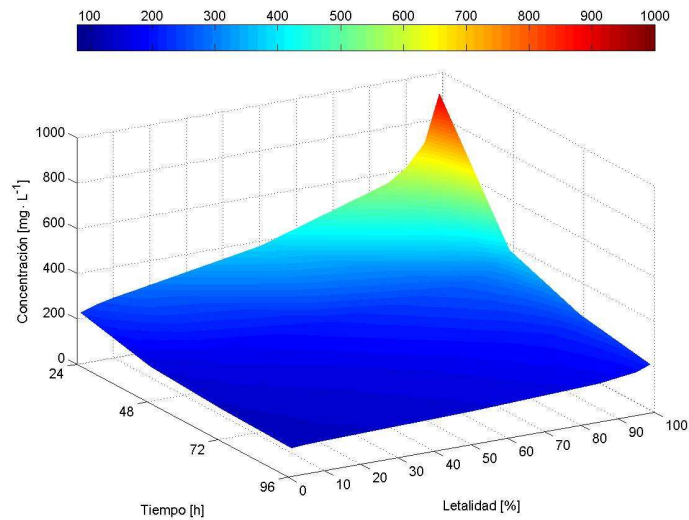


Tabla 4.20: Matriz de valores de CL, para IK en ADR, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	226	153	133	126
5	246	161	138	129
10	264	167	141	131
15	279	173	145	133
50	379	209	165	147
85	556	270	200	170
90	611	289	210	178
95	704	319	227	189
99	914	388	266	215

Figura 4.23: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al IK en ADR. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

Iodopovidona (Figuras 4.24 a 4.27, Tablas 4.21 a 4.24)

En solución de ClNa 0,9 % La superficie de respuesta a la Iodopovidona en ClNa 0,9 % graficada con los valores obtenidos con el método de los Probits (Figura 4.24) muestra un descenso en los valores de letalidad proporcional al tiempo de exposición, desde 38,20 mg.L⁻¹ (CL₁ 96 h) hasta 204,20 mg.L⁻¹ (CL₉₉ 24 h); se mantiene una proporción constante entre los valores CL a 24 y 96 horas de 2:1.

Según los datos obtenidos con el Modelo Biológico la superficie de respuesta a la Iodopovidona en ClNa 0,9 % comprende un rango concentraciones que oscila entre 60,50 mg.L⁻¹ (CL₁ 96 h) y 260,00 mg.L⁻¹ (CL₉₉ 24 h), en este caso no se observa la relación de proporcionalidad entre los valores CL a 24 y 96 horas, el descenso de la concentración en función del tiempo es gradual en porcentajes de letalidad inferiores a la CL₅₀ y se hace más pronunciado principalmente entre las 24 y 48 horas de exposición, en donde el descenso corresponde a un 50 %. Al igual que en los ensayos realizados con IK en solución de ClNa 0,9 %, en estos observamos una respuesta semejante; la tasa de sobrevivencia en los grupos control fue muy baja y debido a esto el efecto letal en los tratamientos no puede ser unicamente atribuido a la Iodopovidona.

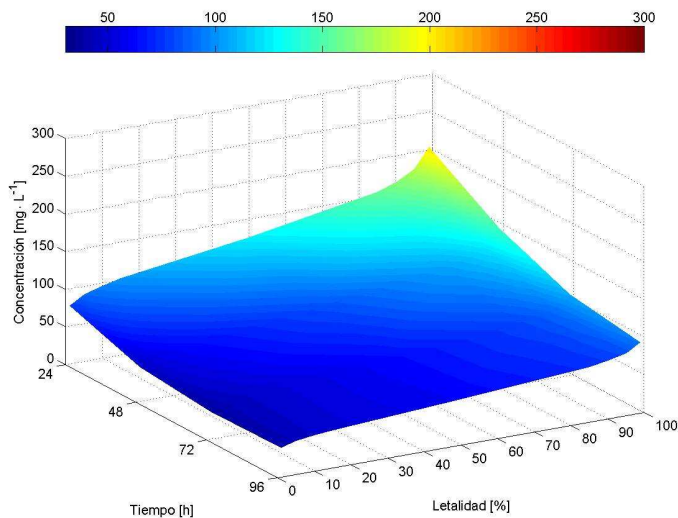


Tabla 4.21: Matriz de valores de CL, para Iodopovidona en ClNa 0,9 %, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	77,4	45,6	35,9	38,2
5	89,2	54,0	42,1	43,7
10	96,2	59,2	45,9	46,8
15	101,3	62,9	48,6	49,1
50	125,7	81,6	62,0	59,9
85	156,1	105,7	79,1	73,1
90	164,3	112,4	83,8	76,6
95	177,2	123,1	91,3	82,1
99	204,2	146,0	107,1	93,6

Figura 4.24: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a Iodopovidona en ClNa 0,9 %. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

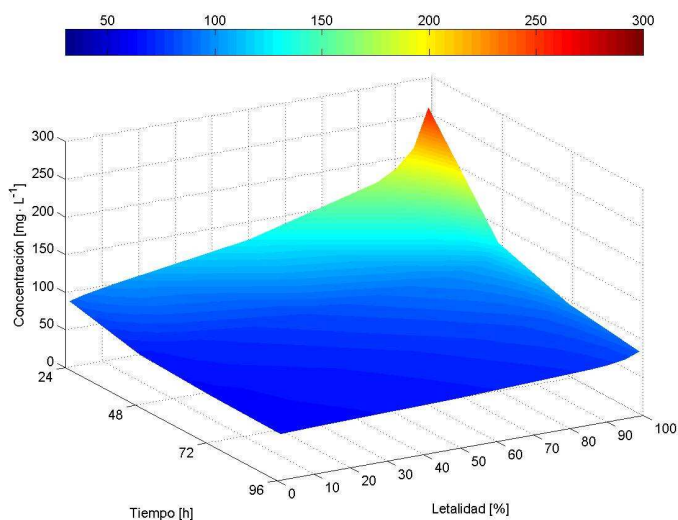


Tabla 4.22: Matriz de valores de CL, para IK en ClNa 0,9 %, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	87,0	66,3	61,8	60,5
5	92,5	68,3	62,9	61,1
10	97,2	70,1	63,8	61,7
15	101,0	71,6	64,7	62,3
50	127,0	81,5	70,3	66,0
85	172,0	98,1	80,0	72,6
90	186,0	103,0	82,9	74,7
95	209,0	111,0	87,7	78,0
99	260,0	130,0	98,5	85,5

Figura 4.25: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a Iodopovidona en ClNa 0,9 %. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

En Agua Dura Reconstituida (ADR) En este caso el método de los Probits no nos permitió calcular el perfil de concentraciones letales a 96 horas; sin embargo, tenemos que la superficie de respuesta (Figura 4.26) comprende un rango de concentraciones de $173,00 \text{ mg.L}^{-1}$ (CL_1 72 h) a $771,00 \text{ mg.L}^{-1}$ (CL_{99} 24 h). El descenso de las CL al aumentar el tiempo de exposición es más acentuado en los porcentajes de letalidad más bajos (CL_1 - CL_{15}); por encima de la CL_{50} las diferencias atribuibles al tiempo de exposición se hacen más notorias hasta que en la CL_{99} 24 h el valor disminuye un 50 % con respecto a la CL_{99} 72 h.

Con los datos aportados por el Modelo Biológico se obtuvo un rango de respuesta que oscila entre $171,00 \text{ mg.L}^{-1}$ (CL_1 96 h) y $1180,00 \text{ mg.L}^{-1}$ (CL_{99} 24 h), el límite inferior es similar al obtenido con el método de los Probits, pero el límite superior de este rango es considerablemente mayor. El descenso de los porcentajes de letalidad más bajos (CL_{1-15}) es más acentuado que en el gráfico anterior, debido a que las concentraciones letales obtenidas en 24 horas son mayores a las obtenidas con el método de los Probits. Desde la CL_{50} hasta la CL_{99} los valores de letalidad entre 24 y 96 horas disminuyen desde aproximadamente un 50 % hasta un 75 %.

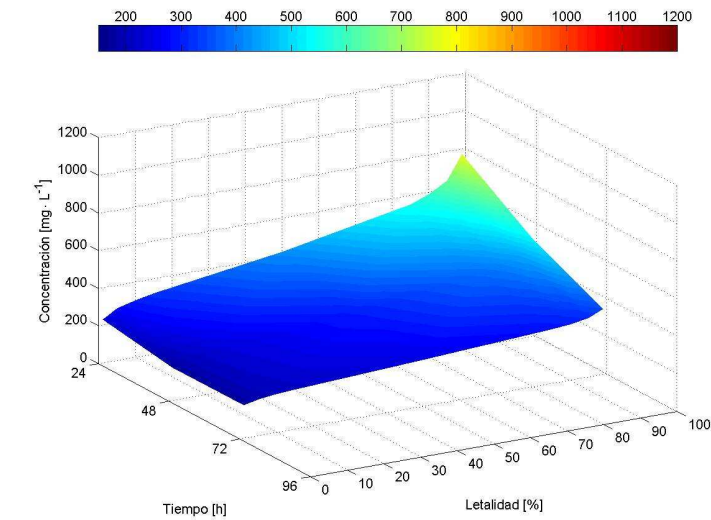


Tabla 4.23: Matriz de valores de CL, para Iodopovidona en ADR, calculados con el método de los Probits.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	229,8	171,5	173,0	-
5	274,3	202,0	191,5	-
10	301,5	220,4	202,2	-
15	321,4	233,8	209,7	-
50	420,9	300,0	244,7	-
85	551,2	384,6	285,5	-
90	587,5	407,9	296,2	-
95	645,7	445,1	312,6	-
99	771,0	524,3	346,0	-

Figura 4.26: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a Iodopovidona en ADR. Parámetros toxicológicos determinados mediante el método de los Probits.

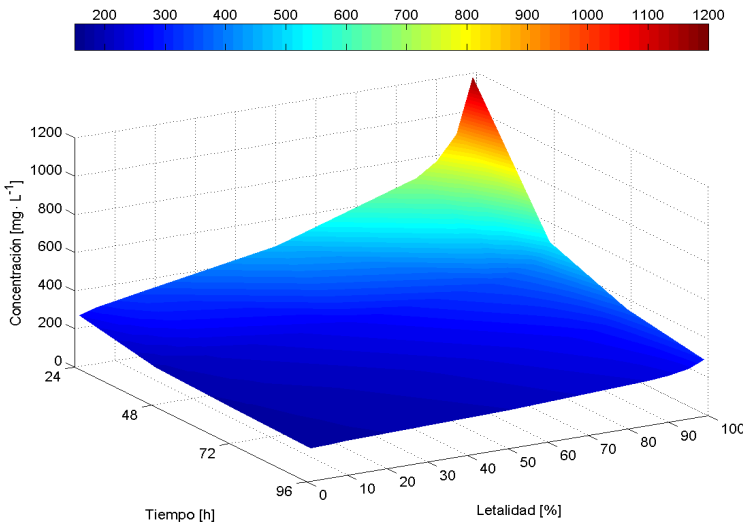


Tabla 4.24: Matriz de valores de CL, para Iodopovidona en ADR, calculados con el Modelo Biológico.

Letalidad (%)	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	96
1	266	194	177	171
5	291	203	182	174
10	313	211	186	177
15	331	218	190	180
50	460	266	218	198
85	694	349	266	232
90	768	375	281	242
95	892	418	306	259
99	1180	515	361	297

Figura 4.27: Superficie de respuesta de ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a Iodopovidona en ADR. Parámetros toxicológicos determinados mediante el Modelo Biológico.

4.3.3. Evolución temporal de las CL₅₀

Los valores obtenidos para la CL₅₀ con los métodos de Probits, Trimmed Spearman-Kärber y el Modelo Biológico se muestran respectivamente en las Tablas 4.25, 4.26 y 4.27. La Tabla 4.28 muestra una comparación entre los métodos anteriores para la CL₅₀ a 96 horas.

Tabla 4.25: Toxicidad aguda comparada, como CL₅₀, de los diferentes antifúngicos testeados con el método de los Probits a diferentes tiempos de exposición. ND: no determinado.

Tratamientos	24 h			48 h			72 h			96 h		
	Lím. Conf.			Lím. Conf.			Lím. Conf.			Lím. Conf.		
	CL ₅₀	95 %		CL ₅₀	95 %		CL ₅₀	95 %		CL ₅₀	95 %	
Verde de Malaquita (mg.L ⁻¹)		ND		3,20	2,70	4,00	1,90	1,70	2,00	1,50	1,40	1,70
Cloruro de Sodio (g.L ⁻¹)	36,80	43,00	36,60	36,10	34,50	38,20	35,60	34,00	37,30	33,40	33,40	36,70
Formalina (μl.L ⁻¹)	1195,60	898,40	2043,90	888,60	750,90	1026,70	790,50	638,50	928,90	681,40	636,00	723,80
Ácido Acético (mg.L ⁻¹)												
Ácido Acético Glacial		ND		365,20	327,30	481,20	270,30	219,30	340,10	229,70	214,90	242,30
Ácido Acético Tamponado	1203,20	1148,10	1257,60	998,50	937,30	1052,50	849,20	790,30	900,40	728,20	567,40	839,70
Compuestos Iodados (mg.L ⁻¹)												
Ioduro de Potasio												
En 0,9 % ClNa	110,90	99,60	110,90	80,20	75,50	84,10	60,70	54,80	65,30		ND	
En ADR	357,10	339,80	373,40	234,10	221,90	245,50	168,90	152,10	179,60	129,90	117,30	140,70
Iodopovidona												
En 0,9 % ClNa	125,70	119,40	131,80	81,60	76,40	86,10	62,00	56,80	66,30	59,90	50,80	65,60
En ADR	420,90	403,20	440,20	300,00	283,70	314,00	244,70	202,90	269,80		ND	

Tabla 4.26: Toxicidad aguda comparada, como CL₅₀, de los diferentes antifúngicos testeados con el Método Trimmed Spearman-Kärber a diferentes tiempos de exposición.

Tratamientos	24 h			48 h			72 h			96 h		
	Lím. Conf.		CL ₅₀	Lím. Conf.		CL ₅₀	Lím. Conf.		CL ₅₀	Lím. Conf.		CL ₅₀
	95 %	95 %		95 %	95 %		95 %	95 %		95 %	95 %	
Verde de Malaquita (mg.L ⁻¹)		ND		2,90	2,20	3,90	1,80	1,70	2,00	1,50	1,40	1,60
Cloruro de Sodio (g.L ⁻¹)	37,60	38,60	36,60	36,70	38,30	35,10	35,80	37,20	34,60	34,80	36,30	33,50
Formalina (μl.L ⁻¹)	1233,10	1149,90	1322,40	893,50	846,40	943,30	761,00	719,20	805,30	652,10	613,70	693,10
Ácido Acético (mg.L ⁻¹)												
Ácido Acético Glacial		ND			ND		252,70	233,60	273,50	221,70	207,60	236,80
Ácido Acético Tamponado	1207,60	1155,30	1262,20	997,50	954,10	1042,80	848,00	800,90	897,70	710,00	665,10	757,90
Compuestos Iodados (mg.L ⁻¹)												
Ioduro de Potasio												
En 0,9 % ClNa	105,60	100,60	110,90	76,60	72,30	81,20	58,80	55,70	62,10	44,50	42,00	47,20
En ADR	352,90	336,50	370,10	229,30	217,30	242,00	166,04	155,70	177,70	124,70	118,40	131,40
Iodopovidona												
En 0,9 % ClNa	124,00	119,20	129,10	80,00	75,80	84,40	60,40	57,30	63,60	60,70	58,50	63,00
En ADR	423,00	400,40	446,90	294,00	282,50	305,90	227,40	213,40	242,30	169,70	154,80	186,10

Tabla 4.27: Valores de Concentración Letal media (CL₅₀) y Desvío Estándar (DE) para los diferentes antifúngicos calculados con el Modelo Biológico.

Tratamientos	24 h			48 h			72 h			96 h		
	CL ₅₀		DS	CL ₅₀		DS	CL ₅₀		DS	CL ₅₀		DS
Verde de Malaquita (mg.L⁻¹)	8,32	±	0,87	3,03	±	0,20	1,87	±	0,09	1,41	±	0,06
Cloruro de Sodio (g.L⁻¹)	45,60	±	2,06	37,10	±	0,92	34,30	±	0,60	33,00	±	0,49
Formalina (μL.L⁻¹)	1160,00	±	53,30	833,0	±	19,90	729,00	±	15,40	678,00	±	14,80
Ácido Acético (mg.L⁻¹)												
Ácido Acético Glacial	747,00	±	78,70	360,00	±	19,40	266,00	±	7,59	228,00	±	6,42
Ácido Acético Tamponado	1230,00	±	48,20	878,00	±	19,90	762,00	±	16,90	704,00	±	16,60
Compuestos Iodados (mg.L⁻¹)												
Ioduro de Potasio												
En ClNa 0,9 %	121,00	±	4,04	68,60	±	1,48	55,50	±	1,21	50,30	±	1,29
En ADR	379,00	±	9,28	209,00	±	3,38	165,00	±	3,46	147,00	±	4,03
Iodopovidona												
En ClNa 0,9 %	127,00	±	3,4	81,50	±	1,28	70,30	±	1,49	66,10	±	1,73
En ADR	460,00	±	12,40	266,00	±	3,86	218,00	±	3,1	198,00	±	3,46

Tabla 4.28: Resumen comparativo de los valores de CL₅₀ - 96 h, Limites de Confianza y Desvío Estándar (DE) de los diferentes antifúngicos calculados con los tres métodos.

Tratamientos	Método de los Probits			Trimmed Spearman Karber			Modelo Biológico		
	CL ₅₀	Lím. Conf. 95 %		CL ₅₀	Lím. Conf. 95 %		CL ₅₀	DS	
Verde de Malaquita (mg.L⁻¹)	1,50	1,40	1,70	1,50	1,40	1,60	1,410	±	0,06
Cloruro de Sodio (g.L⁻¹)	35,00	35,40	36,70	34,80	36,30	33,50	33,00	±	0,49
Formalina (μL.L⁻¹)	681,40	636,00	839,70	652,10	613,70	693,10	678,00	±	14,80
Ácido Acético (mg.L⁻¹)									
Ácido Acético Glacial	229,70	214,90	36,70	221,70	207,60	236,80	228,00	±	6,42
Ácido Acético Tamponado	728,20	567,40	242,30	710,00	665,10	757,90	704,00	±	16,60
Compuestos Iodados (mg.L⁻¹)									
Ioduro de Potasio									
En 0,9 % ClNa		ND		44,50	42,00	47,20	50,30	±	1,29
En ADR	129,90	117,30	723,80	124,70	118,40	131,40	147,00	±	4,03
Iodopovidona									
En 0,9 % ClNa	59,90	50,80	140,70	60,70	58,50	63,00	66,10	±	1,73
En ADR		ND		169,70	154,80	186,10	198,00	±	3,46

Las Figuras 4.28 a 4.36 muestran la evolución temporal de las CL_{50} . Las mismas se registraron a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición calculadas con los tres métodos mencionados. Se aprecia que las CL_{50} tienden a disminuir a mayor tiempo de exposición; la relación CL_{50} vs tiempo de exposición describe una curva de tipo asintótica.

Verde de Malaquita (Figura 4.28)

Como se observa en la Figura 4.28, los valores de las CL_{50} obtenidos para el Verde de Malaquita disminuyen desde $8,32 \text{ mg.L}^{-1}$ luego de 24 horas de exposición a tan sólo $1,47 \text{ mg.L}^{-1}$, valor promedio obtenido tras 96 horas; también se observa la proximidad valores obtenidos con los tres métodos antes mencionados.

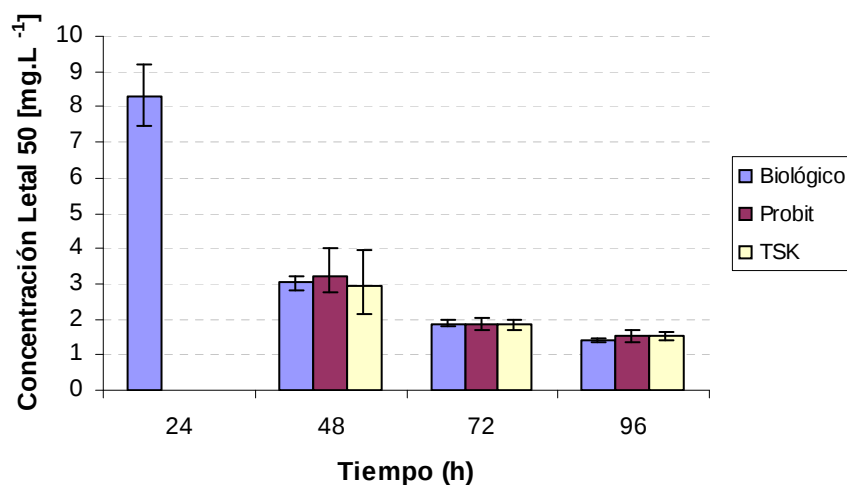


Figura 4.28: Evolución temporal de las CL_{50} del Verde de Malaquita para ovas de *Odontesthes bonariensis*. Las CL_{50} 24 h no pudieron ser determinadas con el método de los Probits ni el TSK.

Cloruro de Sodio (Figura 4.29)

Como se observa en la Figura 4.29, exceptuando a la CL_{50} 24 h determinada según el Modelo Biológico ($45,60 \text{ g.L}^{-1}$); los valores de CL_{50} para los otros métodos se encuentran alrededor de los $37,20 \text{ g.L}^{-1}$ y llamativamente éstos sólo experimentan un ligero descenso al incrementar el tiempo de exposición.

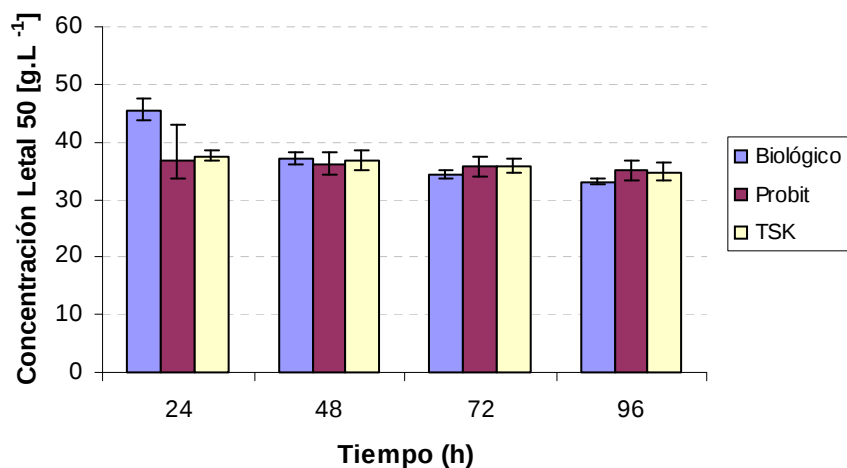


Figura 4.29: Evolución temporal de las CL_{50} del CINa para ovas de *Odontesthes bonariensis*.

Formalina (Figura 4.30)

En la Figura 4.30 se observa que las CL_{50} son similares en los tres métodos empleados para su determinación; en todos los casos hay una tendencia a disminuir los valores de CL_{50} desde aproximadamente $1200 \mu L.L^{-1}$ luego de 24 horas de exposición hasta alrededor de $670,50 \mu L.L^{-1}$ al cabo de 96 horas.

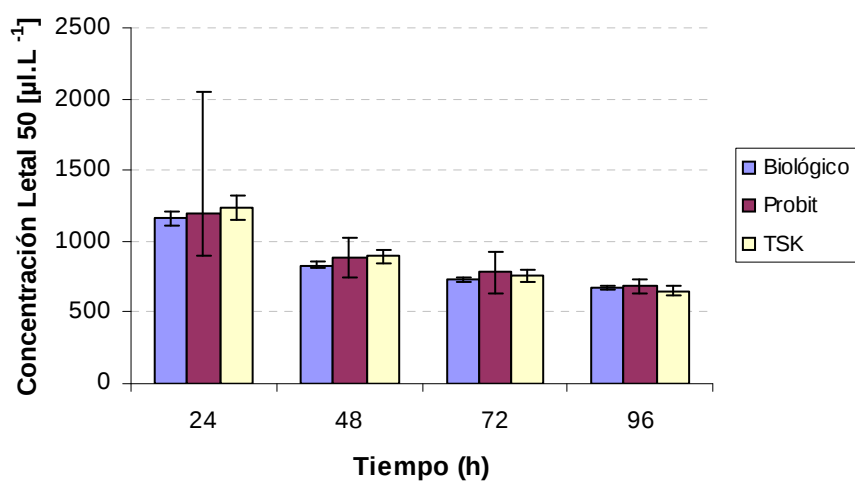


Figura 4.30: Evolución temporal de las CL_{50} de la Formalina para ovas de *Odontesthes bonariensis*.

Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Figura 4.31) La Figura 4.31 muestra claramente como la CL_{50} para el AcH está influenciada por el tiempo de exposición. A pesar de que tras 24 horas de exposición ésta sólo pudo ser determinada con el Modelo Biológico y resultó en $747,00 \text{ mg.L}^{-1}$; luego de 48 horas se observa un descenso del 50 % alcanzando valores próximos a $360,00 \text{ mg.L}^{-1}$; posteriormente las CL_{50} obtenidas a 72 y 96 horas presentan respuestas similares para los tres métodos, con valor final promedio de $226,50 \text{ mg.L}^{-1}$ para la CL_{50} 96 h.

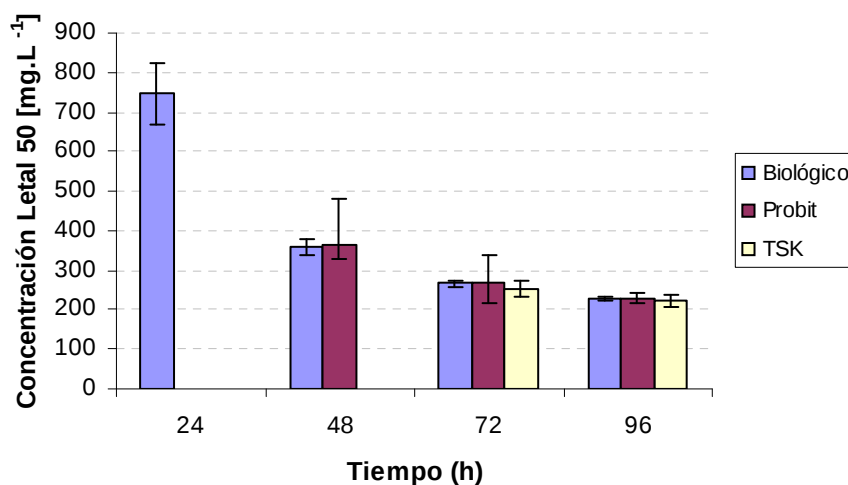


Figura 4.31: Evolución temporal de las CL_{50} del Ácido Acético Glacial (AcH) para ovas de *Odon-testhes bonariensis*. Las CL_{50} 24 h no pudieron ser determinadas con el método de los Probits ni con el TSK.

Ácido Acético Glacial Tamponado (Figura 4.32) La evolución de la CL_{50} se presenta en la Figura 4.32; se puede apreciar la similitud de los valores obtenidos mediante los tres métodos utilizados. También se observa un descenso gradual de las CL_{50} desde aproximadamente $1213,60 \text{ mg.L}^{-1}$ hasta $714,10 \text{ mg.L}^{-1}$ valores promedio para los tres métodos a las 24 y 96 h de exposición.

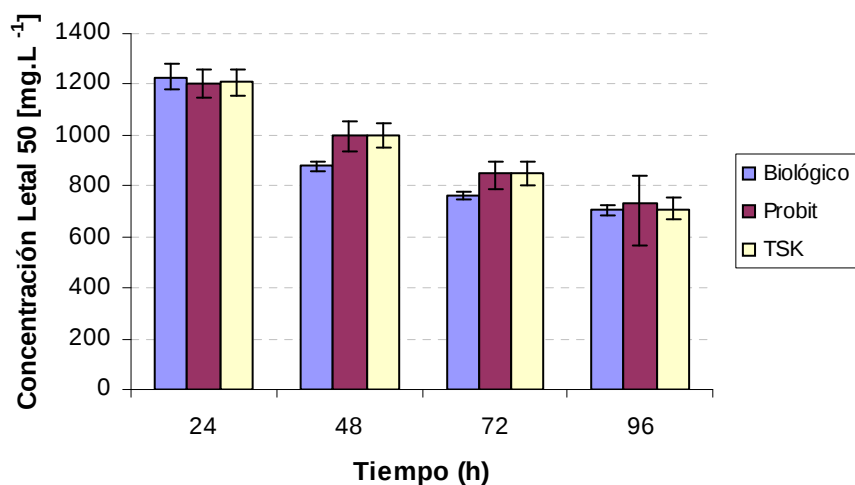


Figura 4.32: Evolución temporal de las CL_{50} del Ácido Acético Glacial tamponado (AcH+ AcNa) para ovas de *Odontesthes bonariensis*.

Compuestos Iodados

Ioduro de Potasio IK (Figuras 4.33 y 4.34)

En solución de ClNa 0,9 % La Figura 4.33 ilustra la evolución de las CL_{50} , la que disminuye desde 110,60 $mg.L^{-1}$, valor promedio obtenido tras 24 horas de

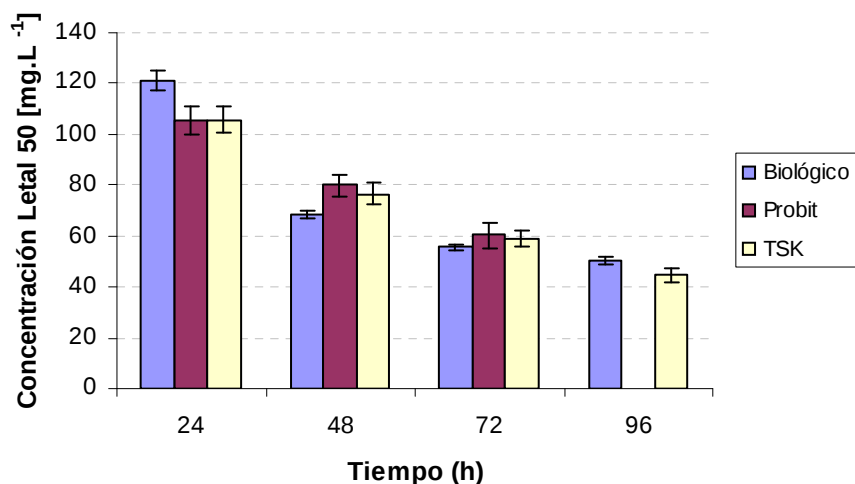


Figura 4.33: Evolución temporal de las CL_{50} del IK en ClNa 0,9 % para ovas de *Odontesthes bonariensis*. La CL_{50} 96 h no pudo ser determinada con el método de los Probits.

exposición, hasta 47,40 mg.L⁻¹ luego de 96 horas; a pesar de que no se cuenta con datos de CL₅₀ 96 horas para el método de los Probits, se observa que la CL₅₀ exhibe una tendencia a disminuir con el incremento del tiempo similar a la observada en los otros métodos.

En agua dura reconstituida (ADR) Como se observa en la Figura 4.34, la CL₅₀ 24 h determinada según el Modelo Biológico (379,00 mg.L⁻¹) es mayor que la obtenida mediante el método de los Probits (357,10 mg.L⁻¹) y el TSK (352,90 mg.L⁻¹). Al cabo de 48 horas de exposición estos valores descienden aproximadamente un 38 % para finalmente, tras 96 horas de exposición, alcanzar valores de 147,00; 139,90 y 124,70 mg.L⁻¹, para el Modelo Biológico, el Método de los Probits y TSK respectivamente.

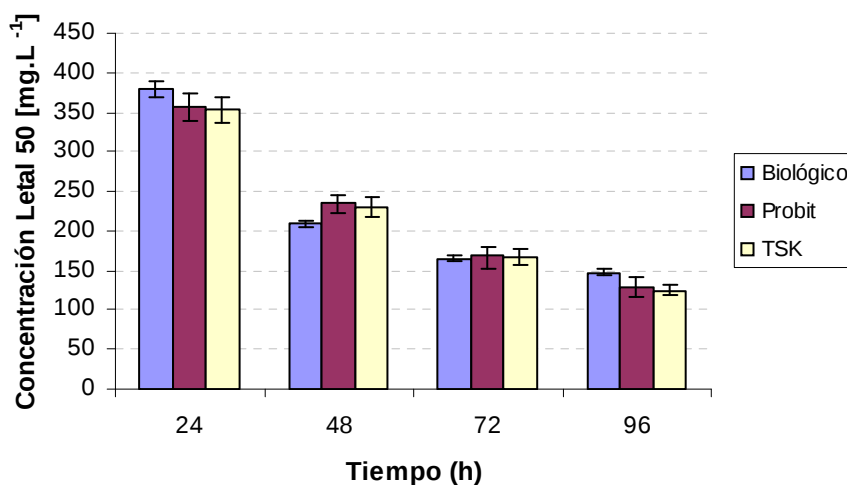


Figura 4.34: Evolución temporal de las CL₅₀ del IK en agua dura reconstituida (ADR) para ovas de *Odontesthes bonariensis*.

Iodopovidona (Figuras 4.35 y 4.36)

En solución de ClNa 0,9 % La Figura 4.35 ilustra los valores de CL₅₀ para esta sustancia y en ella se observa un drástico descenso de la CL₅₀ entre las 24 (125,60 mg.L⁻¹) y las 48 horas (81,30 mg.L⁻¹), el que es de aproximadamente un 36 %. Posteriormente se observa una tendencia decreciente menos pronunciada; donde los valores obtenidos con el Modelo Biológico (66,10 mg.L⁻¹) resultaron ligeramente

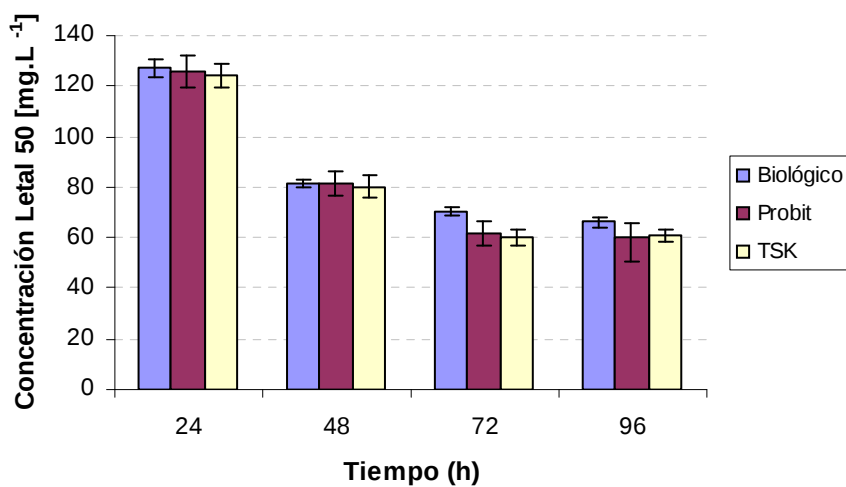


Figura 4.35: Evolución temporal de las CL₅₀ de la Iodopovidona en ClNa 0,9% para ovas de *Odontesthes bonariensis*.

más elevados que los obtenidos mediante el método de los Probits (59,90 mg.L⁻¹) y el Trimmed Spearman-Kärber (60,70 mg.L⁻¹).

En agua dura reconstituida (ADR) Nuevamente ambas sustancias mostraron una tendencia a disminuir su CL₅₀ de manera más pronunciada en las primeras

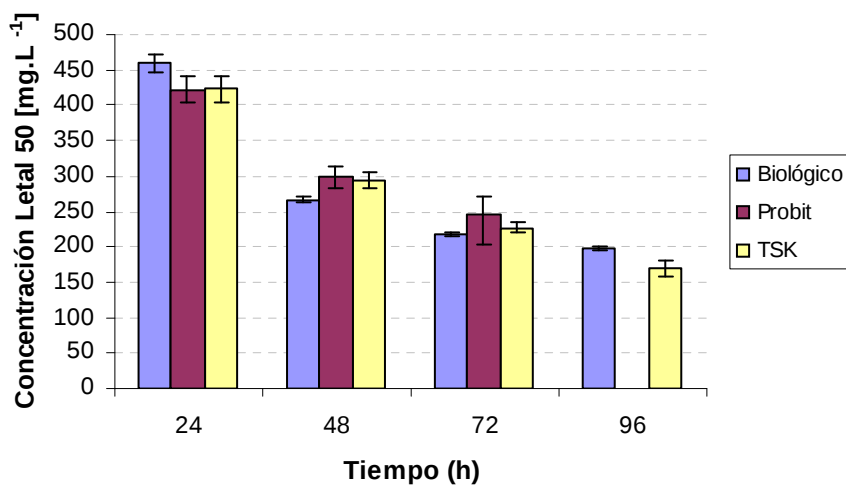


Figura 4.36: Evolución temporal de las CL₅₀ de la Iodopovidona en agua dura reconstituida (ADR) para ovas de *Odontesthes bonariensis*. La CL₅₀ 96 h no pudo ser determinada con el método de los Probits.

de 48 horas de exposición. Como podemos observar en la Figura 4.36, el método de los Probits no permitió calcular el valor de CL_{50} 96 h; no obstante se observa que ésta disminuye hasta alcanzar valores de 198,0 y 169,7 $mg.L^{-1}$ para el Modelo Biológico y el TSK respectivamente. Finalmente, resaltamos que las CL_{50} de la Iodopovidona resultaron ser mayores a las obtenidas con IK.

4.3.4. Análisis de la pendiente (Tabla 4.29)

Los valores de las pendientes de las curvas dosis-respuesta ajustadas mediante el método Probit, nos muestran la amplitud de la respuesta letal en la población de organismos expuesta a los diversos tratamientos antifúngicos. La Tabla 4.29 muestra la pendiente de las curvas dosis-respuesta, o sensibilidad, de los tóxicos analizados. Según ésta tenemos que la sensibilidad a determinada sustancia varía según el tiempo de exposición; no obstante, en todos los tiempos de exposición las ovas de pejerrey fueron más sensibles al Verde de Malaquita que a otra sustancia. Luego de 96 h de exposición la sensibilidad observada en orden creciente fue la siguiente: Iodopovidona en ClNa 0,9 % > ClNa > IK en ADR > AcH > F > [AcH + AcNa] > VM. No habiéndose obtenido valores de pendiente para los ensayos realizados con Iodopovidona en ADR e IK en ClNa 0,9 %, motivo por el cual no fueron incluidos en la secuencia.

Tabla 4.29: Valores de las pendientes de las curvas dosis respuesta estimadas mediante el método Probit, entre paréntesis el error estándar.

Tratamiento	24 h	48 h	72 h	96 h
Verde de Malaquita	ND	2,79 (0,50)	4,45 (0,53)	4,27 (0,49)
Cloruro de Sodio	8,15 (1,83)	9,67 (1,65)	11,31 (1,93)	11,75 (2,06)
Formalina	4,06 (1,04)	6,63 (1,07)	7,94 (1,63)	7,26 (0,74)
Ácido Acético				
Ácido Acético Glacial	0,46 (0,45)	6,23 (1,63)	7,05 (2,09)	9,47 (1,29)
Ácido Acético Tamponado	7,26 (0,73)	7,06 (0,67)	7,18 (0,66)	6,13 (0,92)
Compuestos Iodados				
Ioduro de Potasio				
En 0,9 % ClNa	8,23 (0,77)	11,65 (1,75)	10,22 (1,52)	ND
En ADR	8,35 (0,86)	9,68 (0,92)	11,23 (2,14)	10,73 (1,50)
Iodopovidona				
En 0,9 % ClNa	11,04 (1,12)	9,20 (1,18)	9,80 (1,33)	12,00 (2,58)
En ADR	8,85 (1,03)	9,59 (0,95)	15,46 (3,19)	ND

4.3.5. Tasa de Eclosión

Se determinó la tasa de eclosión 168 horas después de iniciados cada uno de los ensayos; los valores obtenidos para cada tratamiento se muestran en las Tablas 4.28 a 4.32. Se observa que la respuesta es dosis dependiente, las tasas de eclosión disminuyen al aumentar la concentración. En la mayoría de los casos se observó que no hubo eclosión en las concentraciones elevadas, a pesar de que en éstas aún se registrara sobrevivencia al cabo de 96 horas de exposición. En las concentraciones intermedias y más bajas, el porcentaje de sobrevivencia y la tasa de eclosión se equiparan.

Verde de Malaquita (Tabla 4.30)

En la Tabla 4.30 se hallan los valores de la tasa de eclosión y el porcentaje de sobrevivencia para ovas expuestas al VM durante 96 horas. Puede observarse que, si bien las ovas de pejerrey logran sobrevivir durante 96 horas de exposición a concentraciones superiores a 2 mg.L⁻¹ estas concentraciones son incompatibles con la eclosión, debido a que tras la exposición durante 96 horas al VM ocurre una pérdida de viabilidad que impide superar los estadios embrionarios. A concentraciones entre 1 y 2 mg.L⁻¹, si bien se registra eclosión, los valores no alcanzan a sus correspondiente porcentajes de sobrevivencia a 96 horas. También se observa que por debajo de los 0,75 mg.L⁻¹, la tasa de eclosión aumenta aproximándose a los valores de sobrevivencia registrados a 96 horas.

Tabla 4.30: Tasa de eclosión para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 168 h al VM.

Concentración mg.L ⁻¹	0	0,375	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5	3	4
Sobrevivencia 96h (%)	83,2	80,0	87,4	72,2	57,1	51,7	27,0	20,0	6,74	0
Tasa de eclosión (%)	76,67	73,33	60	66,67	43,95	28,13	6,67	0	0	0

Cloruro de Sodio (Tabla 4.31)

Para el caso del ClNa tenemos que, a pesar de que en concentraciones superiores a 25 g.L^{-1} se registraron porcentajes de sobrevivencia relativamente elevados en los ensayos a 96 horas, a partir de esta concentración la tasa de eclosión desciende hasta la nulidad. En concentraciones inferiores a los 20 g.L^{-1} , las tasas de eclosión en las ovas expuestas a 10 y $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ se incrementan hasta alcanzar a sus respectivos porcentajes de sobrevivencia (83,30 y 80,00 %), superando inclusive a la obtenida para grupo Control.

Tabla 4.31: Tasa de eclosión para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 168 h al ClNa.

Concentración g.L^{-1}	Control	7,5	10	15	20	25	30	35	40
Sobrevivencia 96 h (%)	86,7	80,0	83,3	84,3	77,8	71,7	65,6	46,7	17,5
Tasa de eclosión (%)	76,67	80	83,33	70,79	65,6	3,33	0	0	0

Formalina (Tabla 4.32)

El porcentaje de eclosión de las ovas expuestas a Formalina se presenta en la Tabla 4.32; en ésta puede observar que a concentraciones superiores a 300 mg.L^{-1} se registra un importante descenso de la tasa de eclosión. Aunque la tasa de eclosión registrada a 150 mg.L^{-1} no logra alcanzar a su correspondiente porcentaje de sobrevivencia, ésta supera los valores obtenidos en el grupo Control.

Tabla 4.32: Tasa de eclosión para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 168 h a la Formalina.

Concentración $[\mu\text{L.L}^{-1}]$	Control	150	300	400	600	800	1400	1600
Sobrevivencia 96 h (%)	94,4	97,7	90,0	85,7	61,5	35,6	1,1	0
Tasa de eclosión (%)	87,78	91,98	60,00	11,90	3,26	1,11	0	0

Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Tabla 4.33) En concentraciones superiores a 150 mg.L⁻¹ no se registró eclosión a pesar de haberse registrado sobrevivencia luego de 96 horas de exposición. En ovas expuestas a 150 mg.L⁻¹ la tasa de eclosión disminuye un 50 % con respecto a la tasa de sobrevivencia. A concentraciones inferiores a 100 mg.L⁻¹ no se vió un efecto adverso sobre la tasa de eclosión, lográndose igualar el porcentaje de sobrevivencia en las ovas expuestas a 50 y 100 mg.L⁻¹.

Tabla 4.33: Tasa de eclosión para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 168 h al Ácido Acético.

Concentración mg.L ⁻¹	Control	50	75	100	150	200	250	300	350
Sobrevivencia 96 h (%)	96,7	76,7	95	88,7	88,5	65	33,9	9,8	6,9
Tasa de eclosión (%)	93,34	76,67	81,67	88,34	46,88	0	0	0	0

Ácido Acético Tamponado No se registró eclosión en ninguna de las concentraciones de los ensayos realizados con Ácido Acético tamponado.

Compuestos Iodados

No se registró eclosión en ninguna de las concentraciones de los ensayos realizados con Ioduro de Potasio y Iodopovidona.

4.3.6. Parámetros Toxicológicos Subletales

Con la finalidad de conocer las concentraciones seguras para las ovas de pejerrey, es decir que no representen un riesgo durante su utilización como agentes quimioterapéuticos, se determinaron las concentraciones a las cuales las sustancias estudiadas presentan bajos niveles de toxicidad. Entre estos parámetros toxicológicos denominados subletales tenemos: 1) la concentración de efecto no observable (NOEC), 2) La concentración letal para 10 % de la población expuesta (CL₁₀), y 3) la concentración de no efecto (NEC). En la Tabla 4.34 se observan los valores de NOEC, CL₁₀ y NEC, las CL₁₀ fueron obtenidas con el método de los Probits (CL₁₀P) y el Modelo Biológico (CL₁₀D).

Tabla 4.34: Valores de Concentraciones subletales NOEC, CL₁₀, NEC 96h y Límites de Confianza al 95 % y desvío estándar (DS) de los diferentes antifúngicos, calculados con el método de los Probits, Modelo Biológico, valores en cursiva corresponden a 72 horas.

Tratamientos	NOEC	Probit			Modelo Biológico					
		CL ₁₀	Límites de Confianza 95 %		CL ₁₀	DS	NEC	Límites de Confianza 95 %		
Verde de Malaquita (mg.L⁻¹)	1,50	0,77	0,58	0,93	0,74	±	0,06	0,51	0,40	0,60
Cloruro de Sodio (g.L⁻¹)	30,00	27,30	23,50	29,50	29,30	±	0,53	28,70	27,10	29,70
Formalina (μL.L⁻¹)	400,00	453,70	501,90	393,10	553,00	±	17,30	530,00	486,10	555,90
Ácido Acético (mg.L⁻¹)										
Ácido Acético Glacial	150,00	168,20	143,90	185,10	178,00	±	9,46	156,60	124,30	178,20
Ácido Acético Tamponado	< 600,00	450,00	258,70	574,90	559,00	±	19,10	532,90	481,50	574,60
Compuestos Iodados (mg.L⁻¹)										
Ioduro de Potasio										
En 0,9 % ClNa	50,00	45,50	37,20	51,20	44,60	±	1,41	41,82	39,10	44,90
En ADR	100,00	98,70	82,30	110,50	131,00	±	4,45	119,60	108,70	127,50
Iodopovidona										
En 0,9 % ClNa	50,00	46,90	33,90	54,10	61,70	±	1,91	59,70	62,90	54,80
En ADR	100,00	202,20	139,30	231,00	177,00	±	3,92	167,20	157,90	175,80

Las Figuras 4.37 a 4.45 ilustran las diferencias entre los parámetros toxicológicos subletales obtenidos con los diferentes métodos de cálculo.

Verde de Malaquita (Figura 4.37)

El valor obtenido para la NOEC supera ampliamente a las CL_{10} 96 horas, las que resultaron en $0,77 \text{ mg.L}^{-1}$ según el método de los Probits y $0,74 \text{ mg.L}^{-1}$ con el Modelo Biológico, y la NEC cuyo valor ($0,51 \text{ mg.L}^{-1}$) es aún menor que las CL_{10} y aproximadamente 3 veces menor que la NOEC.

Al correlacionar los parámetros subletales con la tasa de eclosión tenemos que a concentraciones inferiores a la CL_{10} , dentro de las que se encuentra la NEC, se observan porcentajes de eclosión superiores al 60,00 %.

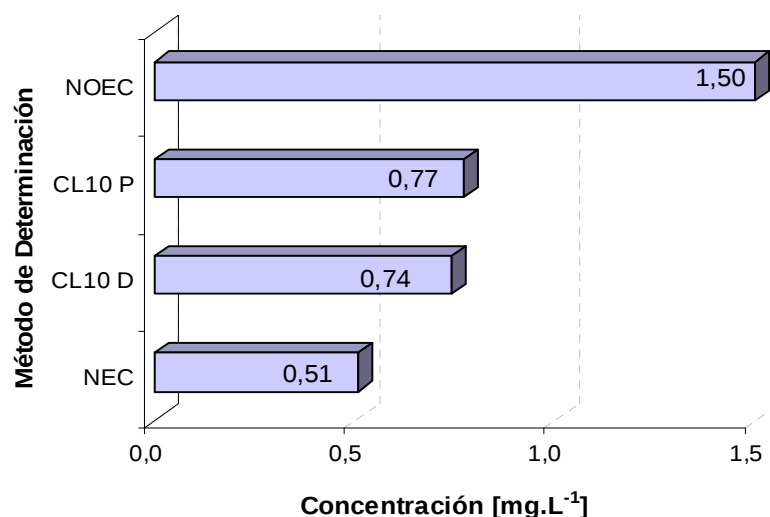


Figura 4.37: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas al Verde de Malaquita durante 96 horas. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL_{10} P: Concentración letal 10 Probit, CL_{10} D: Concentración letal 10 Modelo Biológico, y NEC: Concentración de no efecto.

Cloruro de Sodio (Figura 4.38)

En este caso encontramos que los valores todos los parámetros toxicológicos subletales calculados se encuentran dentro un rango de concentraciones relativamente

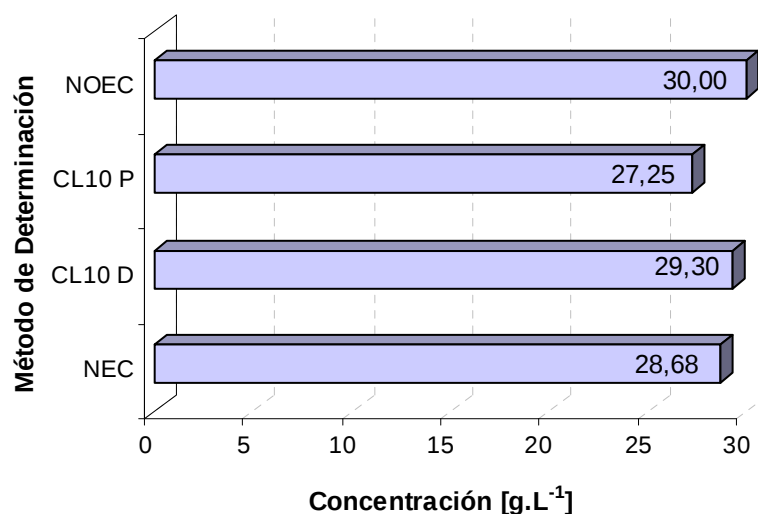


Figura 4.38: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al ClNa. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL₁₀ P: Concentración letal 10 Probit, CL₁₀ D: Concentración letal 10 Modelo Biológico, y NEC: Concentración de no efecto.

estrecho (27,25 g.L⁻¹, (CL₁₀ Probit) a 30,00 g.L⁻¹ (NOEC). Al establecer una relación entre las concentraciones subletales y la tasa de eclosión, observamos que aún en concentraciones subletales la tasa de eclosión se ve afectada negativamente, alcanzando valores mayores al 60 % en concentraciones inferiores a 20,00 mg.L⁻¹.

Formalina (Figura 4.39)

En el caso de Formalina el valor más bajo corresponde a la NOEC (400,00 mg.L⁻¹), seguida de la CL₁₀ calculada mediante el método de los Probits (453,70 mg.L⁻¹). Es llamativa la semejanza en los valores para NEC y CL₁₀ obtenidos con el Modelo Biológico, siendo de 530,00 y 533,00 mg.L⁻¹ respectivamente. A la NOEC le corresponde una tasa de eclosión del 11,60 %; únicamente en concentraciones inferiores a 300 mg.L⁻¹ la tasa de eclosión alcanza porcentajes superiores al 60 %.

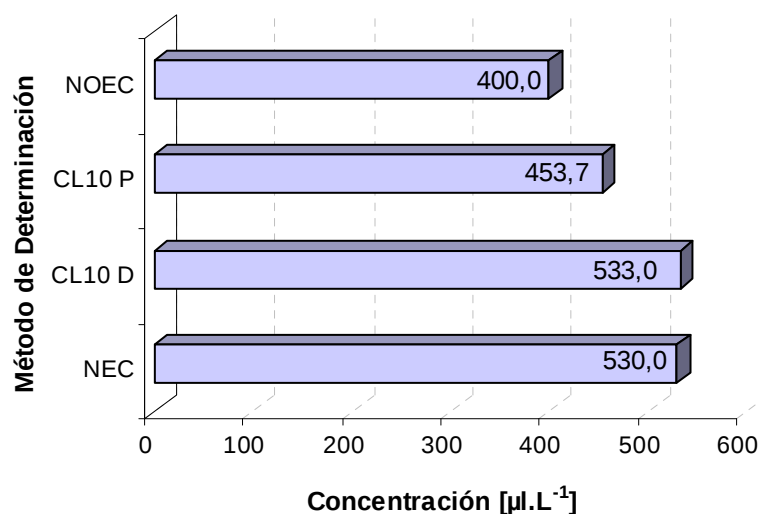


Figura 4.39: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas a la Formalina. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL₁₀ P: Concentración letal 10 Probit, CL₁₀ D: Concentración letal 10 Modelo Biológico y NEC: Concentración de no efecto.

Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Figura 4.40) En este caso nuevamente la NOEC (150,0 mg.L⁻¹) resultó ser inferior al resto de los parámetros toxicológicos subletales obtenidos. Se observa un valor mayor para las CL₁₀ (178,00 y 168,20 mg.L⁻¹), y el valor de la NEC (156,60 mg.L⁻¹) se aproxima a la NOEC. Nuevamente se encontró que en las concentraciones subletales las tasas de eclosión son bajas, resultado inferiores al 50,00 %.

Ácido Acético tamponado (Figura 4.41)

Para el Ácido Acético tamponado el valor mas elevado corresponde a la CL₁₀ y la NEC determinadas mediante el Modelo Biológico, con valores de 559,00 y 532,90 mg.L⁻¹, respectivamente; el valor más bajo obtenido corresponde a la CL₁₀ calculada por el método de los Probits (450,00 mg.L⁻¹). Al determinar la NOEC, encontramos que esta se ubica por debajo de rango de concentraciones ensayadas, siendo menor a 600 mg.L⁻¹. No se logró establecer una relación, entre la tasa de eclosión y los indicadores toxicológicos subletales debido a la ausencia de eclosión en las ovas expuestas al Ácido Acético tamponado.

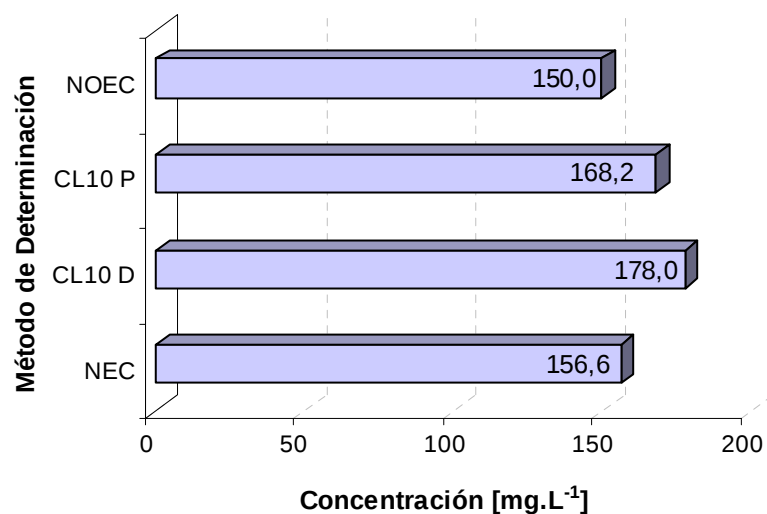


Figura 4.40: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 horas al Ácido Acético. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL₁₀ P: Concentración letal 10 Probit, CL₁₀ D: Concentración letal 10 Modelo Biológico y NEC: Concentración de no efecto.

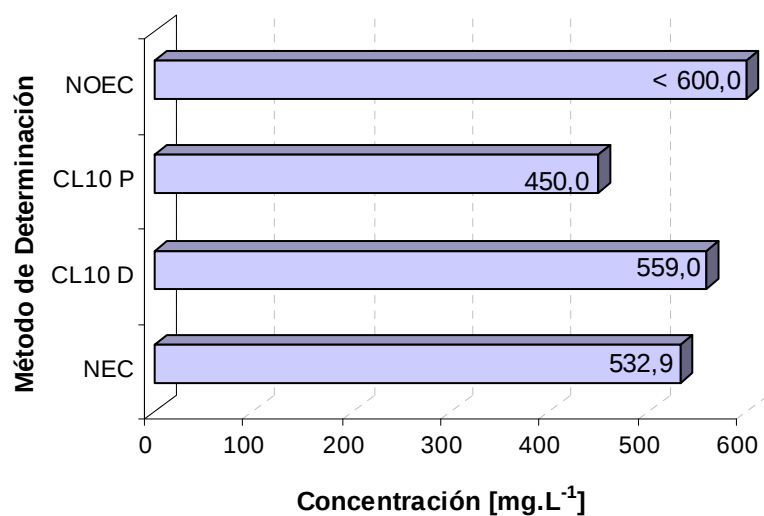


Figura 4.41: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas a durante 96 horas al Ácido Acético tamponado. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL₁₀ P: Concentración letal 10 Probit, CL₁₀ D: Concentración letal 10 Modelo Biológico y NEC: Concentración de no efecto.

Compuestos Iodados

Ioduro de Potasio (Figuras 4.42 y 4.43)

En solución ClNa 0,9 % En este caso el valor de la NOEC ($50,00 \text{ mg.L}^{-1}$) es levemente superior a los obtenidos con los otros métodos; sin embargo, es necesario considerar que la CL_{10} del Probit ($45,50 \text{ mg.L}^{-1}$) corresponde a las 72 h de exposición, este valor es cercano al obtenido con el Modelo Biológico $44,60 \text{ mg.L}^{-1}$ y superior a la NEC ($41,80 \text{ mg.L}^{-1}$). No se logró establecer relación, entre la tasa de eclosión y los indicadores subletales debido a la ausencia de eclosión.

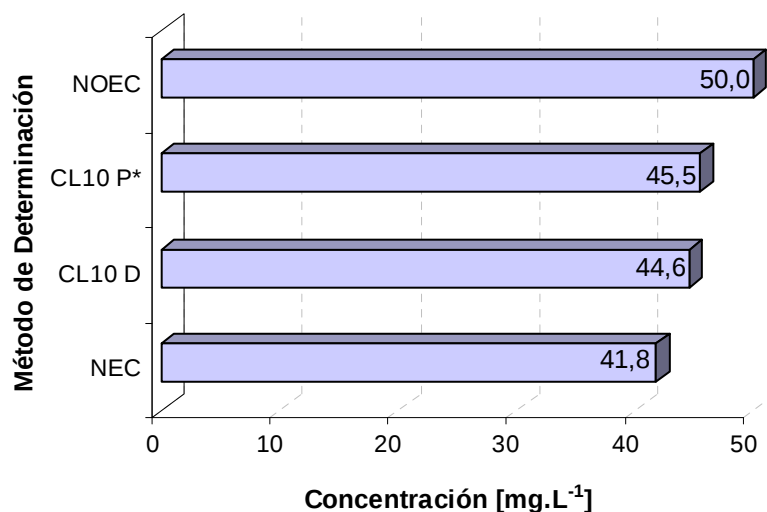


Figura 4.42: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 h al IK en 0,9 % ClNa. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL_{10} P 72h: Concentración letal 10 Probit, CL_{10} D: Concentración letal 10 Modelo Biológico y NEC: Concentración de no efecto.

En Agua Dura Reconstituida (ADR) La CL_{10} del Modelo Biológico resultó ser valor más elevado ($131,00 \text{ mg.L}^{-1}$), seguido de la NEC $119,60 \text{ mg.L}^{-1}$, y la NOEC que fue de $100,00 \text{ mg.L}^{-1}$; este valor es cercano a la CL_{10} calculada por el Probit ($98,70 \text{ mg.L}^{-1}$). No se logró establecer una relación entre los indicadores subletales y la tasa de eclosión debido a la ausencia de esta última.

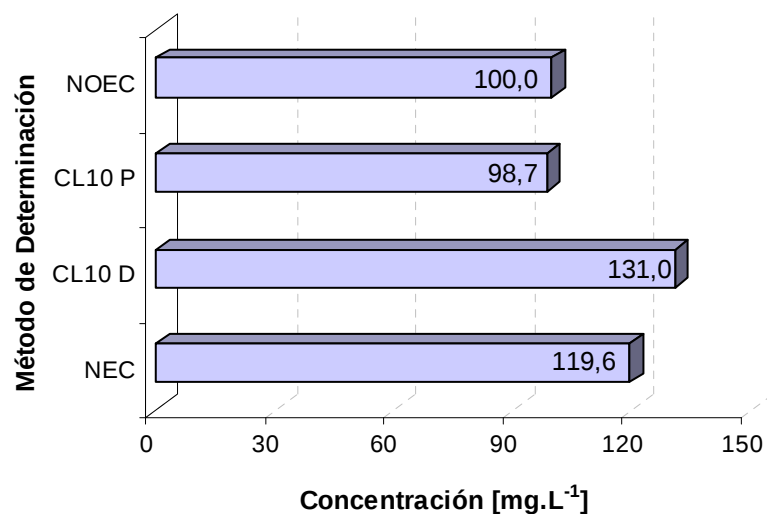


Figura 4.43: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 h al IK en agua dura reconstituida. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL₁₀ P: Concentración letal 10 Probit, CL₁₀ D: Concentración letal 10 Modelo Biológico y NEC: Concentración de no efecto.

Iodopovidona (Figuras 4.44 y 4.45)

En solución de ClNa 0,9 % El valor de NOEC para Iodopovidona coincide con el obtenido para Ioduro de Potasio. Sin embargo, en los otros parámetros se observa que la CL₁₀ (61,70 mg.L⁻¹) y la NEC (59,70 mg.L⁻¹) son mayores a obtenidas en Ioduro de Potasio. La relación, entre la tasa de eclosión y los indicadores subletales no pudo ser determinada debido a la ausencia de eclosión en los tratamientos.

En Agua Dura Reconstituida (ADR) El método de los Probits no permitió determinar la CL₁₀ 96 h; sin embargo, encontramos que la CL₁₀ 72h (202,20 mg.L⁻¹) supera los valores obtenidos para la CL₁₀ del Modelo Biológico (177,00 mg.L⁻¹), la NEC (167,20 mg.L⁻¹), y la NOEC (100,00 mg.L⁻¹).

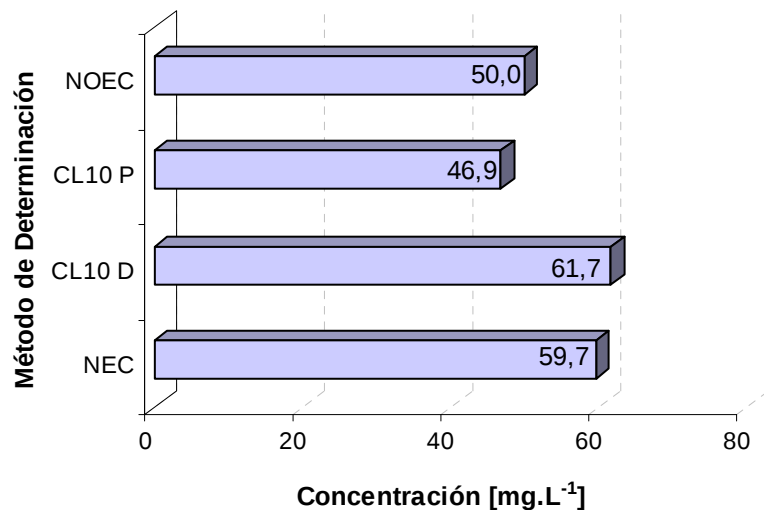


Figura 4.44: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96 h a la Iodopovidona en 0,9% CNa. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL₁₀ P: Concentración letal 10 Probit, CL₁₀ D: Concentración letal 10 Modelo Biológico y NEC: Concentraron de no efecto.

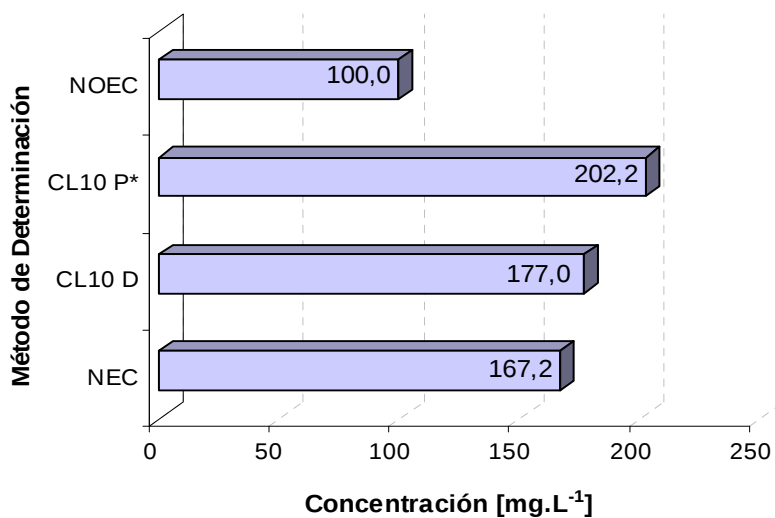


Figura 4.45: Parámetros toxicológicos subletales para ovas de *Odontesthes bonariensis* expuestas durante 96h a la Iodopovidona en agua dura reconstituida. NOEC: Concentración de efecto no observable, CL₁₀ P 72h: Concentración letal 10 Probit, CL₁₀ D: Concentración letal 10 Modelo Biológico y NEC: Concentración de no efecto.

4.4. Discusión

4.4.1. Verde de Malaquita

El Verde de Malaquita (VM) es una tinción orgánica sintética que, como el cristal violeta, pertenece al grupo de los colorantes trifenilmetano (Au et al., 1978; Culp & Beland, 1996). Existen dos formas de VM, una coloreada, iónica e hidrosoluble; y otra, el carbinol, incolora y liposoluble. En medio acuoso el equilibrio entre sus dos formas está gobernado principalmente por el pH de la solución. La constante de ionización (PK) del VM es 6,90; por lo tanto a pH 4 este se encuentra totalmente ionizado, al aumentar el pH el VM se combina covalentemente con aniones hidroxilos hasta llegar a pH 10, donde se encuentra íntegramente como carbinol. De las dos formas químicas del VM, únicamente los aniones coloreados tienen actividad antimicrobiana; la forma no coloreada es la que permite el paso a través de las membranas biológicas.

Desde 1930 el VM ha sido utilizado en acuicultura como agente antimicrobiano, antifúngico, y antiparasitario (Treves & Brown, 2000; Srivastava et al., 2004). Su poderosa actividad antimicrobiana es atribuida a su interacción con membranas celulares, la inhibición de enzimas intracelulares, y su actividad como sustancia intercalante (Elferink & Booi, 1975; Gouranchat, 2000). Su aplicación se realiza básicamente en dos modalidades: baños de inmersión (semejantes a exposiciones estáticas) o tratamientos a flujo constante. Si bien se trata de tratamientos tópicos, es importante considerar que durante la aplicación tópica de productos terapéuticos éstos pueden ser absorbidos y producir efectos sistémicos deletéreos.

La toxicidad del VM, en el medio ambiente acuático, puede verse influenciada por los parámetros fisicoquímicos del entorno como la temperatura, el pH y la dureza del agua, y la presencia en el agua de sustancias húmicas, compuestos orgánicos e iones como el Calcio (Alderman, 1985; Meinelt et al., 2003; Mitrowska & Posyniak, 2005). Bills et al. (1977a), realizaron ensayos para determinar la toxicidad aguda del VM en trucha arco iris y bagre de canal, encontrando que en exposiciones a corto plazo (3 - 6 horas), la toxicidad aguda aumentó significativamente en las temperaturas más altas; mientras que en periodos de exposición prolongados (96 horas), el efecto de la temperatura desapareció; en estos experimentos el pH y la dureza del agua no tuvieron influencia significativa sobre la toxicidad aguda del VM.

El Verde de Malaquita es tóxico para los peces, especialmente para las larvas pequeñas (FAO, 2009). Los efectos tóxicos de esta sustancia han sido estudiados por diversos autores, en distintas especies y condiciones (Alderman, 1985; Gouranchat, 2000; Srivastava et al., 2004; Sudova et al., 2007). Los síntomas clínicos típicos de la intoxicación aguda por VM en peces incluyen: inquietud, movimientos descoordinados, boqueo; seguidos de: pérdida del equilibrio, apatía, agonía y finalmente la muerte (Sudova et al., 2007). El cuadro anatomopatológico acompañante se caracteriza por la adquisición de un tono verdoso en la piel, tejido muscular y órganos internos, y el aumento de la producción de mucus en piel y branquias donde además se observa edema, decoloración y dilatación de los vasos sanguíneos (Machova et al., 2001).

Además de su elevada toxicidad aguda, el VM puede ser la causa de una serie de efectos secundarios en los peces expuestos, la frecuencia y gravedad de estos cambios se incrementa con el número de exposiciones. Debido a que los peces captan los compuestos hidrofóbicos, por difusión pasiva a través del epitelio vascularizado branquial, éste resulta ser el principal lugar de captación del VM en solución, y también su principal órgano blanco (Gobas et al., 1986; Alderman & Clifton-Hadley, 1993). Entre las principales alteraciones observadas en las branquias podemos mencionar: separación de las células del epitelio lamelar, infiltración leucocitaria, hipertrófia, alteraciones distróficas moderadas y necrosis (Gerundo et al., 1991; Svobodova & Vykusova, 1997; Srivastava et al., 1998; Treves & Brown, 2000). Además, los efectos del VM a nivel hepático descritos por Treves & Brown (2000) fueron: degeneración de los hepatocitos y una eventual desorientación de la lámina hepática, éstasis vascular seguida de necrosis coagulativa perivascular y peribiliar; Zhan & Braunbeck (1995) también observaron efectos citotóxicos en hepatocitos de trucha arco iris expuesta a concentraciones subletales de VM. El efecto del VM sobre las células sanguíneas de salmónidos ha sido extensamente documentado (Treves & Brown, 2000). La leucopenia fue la respuesta más frecuentemente observada tras las exposición al VM en diversas especies de peces; entre ellos podemos mencionar los hallazgos de Glagoleva & Malikova (1968) en *Salmo salar*; Bills & Hunn (1976) en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Saglan et al. (2003), además observaron una deplección en el recuento de eritrocitos en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), mientras que otros autores observaron una reducción del valor absoluto y relativo de monocitos en carpa

común (Svobodova & Vykusova, 1997). Treves & Brown (2000), mencionan que el VM exhibe un efecto inmunosupresor, determinado principalmente por una marcada linfopenia en el salmón del Atlántico. Otros parámetros sanguíneos afectados fueron los índices hematimétricos; Svobodova & Vykusova (1997) observaron una disminución del hematocrito, el volumen eritrocitario, y un aumento de la concentración de hemoglobina corpuscular media, reportada también por Saglan et al. (2003) en trucha arco iris. Finalmente., tanto Srivatava et al. (1995) en *Heteropneustes fossilis*, como Svobodova & Vykusova (1997) en carpa común, observaron la disminución de la concentración de proteínas totales plasmáticas; la que puede estar relacionada con el efecto hepatotóxico del VM.

Los efectos genotóxicos y las propiedades carcinogénicas de esta sustancia fueron revisadas por Gouranchat (2000). De la estructura molecular básica del VM podemos inferir que esta sustancia tendría efectos carcinogénicos similares a otros colorantes como el cristal violeta, debido a su alto grado de afinidad por el material genético (ADN) con el cual es capaz de integrarse alterando sus funciones y estructura, lo que le confiere propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Morin & Boucher, 2005). Al respecto Srivatava et al. (2004), mencionan una serie de estudios realizados en trucha arco iris hace más de 40 años en los que se reporta, además de la reducción de la fecundidad, la ocurrencia de mutagénesis, fracturas cromosómicas, efectos teratogénicos y carcinogénesis tras la exposición al VM; pero a luz de los conocimientos actuales se desconoce con precisión la existencia o la magnitud los efectos carcinogénicos y teratogénicos en peces. Más recientemente Meyer & Jorgenson (1983), establecieron que los niveles de anomalías observadas en ejemplares de trucha arco iris expuestas repetidas veces a concentraciones de 1 mg.L^{-1} de VM por periodos de una hora durante su desarrollo embrionario, estuvieron directamente relacionados con las dosis suministradas. Wörle (1995) también reportó la ocurrencia de aberraciones cromosómicas en ovas de peces de agua dulce tratados con VM.

Otro aspecto importante de la toxicidad del VM es su acumulación en los tejidos, ya que esta sustancia luego de ser metabolizada en el pez da origen al Verde de Leucomalaquita (VLM) y otros productos de degradación aún no identificados. La tasa de acumulación de VM como VLM en el pez dependerá de su contenido de grasa, puesto que se acumula en el tejido graso donde alcanza concentraciones mucho más elevadas que las dosis suministradas de VM, esto último debido a que su tasa de

eliminación es más lenta que su vida media (FAO, 2009; Culp et al., 1999).

Las ovas tratadas con VM también pueden ser capaces de acumular VM hasta estadios posteriores a la eclosión. Allen (1990) demostró que luego de exponer a hembras grávidas de *Oncorhynchus tshawytscha* a 1 ppm de VM, éste se acumula en ovas y persiste aún hasta el estadio larval. Estudios farmacocinéticos recientes, realizados por Alderman & Clifton-Hadley (1993) en trucha arco iris expuestas durante 40 minutos a una concentración de $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$, revelaron que la captación del VM fue menor a bajas temperaturas (8°C) que a 16°C , encontrándose concentraciones más elevadas en riñón, hígado, suero y músculo. Law (1994) demostró una rápida absorción del VM en alevines de trucha arco iris expuestos a 2 ppm durante una hora, encontrando que la concentración de VM en el homogenato del pez entero decreció con el tiempo, mientras que el VLM se incrementó luego de las 24 horas de exposición y se mantuvo estable por los siguientes siete días. Resultados similares fueron descritos por Plakas et al. (1996), quienes estudiaron la farmacocinética y el metabolismo del VM en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) luego de suminístrale una dosis de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ vía intravascular y en solución acuosa mediante baños de inmersión, encontrando que el VM y el VLM se distribuyeron ampliamente concentrándose principalmente en el tejido adiposo y tejidos excretores, y en menor proporción en el músculo y plasma. Las concentraciones totales de residuos de VM encontradas todos los tejidos, superaron la concentración inicial del baño de inmersión.

Aunque no existen estudios de absorción y distribución del VM en humanos, diversos autores han realizado estudios de carcinogenicidad en modelo murino. Los resultados que obtuvieron no permiten descartar la posibilidad de que el LMG induzca la formación de adenomas hepatocelulares en mamíferos. En base a esta evidencia el Expert Committee on Food Activities (JECFA) de la World Health Organization consideró inapropiado establecer una ingesta diaria admisible (ADI) para dicha sustancia; por lo tanto, el uso de MG para los animales destinados a la alimentación humana no puede ser respaldado (FAO, 2009).

Debido al potencial riesgo que implica el consumo de peces contaminados con VM, desde Enero del 2000 la Resolución (EEC) N° 2377/90 del Consejo de la Unión Europea, impuso una estricta prohibición sobre el uso del VM en peces destinados a la alimentación, sin restricción de su estadio de desarrollo. Posteriormente en

2002, se aprobó el decreto N° 2002/657/CE, en el que se establecen los métodos analíticos para la determinación de las sustancias no aceptadas o prohibidas, además se estableció que la concentración admisible de VM en especies de consumo humano sería de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

La implementación de un programa de monitoreo de residuos de VM en peces, realizado a través de muestreos al azar de peces de tallas comerciales, obtenidos de criaderos de la Republica Checa, puso en evidencia el hecho de que los peces muestreados estuvieron expuestos ilegal o accidentalmente al VM. Una situación similar ocurrió en otros países de la Unión Europea, tal como lo describen Mitrowska & Posyniak (2005), quienes revelaron el hallazgo de concentraciones de VM que superan los límites permitidos (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras de peces obtenidas en el 2002, provenientes de Irlanda, Francia, Austria y Reino Unido. En el 2003, el número de resultados positivos se redujo y la mayor parte de ellos provinieron del Reino Unido, Francia, Irlanda y Austria. Aunque en Estados Unidos el uso del VM en acuicultura fue explícitamente prohibido por la Food and Drug Administration, en este país no se encuentra implementado un sistema de monitoreo de residuos de VM o VLM en peces destinados a consumo humano, razón por la cual no se dispone de información sobre la presencia de estos residuos en peces (Culp & Beland, 1996).

La tasa de sobrevivencia en las ovas expuestas al VM presentada en la Figura 4.1 nos indica que, luego de 96 horas de exposición se alcanzan porcentajes medios de sobrevivencia (PMS) a una concentración de 1,5 mg.L^{-1} ; únicamente en concentraciones inferiores a los 0,5 mg.L^{-1} se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia semejantes a los del grupo Control. Meyer & Jorgenson (1983), observaron que se produce un marcado descenso en la supervivencia de los embriones de trucha arco iris luego de 38 h de exposición a altas dosis de VM. Wright (1976) observó que al duplicar la concentración de VM, la tasa mortalidad de las ovas y larvas de *Micropterus salmoides* aumenta más de 20 veces. En nuestros ensayos el aumento de la mortalidad no resultó ser tan drástico, fue de un 12,60 % al duplicar la concentración de 0,25 a 0,5 mg.L^{-1} , y de esta última concentración a 1 mg.L^{-1} la mortalidad resultó en 42,90 %; finalmente al duplicar la concentración de 1 a 2 mg.L^{-1} el aumento fue del 73,00 %.

Los valores de la $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ calculada con los distintos métodos (Tabla 4.28), resultaron ser semejantes para Probit y TSK (1,50 mg.L^{-1}); y ligeramente inferiores

(1,41 mg.L⁻¹) según el Modelo Biológico. Esta pequeña diferencia no resulta significativa ya que el valor obtenido con el Modelo Biológico se encuentra dentro de los Límites de Confianza al 95 % de los otros métodos, además cabe señalar que los valores de CL₅₀ obtenidos se correlacionan con el PMS. La superficie de respuesta para VM, diagramada con los datos obtenidos utilizando el Modelo Biológico (Figura 4.11) nos permite observar una repuesta mucho más amplia, ya que el método de los Probits no permitió la obtención de las CL₅₀ luego de 24 horas de exposición (Figura 4.10).

A pesar de que diversos autores han evaluado la toxicidad aguda del VM para una gran variedad de peces, no todos han tomando como parámetro la CL₅₀, ni tampoco condiciones estandarizadas de ensayo; por esto las comparaciones entre resultados obtenidos en otros estudios debe ser considerados a modo referencial. En el Apéndice C se presenta una Tabla que contiene información adicional extraída de la base de datos sobre pesticidas de la Pesticide Action Network (PAN), que condensa información proporcionada por investigadores que evaluaron la CL₅₀ de VM para diversas especies de peces.

La CL₁₀ - 96h calculadas con el Probit y el Modelo Biológico resultaron en 0,77 y 0,74 mg.L⁻¹ respectivamente, mientras que la NEC (0,51 mg.L⁻¹) resultó ser menor que las CL₁₀-96 h y la NOEC (1,50 mg.L⁻¹) superó incluso a la CL₅₀. Esto se debe, como explicamos anteriormente, a que el cálculo de la NOEC se basa en un test de hipótesis que determina la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el grupo Control. En este caso el valor de la NOEC es cercano a de la CL₅₀ debido el porcentaje de sobrevivencia del grupo Control es semejante al de las ovas expuestas a bajas concentraciones de VM. Si establecemos una relación entre la CL₅₀/NEC obtendremos un valor indicativo del margen de seguridad de cualquier sustancia; donde valores cercanos a 1 indican escasos márgenes de seguridad. Esto quiere decir que en el caso de utilizar esta sustancia se deberán extremar las precauciones al momento de la dosificación, ya que pequeños errores podrán conducir a un importante aumento de la mortalidad. Para el VM el coeficiente CL₅₀/NEC (1,41/0,51) resultó en 2,76; por lo que tenemos un margen de seguridad aceptable para esta sustancia. Finalmente se obtuvieron tasas de eclosión óptimas en las ovas expuestas a concentraciones inferiores a los 0,75 mg.L⁻¹; estos resultados se correlacionan con los valores de CL₁₀ y NEC.

4.4.2. Cloruro de Sodio

El Cloruro de Sodio es un compuesto iónico formado por un catión Sodio (Na^+) y un anión Cloruro (Cl^-). Es sólido, incoloro, estable, hidrosoluble e higroscópico, es obtenido de minas donde se forma por precipitación de sales dando origen a su forma cristalizada o halita, o mediante la evaporación del agua de mar u otros cuerpos de agua con elevada salinidad.

En la naturaleza, la salinidad es uno de los factores determinantes de la distribución de los organismos ya que la capacidad osmorregulatoria, específica de cada especie, determinará su tolerancia a la salinidad (Holliday, 1969; Swanson, 1998). De las especies encontradas en cuerpos de agua de la Argentina con elevadas salinidades, tenemos ocupando el primer lugar a *Jenynsia multidentata*, seguida de *O. bonariensis* y *Australoheros-Cichlasoma facetum* (Gómez & Ferriz, 1998). Por ende, el pejerrey es una especie eurihalina, tal como lo mencionan Mancini & Grosman (2009) en una detallada caracterización de los ambientes naturales en los que comúnmente es capturado. Los cuerpos de agua en los que *O. bonariensis* suele ser capturado presentan por lo general un contenido de sales con intervalos amplios y heterogéneos, cuyas variaciones se deben principalmente a: condiciones climáticas, disminución de la circulación, intercambio escaso con aguas adyacentes y concentración por disminución del volumen de agua. El contenido de sales en estas lagunas es variable y presenta grandes oscilaciones encontrándose ambientes que pueden ser oligohalinos ($0,5$ a 5 g.L^{-1}); hasta hipersalinos con contenidos de sales superiores a los 40 g.L^{-1} .

A su vez, en un mismo cuerpo de agua se pueden experimentar variaciones estacionales en el contenido de sales disueltas. Mancini & Grosman (2009) recopilaron los valores medios de salinidad registrados en lagunas habitadas por el pejerrey; así tenemos que la salinidad media de Cochicó fue de $5,7 \text{ g. L}^{-1}$, en la laguna Del Venado $8,8 \text{ g.L}^{-1}$, en La Salada de Pehuajó $8,4 \text{ g.L}^{-1}$, en el complejo La Brava - La Salada $7,2 \text{ g.L}^{-1}$, en Los Charos $10,4 \text{ g.L}^{-1}$ y en Chasicó, que a principios del siglo pasado superaba los 100 g.L^{-1} , en la actualidad se alcanzan salinidades de $16,5$ a 26 g.L^{-1} , hecho que posibilitó la invasión y establecimiento del pejerrey (Remes-Lenicov et al., 2004).

El Cloruro de Sodio es una sustancia ampliamente utilizada en la acuicultura, además de ser un producto económico, de fácil acceso y seguro, posee un amplio

espectro de acciones terapéuticas, que incluye: el control de enfermedades parasitarias, bacterianas y fúngicas, la regulación del estrés osmótico, la disminución de la metahemoglobinemia; también actúa mitigando la toxicidad del Amonio o Nitrito en sistemas de cultivo y de la lluvia ácida en lagos, promueve la absorción de otras sustancias mediante infiltración hiperosmótica, potencia la acción antiparasitaria de la Formalina y mitiga sus efectos colaterales (Francis-Floyd, 1995; Noga, 1999; Treves & Brown, 2000). El Cloruro de Sodio no ejerce una acción farmacológica sobre el pez; actúa elevando la presión osmótica del medio; al reducir el gradiente osmótico entre el agua y el pez se reduce el flujo de agua hacia el pez, por lo tanto limita la absorción de compuestos hidrosolubles como el Amonio, Nitrito y Formalina presentes en el medio. Las concentraciones del Cloruro de Sodio dependerán del uso al que esté destinado, la duración de la exposición y de la tolerancia de la especie a tratar (Francis-Floyd, 1995), por lo que su eficacia en el tratamiento de las parasitosis o micosis externas dependerá de la tolerancia de los peces al aumento de la presión osmótica extrema.

Existen diversas formas de incrementar la salinidad del agua, una de ellas es mediante el agregado de ClNa puro; este procedimiento resulta antieconómico debido a que para elevar la salinidad niveles requeridos para tratamiento, son necesarias grandes cantidades de ClNa. También se puede emplear sal en su estado natural, la que puede contener impurezas pero éstas raramente alcanzan niveles tóxicos para los peces. Otra forma de aumentar la salinidad es mediante el agregado de sal marina o la dilución de agua de mar; en este caso es importante considerar que si bien el agua de mar está compuesta predominante por Cloruro de Sodio, contiene también otras sales, lo que dificulta la determinación de las concentraciones finales de ClNa de manera precisa, puesto que la conductividad no podrá ser usada como un fiel reflejo de la concentración de ClNa. Finalmente, es recomendable evitar el uso de sal para consumo humano ya que ésta suele ser suplementada con diversos compuestos que son tóxicos para los peces en las concentraciones en las que habitualmente se encuentra en la sal de consumo humano. El mas importante de éstos es el Ioduro de Sodio, aditivo de valor nutricional para los seres humanos (Treves & Brown, 2000); también el Ferrocianuro de Sodio, este es un agente antiapelmazante que al ser expuesto a la luz solar forma Ácido Cianhídrico, altamente tóxico para los peces (Noga, 1999).

En la Figura 4.2 se presenta la tasa de sobrevivencia de las ovas expuestas a ClNa; los PMS luego de 96 horas de exposición se ubican próximos a los 35 g.L⁻¹, concentración comparable con la salinidad del agua de mar. Estos resultados nos indican que el alto grado de tolerancia del pejerrey a la salinidad está presente desde etapas tempranas de su desarrollo. Al respecto Holliday (1969) menciona que la respuesta a la salinidad durante la etapa más susceptible del desarrollo determinará la supervivencia de los embriones hasta la eclosión. Diversos autores coinciden en señalar como las etapas más susceptibles del desarrollo embrionario a la gastrulación y la eclosión (Battle, 1930; Mc Mynn & Hoar, 1953; Holliday, 1963; Alderice & Forrester, 1968; Holliday, 1969; May, 1975). Los efectos del Cloruro de Sodio durante la gastrulación de *O. bonariensis* no pudieron ser observados debido a que nuestros experimentos fueron realizados con embriones en organogénesis, pero sí se pudo corroborar que la eclosión es un suceso muy sensible al aumento de la salinidad en el entorno. Sin embargo, Sampaio (1992) obtuvo una alta tasa de mortalidad durante la gastrulación de *O. argentiniensis* al exponerlo a una salinidad de 5 g.L⁻¹. Como se mencionó anteriormente el pejerrey *Odontesthes bonariensis* ha demostrado ser capaz de habitar ambientes naturales con elevadas concentraciones salinas. Gómez et al. (2007) y Mancini & Grosman (2009), sostienen que el pejerrey ante determinadas condiciones de adaptación previa, es capaz de tolerar salinidades superiores a la del agua de mar.

Por otro lado, en los ensayos realizados se alcanzaron valores de sobrevivencia muy cercanos a los del grupo Control (86,70 %) en concentraciones de hasta 15 g.L⁻¹. Estos hallazgos se relacionan con la tolerancia del pejerrey observada en ambientes naturales con salinidades promedio cercanas a los 10 g.L⁻¹. Hallazgos similares fueron reportados por Sampaio & Pholnor (1996) en *O. humensis*, quienes además recomiendan el uso de agua salobre (5 al 10 g.L⁻¹) luego del primer día post fecundación hasta que se haya completado la absorción del saco vitelino. Pholnor & Sampaio (1992) estudiaron el efecto de la salinidad a niveles entre 5 - 35 ‰ sobre la sobrevivencia y el crecimiento de *O. argentiniensis*, encontrando porcentajes de sobrevivencia promedio en los tratamientos del 96 %, y una mortalidad del 100 % en las larvas expuestas a agua corriente; además encontraron que el incremento de la salinidad, entre los distintos tratamientos, no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento. Finalmente concluyeron que la salinidad no es un factor limitante

para el crecimiento y desarrollo de esta especie. Otros Atherínidos muestran alguna preferencia por la salinidad; tal es el caso de *Menidia beryllina*, que exhibe porcentajes de sobrevivencia y crecimiento óptimos en 15 ‰, mientras que en *Menida peninsulae*, éstos se observaron hasta en 30 ‰ (Phonlor & Sampaio, 1992).

Algunos autores mencionan que el incremento de la salinidad puede inhibir el curso normal de procesos importantes en el desarrollo embrionario, tales como el endurecimiento del corion, en *Oncorhynchus sp.*, y la formación de espacio perivitelino, realizada por imbibición de agua a través del corion, en algunas especies de agua dulce. También es capaz de provocar la disminución de la flotabilidad y del tamaño de las ovas y del saco vitelino (Shi et al., 2008). La severidad de estos efectos es modulada por la capacidad osmorregulatoria de cada especie. Así por ejemplo, las ovas de *Pleuronectes platessa* adquieren capacidad osmorregulatoria inmediatamente después de la fertilización; en cambio en *Clupea arengus* esta capacidad se observa después del cierre del blastoporo. Weisbart (1968) encontró que la capacidad de osmorregulación en la etapa embrionaria en *O. gorbuscha* y *O. keta* fue mayor que para *O. kisuth*, *O. tshawytscha* y *O. nerka*, otorgándoles una mayor capacidad de supervivencia en aguas marinas.

Los valores de CL₅₀-96h calculados con los distintos métodos (Tabla 4.28), presentados en orden creciente resultaron en: 33,00 g.L⁻¹ según el Modelo Biológico, 34,80 g.L⁻¹ con el test no paramétrico de TSK y 35,00 g.L⁻¹ con el método de los Probits; a pesar de que todos estos valores exhiben pequeñas diferencias entre sí, todos se encontraron dentro de los límites de Confianza del 95 % y/o desvió estándar respectivos. Además cabe señalar que los porcentajes medios de sobrevivencia (PMS) se encuentran ligeramente por encima de las CL₅₀ obtenidas. Estos hallazgos se correlacionan con los obtenidos por Gómez & Ferriz (2001), quienes establecieron la CL₅₀-96h de pejerrey en 32,80 g.L⁻¹.

Si bien, el ClNa ha sido considerado por la US EPA como una sustancia que no exhibe toxicidad aguda en peces, diversos autores han determinado parámetros toxicológicos para este compuesto en varias especies de peces. La base de datos de la PAN brinda un listado de CL₅₀ de ClNa para diversas especies de peces, el que puede consultarse en el Apéndice C. Esta información disponible sólo puede ser utilizada de modo referencial ya que no se trata de especies filogenéticamente emparentadas con el pejerrey y además los ensayos no necesariamente fueron realizados en condiciones

semejantes a las presentadas en este trabajo.

En las Figuras 4.12 y 4.13 podemos observar que existen diferencias entre la superficie de respuesta obtenida con los datos obtenidos con el método de los Probits (Figura 4.12) y el Modelo Biológico (Figura 4.13). Estas diferencias se deben principalmente a que en este último se alcanzan valores de letalidad más altos al cabo de 24h que en el Probit. Pero en términos generales en ambos casos se observa que el efecto de tiempo de exposición es más notorio en porcentajes de letalidad superiores al 50 %.

Los efectos adversos de ClNa pueden verse influenciados tanto por las condiciones físico-químicas del agua (pH, temperatura, dureza, etc.) así como por el estadio de desarrollo de los organismos expuestos y su capacidad osmorregulatoria (Kane et al., 1990; Grizzle & Mauldin, 1995). A pesar de las cualidades beneficiosas que provee la adición de ClNa al agua durante el transporte y cosecha de peces de agua dulce, algunas especies pueden verse severamente afectadas por el aumento de la cantidad de Na^+ en su entorno, hecho que ocurre en aguas con poco contenido de sales disueltas. Tal es así que, una concentración de 5 g ClNa.L^{-1} , inofensiva para larvas de la lubina estriada (*Morone saxatilis*), puede ser letal para juveniles en agua blanda con un contenido de CaCO_3 de 30 mg.L^{-1} (Grizzle & Mauldin, 1994). Una situación similar fue observada en otras especies como *Sciaenops ocellatus* (Wurts & Stickney, 1989) y el bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Criswell, 1978). El incremento de la dureza y la concentración de Ca^{+2} también disminuyen la toxicidad de los metales pesados (Miller & Mackay, 1980; Sprague, 1985) y del amonio ionizado (Weirich et al., 1993). Carriquiriborde (2005) encontró que la dureza del agua tuvo un efecto significativo sobre la toxicidad del Cadmio II, en juveniles de pejerrey *O. bonariensis*, observando que al reducir 8,13 veces la dureza del agua (255 a $31,4 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$) se produjo una disminución de similares proporciones (8,14 veces) en los valores de $\text{CL}_{50-96\text{h}}$. Si bien se desconoce hasta que punto la dureza del agua tiene algún efecto sobre la sobrevivencia del pejerrey al ser expuesto a elevados niveles de salinidad; en los ensayos realizados se utilizó agua dura reconstituida ($120-160 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$). El tenor de Ca^{+2} como carbonato del agua utilizada para los ensayos supera los valores recomendados por Grizzle & Mauldin (1994) ($100 \text{ mgCa}^{2+}.\text{L}^{-1}$) como cantidad mínima de calcio requerida para mitigar la toxicidad del ClNa en juveniles de *Morone saxatilis*.

Se desconoce la naturaleza de los cambios fisiológicos que llevan a la muerte, tanto de *M. saxatilis* como de otras especies de agua dulce, al ser sometidas al incremento de la concentración de ClNa en aguas con bajas concentraciones de Ca^{+2} . Sin embargo, se ha observado que los peces afectados sufren convulsiones y mueren con la boca y el opérculo totalmente abiertos (Grizzle & Mauldin 1994). El incremento de la toxicidad del ClNa en ambientes con bajas concentraciones de Ca^{+2} podría estar relacionado con el aumento de la permeabilidad de las branquias al Na^{+} , H^{+} y Cl^{-} . Grizzle & Mauldin (1995) sugieren la existencia de una respuesta fisiológica diferente entre las larvas con saco vitelino y los juveniles más viejos, ante el incremento de Na^{+2} . De hecho, es probable que el tegumento y la membrana del saco vitelino sean los principales sitios de osmorregulación durante la etapa embrionaria y larval (Varsamos et al., 2005). Kosztowny et al. (2008) estudiaron los cambios en la actividad Na^{+} , K^{+} -ATPasa en embriones y larvas de *Tilapia mozambica* sometidas a un incremento de la salinidad y observaron abundantes células del cloro y una mayor actividad Na^{+} , K^{+} -ATPasa en la membrana del saco vitelino; también encontraron que esta actividad enzimática exacerbada disminuyó al avanzar el desarrollo.

En individuos adultos las células del cloro, también conocidas como células ricas en mitocondrias, se encuentran principalmente en las branquias y son las encargadas de regular el flujo de iones entre el organismo y su entorno. En condiciones de estrés osmótico, las principales respuestas adaptativas del epitelio branquial son la hiperplasia y la hipertrófia, ambas destinadas a aumentar la superficie de intercambio iónico para compensar el desbalance osmótico (Tintos Gómez, 1999). Estos mecanismos son reversibles; al retornar a las condiciones normales luego de pocas horas el epitelio branquial recupera su volumen normal. Sin embargo, las células del cloro sufren alteraciones morfológicas ultra estructurales que tardan mucho más tiempo en ser revertidas (Holliday, 1969).

En cuanto a los parámetros toxicológicos subletales obtenidos tenemos que la NOEC ($30,00 \text{ g.L}^{-1}$) resultó ser más alta que la $\text{CL}_{10-96\text{h}}$ calculada con el Modelo Biológico ($29,30 \text{ g.L}^{-1}$) y la NEC ($28,68 \text{ g.L}^{-1}$) y ésta a su vez mayor que la $\text{CL}_{10-96\text{h}}$ calculada con el Probit ($27,25 \text{ g.L}^{-1}$). Aunque resulta llamativo que la CL_{10} Probit sea inferior a la NEC del Modelo Biológico, estas diferencias no son significativas y podríamos considerarlas semejantes, ya que se encuentran dentro de los respectivos intervalos de confianza al 95 %. Los valores obtenidos para los parámetros subletales

(NOEC, NEC, CL_{10}), se encuentran muy por encima de la concentración en la que se obtuvieron porcentajes de eclosión comparables a los del grupo Control. Al respecto es necesario considerar que tanto la NOEC, NEC o la CL_{10} son parámetros toxicológicos para el estadio embrionario y no consideran los efectos que tiene la eclosión sobre los organismos.

A pesar de que a una concentración de 25 g.L^{-1} se registraron elevados porcentajes de sobrevivencia (71,70 %), la tasa de eclosión obtenida a esta concentración fue de 3,33 %; únicamente en concentraciones inferiores a los 20 mg.L^{-1} la tasa de eclosión se aproximó a la obtenida en el grupo Control (76,67 %); superando este valor en los individuos expuestos a 7,5 (80,00 %) y 10 mg.L^{-1} (83,33 %). Resultados similares fueron registrados por Sampaio & Pholnor (1996) en ovas de *O. humensis*, quienes obtuvieron porcentajes de eclosión de 86, 94 y 100 % en concentraciones salinas de 2, 4 y 10 g.L^{-1} , respectivamente; tanto en el grupo Control como en el grupo expuesto a 20 g.L^{-1} la tasa de eclosión no sobrepasó el 40 %, y ésto fue atribuido a infección fúngica en el control y a la toxicidad del ClNa en las ovas expuestas a 20 g.L^{-1} . Es importante destacar que a pesar de las semejanzas con los resultados obtenidos, en los ensayos realizados por Sampaio & Pholnor (1996) se empleó agua de mar y temperaturas de incubación de $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Generalmente, el agua marina puede ser menos tóxica que su concentración equivalente de ClNa debido a la elevada concentración de Ca^{2+} presente en ésta. Por lo tanto los resultados obtenidos por Sampaio & Pholnor (1996) en ovas de *O. humensis* expuestas a diferentes diluciones de agua de mar e incubadas a 20°C , no serían directamente comparables con los resultados presentados en este estudio. No sólo por haber utilizado diferentes medios para aumentar la salinidad, sino también porque estos se realizaron a diferentes temperaturas de incubación; ya que tal como indica Heuts (1947, 1956), la temperatura de incubación podría modificar profundamente el efecto de la salinidad sobre el desarrollo y la eclosión. Al respecto, Alderice & Forrester (1968) demostraron que la salinidad y la temperatura actúan de manera conjunta produciendo una tasa de desarrollo más rápida en *Parophrys vetulus*.

El efecto de la salinidad sobre la tasa de eclosión de peces marinos y dulceacuícolas, ha sido estudiado por diversos autores. Holliday (1969) recopiló información referida a los rangos de salinidad en los que se encontró eclosión exitosa; el valor más alto fue el obtenido por el extremófilo *Cyprinodon macularius*, capaz de eclosio-

nar en salinidades de hasta 70 ‰. En las especies marinas *Enchelyopus cimbrius*, *Clupea harengus*, *Pleuronectes platessa* y *Gadus callarias* la salinidad más elevada en la que se observó eclosión fue de 60 ‰, y de hasta 50 ‰ en *Pleuronectes flesus*. También es sorprendente encontrar que especies que desovan en ambientes dulceacuícolas, como *Abramis brama*, *Luciperca luciperca* y *Caspiolosa volgensis* eclosionaron en salinidades del 10 al 20 ‰ y que los porcentajes de supervivencia y eclosión aumentaron en salinidades entre 2,5 a 5 ‰ con respecto a los obtenidos en agua dulce.

Es claro que la salinidad, muchas veces en combinación con otros factores, marca efectos reversibles e irreversibles en la estructura de las larvas de teleósteos. La mayoría de estos cambios son adaptaciones y fueron mencionadas en párrafos anteriores, pero en algunos casos se trata de anormalidades groseras resultantes de la influencia de la salinidad en el proceso del desarrollo embrionario. Holliday (1969) menciona la presencia de diferencias estructurales en larvas, tales como: aumento de la longitud, peso, variaciones en la apariencia del saco vitelino, todas ellas desencadenadas por la exposición a salinidad durante su desarrollo embrionario. Existen otros reportes sobre la influencia de la salinidad en la estructura de las larvas de teleósteos; Alderice & Forrester (1968) y Kinne & Kinne (1962), reportaron la existencia de diferencias en el tamaño de las larvas relacionadas con la salinidad. Battle (1930) reportó deformidades de la cola y de regiones cardíacas en *Enchelyophus cimbrius*, que eclosionaron en salinidades de hasta 70 g.L⁻¹. Kryzhanvsky (1956) observó anormalidades de la región cardíaca, la región ótica, saco vitelino, canal alimentario, y órganos asociados como el hígado, en larvas de arenque del báltico *Clupea harengus membras* expuestos a salinidades de hasta 25 ‰ durante su desarrollo embrionario. En nuestros ensayos no se profundizó la investigación al respecto, sin embargo es un tema que podría ser abordado en estudios posteriores.

4.4.3. Formaldehído

La Formalina es una solución saturada de Formaldehído en agua, que a temperatura ambiente contiene 34-38 % p/v de Formaldehído. Para su utilización en acuicultura usualmente es suplementada con 12 % de Metanol con el objeto de retardar la polimerización del Formaldehído, la que ocurre fácilmente al ser expuesto a la luz solar a bajas temperaturas, dando lugar a la formación del paraldehído,

compuesto altamente tóxico para los peces (Treves & Brown, 2000).

Ésta es una de las pocas sustancias aprobadas para uso terapéutico en Alemania y otros países miembros de la Unión Europea (Schlotfeld, 1998); también en USA es el único fungicida disponible para aplicación en el cultivo de peces (Marking et al., 1994; Waterstrat & Marking, 1995; Rach et al., 1997b; Treves & Brown, 2000; Barnes et al., 2005). La Formalina es utilizada en acuicultura como agente antiparasitario contra protozoos de la piel y branquias como: *Chilidonella* spp., *Epystilis* spp., *Ichthyobodo* necator, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Scyphidia* spp. y *Trichodina* spp. Es utilizada también en el tratamiento de infecciones por monógenesos como *Dactylogyrus* spp., *Gyrodactylus* spp. y *Cleidodiscus* spp. También posee una amplia actividad antibacteriana siendo usado principalmente para el tratamiento de la enfermedad bacteriana de las branquias, causada por la acción combinada de *Flavobacterium branchiophilum* y protozoos.

Debido a que la Formalina se utiliza cada vez más para prevenir las infecciones ocasionadas por hongos y eliminar parásitos externos en criaderos de peces, es recomendable que la composición físico-química del agua sea monitoreada, ya que tanto su capacidad terapéutica como su toxicidad pueden verse influenciadas por parámetros físico-químicos del agua tales como la salinidad, pH y dureza. Noga (1999) y Piper & Smith, (1973) afirman que el efecto tóxico de la Formalina se incrementa proporcionalmente a la temperatura. Anónimos (2002) y Noga (1999) mencionan que su toxicidad es mayor en aguas blandas, y que además existe una relación inversamente proporcional entre la toxicidad del Formaldehído y el pH. Meinlet et al. (2005) estudiaron el efecto de la concentración de Ca^{+2} y a la presencia de materia orgánica sobre la toxicidad del Formaldehído, en embriones y larvas de *Danio rerio* bajo condiciones de laboratorio, encontrando que la toxicidad de esta sustancia se ve incrementada en presencia de iones Calcio y que también puede ser alterada por la presencia de materia orgánica. Estos autores sugieren que el Calcio facilita el transporte de Formaldehído a través de la membrana del embrión mediante la formación de canales iónicos. En contraposición los estudios de Piper & Smith (1973) y Chinabut et al. (1988) no encontraron ninguna influencia de la dureza o el pH del agua sobre la toxicidad de Formaldehído para los peces.

En los ensayos realizados encontramos que elevadas concentraciones de Formalina mostraron un efecto letal agudo sobre las ovas de pejerrey, como podemos ver

en la Figura 4.3; a una concentración de $1600 \mu\text{L.L}^{-1}$ se alcanzó un 85,00 % de mortalidad en tan sólo 24 h; mientras que en $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$ la mortalidad alcanzada al cabo de 48 h de exposición fue cercana al 80,00 %. El PMS luego de 96 h de exposición se ubicó entre los 600 y $800 \mu\text{L.L}^{-1}$; se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia cercanos a los del grupo Control (94,40 %) en 400, 300 y $150 \mu\text{L.L}^{-1}$. En esta última concentración el porcentaje de sobrevivencia (97,90 %) superó al obtenido en el Control.

Waterstrat & Marking (1995) mencionan que si bien concentraciones de Formalina de 500 - 1000 mg.L^{-1} provocan un incremento, dosis dependiente, en la mortalidad de las ovas de salmón chinook, la tasa de sobrevivencia obtenida en ambos tratamientos supera a las del grupo control sin tratamiento. En otros estudios realizados para evaluar la capacidad de la Formalina de mejorar la tasa de eclosión de la trucha marrón (*Salmo trutta*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se obtuvieron altos porcentajes de sobrevivencia ($\approx 90\%$), tanto en los grupos tratados con Formalina como en los controles sin tratamiento, no habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos (Barnes et al., 2000b; Barnes et al., 2001). Los autores atribuyeron este suceso a dos factores: la óptima calidad de las ovas que les provee una resistencia natural a las infecciones y la ausencia de detritos orgánicos en el agua (Barnes et al., 1999; Barnes et al., 2000a). Por el contrario Barnes et al. (1997), encontraron que el tratamiento diario durante 15 minutos con 1667 mg.L^{-1} de Formalina, provoca un incremento estadísticamente significativo en la tasa de sobrevivencia de ovas de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), pre y post eclosión; en estudios posteriores en esta misma especie, Barnes et al. (2003) obtuvieron resultados similares con tasas de eclosión en los grupos tratados con Formalina de 90,52 a 93,17 %, ambas significativamente superiores a las obtenidas en el Control (86,84 - 88,75 %) en los que la única medida profiláctica fue la eliminación manual de las ovas muertas. Barnes et al. (1997-2003) y otros autores (Subasinghe & Sommerville, 1985; Marking et al., 1994; Howe et al., 1999), proponen que el aumento de la tasa de sobrevivencia en los tratamientos con microbicidas como el Formaldehído puede deberse al efecto fungicida y/o bactericida de estas sustancias. Según los estudios de Barnes (1999) y Barnes (2000a), la carga bacteriana en ovas se incrementa la acercarse la eclosión, momento en el que el mayor número de bacterias no se encuentra distribuido en la columna de agua sino que

está adherido a la membrana externa de las ovas. Barker et al. (1991) demostraron que *Pseudomonas fluorescens* es la principal bacteria implicada en la mortalidad de ovas de salmónidos. Al analizar la flora bacteriana asociada a las ovas del salmón del atlántico, Barnes et al. (2005) identificaron a *Flavobacterium columnare*, *Sphingobacterium* sp. y *Pseudomonas* sp.; también observaron que en las ovas no tratadas con Formalina el recuento de bacterias aumentó con el tiempo alcanzándose una mortalidad mayor que en las ovas tratadas.

Al calcular la CL₅₀ 96 h se obtuvieron valores muy similares con los tres métodos utilizados (Tabla 4.28), encontrándose todos ellos dentro de los límites de confianza. Según el método de los Probits la CL₅₀ 96 resultó en 681,40 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 652,10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ con el método TSK y 678,00 $\mu\text{L.L}^{-1}$ según el Modelo Biológico. Estas semejanzas también se vieron reflejadas al construir las superficies de respuesta (Figuras 4.14 y 4.15) en las que en ambos casos se obtuvo un amplio rango de respuesta con valores mínimos y máximos comparables.

La toxicidad del Formaldehído ha sido evaluada en diversos modelos biológicos; además de sus efectos letales se ha demostrado que esta sustancia actúa en concentraciones subletales alterando la capacidad fotosintética de las algas verdes y azules como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Anacystis aeruginosa* *Scenedesmus quadricauda* (Tišler & Zagorc-Konèan, 1997; Camacho, 2004); también existen diversos estudios sobre su efecto sobre el cladócero *Daphnia magna* (Bringmann & Khun, 1977; Lagerspetz et al., 1993; Camacho, 2004). La toxicidad en moluscos bivalvos de los géneros *Corbicula* y *Pinctada* y gasterópodos como *Helisoma* spp. (almejas de agua dulce) fueron estudiadas por Bills et al. (1977b), Chandler & Marking (1979) y Takayanagi et al. (2000). Encontramos una vasta información de la toxicidad de esta sustancia en peces, enfocada principalmente a su utilización como agente profiláctico en acuicultura. Sin embargo, los estudios realizados con la finalidad de evaluar su aplicabilidad como agente terapéutico, no se rigen por criterios puramente toxicológicos puesto que las metodologías aplicadas no son estandarizadas. Además en muchos casos se considera a la eclosión y no la sobrevivencia como el punto final; y por último, el inconveniente que reviste mayor importancia, es que soluciones utilizadas suelen ser normalmente designadas por su contenido de Formalina y no por la cantidad de Formaldehído (Treves & Brown, 2000).

La CL₅₀ 96 h de Formaldehído para ovas de pejerrey ($\approx 670 \text{ mg.L}^{-1}$) indica que

esta especie exhibe una importante tolerancia al Formaldehído durante su desarrollo embrionario, tolerando concentraciones superiores a las reportadas por Howe et al. (1995) para ovas de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* $121 \mu\text{L}^{-1}$ (Límites de Confianza: 101-144) y del bagre de canal *Ictalurus punctatus* $54,0 \mu\text{L}^{-1}$ (LC: 44,1-66,0). La CL_{50} de Formalina reportada por Shafiezhadeh et al. (2006) para ovas de esturión persa resultó más elevada que la obtenida en nuestros ensayos (1900 mg.L^{-1}). Rach et al. (1997a) afirmaron que existen diferencias significativas en la sensibilidad a la Formalina en diferentes especies de peces. Esta información es confirmada por los hallazgos reportados por Theron et al. (1991) quienes investigaron la tolerancia de las ovas de carpa común (*Cyprinus carpio*) y del bagre africano (*Clarias gariepinus*), evaluando el tiempo óptimo de exposición a una concentración de 2000 mg.L^{-1} de Formalina y encontraron que las ovas de carpa fueron capaces de tolerar inmersiones de hasta 30 minutos, mientras que las ovas del bagre africano exhibieron mortalidades significativamente mayores a las del Control luego de ser expuestos durante 5 minutos a la Formalina.

Muchos trabajos indican que el Formaldehído exhibe una toxicidad relativamente baja para peces de agua dulce con valores de CL_{50} 96 h que varían entre 26 a 1020 mg.L^{-1} (Farjer-Avila et al., 2003). Esta amplitud del rango puede estar influenciada por la sensibilidad que diversas especies de peces presentan a un determinado xenobiótico. Así por ejemplo, la CL_{50} 96 h para la anguila americana es de 81 mg.L^{-1} (Hinton & Eversols, 1979), mientras que para alevines del salmón del atlántico resultó en 69 mg.L^{-1} (Bills et al., 1977b). Como mencionamos anteriormente, la composición química del agua influye en la toxicidad de esta sustancia, tal como lo demostraron Reardon & Harrell (1990) quienes comunicaron que *Morone saxatilis* exhibe una menor tolerancia a la Formalina con una CL_{50} 96 h de $10,84 \text{ mg.L}^{-1}$, pero al incrementar la salinidad hasta 11-13 %, observaron que también se incrementaba la tolerancia al Formaldehído. Así mismo, el tiempo de exposición es otra variable a tener en cuenta. Farjer-Avila et al. (2003) estudiaron la toxicidad de la Formalina en juveniles del pez globo diana, encontrando que la CL_{50} osciló entre 1095 y 79 mg.L^{-1} durante exposiciones de 30 minutos y 72 horas respectivamente. En el Apéndice C presentamos a modo comparativo una Tabla, extraída de la base de datos de la PAN, que contiene un listado de valores de CL_{50} de Formalina obtenidos a diferentes tiempos de exposición, metodologías de ensayo y en diversas

especies.

Las concentraciones obtenidas para los parámetros subletales oscilaron entre 400 - 533 $\mu\text{L.L}^{-1}$, según esta secuencia en orden creciente: NOEC (400,00 $\mu\text{L.L}^{-1}$) < CL₁₀ Probit (453,70 $\mu\text{L.L}^{-1}$) < NEC (530,00 $\mu\text{L.L}^{-1}$) < CL₁₀ del Modelo Biológico (533,00 $\mu\text{L.L}^{-1}$). En el límite superior tenemos a la CL₁₀ y la NEC del Modelo Biológico cuyos valores son muy cercanos a la CL₅₀ 96 h (670,5 $\mu\text{L.L}^{-1}$), por lo cual podemos afirmar que estas concentraciones no ofrecen márgenes de seguridad adecuados para su utilización ya que pequeños errores en los cálculos podrían llevar a un notable aumento de la mortalidad en ovas de pejerrey. Además, podemos señalar que en el grupo expuesto a la concentración correspondiente a la NOEC se obtuvo un bajo porcentaje de eclosión (11,90 %); la Formalina mejoró el porcentaje de eclosión únicamente a una concentración de 150 $\mu\text{L.L}^{-1}$.

Desconocemos cuál pueda ser la razón por la cual la eclosión fue inhibida en concentraciones inferiores a las subletales. Existe cierta controversia respecto al efecto del Formaldehído sobre la estructura de la membrana y el corion de las ovas; al respecto, Meinlet et al. (2005) mencionan que el Formaldehído actuaría desnaturalizando y endureciendo las proteínas que componen la membrana, lo que puede causar alteraciones en la estructura del corion dificultado la eclosión. En contraposición, Stephenson et al. (2005) encontraron que la estructura de ovas de *Oncorhynchus tshawytschata* tratadas con 1667 mg.L⁻¹ de Formalina no presentaron alteraciones ni diferencias en la altura y ancho del canal del poro, altura de la capa basal y número de poros. La eclosión también podría verse afectada si el Formadehído actuara alterando la estructura protéica de la corionasa, enzima que cumple un importante rol durante el proceso de eclosión (Meinlet et al., 2005).

Nuestros resultados difieren de los obtenidos por diversos autores, muchos de los cuales encontraron que el Formaldehído mejora notablemente la tasa de eclosión de distintas especies de interés económico. Entre los hallazgos más resaltantes se encuentra el obtenido por Rach et al. (1997a) en ovas de *Stizostedion vitreum*, *Catostomus commersoni*, carpa común (*Cyprinus carpio*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) y esturión de lago (*Acipenser fulvescens*). Estos autores encontraron que el uso de Formalina como tratamiento antifúngico, en concentraciones de hasta 1500 $\mu\text{L.L}^{-1}$, provee un adecuado margen de seguridad para las ovas de dichas especies, mejorando su tasa de eclosión. Khodabande & Abatí (2006), también encontraron

que el uso de concentraciones entre 100 y 400 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de Formalina durante la incubación de ovas de *Cyprinus carpio*, mejora progresiva y significativamente la tasa de eclosión, con valores de 39,2 - 91,8 %, ambos superiores a los obtenidos en el Control sin tratamiento (8,2 %). Cabe señalar que la principal causa de mortalidad en las ovas no tratadas (Control) en muchos de los estudios a los que hacemos referencia fue la infección fúngica, esto no fue observado durante nuestros ensayos ya que los embriones fueron seleccionados cuidadosamente antes de iniciar los ensayos verificando mediante la observación al microscopio la ausencia de micosis.

Khodabandeh & Abatí (2006) afirman que la concentración óptima para el tratamiento de ovas de *Cyprinus carpio* fue 400 mg.L^{-1} ; sin embargo nosotros encontramos que la tasa de eclosión se redujo considerablemente en ovas expuestas a concentraciones mayores a 300 $\mu\text{L.L}^{-1}$; nuestros resultados también difieren de los obtenidos por Liu et al. (1995) en ovas de *Myxocyprinus asiaticus*, en diferentes estadios de desarrollo, tratados con 50-500 $\mu\text{L.L}^{-1}$; en este caso la tasa de eclosión no fue afectada por la concentración de Formalina.

Además de sus efectos letales, el Formaldehído es capaz de inducir otros efectos adversos, los que han sido estudiados en larvas, alevines y adultos de diversas especies ícticas. Buchmann et al. (2004) demostraron que la exposición al Formaldehído, aún por períodos cortos (1 hora), desencadena efectos que van desde la proliferación de las células mucosas hasta desorganización celular observada en individuos expuestos a 300 ppm de Formaldehído. Jørgensen & Buchmann (2007) señalaron que el uso del Formaldehído como tratamiento antiparasitario puede provocar la irritación y lesión superficial del epitelio, hecho que sumado a la inmunosupresión inducida por la primoinfección facilita la reinfección por parásitos. Otra de las alteraciones provocadas por el tratamiento con Formalina es el schok respiratorio, observado en larvas y juveniles, para evitarlo es necesario verificar que la concentración de oxígeno disuelto no disminuya durante el tratamiento; por esta razón el agua debe ser aireada. Finalmente, Warren (1981) señaló que también pueden presentarse muertes ideopáticas en tratamientos prolongados ().

El hecho de que el Formaldehído sea una sustancia aprobada para su uso en acuicultura, ha contribuido enormemente a la difusión de su utilización como antifúngico y antiparasitario; pero no se ha considerado el impacto que esta sustancia puede producir sobre el medio ambiente, sobre todo considerando que incluso los

cambios mínimos de las características químicas del agua puede causar daños en el ecosistema, como la destrucción de las plantas o los filtros bacterianos (Stuart, 1983). Los ecosistemas fluviales y lacustres cercanos a una estación de cría se verían seriamente afectados si las estaciones de piscicultura no implementan algún sistema de tratamiento de efluentes. Por otra parte, es necesario considerar el riesgo químico y toxicológico que implica el manejo de esta sustancia, tanto para los acuicultores como para el personal relacionado, ya que se sospecha que el Formaldehído posee propiedades carcinogénicas para el ser humanos (US EPA, 1998).

4.4.4. Ácido Acético

El Ácido Acético (CH_3COOH), también conocido como Ácido Etanóico, es un compuesto químico orgánico que en su forma anhidra es denominado Ácido Acético Glacial, es un líquido incoloro, higroscópico. Es uno de los ácidos carboxílicos más simples siendo utilizado en acuicultura para la remoción de parásitos externos a una concentración de 2000 ppm, en baños de inmersión cortos de 45 segundos a 10 minutos (Schnick et al., 1989). Su utilización en el control del *fouling* ha sido evaluada por Le Blanc et al. (2007), quienes recomiendan el tratamiento con 2-5 % de Ácido Acético para eliminar al tunicado invasivo *Styela clava*, que afecta las poblaciones cultivadas del mejillón *Mytilus edulis*, ya que esta sustancia no ejerce un efecto negativo a largo plazo sobre las poblaciones de mejillón tratadas; procedimientos de desinfección similares fueron sugeridos por Forrest et al. (2007). También se ha estudiado la capacidad virucida de compuestos que contienen Ácido Acético y Ácido Peracético en su composición como el PROXITANER 5, sustancia que según Smail et al. (2004) es recomendable para la desinfección de material contaminado con el virus de la anemia infecciosa del salmón. Trabajos previos han demostrado que la eficacia del Ácido Acético (y otros ácidos orgánicos débiles) es principalmente una función propia de los compuestos capaces de alterar el pH (Kimble, 1977; Spaulding et al., 1977; Verschueren, 1996; Breidt et al., 2004).

En los ensayos realizados se registraron los pHs en cada una de las soluciones ensayadas; éstos se muestran en las Tablas 4.1 y 4.2. Los valores de pH iniciales de las soluciones de Ácido Acético Glacial, en concentraciones de 50 a 350 mg.L^{-1} variaron entre 6,1 a 4,2. Luego de 24 horas de exposición, los valores de pH de estas soluciones aumentaron, excepto en las concentraciones superiores a los 200

mg.L⁻¹, en donde se observó un descenso del pH que acompañó al aumento de la concentración, alcanzando su valor más bajo (3,9) en 350 mg.L⁻¹.

Para confirmar que los efectos tóxicos se deban al Ácido Acético Glacial y no al descenso del pH generado por el aumento de su concentración, se realizaron ensayos con una solución tamponada de Ácido Acético en la que el pH se mantiene estable al aumentar la concentración de ácido. En los ensayos preliminares con Ácido Acético tamponado las ovas de pejerrey exhibieron una mayor tolerancia, motivo por el cual las concentraciones ensayadas encontraron en un rango mucho más amplio 600 - 1600 mg.L⁻¹. Tal como esperábamos, no se observaron variaciones significativas en los valores de pH al incrementar la concentración de Ácido Acético, permaneciendo estables al inicio del ensayo con valores entre 5,50 y 5,60; luego de 24 horas sólo se observó un leve incremento del pH hasta 5,70 en las concentraciones más altas: 1400 y 1600 mg.L⁻¹. Ésto nos demuestra que en gran medida la toxicidad del Ácido Acético se debe principalmente al descenso del pH, ya que la estabilidad del pH obtenida en su versión tamponada contribuyó al aumento de la tolerancia en las ovas de pejerrey.

Como se observa en la Figura 4.4, luego de 96 h de exposición ninguno de los tratamientos con Ácido Acético lograron superar la tasa de sobrevivencia obtenida en el grupo Control (96,70 %), sólomente se obtuvieron valores cercanos a los del Control 95,00; 88,70 y 88,50 % en las ovas expuestas a 75, 100 y 150 mg.L⁻¹, respectivamente. Contrariamente a lo esperado, en 50 mg.L⁻¹ la tasa de eclosión resultó en 76,90 %. Se observó también que en concentraciones superiores a 200 mg.L⁻¹ la tasa de sobrevivencia empezó a declinar considerablemente luego de 48 de exposición hasta alcanzar luego de 96 horas, valores inferiores al 10 % en 300 y 350 mg.L⁻¹. Este aumento de la mortalidad en las ovas expuesta a concentraciones superiores a los 200 mg.L⁻¹ coincide con el descenso del pH mencionado anteriormente y también se acentúa en las concentraciones más elevadas.

En las ovas expuestas al Ácido Acético tamponado, aunque los valores de pH se mantuvieron relativamente estables (5,50-5,70), observamos ya desde las primeras 24 horas de exposición que existe un claro descenso en la tasa de sobrevivencia en las concentraciones más altas. La tasa de sobrevivencia (Figura 4.5) en los tratamientos no logró superar ni aproximarse a la obtenida en el grupo Control (90,80 % mg.L⁻¹) incluso en la concentración más baja: 600 mg.L⁻¹, donde ésta sólo alcanza

un 62,90 %. La respuesta observada en Ácido Acético tamponado, es mucho más gradual que la observada en Ácido Acético Glacial; sin embargo, debemos considerar que las concentraciones ensayadas son más elevadas y que probablemente a concentraciones semejantes a las utilizadas en los ensayos con Ácido Acético Glacial, no se observe un efecto letal tan agudo y precoz.

Los mecanismos que producen la muerte en bajos y altos niveles de pH son esencialmente diferentes. El stress ácido afecta una gran variedad de funciones de los peces, el efecto inicial se enfoca en la osmorregulación iónica branquial. El descenso del pH en el medio acuático genera un aumento del potencial a nivel del epitelio branquial lo que provoca la pérdida de Sodio y Cloro, e involucra una menor capacidad de retención de Calcio, el que se pierde más rápidamente de lo que puede ser recuperado. La presencia de Calcio en el entorno acuático modula el efecto del pH ácido, modificando la permeabilidad del epitelio branquial a los iones Na^+ , Cl^- y H^+ , lo que a su vez influye en la salida neta de Sodio (Mc Williams, 1982). Durante la exposición aguda a un medio ácido, la muerte se atribuye a factores circulatorios: reducción del volumen plasmático, aumento de la viscosidad de la sangre y aumento de la presión arterial. Por otro lado la exposición aguda a valores críticos de pH alcalinos, produce una inhibición de la excreción de amonio, entonces en la alcalosis respiratoria el efecto sería puramente tóxico (Heath, 1995; Noga, 1999).

Gómez (1998) menciona que la tolerancia de *Odontesthes bonariensis* a niveles extremos de pH también puede ser observada en ambientes naturales sometidos a contaminación antrópica. Mancini & Grosman (2009) caracterizaron ecológicamente los ambientes habitados por el pejerrey, describiendo también algunas de sus principales características físico químicas, concordando en sus hallazgos, con los trabajos elaborados por Gómez (1998), en el hecho de que *O. bonariensis* es una especie que tolera un amplio rango de pH (5,80 -9,80) con un valor medio de 8,02 (+/- 0,47); pero comparado con otras especies de peces argentinos de agua dulce como *Cnesterodon decemmaculatus*, *Pimelodella laticeps*, *Gymnocorymbus ternetzi*, el pejerrey es el menos resistente a bajos niveles de pH. Mancini y Grosman (2009) afirman que la composición iónica del agua de las lagunas oscila en su mayoría entre bicarbonatadas sódicas y cloruradas sódicas, hemi a hiposulfatadas e hipomagnesémicas. Aquellas con alguna afluencia marina, poseen relaciones Mg/Ca y $\text{Cl}/(\text{CO}_3 + \text{HCO}_3)$ muy elevados. La composición iónica del medio ambiente acuático es de crucial impor-

tancia para la sobrevivencia de los peces; debido a que, tal como lo demostró Brown (1981-1982), la presencia de algunos iones contribuyen a mantener un adecuado balance iónico.

Para el Ácido Acético Glacial, las CL_{50} obtenidas con los tres métodos (Tabla 4.28) resultaron semejantes, la CL_{50} de menor valor fue la calculada según el método no paramétrico de Trimmed Spearman Karber (TSK) 221,70 mg.L⁻¹, seguida de la obtenida mediante el uso del Modelo Biológico 228,00 mg.L⁻¹ y finalmente la calculada con el método de los Probits 229,70 mg.L⁻¹; con este método también se obtuvo una superficie de respuesta sesgada por la falta de datos disponibles para la CL_{50} 24 h (Figura 4.16). En cambio con el Modelo Biológico se obtuvieron para la valores de CL_{50} 24 h permitiendo así la elaboración de una superficie de respuesta más completa que cubre un rango de concentraciones más amplio, el que va desde 2820,00 mg.L⁻¹ (CL_{99-24} h) hasta 164,00 mg.L⁻¹ (CL_{1-96} h) (Figura 4.17). En los ensayos con Ácido Acético tamponado la CL_{50} calculada según el Modelo Biológico, el test no paramétrico TSK y el método de los Probits resultaron en 704,00; 710,00 y 728,20 mg.L⁻¹ respectivamente. La superficie de respuesta elaborada con los datos proporcionados por el método de los Probits cubre un rango que va desde 2516,00 mg.L⁻¹ (CL_{99-24} h) hasta 303,90 mg.L⁻¹ (CL_{1-96} h); y con los datos obtenidos según el Modelo Biológico, el rango de concentraciones oscila entre 353,00 mg.L⁻¹ (CL_{99-24} h) y 5130,00 mg.L⁻¹ (CL_{1-96} h). En ambos casos (Figuras 4.17 y 4.18) no encontramos diferencias en la evolución temporal de la CL_{50} ; las diferencias se acentúan principalmente en los valores encontrados para las 24 h de exposición, los que según el Modelo Biológico son mucho más elevados.

El pH de las soluciones de Ácido Acético Glacial entre las que se ubicó la CL_{50} fue de 4,50 a 4,70; mientras que el pH de las soluciones en los ensayos con Ácido Acético tamponado se mantuvo estable en 5,6. Si comparamos los resultados obtenidos con los hallazgos reportados por Gómez (1998) en estudios en los que evalúa la tolerancia de *Odontesthes bonariensis* a niveles extremos de pH en condiciones experimentales semejantes a la nuestra (dureza de 161 mg CO₃Ca. L⁻¹, T°: 15,5 - 20°C y pH 7,3 para los Controles), podemos afirmar que el efecto letal del Ácido Acético Glacial esta estrechamente relacionado con el descenso del pH, ya que según Gómez (1998) el pH letal para el 50 % de los individuos a 96 horas fue de 5,38; y el pH correspondiente a la CL_{50} de Ácido Acético obtenido en nuestros ensayos es mucho más bajo. Sin

embargo, en los ensayos realizados con el Ácido Acético Tamponado, incluso en las concentraciones mas elevadas el pH se mantuvo estable (5,5 - 5,7) lo que nos induce a pensar que la toxicidad de esta sustancia estarían involucrados otros factores además del pH.

Por otro lado, las concentraciones subletales de Ácido Acético Glacial siguieron el orden que se describe a continuación: $\text{NOEC } 150,00 \text{ mg.L}^{-1} < \text{NEC } (156,60 \text{ mg.L}^{-1}) < \text{CL}_{10} \text{ Probit } (168,20 \text{ mg.L}^{-1}) < \text{CL}_{10} \text{ del Modelo Biológico } (178,00 \text{ mg.L}^{-1})$. En todos los tratamientos con Ácido Acético Glacial, la tasa de eclosión fue menor a la del grupo Control (93,34 %) alcanzando su valor más alto (88,34 %) en las ovas expuestas a 100 mg.L^{-1} . Posteriormente en las concentraciones próximas inferiores se observó un descenso paulatino del porcentaje de eclosión llegando a valores de 81,67 y 76,67 % en 75 y 50 mg.L^{-1} respectivamente. Cabe resaltar que en la concentración correspondiente a la NOEC ($150,00 \text{ mg.L}^{-1}$) la tasa de eclosión fue tan sólo del 46,88 %. En los ensayos realizados con Ácido Acético tamponado, las concentraciones subletales obtenidas con los diferentes métodos fueron similares y estuvieron en el orden siguiente: $\text{CL}_{10} \text{ Probit } (450,00 \text{ mg.L}^{-1}) < \text{CL}_{10} \text{ del Modelo Biológico } (559,00 \text{ mg.L}^{-1}) < \text{NEC } (532,90 \text{ mg.L}^{-1}) < \text{NOEC } < 600,00 \text{ mg.L}^{-1}$. Todas las concentraciones subletales obtenidas se encuentran por debajo de la dosis ensayada más baja ($600,00 \text{ mg.L}^{-1}$); esto nos podría explicar el por qué no se registró eclosión en ninguno de los tratamientos. Finalmente, los márgenes de seguridad, para el Ácido Acético Glacial y tamponado, resultantes del coeficiente $\text{CL}_{50}/\text{CL}_{10}$ y $\text{CL}_{50}/\text{NOEC}$ fueron en 1,48 y 1,56 respectivamente.

4.4.5. Compuestos Iodados

Los compuestos desinfectantes en los que el principio activo es el Iodo son denominados Iodóforos. Además del Iodo poseen otras sustancias que actúan como agentes solubilizantes o “carriers”, a partir de la cuales el Iodo es liberado lentamente; entonces su capacidad desinfectante depende de la cantidad de Iodo liberada lo que se cuantifica en la solución en términos de Iodo disponible o Iodo libre.

En solución acuosa el Iodo da lugar a la formación de siete formas químicas de las cuales el Iodo elemental (I_2), el Ácido Hipiodoso (HIO), y el catión (H_2OI)⁺ son los desinfectantes más potentes, ya que poseen una excelente capacidad microbicida a un amplio rango de pH (Treves & Brown, 2000). Una de las soluciones comerciales

más ampliamente utilizadas es la Iodopovidona, compuesta por Iodo y Polivinilpirrolidona (PVP), ésta es una sustancia neutra, a diferencia de los otros Iodóforos que tienden a acidificar el medio durante la liberación de Iodo, hecho que les otorga propiedades corrosivas para algunos metales.

La acción microbicida del Iodo se debe principalmente a procesos de oxidación y halogenación en los microorganismos, en los que se observan las siguientes reacciones químicas: a) Formación de radicales N-Iodo en las cadenas laterales de los aminoácidos básicos, los que previenen la formación de uniones del tipo puente Hidrógeno en estos puntos y alterando la estructura secundaria y terciaria de las proteínas; b) Oxidación de los grupos sulfuro -SH de la cisteína, evitando la formación de puentes disulfuro; c) También reacciona con los grupos fenólicos de la tirosina; y d) Actúa alterando la permeabilidad de la membrana por oxidación de los ácidos grasos insaturados.

Los iodofóros también han sido reconocidos como efectivos agentes virucidas (Noga, 1999; Treves & Brown, 2000). Chang et al. (1998) encontraron que el tratamiento con 100 mg.L⁻¹ resultó ser eficaz en la erradicación total de la infección por el baculovirus asociado al síndrome de la mancha blanca en *Penaeus monodon*, mientras que una concentración de 50 mg.L⁻¹ resulta ser suficiente para reducir la tasa de infección a un 20 %. Su uso como bactericida se encuentra ampliamente difundido, Cipriano et al. (2001) demostró que estas sustancias son eficaces en la desinfección y el control de *Aeromona salmonicida*. Otros autores, obtuvieron resultados similares en diversas especies de peces; Wagner et al. (2008) comprobaron que el Iodo reduce significativamente la carga bacteriana de las ovas de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* siendo más eficiente que el Cloruro de Sodio, el Peróxido de Hidrógeno y la Formalina; Overton et al. (2010) comprobaron su eficiencia en la desinfección de ovas del bacalao del mar Báltico, (*Gadus morhua*); Ross & Smith (1972) señalaron que soluciones con concentraciones de 25 mg.L⁻¹ de Iodo ejercen una actividad bactericida y fungicida efectiva. Finalmente, Brown & Shrable (1992) resaltaron la eficacia del Iodo para reducir la carga bacteriana de las ovas del timalo del ártico (*Thymallus arcticus*).

La desinfección de ovas con Iodóforos ha sido practicada desde 1970 con la finalidad de reducir la transmisión de bacterias y virus asociados a ovas, fluido coleómico o seminal; ésta es una práctica establecida en estaciones de cría para mitigar las enfer-

medades y tratar patógenos de transmisión vertical (US FWS, 2004). Los Iodóforos son considerados desinfectantes adecuados para su uso durante el desarrollo embrionario en peces, debido a su alta toxicidad para los patógenos y su toxicidad relativamente baja para las ovas de varias especies de peces, en los que en la actualidad es utilizado ampliamente (Alderman, 1984; Subasinghe & Sommerville, 1985; Fowler & Banks, 1990-1991; Bergh & Jelmert, 1996; Wagner et al., 2010).

El procedimiento estándar de aplicación es la inmersión, las concentraciones recomendadas para la desinfección de ovas varían según la especie; por ejemplo en salmónidos oscilan entre los 25 y 150 mg.L⁻¹ y los tiempos de exposición recomendados son de 10 a 60 minutos; estas variaciones están condicionadas por la diferente sensibilidad de las distintas especies estudiadas (Piper et al., 1982; Fowler & Banks, 1991; Hendrix & Baker, 1992; Treves & Brown, 2000) y el estadio de desarrollo. Al respecto Brown & Shrable (1992) encontraron que la exposición al Iodo en concentraciones entre 50 y 100 mg.L⁻¹, durante la fase de endurecimiento del corion, es capaz de desencadenar una elevada mortalidad en ovas del timalo del ártico (*Thymallus arcticus*). Posteriormente, Jodun & Millard (2001) evaluaron el impacto de diferentes concentraciones de Iodo-Polivinilpirrolidona (PVP), sobre ovas del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) durante la fase de endurecimiento a distintos momentos de la exposición, y encontraron que para evitar elevados porcentajes de mortalidad asociados al tratamiento con PVP el tiempo de exposición no deberá exceder los 30 min., siendo preferible el aumento de la concentración de Iodóforo al aumento del tiempo de exposición.

Es importante considerar que la acción desinfectante de los Iodóforos se encuentra limitada a la superficie, ya que estas sustancias no son capaces de atravesar el corion e ingresar al vitelo. Factores como un pH inadecuado, presencia de materia orgánica o de proteínas asociadas con la superficie de la ova, como sangre, semen o fluido coleómico alteran la concentración efectiva reduciendo la cantidad de Iodo disponible; por tal razón las ovas deben ser lavadas antes de ser sometidas a tratamiento.

Se realizaron ensayos con dos formas de compuesto iodurados: Ioduro de Potasio (IK) y Iodopovidona. Primeramente los ensayos fueron realizados siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.2.3., utilizando como medio de dilución una solución salina isotónica de ClNa al 0,9 %. Los porcentajes de sobrevivencia en los Contro-

les fueron muy bajos (37,40 y 37,60 %); desconocemos la razón de este hecho, pero puede ser atribuido a la ausencia de otras sales que equilibren el efecto adverso del Cloruro de Sodio. La elevada mortalidad en los Controles nos condujo a realizar nuevos ensayos, reemplazando el medio de dilución (ClNa 0,9 %) por Agua dura reconstituida (US EPA, 2002); en estos ensayos se reestablecieron los porcentajes normales de sobrevivencia en los Controles alcanzando valores entre 76,90 y 90,50 %. La composición del medio de dilución también tuvo un efecto notorio sobre la toxicidad de estos iodóforos; en los ensayos preliminares realizados con la solución salina isotónica el rango de concentraciones obtenido fue de 25 a 200 mg.L⁻¹. La toxicidad de estos iodóforos disminuyó considerablemente al utilizar ADR como medio de dilución, obteniendo un rango de concentración entre 50 y 500 mg.L⁻¹. Esta es mucho mayor a la obtenida al emplear solución salina isotónica como medio de dilución, en donde el rango de concentraciones fue de 20 a 200 mg.L⁻¹.

Tal como sucede con otras sustancias químicas en solución, las características físico-químicas del agua inciden directamente en su toxicidad. En un pH medio (7 - 7,5) se mantiene el balance entre Iodo elemental (I₂) y el Ácido Hipoiódoso (HIO); si el pH aumenta de 6 a 8 la concentración de I₂ disminuirá de 90 a 12 % mientras que el porcentaje de HIO aumentará de 10 a 88 % (US FWS, 2004). Amend (1974) encontró que la toxicidad del Betadine y el Wescodyne, dos iodóforos comerciales, se vio incrementada a un pH 6, pero que la dureza (expresada como contenido de Ca y Mg) no afectó la toxicidad. En contraposición a lo mencionado por Amend (1974), el manual de procedimientos y operaciones de descontaminación de la Department of Agriculture, Fisheries and Forestry - DAFF - (2008) afirma que la toxicidad de los iodóforos es afectada por la dureza y la alcalinidad del agua. Noga (1999) recomienda, agregar 1g.L⁻¹ de Bicarbonato de Sodio, cuando el agua posee una alcalinidad menor a 50 mg.L⁻¹, para mitigar el descenso del pH durante la liberación de Iodo al medio acuático.

Al utilizar una solución isotónica de Cloruro de Sodio, observamos que el porcentaje de sobrevivencia en las ovas de pejerrey expuestas a 25 mg.L⁻¹ de IK fue de 48,35 % resultando mayor al obtenido en el grupo Control (37,36 %), y en las concentraciones más altas se observó un 100 % de mortalidad entre las primeras 24 y 48 horas de exposición. En las ovas expuestas al IK (en ADR), el efecto tóxico observado fue gradual, registrándose al término de 72 h un 100 % de mortalidad en

las tres concentraciones más altas. El porcentaje de sobrevivencia en el grupo Control aumentó considerablemente (76,9 %), pero fue inferior al obtenido en el grupo expuesto a 50 mg.L⁻¹ (78,85 %).

En los ensayos realizados con Iodopovidona se observó una respuesta similar. Al utilizar una solución isotónica de Cloruro de Sodio el porcentaje de sobrevivencia en las ovas expuestas a 25 y 50 mg.L⁻¹ resultó en 57,96 y 43,96 % respectivamente y fue mayor al obtenido en el grupo Control (37,63 %) y en los grupos expuestos a 75 y 100 mg.L⁻¹ fue menor al 5 %; también se observó una mortalidad aguda en las concentraciones más altas. En cambio al utilizar ADR como medio de dilución, aunque los porcentajes de sobrevivencia más cercanos al Control se obtuvieron en 150 y 50 mg.L⁻¹ y éstos resultaron en 83,30 y 81,70 % respectivamente, en ninguno de los tratamientos se logró superar el porcentaje de sobrevivencia alcanzado en el grupo Control de 90,50 %.

Diversos autores mencionan que la exposición a compuestos iodados incrementa la sobrevivencia en ovas de una gran variedad de peces teleósteos de las familias Salmonidae (truchas y salmones), Serranidae (Sub familia Epinephelinae) (meros) Acipenseridae (esturiones) y Pleuronectidae (hipoglosos) (Bouchard & Aloisi, 2002; Tendencia, 2001; Bergh & Jelmert, 1996). Katharios et al. (2007) encontraron la exposición durante 5 minutos a 50 mg.L⁻¹ de Iodo, no afectó negativamente la eclosión ni la tasa de sobrevivencia de las ovas (24 h post fertilización) del besugo (*Pagrus pagrus*) y del besugo blanco (*Diplodus sargus sargus*). Pravecek & Barnes (2003) encontraron que la tasa de sobrevivencia de ovas embrionadas de *Oncorhynchus clarki lewisi* tampoco se vio afectada por la exposición a Iodóforos en concentraciones de hasta 125 mg.L⁻¹ de Iodo activo, durante 30 minutos.

Nosotros encontramos una mayor tasa de sobrevivencia en las ovas expuestas a 25 mg.L⁻¹ de IK y 25 y 50 mg.L⁻¹ de Iodopovidona en solución salina isotónica, la que superó los valores obtenidos en el grupo Control, que como mencionamos anteriormente fueron atípicamente bajos (37,4 y 37,6 %). En estos términos podríamos decir que el tratamiento con IK o Iodopovidona mejora la tasa de sobrevivencia. Aunque estos hallazgos concuerdan con el supuesto que indica que "el uso de Iodóforos durante la incubación mejora la tasa de eclosión"; en nuestros ensayos, la elevada mortalidad del Control hace que los estándares a superar en los tratamientos hayan sido bajos y nos lleven a concluir erróneamente que existe una mejora en la tasa de

eclosión, cuando en realidad la tasa de sobrevivencia obtenida en los tratamientos con IK y Iodopovidona no alcanzó valores deseables. Algo distinto ocurrió en los ensayos realizados con ADR como medio de dilución, en los que el porcentaje de sobrevivencia de los Controles resultó ser adecuado; obteniendo, en los ensayos con IK, un 76,90 % valor que sólo fue superado por el obtenido en el grupo expuesto a 50 mg.L⁻¹ (78,90 %), también se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia próximos a los del grupo Control (72,40 %), en 100 mg.L⁻¹. En los ensayos con Iodopovidona, la tasa de sobrevivencia del grupo Control (83,3 %) no logró ser superada por ninguna de las concentraciones ensayadas.

Debido a la elevada mortandad registrada en los Controles, la CL₅₀ 96h del IK en solución isotónica no pudo ser calculada mediante el método de los Probits; sin embargo, según el test no paramétrico de Trimmed Spearman Karber ésta resultó en 44,50 mg.L⁻¹ y 50,30 mg.L⁻¹ según el Modelo Biológico. La CL₅₀ 96h, de esta misma sustancia, utilizando ADR como medio de dilución resultó en 124,70 mg.L⁻¹ TSK < 129,90 mg.L⁻¹ Probit < 147,00 mg.L⁻¹ según el Modelo Biológico. Por otro lado La CL₅₀ 96h de la Iodopovidona en ClNa 59,90 mg.L⁻¹ Probit < 60,70 mg.L⁻¹ TSK < 66,10 mg.L⁻¹ según el Modelo Biológico. Al reemplazar el medio de dilución de la Iodopovidona por ADR no se logró calcular la CL₅₀ 96h con el método de los Probits, sin embargo según el test no paramétrico TSK ésta resultó en 167,70 mg.L⁻¹ y 198,00 mg.L⁻¹ según el Modelo Biológico. Los resultados obtenidos nos demuestran que en ambas condiciones de ensayo (ClNa 0,9 % y ADR), la toxicidad del IK fue mayor a la de la Iodopovidona. También encontramos que la toxicidad de ambas sustancias estuvo determinada en gran medida por el medio de dilución utilizado, siendo mayor en los ensayos con solución isotónica de ClNa 0,9 %, y que en este caso la toxicidad estaría determinada por el descenso del pH.

En todos los ensayos se observó un aumento del pH luego de 24 de exposición. En los ensayos realizados con IK disuelto en ClNa 0,9 % observamos que el pH promedio del grupo Control (5,51) resultó ser incompatible con la sobrevivencia del pejerrey; y fue disminuyendo al aumentar la concentración desde 5,12 en 25 mg.L⁻¹ hasta 3,65 en 200 mg.L⁻¹. Se obtuvieron resultados similares en los ensayos realizados con Iodopovidona disuelta en ClNa 0,9 %, en los que observamos que el pH promedio del grupo Control (5,86) es levemente mayor al pH letal medio para pejerrey reportado por Gómez (1998). En los grupos expuestos a la Iodopovidona los valores de pH

también fueron disminuyendo al aumentar la concentración desde 5,30 en 25 mg.L⁻¹ a 4,02 en 200 mg.L⁻¹. Estos resultados concuerdan con los reportados por Amend (1974), quien menciona que a valores de pH menores a 6,00 la toxicidad del Iodo se ve exacerbada. Al igual que en los ensayos realizados con Ácido Acético Glacial, podemos afirmar que el efecto letal del IK y la Iodopovidona en solución isotónica, está estrechamente relacionado con el descenso del pH, puesto que las ovas se ven sometidas a valores de pH por debajo de su umbral de tolerancia.

Por otro lado, en los ensayos realizados con IK disuelto en ADR, el pH de las soluciones no sufrió importantes variaciones al incrementar la concentración de IK, manteniéndose estable y próximo a la neutralidad tanto al inicio como al final de las exposiciones, con valores medios de 7,38 y 7,60 respectivamente. A diferencia de los ensayos con IK, en los realizados con Iodopovidona observamos únicamente un ligero descenso del pH al incrementar la concentración de: 7,4 en 50 mg.L⁻¹ a 7,1 en 500 mg.L⁻¹ al inicio, y de 7,80 en 50 mg.L⁻¹ a 7,61 en 500 mg.L⁻¹ al término de los ensayos. En estas condiciones ambas formas de Iodo, el Iodo elemental y el Ácido Hipoidoso se encuentran en equilibrio; y la toxicidad no es atribuida al pH sino al aumento de la concentración de Iodo.

Dentro de los parámetros toxicológicos subletales para IK, tenemos que en los ensayos realizados con la solución isotónica como medio de dilución se obtuvieron valores más bajos con el Modelo Biológico NEC (41,80 mg.L⁻¹) y CL₁₀ (44,60 mg.L⁻¹) seguidos muy de cerca por la CL₁₀ Probit (45,50 mg.L⁻¹) y finalmente la NOEC (50,00 mg.L⁻¹). Al establecer la relación CL₅₀/NEC = 1,06 encontramos que el margen de seguridad de esta sustancia es muy bajo por lo que deberá ser utilizada con precaución. Sin embargo, al reemplazar la solución isotónica por ADR obtuvimos una secuencia distinta, donde la CL₁₀ Probit (98,70 mg.L⁻¹) es seguida por la NOEC (100,00 mg.L⁻¹); la NEC (119,60 mg.L⁻¹) y finalmente la CL₁₀ Modelo Biológico (131,00 mg.L⁻¹). El índice de seguridad de esta sustancia (CL₅₀/CL₁₀ Probit) resultó en 1,26, este valor nos indica que la dilución en ADR le otorga mayor estabilidad al IK y no sólo disminuyó su toxicidad sino que también amplía sus márgenes de seguridad.

En el caso de la Iodopovidona, las concentraciones subletales obtenidas en los ensayos utilizando la solución isotónica como medio de dilución encontramos que los valores son muy cercanos entre sí, no obstante en orden creciente resultaron

en: CL_{10} Probit ($46,90 \text{ mg.L}^{-1}$) < NOEC ($50,00 \text{ mg.L}^{-1}$) < NEC ($59,60 \text{ mg.L}^{-1}$) < CL_{10} Modelo Biológico $61,70 \text{ mg.L}^{-1}$. Nuevamente en ADR la secuencia se modifica resultando en: NOEC ($100,00 \text{ mg.L}^{-1}$) < NEC ($167,20 \text{ mg.L}^{-1}$) < CL_{10} del Modelo Biológico ($177,00 \text{ mg.L}^{-1}$) < CL_{10} Probit ($202,20 \text{ mg.L}^{-1}$). Los márgenes de seguridad obtenidos para la Iodopovidona en soluciones de ClNa 0,9 % y ADR resultaron en 1,27 y 1,68 respectivamente, al igual que en los ensayos con IK el margen de seguridad aumentó al reemplazar la solución isotónica por ADR.

A pesar de que en todos los casos las concentraciones subletales obtenidas se encuentran dentro del rango de concentraciones ensayadas, no se obtuvo eclosión en ninguno de los ensayos realizados con IK o Iodopovidona. Esto puede deberse a que si bien los embriones fueron capaces de sobrevivir a determinadas concentraciones de ambos Iodóforos, es probable que el desgaste energético que implicó la sobrevivencia les haya impedido completar su desarrollo satisfactoriamente, retrasando el crecimiento o imposibilitando la eclosión debido a la importante demanda energética necesaria para iniciarla.

Parte III

Evaluación de la capacidad fungicida de los tratamientos profilácticos

Capítulo 5

Evaluación sobre *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax*

5.1. Introducción

La intensificación de la acuicultura conlleva ineludiblemente al incremento de las densidades de cría, hecho que a su vez favorece la diseminación de enfermedades en individuos que estas condiciones se encuentran sometidos al estrés propio del manejo. Ya sea con fines profilácticos o terapéuticos, diversas sustancias tales como desinfectantes inespecíficos, antiparasitarios, antibióticos y antifúngicos han sido empleadas para contrarrestar los efectos adversos generados por los patógenos ya sean parásitos, bacterias, virus u hongos. Las sustancias antifúngicas y algunas antiparasitarias, son denominadas **desinfectantes de superficie** ya que su objetivo es erradicar patógenos superficiales, siendo utilizados en ambos casos, en baños de inmersión de duración variable.

El Verde de Malaquita es el fungicida más antiguamente utilizado en acuicultura (Burrows, 1949; Sharp et al., 1952), la prohibición y/o restricción de su uso en muchos países ha generado la necesidad de ampliar el estudio de sustancias que lo reemplacen. Entre los compuestos alternativos cuyo potencial fungicida ha sido evaluado los más estudiados fueron: el Cloruro de Sodio (Edgell et al., 1993; Marking et al., 1994; Waterstrat & Marking, 1995; Bly et al., 1996; Schreier et al., 1996), la Formalina (Marking et al., 1994; Waterstrat & Marking, 1995; Bly et al., 1996; Schreier et al., 1996), el Permanganato de Potasio (Bly et al., 1996), el Sulfato de Cobre (Bly

et al., 1996), el Iodo (Fitzpatrick et al., 1995), el Glutaraldehído (Marking et al., 1994; Fitzpatrick et al., 1995; Skjermo & Vadstein, 1999), el Peróxido de Hidrógeno (Marking et al., 1994; Fitzpatrick et al., 1995; Waterstrat & Marking, 1995; Schreier et al., 1996), los herbicidas: Diquat, Simazina, Hydrothol 191, Aquathol K (Marking et al., 1994; Bly et al., 1996), y el Ozono (Bullock et al., 1997; Summerfelt et al., 1997). Más recientemente, Khomvilai et al. (2006) propusieron el uso de Hipoclorito de Sodio, Loan et al. (2006) evaluaron el efecto fungicida de la Violeta de Genciana, la Nistatina, el Benzoato de Sodio y el Griseofulvin, y las investigaciones realizadas por Pottinger & Day (1999), Oono et al. (2007) sugieren que el Bronopol [2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol] podría ser un agente fungicida eficaz. Skjermo & Vadstein (1999) proponen un control basado en el uso de antagonistas bacterianos no patógenos, y probióticos que estimulen el sistema inmune. En la actualidad se está estudiando el uso de aceites esenciales de hierbas aromáticas (Mousavi et al., 2009).

Para la evaluación del potencial fungicida de una sustancia es necesario conocer los principales factores implicados en el proceso de infección, denominados **triada epidemiológica**; conformada por: el huésped susceptible, el organismo patógeno, y condiciones medioambientales favorables.

La susceptibilidad del huésped dependerá de la especie, el estado o condición, el estadio de desarrollo; siendo el periodo embrionario el más susceptible debido a que el sistema inmune aún se encuentra en vías de desarrollo, los individuos adultos además de poseer barreras biológicas que impedirán el inicio de la infección, son capaces de entablar una respuesta inmune específica contra la Saprolegniasis. Otros factores condicionantes intrínsecos son las situaciones de estrés y el desbalance hormonal característico del desove. Los factores extrínsecos como presencia de contaminantes ambientales, u otros agentes patógenos son capaces de alterar las barreras naturales o de disturbar la homeostasis del pez facilitando el ataque de organismos patógenos. Para el establecimiento de una enfermedad, es imprescindible la presencia de un agente patógeno capaz de penetrar en los tejidos del huésped, a esta capacidad invasiva se le denomina infectividad; además de ser infectivo es necesario que encuentre las condiciones adecuadas para su reproducción y diseminación logrando colonizar otros individuos sanos. En el medio ambiente acuático las Saprolegniales forman estructuras reproductivas asexuales denominadas zoosporan-

gios dentro de los cuales tienen origen las zoosporas; consideradas como unidades infectivas más importantes y cuya abundancia determinara el éxito de la infección (Nolard-Tintigner, 1978). Todas las zoosporas, incluyendo aquellas de especies no patógenas, poseen quimiotaxismo positivo; es decir son capaces de reconocer potenciales sustratos a colonizar. Las zoosporas del género *Saprolegnia*, debido a su movilidad, son capaces de encontrar más rápidamente un sustrato o huésped; en los otros géneros de Saprolegniales las zoosporas se enquistan en el extremo de salida del esporangio y su movimiento será facilitado únicamente por la corriente del agua.

Los sistemas de incubación de ovas utilizados la cría intensiva proveen condiciones óptimas para el desarrollo de estos organismos. Las temperaturas de incubación generalmente se encuentran cercanas o dentro de los rangos de crecimiento óptimo para la mayoría de Saprolegniaceae -18 a 26°C – (Rach et al., 2004), las altas densidades de carga y un flujo agua lento facilita la liberación de esporas y promueve su diseminación. Los peces y sus ovas son comúnmente parasitados por numerosas especies de “mohos acuáticos” pertenecientes a la familia Saprolegniaceae. Las distintas especies ubicadas en los géneros *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces* y *Dictyuchus* tienen una distribución cosmopolita, siendo ubicuos del medio ambiente acuático y han sido reconocidos como causantes de graves pérdidas en la producción de peces (Alderman & Polglase, 1984; Post, 1987; Bruno & Wood, 1999; Celada et al., 2004). Según Post (1987), la infección ocurre tras la colonización de ovas muertas o no fecundadas, las que sirven de sustrato de crecimiento, facilitando la diseminación y propagación del micelio hacia las ovas vivas adyacentes, que pueden ser invadidas o asfixiadas durante la expansión del micelio.

Según lo mencionado anteriormente la eficacia de una sustancia fungicida dependerá principalmente de su capacidad de inhibir el crecimiento vegetativo; limitar la formación de esporangios o alterar la capacidad infectiva de las zoosporas. Como se detallará más adelante, se han descrito diversas metodologías para evaluar la eficacia de un agente fungicida; cada una proporciona diferentes ventajas o desventajas pero comparten un factor limitante común: el hecho de que todos los métodos *in vitro* mantienen bajo control circunstancias que en condiciones reales no pueden ser controladas por lo que resulta muy difícil simular la compleja interacción medio ambiente-huésped-parásito.

En el presente Capítulo se presentan los resultados obtenidos en los ensayos rea-

lizados; en los que primeramente se consideró la sensibilidad *in vitro* de *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa* a las sustancias fungicidas propuestas en concentraciones inocuas para las ovas de pejerrey. En estas condiciones se determinó el efecto de las sustancias fungicidas propuestas sobre la tasa crecimiento, determinándose a su vez las concentraciones inhibitorias (CI) y la concentración inhibitoria media (CIM); también se registraron las principales alteraciones morfológicas inducidas por dichas sustancias, evaluándose a su vez su efecto sobre el desarrollo mediante la observación de caracteres reproductivos sexuales. Finalmente se realizaron pruebas de eficacia, en las que se determinó, la capacidad, de dichas sustancias, para inhibir la infección de ovas por *S. ferax* y *A. racemosa*.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Efecto de los Fungicidas sobre la Tasa de Crecimiento

Los ensayos fungicidas se realizaron con dos de los géneros más representativos de la Familia Saprolegniaceae (Scott & O'Bier, 1962); una cepa de *Saprolegnia ferax* (LPSC 1020) y otra de *Achlya racemosa* (LPSC 1019). Ambas cepas fueron aisladas de ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*, tal como se describe en la Sección 2.2.2.

Se evaluó el efecto de cinco sustancias fungicidas: Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, y Formalina (estabilizada con Metanol), Ácido Acético Glacial, Ácido Acético Tamponado, Ioduro de Potasio y Iodopovidona de una marca comercial denominada Pervinox. Se realizaron ensayos en medio sólido utilizando Agar Glucosa Glutamato (Seymour, 1970) como medio base, con agregado de cada sustancia hasta obtener las concentraciones mencionadas en la Tabla 5.1. La composición del medio de cultivo basal se detalla en el Apéndice A. Para la determinación del rango de concentraciones a ensayar, se consideraron parámetros de toxicidad para ovas de pejerrey como la Concentración de No efecto (NEC) y la CL₅₀-96h cada sustancia, siendo esta última considera como el limite superior del rango de concentraciones a ensayar.

Los inóculos utilizados para los ensayos de inhibición del crecimiento fueron provenientes de cultivos puros en GGI. Para la obtención de los mismos, se sembró una porción de micelio de cada cepa en el centro de una placa de Petri con 20 ml de agar Glucosa Glutamato (GGI). Al cabo de 4 días de incubación para *S. ferax* y 8 para *A.*

Tabla 5.1: Concentraciones empleadas en los ensayos de inhibición del crecimiento (en negrita las concentraciones por encima de las CL₅₀-96h para ovas de pejerrey).

Sustancia	Concentraciones ensayadas							
Verde de Malaquita [mg.L ⁻¹]	0,03	0,06	0,12	0,25	0,375	0,5	0,75	1
Cloruro de Sodio [g.L ⁻¹]	7,5	10	15	20	25	30	35	/
Formalina [μl.L ⁻¹]	20	40	80	150	250	450	900	/
Ácido Acético Glacial [mg.L ⁻¹]	10	15	25	50	100	200	/	/
Ácido Acético Tamponado [mg.L ⁻¹]	100	200	400	600	800	1000	1500	2000
Ioduro de Potasio [mg.L ⁻¹]	20	30	50	72,5	145	240	480	960
Iodopovidona [mgIK.L ⁻¹]	30	50	80	120	180	360	720	1440

racemosa, se cortaron inóculos de 5,0 mm diam. con un sacabocado de vidrio estéril, del borde activo de crecimiento de la colonia. Se realizaron cuatro réplicas para los tratamientos y cinco réplicas para los Controles; con la finalidad de disminuir las pérdidas por evaporación, cada placa fue sellada con film adherente y almacenada en una cámara de incubación a 17°C.

Diariamente se midió y registró el diámetro de la colonia en la misma dirección, durante dos semanas, utilizando un calibre Vernier (precisión = 0,1 mm), hasta que el grupo Control de alguna de las especies alcanzara el borde de la placa. La observación de las placas que no alcanzaron el borde, se prolongó por una semana adicional para detectar crecimiento tardío en alguna de las concentraciones.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión simple y se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson (R) y el Coeficiente de Determinación (R²). La Tasa de Crecimiento fue expresada como la pendiente de la recta de regresión para cada condición.

La tasa de Inhibición del Crecimiento (IC), se expresó como porcentaje de reducción del diámetro de la colonia del tratamiento comparado con el grupo Control, y fue calculado como sigue:

$$\text{Inhibición}[\%] = \left(1 - \frac{\text{Diámetro de colonia tratamiento}}{\text{Diámetro de colonia Control}}\right) \cdot 100\%$$

La Concentración Inhibitoria Media (CIM), concentración en la que el crecimiento se inhibe en un 50 %, fue calculada mediante la interpolación de los datos de inhibición obtenidos para las concentraciones ensayadas.

Análisis Estadístico

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de crecimiento en las placas adicionadas con las sustancias fungicidas y los Controles, se realizó un análisis de varianza mediante un ANOVA de una vía; las comparaciones entre grupos se efectuaron mediante el método a posteriori de multicomparaciones de Dunnet, o el test no paramétrico Kruscall Wallis, en ambos casos utilizando el programa XL Stat 7.5.

5.2.2. Efecto de los fungicidas sobre caracteres morfológicos

Con la finalidad de observar el efecto de los fungicidas sobre el desarrollo de *S. ferax* y *A. racemosa*, luego de dos semanas de exposición, se procedió a la observación de: 1) características macroscópicas como: la abundancia de micelio: denso o disperso; la forma de crecimiento (aéreo o sumergido) y, 2) características microscópicas como: el aspecto general del micelio, la formación y abundancia de yemas, la presencia de oogonios y oosporas, normales o anómalos.

Cada placa se dividió en cuatro sectores, las observaciones se realizaron en uno de éstos, para cada una de las réplicas de cada tratamiento. El número de oogonios por placa se obtuvo multiplicando por 4 el recuento obtenido en cada sector, finalmente fue expresado como el número de oogonios promedio para cada concentración.

5.2.3. Prueba de Eficacia en ovas de pejerrey

Las pruebas de eficacia fueron realizadas con el objetivo de determinar el efecto fungicida de las sustancias elegidas en solución acuosa y evaluar su capacidad de inhibir la infección. Las sustancias utilizadas fueron seleccionadas de acuerdo a su capacidad fungicida *in vitro*, siendo seleccionadas aquellas sustancias que exhibieron un efecto inhibitorio, a concentraciones menores que las NEC correspondientes, en los ensayos en medio agarizado.

Las pruebas de eficacia consistieron en exponer simultáneamente a: a) las ovas de pejerrey, b) la especie fúngica, y c) a una concentración determinada del agente fungicida, con la finalidad de conocer si dicha sustancia inhibe o limita la infección de las ovas, mejorando el porcentaje de sobrevivencia.

Para esto fue necesario primeramente preparar los inóculos, los que se obtuvieron de cultivos puros de *S. ferax* y *A. racemosa*, de los cuales se extrajeron del borde activo de crecimiento de la colonia porciones de agar de 13 mm diam, las que fueron colocadas en placas de Petri estériles con 20 ml de agua dura reconstituida (ADR) estéril y 5 semillas de sésamo estériles empleadas como cebo. Para mantener separadas las colonias y facilitar su estandarización, se emplearon discos de goma eva de 7,5 cm de diámetro con un orificio central, en el que se colocó la porción de agar y cinco orificios en la periferia donde se colocó una semilla de sésamo por orificio. Luego de ser incubadas a una temperatura de $17 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 6 días para *Saprolegnia ferax* y 10 días para *Achlya racemosa*., las placas fueron observadas bajo lupa binocular para verificar la ausencia de organismos contaminantes y las semillas colonizadas fueron colectadas.

Los inóculos obtenidos, según lo descrito anteriormente fueron colocados en placas de Petri, a razón de 1 por placa, con 20 ml de las soluciones con las sustancias fungicidas: Ácido Acético Tamponado (200 mg.L^{-1}), Verde de Malaquita ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) y Formalina ($40 \mu\text{L.L}^{-1}$) y un Control con ADR estéril. En cada placa se colocaron 10 ovas. Al cabo de 48 horas se realizó un recambio de las soluciones, tras las 48 horas siguientes, al completar un total de 96 horas de exposición, se dió por terminado el ensayo haciendo un recuento del número de ovas: vivas sin infección, infectadas (vivas y muertas) y muertas sin infección.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el test no paramétrico de Wilcoxon de rangos signados para muestras apareadas; mediante el cual se evaluó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de infección y sobrevivencia entre el grupo Control y los tratamientos.

5.3. Resultados

5.3.1. Efecto de los Fungicidas sobre la Tasa de Crecimiento

En la presente sección se incluyen los resultados de los ensayos realizados con las sustancias fungicidas. A continuación se presenta de manera gráfica el efecto de cada sustancia sobre el crecimiento de ambas especies en función al tiempo de exposición; seguido de las pendientes obtenidas a partir de la recta de regresión

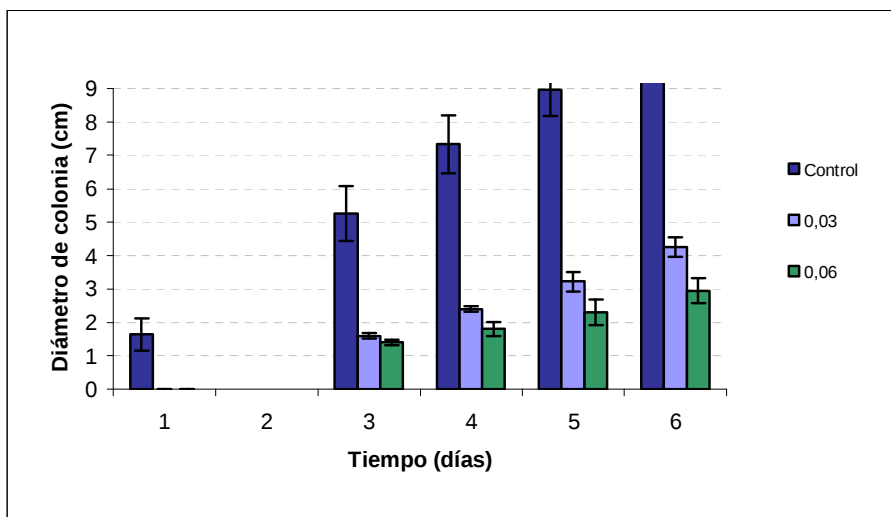


Figura 5.1: Efecto del Verde de Malaquita sobre el crecimiento de *S. ferax*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

y de los estadísticos: Coeficiente de correlación de Pearson (R) y Coeficiente de Determinación (R^2). Seguidamente se ilustra comparativamente el crecimiento de ambas especies al sexto día de exposición y finalmente se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento para cada especie y sustancia.

Verde de Malaquita (Figuras 5.1 a 5.3)

En la Figuras 5.1 y 5.2 se muestra el efecto del Verde de Malaquita (VM) sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*; en ambos casos se observa una tendencia a disminuir el crecimiento conforme se incrementa la concentración de VM. Sólomente se registró crecimiento en concentraciones inferiores a los $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$, concentración que se encuentra muy por debajo de la NEC para ovas de pejerrey ($0,51 \text{ mg.L}^{-1}$).

También se observó un leve retraso del crecimiento en las placas expuestas a VM. En *S. ferax* (Figura 5.1), podemos observar que el grupo Control creció temprana y rápidamente alcanzando el borde de la placa de Petri luego del cuarto de día de incubación; sin embargo, el crecimiento en los tratamientos con $0,03$ y $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ se inició al tercer día de incubación. En *A. racemosa* (Figura 5.2), solamente se observó un retraso en el inicio del crecimiento en las placas expuestas a $0,06$ y $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$, iniciando el cuarto y octavo día de exposición respectivamente.

Los valores de las pendientes, son presentados en la Tabla 5.2. En ambos casos

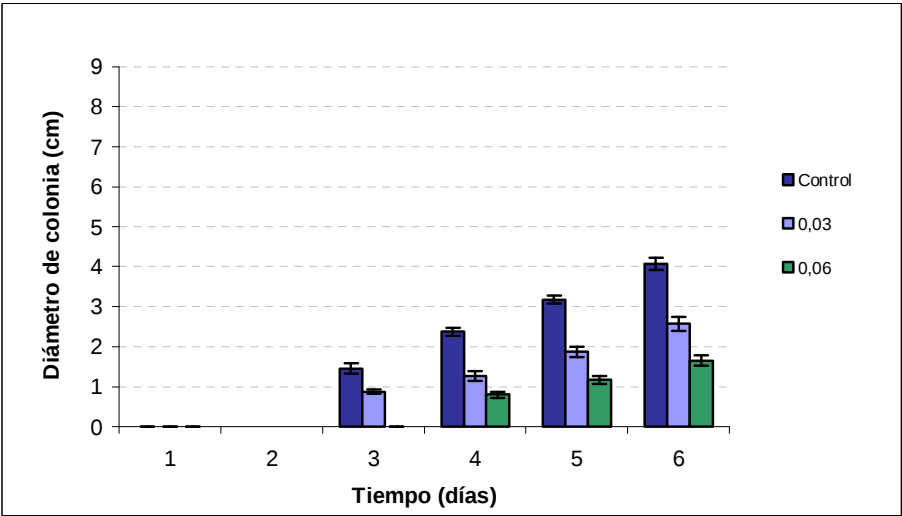


Figura 5.2: Efecto del Verde de Malaquita sobre el crecimiento de *A. racemosa*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

Tabla 5.2: Valores de Pendiente, R y R^2 para *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de VM. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Saprolegnia ferax			Achlya racemosa		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
Control	1,80	1,00	1,00	0,623	1,00	0,93
0,03	<i>0,64</i>	1,00	0,93	<i>0,37</i>	0,99	0,91
0,06	<i>0,47</i>	1,00	0,95	<i>0,22</i>	0,93	0,71
0,12	0	-	-	0	-	-

fueron decreciendo al incrementar la concentración de VM; en todos los tratamientos las pendientes fueron menores a las del grupo Control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los coeficientes de correlación de Pearson fueron mayores a 0,99 en todos los casos, lo que indica un estrecho grado de asociación entre las variables.

La Figura 5.3 esquematiza las diferencias en la sensibilidad de ambas especies al VM luego de 6 días de incubación; los asteriscos señalan las concentraciones a las que los valores de pendiente fueron significativamente menores a los del grupo Control.

En la Tabla 5.3, se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento (IC)

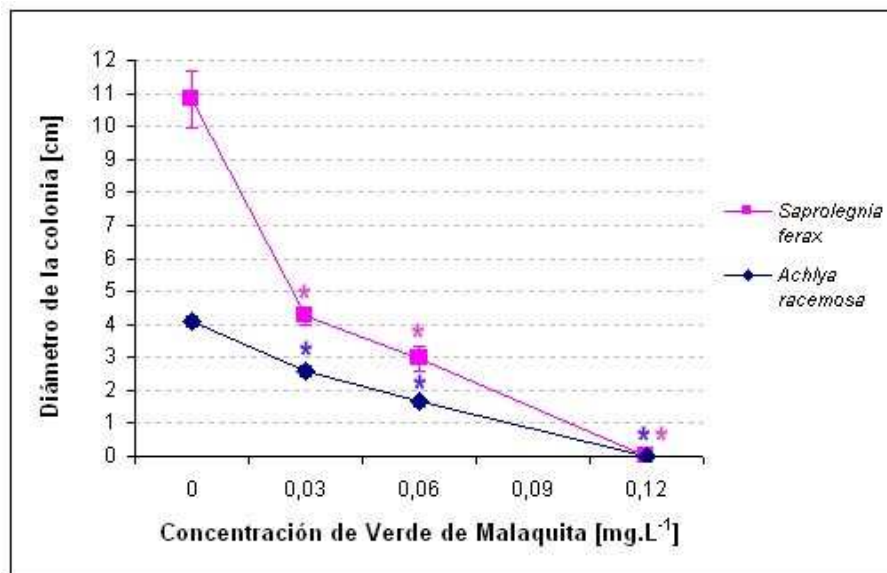


Figura 5.3: Efecto de la concentración de VM sobre el crecimiento, de *S. ferax* y *A. racemosa* en GGI. Diámetro registrado luego de 6 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Tabla 5.3: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Verde de Malaquita.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
Control	-	-
0,03	60,65	36,81
0,06	72,69	59,51
0,12	100,00	100,00

para cada tratamiento y especie. En ambas especies se alcanzó una inhibición total del crecimiento a 0,12 mg.L⁻¹. Los valores de IC, para *S. ferax* al ser expuestos a 0,03 – 0,06 mg.L⁻¹ oscilan entre 60,65 y 72,69 %, ambos superan la concentración inhibitoria media (CIM) cuyo valor se encuentra por debajo de los 0,03 mg.L⁻¹ y resultó en 0,025 mg.L⁻¹. Para *A. racemosa* la inhibición del crecimiento fue mucho más gradual, con valores de IC de 36,81 y 59,51 % para 0,03 y 0,06 mg.L⁻¹ respectivamente; entre estas concentraciones también se ubicó la CIM (0,047 mg.L⁻¹).

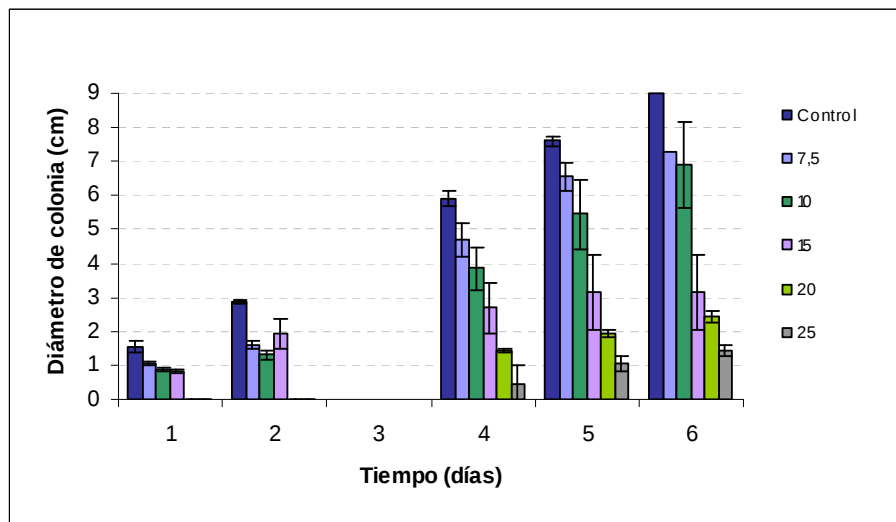


Figura 5.4: Efecto del ClNa sobre el crecimiento de *S. ferax*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en g.L⁻¹.

Cloruro de Sodio (Figuras 5.4 a 5.6)

En el caso de Cloruro de Sodio (ClNa) (Figuras 5.4 y 5.5), el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* fue inhibido a concentraciones por debajo de la Concentración de No efecto (NEC: 28,68 g.L⁻¹) y la CL₁₀ Probit (27,25 g.L⁻¹) para ovas de pejerrey.

S. ferax logró crecer en un espectro más amplio de concentraciones que *A. racemosa*; no obstante en esta especie se observó un retraso en el inicio del crecimiento en las placas expuestas a 20 y 25 g.L⁻¹, el que tuvo lugar al tercer día de exposición; también se observó que el grupo Control creció rápidamente alcanzando el borde de la placa al sexto día de incubación.

El crecimiento de *A. racemosa* se vió afectado por el incremento de la concentración de ClNa en el medio, de manera más drástica, iniciando tardíamente en las placas expuestas a 7,5 y 10 g.L⁻¹, al cuarto y quinto día de exposición respectivamente. A concentraciones superiores a 10 g.L⁻¹ el crecimiento fue totalmente inhibido.

En la Tabla 5.4 se presentan los valores de la Pendiente y el Coeficiente de Determinación (R²). Podemos observar un descenso progresivo de la pendiente al incrementar la concentración, con valores para el Coeficiente de correlación de Pearson (R) que oscilan entre (0,95-1,00), lo que demuestra un alto grado de asociación entre el diámetro de la colonia y el tiempo de exposición.

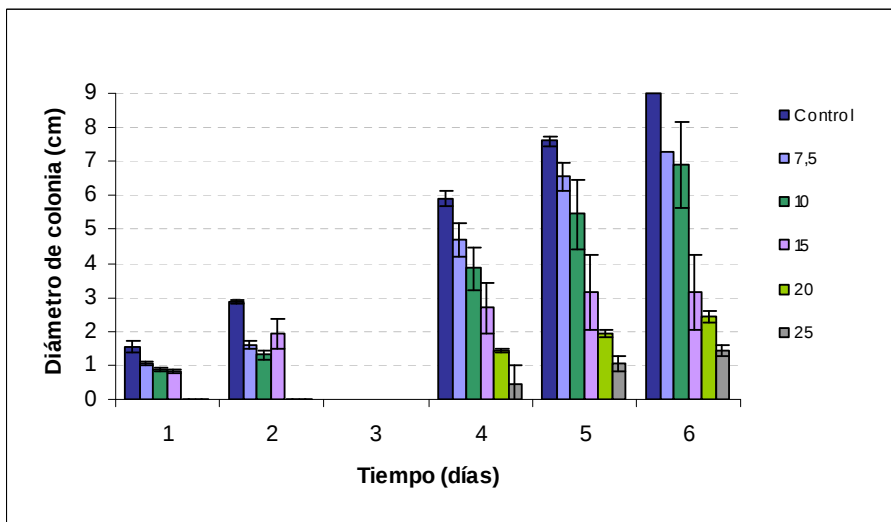


Figura 5.5: Efecto del ClNa sobre el crecimiento de *A. racemosa*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en g.L^{-1} .

Tabla 5.4: Valores de Pendiente, R y R^2 para *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de ClNa. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	<i>Saprolegnia ferax</i>			<i>Achlya racemosa</i>		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
Control	1,50	1,00	1,00	0,55	0,99	0,96
7,5	1,21	0,99	0,95	<i>0,36</i>	0,98	0,85
10	<i>1,07</i>	0,99	0,96	<i>0,10</i>	0,85	0,58
15	<i>0,61</i>	0,95	0,77	0	-	-
20	<i>0,37</i>	0,99	0,85	0	-	-
25	<i>0,19</i>	0,96	0,77	0	-	-
30	0	-	-	0	-	-

En la Figura 5.6 se presenta un esquema comparativo del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*. Aquí se observa con claridad lo mencionado en párrafos anteriores, el efecto inhibitor del Cloruro de Sodio más agudo en *A. racemosa* que en *S. ferax*. En ambas especies se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre el grupo Control y todas las concentraciones ensayadas ($p < 0,05$). Además se observó claramente la mayor tolerancia a la salinidad que exhibe *S. ferax*, en la que observamos un abrupto descenso del crecimiento entre 10 y 15 g.L^{-1} . *A. racemosa*, en cambio mostró un descenso del crecimiento menos pronunciado entre 7,5 y 10

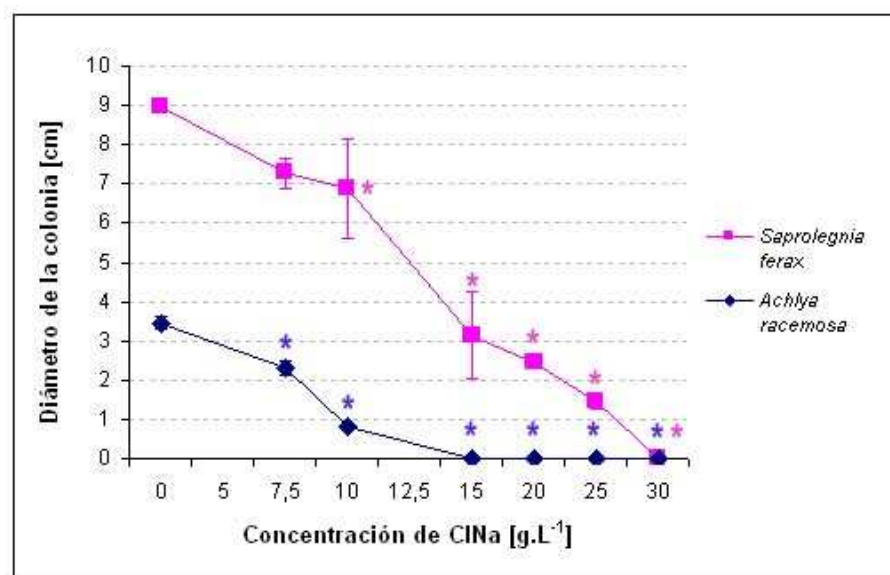


Figura 5.6: Efecto de la concentración de ClNa sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* en GGI. Diámetro registrado luego de 6 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). * : Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Tabla 5.5: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* expuestos a diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio.

Concentración [g.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
Control	-	-
7,5	19,08	33,53
10	23,38	76,88
15	65,03	100,00
20	72,83	100,00
25	83,85	100,00
30	100,00	100,00

g.L⁻¹ y fue totalmente inhibida en 15 g.L⁻¹.

Para ambas especies el ClNa tuvo un efecto inhibitor del crecimiento proporcional a su concentración. Los porcentajes de inhibición para *S. ferax* oscilaron entre 19,08 - 83,85 %; la CIM (13,20 g.L⁻¹) se ubicó entre 10 y 15 g.L⁻¹, finalmente en las placas expuestas a 30 g.L⁻¹ el crecimiento de *S. ferax* fue totalmente inhibido. *A. racemosa* resultó ser más sensible al ClNa, siendo completamente inhibida a 15 g.L⁻¹; los porcentajes de inhibición obtenidos a 7,5 y 10 g.L⁻¹ fueron de 33,53 y

76,88 %; dentro de este rango de concentraciones también se encontró la CIM ($8,50 \text{ g.L}^{-1}$) la que resultó ser menor a la obtenida para *S. ferax*.

Formalina (Figura 5.7)

El efecto de la Formalina sobre estas especies fue bastante notorio. Se puede observar una inhibición total del crecimiento a concentraciones mucho menores que la NEC para ovas de pejerrey ($530 \mu\text{L.L}^{-1}$). *Saprolegnia ferax* no logró crecer en ninguna de las concentraciones ensayadas; por su parte *A. racemosa* sólo logró crecer en $20 \mu\text{L.L}^{-1}$; el efecto de la Formalina sobre el crecimiento de esta especie se ilustra en la Figura 5.7.

En la Tabla 5.6 se observa que la pendiente de *A. racemosa* mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo Control y el tratamiento con $20 \mu\text{L.L}^{-1}$. Los valores elevados para los Coeficientes de Correlación de Pearson y de Determinación indican un buen ajuste de los datos al modelo.

Puesto que *Saprolegnia ferax* no creció en ninguna de las concentraciones ensayadas obviaremos la presentación del gráfico que ilustra comparativamente el efecto de la Formalina sobre ambas especies.

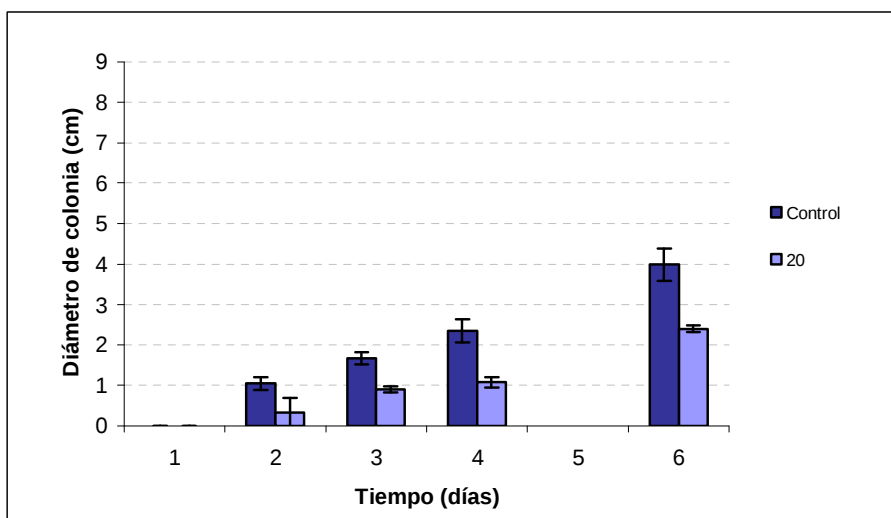


Figura 5.7: Efecto de la Formalina sobre el crecimiento de *A. racemosa*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en $\mu\text{L.L}^{-1}$.

Tabla 5.6: Valores de Pendiente, R y R^2 para *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Formalina. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [$\mu\text{L.L}^{-1}$]	<i>Saprolegnia ferax</i>			<i>Achlya racemosa</i>		
	Pendiente	R	R^2	Pendiente	R	R^2
Control	0	-	-	0,61	1,00	0,94
20	0	-	-	<i>0,33</i>	0,99	0,96
40	0	-	-	0	-	-
80	0	-	-	0	-	-

Tabla 5.7: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Formalina.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
Control	-	-
20	100,00	39,75
40	100,00	100,00
80	100,00	100,00
150	100,00	100,00
250	100,00	100,00

En la Tabla 5.7 se presentan los Porcentajes de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a Formalina. A una concentración de $20 \mu\text{L.L}^{-1}$ la IC de *A. racemosa* fue de 39,75 % mientras que a $40 \mu\text{L.L}^{-1}$ alcanza el 100 %, entre ambas concentraciones se encuentra la CIM ($23,40 \mu\text{L.L}^{-1}$).

Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Figuras 5.8 a 5.10) Las Figuras 5.8 y 5.9 muestran el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* expuestas al Ácido Acético Glacial (AcH); el rango de concentraciones ensayadas no ejerció efecto inhibitorio sobre la TC de ambas especies.

El crecimiento de *S. ferax* se vió estimulado a una concentración de 10 mg.L⁻¹ de AcH; a pesar de que a concentraciones superiores a los 15 mg.L⁻¹ se observó un efecto levemente inhibitor, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las TC del grupo Control y las placas expuestas a 200 mg.L⁻¹. En esta concentración también se observó un retraso en el inicio del crecimiento, el que empezó el cuarto día de exposición.

El AcH tampoco tuvo un efecto inhibitorio sobre *A. racemosa*, pero a diferencia de *S. ferax*, el crecimiento en las placas expuestas a 10 y 25 mg.L⁻¹ fue menor al obtenido en el grupo Control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), además en esta especie se observó la total inhibición del crecimiento en 200 mg.L⁻¹.

En la Tabla 5.8 se presentan los valores de la Pendiente, Coeficiente de Correlación de Pearson y Coeficiente de Determinación, correspondientes a la recta de regresión. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson para *S. ferax* oscilan

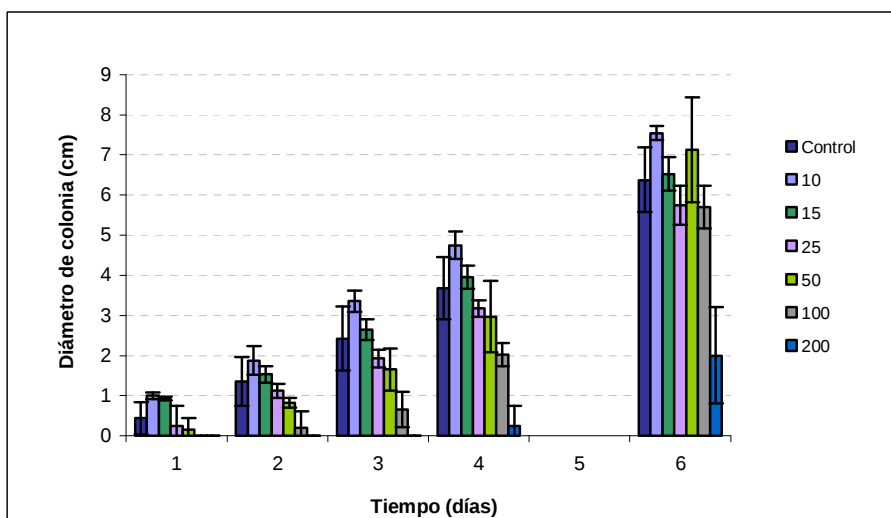


Figura 5.8: Efecto del Ácido Acético Glacial sobre el crecimiento de *S. ferax*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

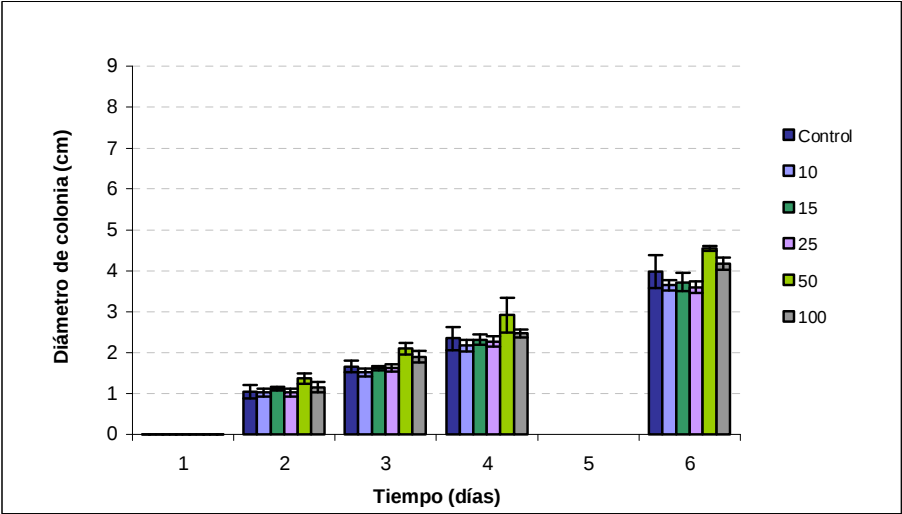


Figura 5.9: Efecto del Ácido Acético Glacial sobre el crecimiento de *A. racemosa*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

Tabla 5.8: Valores de Pendiente, R y R^2 para *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Glacial. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Saprolegnia ferax			Achlya racemosa		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
Control	0,96	1,00	0,94	0,61	1,00	0,94
10	1,20	1,00	0,98	<i>0,56</i>	1,00	0,94
15	1,01	0,99	0,97	0,59	0,99	0,95
25	0,84	0,99	0,92	<i>0,57</i>	1,00	0,95
50	0,93	0,97	0,81	0,73	0,99	0,95
100	0,68	0,95	0,69	0,65	1,00	0,94
200	<i>0,20</i>	0,86	0,51	0	-	-

entre (0,86-1,00); el limite inferior de este rango corresponde al valor obtenido en las placas expuestas a 200 mg.L^{-1} y su valor es más bajo debido a que la recta fue trazada únicamente con dos puntos de medición; para *A. racemosa* éstos valores se encontraron entre (0,99-1,00) e indican un buen ajuste de los datos a la recta de regresión.

La Figura 5.10 ilustra comparativamente la respuesta de *S. ferax* y *A. racemosa*, en un período de exposición de 6 días; como podemos observar ambas especies describieron un patrón de respuesta comparable al incremento en la concentración de Ácido Acético.

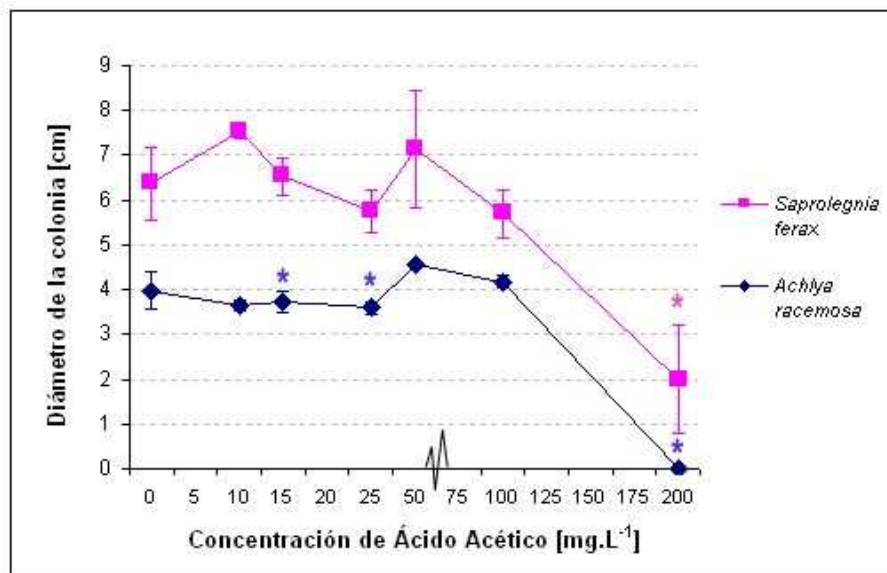


Figura 5.10: Efecto del Ácido Acético Glacial sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* en GGI. Diámetro registrado luego de 6 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Tabla 5.9: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Glacial.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
Control	-	-
10	-18,34	8,37
15	-2,27	6,49
25	9,87	9,62
50	-11,68	-14,23
100	10,66	-4,81
200	68,65	100,00

En la Tabla 5.9 se muestran las IC, que para ambas especies la CIM para ambas especies se ubica entre los 100 y 200 mg.L⁻¹, siendo 167,84 y 152,3 mg.L⁻¹ para *S. ferax* y *A. racemosa*, respectivamente.

Ácido Acético Tamponado (Figuras 5.11 a 5.13) En las Figuras 5.11 y 5.12 se presentan las respuestas de *S. ferax* y *A. racemosa* a la exposición al Ácido Acético Tamponado (AcHT); el efecto tóxico de esta sustancia se observó claramente en

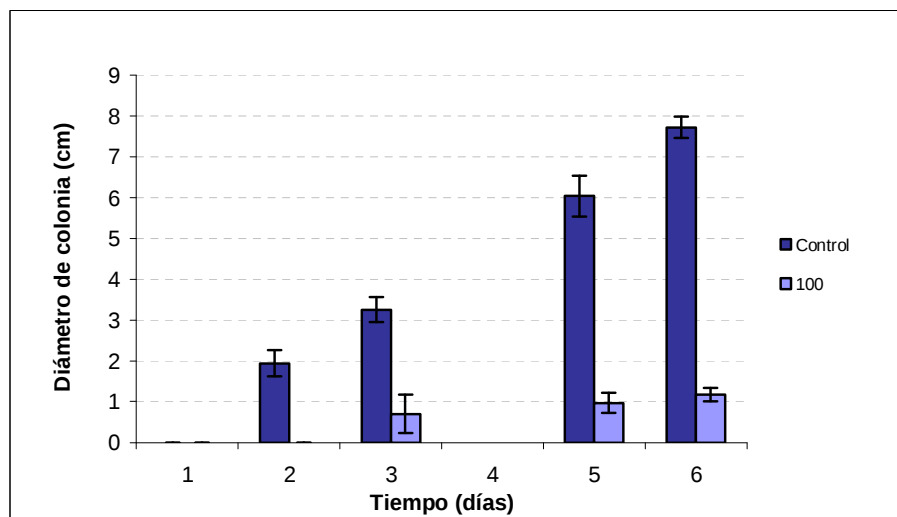


Figura 5.11: Efecto del Ácido Acético Tamponado sobre el crecimiento de *S. ferax*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

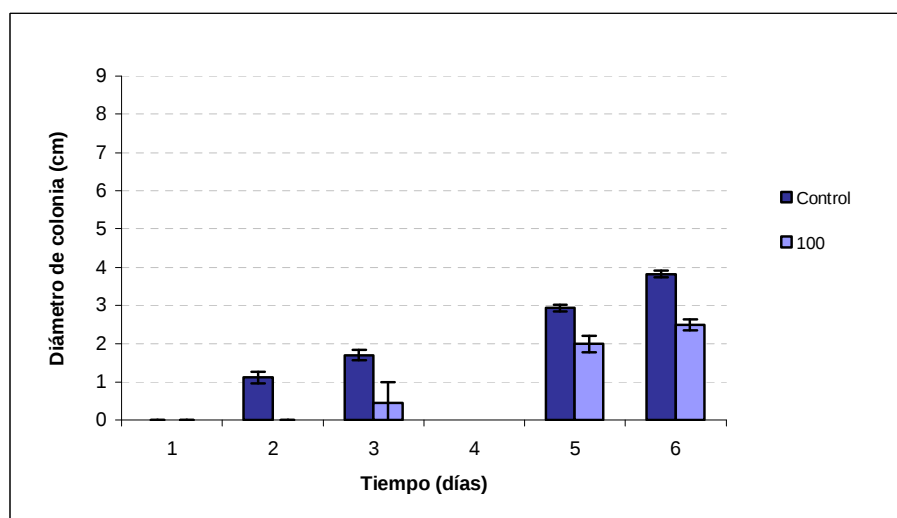


Figura 5.12: Efecto del Ácido Acético Tamponado sobre el crecimiento de *A. racemosa*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

ambas especies, ya que sólo lograron crecer luego del tercer día de exposición y en la más baja de las concentraciones empleadas para los ensayos. Concentraciones superiores a los 100 mg.L^{-1} tuvieron un efecto letal sobre ambas especies; estos resultados indican que existe un amplio rango amplio de concentraciones con efecto fungicida que se encuentra por debajo de la NEC correspondiente ($532,90 \text{ mg.L}^{-1}$).

En la Tabla 5.10 se presenta los valores de las Pendientes, Coeficiente de corre-

Tabla 5.10: Valores de Pendiente, R y R^2 para *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Tamponado. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	<i>Saprolegnia ferax</i>			<i>Achlya racemosa</i>		
	Pendiente	R	R^2	Pendiente	R	R^2
Control	1,20	1,00	0,95	0,60	0,99	0,95
100	<i>0,19</i>	0,96	0,83	<i>0,35</i>	0,97	0,79
200	0	-	-	0	-	-
400	0	-	-	0	-	-
600	0	-	-	0	-	-
800	0	-	-	0	-	-

lación de Pearson y Coeficiente de Determinación; en ambos casos los valores de la Pendiente en los grupos expuestos a 100 mg.L⁻¹ fueron significativamente inferiores a los obtenidos en el grupo Control. Los valores para el Coeficiente de correlación de Pearson y Coeficiente de Determinación son elevados indicando un buen ajuste de los datos al modelo.

En la Figura 5.13, podemos ver que tanto *S. ferax* como *A. racemosa* exhibieron una respuesta similar al Ácido Acético tamponado.

En la Tabla 5.11 se presentan las IC para ambas especies; así tenemos que *S. ferax* resultó ser más sensible al Ácido Acético Tamponado que *A. racemosa*. En las placas expuestas a 100 mg.L⁻¹, la IC de *S. ferax* fue de 84,78 %, y la CIM se ubicó por debajo de los 100 mg.L⁻¹ resultando en (58,97 mg.L⁻¹); mientras que para *A. racemosa* la inhibición del crecimiento correspondiente a 100 mg.L⁻¹ fue del 34,55 %, y la CIM (123,61 mg.L⁻¹) se ubicó entre los 100 y 200 mg.L⁻¹.

Compuestos Iodados (Figuras 5.14 a 5.19)

Ioduro de Potasio (Figuras 5.14 a 5.16) El efecto del Ioduro de Potasio (IK) sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* se presenta en las Figuras 5.14 y 5.15. Como podemos observar ambas especies lograron crecer en todas las concentraciones ensayadas, el IK no tuvo un efecto letal sobre las cepas en estudio. Se puede apreciar que algunas concentraciones tuvieron un efecto levemente estimulador del crecimiento, como el observado en *S. ferax* al ser expuesta a 20 y 50 mg.L⁻¹ aunque éste no resultó estadísticamente significativo. En *A. racemosa* la estimulación

Tabla 5.11: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Tamponado.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
Control	-	-
100	84,78	34,55
200	100,00	100,00
400	100,00	100,00
600	100,00	100,00
800	100,00	100,00

del crecimiento observada en las placas expuestas 10 – 80 mg.L⁻¹ de IK ha sido demostrada estadísticamente, encontrándose diferencias significativas con el grupo Control. Cabe señalar que en ambos casos los rangos de concentraciones ensayadas supera los valores de NEC para ovas de pejerrey, los que fueron: de 50,30 y 147,00 mg.L⁻¹ en ClNa 0,9 % y ADR respectivamente.

Los valores de la Pendiente, presentados en la Tabla 5.12, se correlacionan con lo

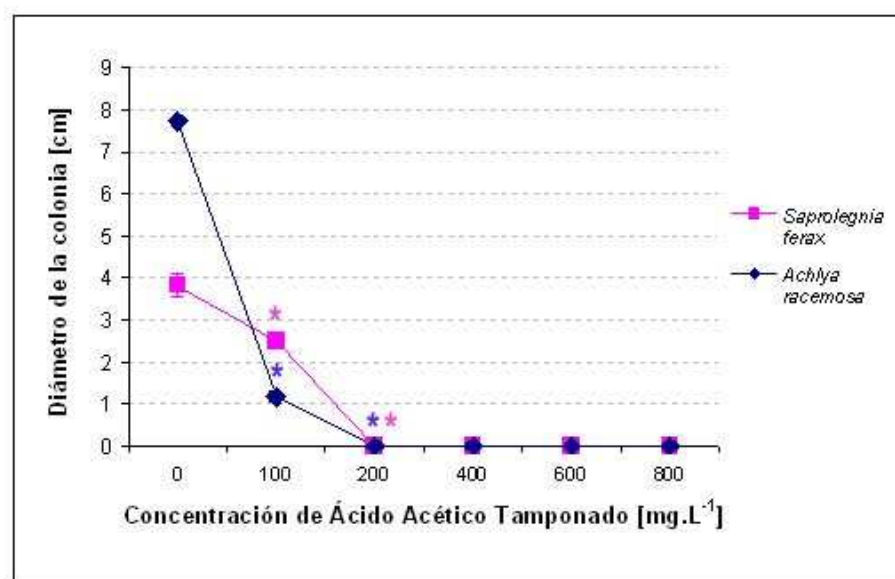


Figura 5.13: Efecto de la concentración de Ácido Acético tamponado sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*. Diámetro registrado luego de 6 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

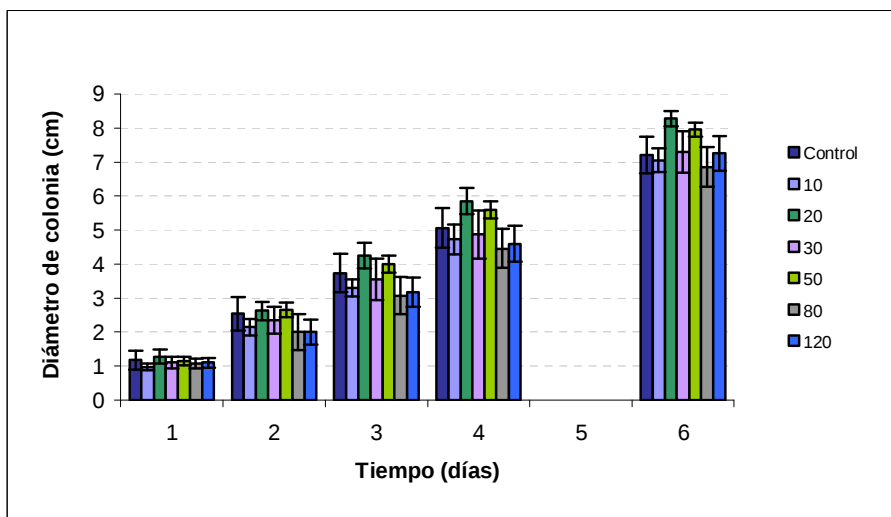


Figura 5.14: Efecto del IK sobre el crecimiento de *S. ferax*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

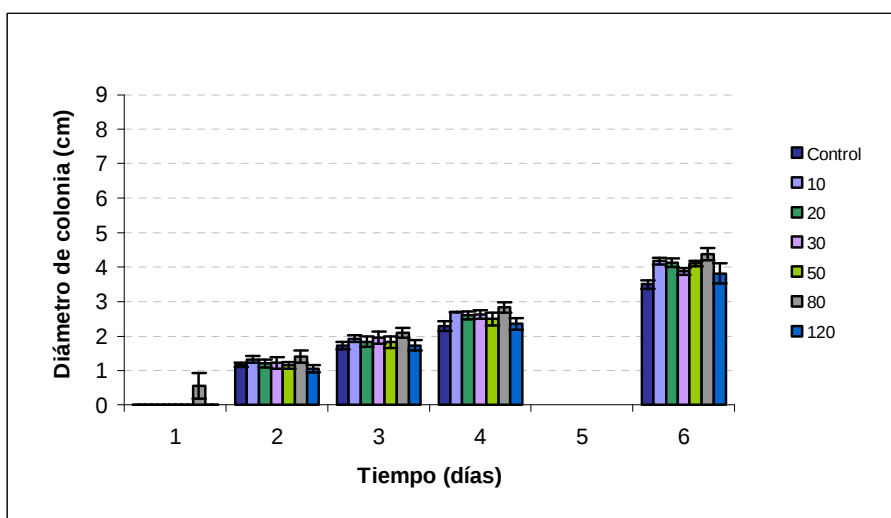


Figura 5.15: Efecto del IK sobre el crecimiento de *A. racemosa*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

observado en los gráficos anteriores; las variaciones en las pendientes son aleatorias y no están relacionadas con la concentración.

En la Figura 5.16 podemos observar que al sexto día de exposición el crecimiento de ambas especies permanece inalterado por el incremento de la concentración de IK, sin embargo en *A. racemosa* éste fue ligeramente estimulado en concentraciones de hasta 80 mg.L^{-1} .

Tabla 5.12: Valores de Pendiente, R y R^2 para *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de IK. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	<i>Saprolegnia ferax</i>			<i>Achlya racemosa</i>		
	Pendiente	R	R^2	Pendiente	R	R^2
Control	1,23	1,00	1,00	0,57	0,99	0,95
10	1,16	1,00	1,00	0,67	0,992	0,95
20	1,40	1,00	1,00	0,65	0,995	0,95
30	1,21	1,00	1,00	0,64	0,99	0,95
50	1,34	1,00	1,00	0,64	1,00	0,95
80	1,11	1,00	0,99	0,72	1,00	1,00
120	1,16	1,00	0,99	0,60	1,00	0,95

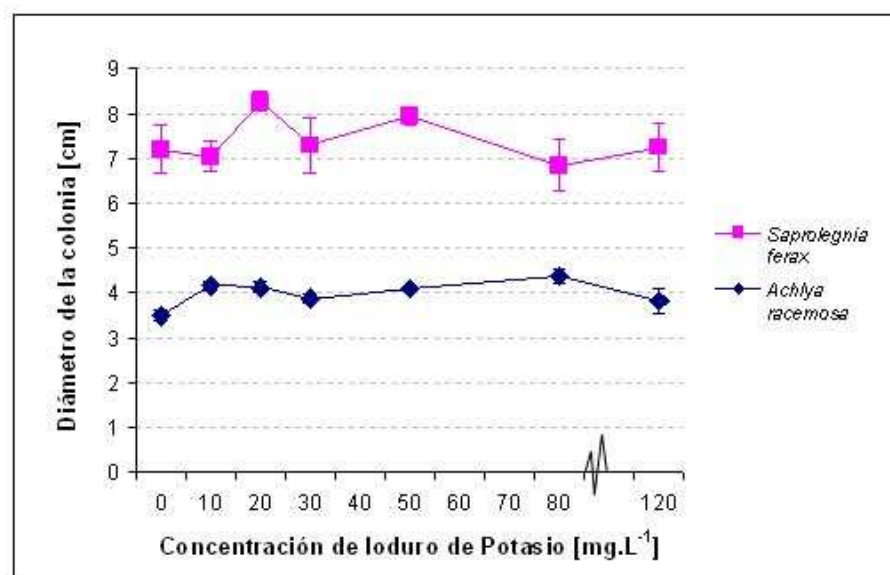


Figura 5.16: Efecto del IK sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* en GGI. Diámetro registrado luego de 6 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

La Tabla 5.13 muestra los porcentajes de inhibición del crecimiento de ambas especies, obtenidos en las distintas concentraciones de IK. En *S. ferax*, a lo largo del perfil de concentraciones se alternan indistintamente efectos levemente inhibitorios y estimulantes; el porcentaje de inhibición máximo alcanzado fue de 4,86 % a 80 mg.L⁻¹. En *A. racemosa* se observan valores de IC negativos, los que indican que el IK actuaría estimulando el crecimiento de esta especie.

Tabla 5.13: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de IK.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
Control	-	-
10	2,08	-19,29
20	-14,93	-17,86
30	-1,39	-10,71
50	-10,42	-17,14
80	4,86	-25,00
120	-0,69	-9,29

Iodopovidona (Figuras 5.17 a 5.19) El efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* se ilustra en las Figuras 5.17 y 5.18; la TC de ambas especies no logró ser totalmente inhibida por dicha sustancia. Considerando que la NEC de la Iodopovidona para ovas de pejerrey en una solución isotónica fue de 41,80 mg.L⁻¹ mientras que en ADR fue de 119,60 mg.L⁻¹; podemos afirmar que, en un rango de concentraciones inferior a la NEC o en este caso la CL₁₀ del Probit 98,7 mg.L⁻¹, la Iodopovidona no ejerce un efecto fungicida o fungistático sobre *S. ferax* y *A. racemosa*.

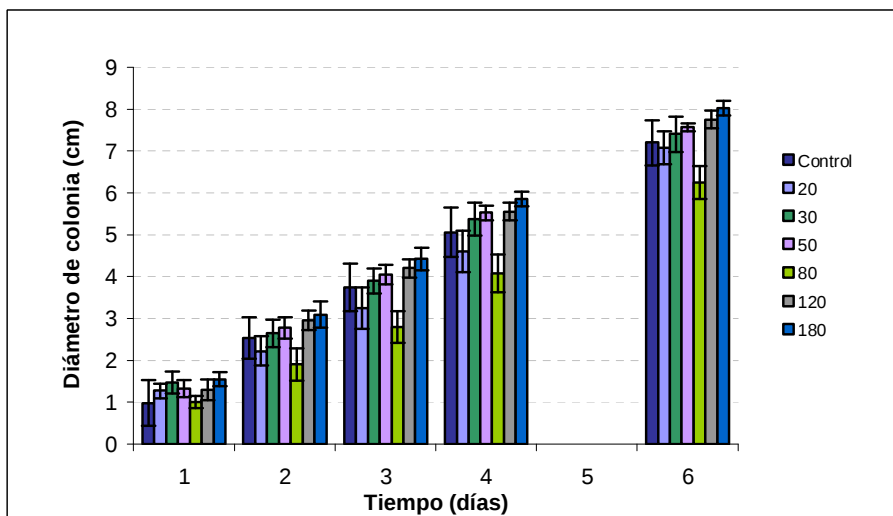


Figura 5.17: Efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *S. ferax*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

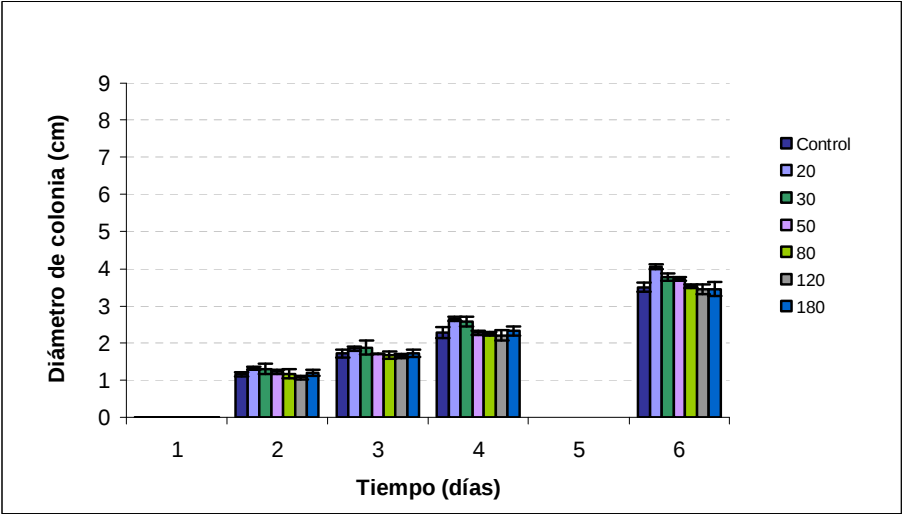


Figura 5.18: Efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *A. racemosa*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

En la Tabla 5.14 se presentan los valores de Pendiente, Coeficiente de correlación de Pearson y Coeficiente de determinación para ambas especies expuestas a Iodopovidona. En *Saprolegnia ferax* se observó que una concentración de 180 mg.L^{-1} ejerce un efecto estimulador del crecimiento; mientras en *Achlya racemosa* se observó un efecto semejante en las placas expuestas a 20 mg.L^{-1} , y en las expuestas a 120 y 180 mg.L^{-1} se observó un efecto inhibitorio de la Iodopovidona sobre esta especie.

Como podemos observar en la Figura 5.19, la Iodopovidona sólo ejerció un efecto negativo sobre el crecimiento de *S. ferax* a 80 mg.L^{-1} mientras que en *A. racemosa*

Tabla 5.14: Valores de Pendiente, R y R^2 para *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Iodopovidona. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Saprolegnia ferax			Achlya racemosa		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
Control	1,22	1,00	1,00	0,57	0,99	0,95
20	1,16	1,00	1,00	0,65	0,99	0,95
30	1,28	1,00	0,99	0,62	0,99	0,95
50	1,31	1,00	0,99	0,59	0,99	0,95
80	1,02	1,00	0,99	0,57	0,99	0,95
120	1,34	1,00	0,99	0,56	0,99	0,95
180	1,40	1,00	0,99	0,57	0,99	0,95

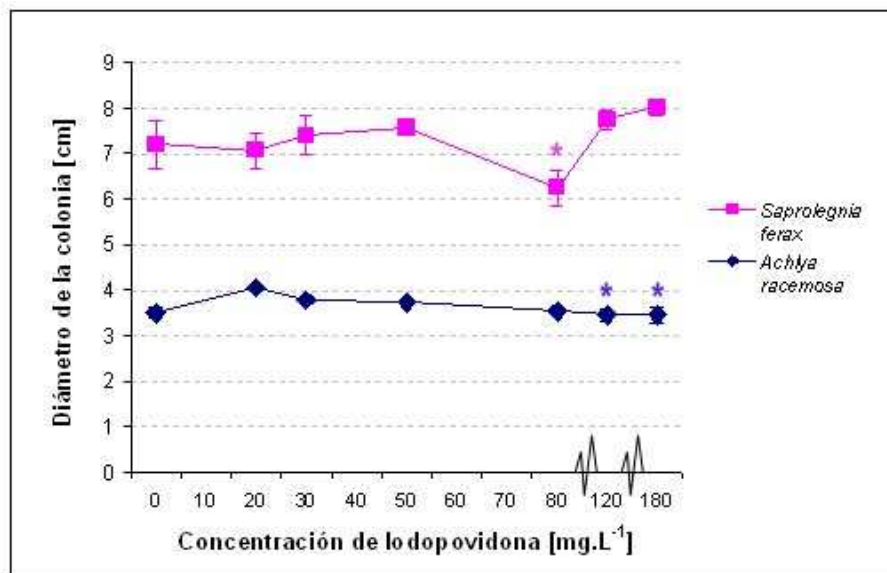


Figura 5.19: Efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* en GGI. Diámetro registrado luego de 6 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

éste fue observado a 120 y 180 mg.L⁻¹.

En la Tabla 5.15 se presentan los porcentajes de IC de *S. ferax* y *A. racemosa* expuestas a Iodopovidona; encontramos que esta sustancia no tuvo un efecto inhibitor directamente relacionado con su concentración, ya que en ambas especies se observó de manera alternada y aleatoria la inhibición y estimulación del crecimiento motivo por el cual la CIM no pudo ser calculada.

Tabla 5.15: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestos a diferentes concentraciones de Iodopovidona.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Saprolegnia ferax</i>	<i>Achlya racemosa</i>
Control	-	-
20	1,74	-15,71
30	-2,78	-7,86
50	-5,21	-6,43
80	13,19	-0,71
120	-7,64	1,43
180	-11,46	1,43

Finalmente, podemos concluir que el crecimiento de ambas especies respondió a un modelo de regresión lineal simple de origen en cero, tal como lo demuestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson presentados más adelante. En términos generales, los valores del Coeficiente de Determinación indican qué proporción de las variaciones en el diámetro de la colonia, para cada concentración, están determinadas por la variación en el tiempo de exposición. Por éste motivo la Tasa de Crecimiento (TC) fue expresada como la pendiente de la recta de regresión de los diámetros de la colonia obtenidos en cada tratamiento y a cada concentración.

Los valores de las pendientes indicaron que, en ausencia del agente fungicida, la Tasa de Crecimiento de *Saprolegnia ferax* fue el doble que la de *Achlya racemosa* (relación 2.0-2.2). En ambas especies el Coeficiente de Pearson mostró un alto grado de asociación entre el tiempo de exposición y el crecimiento en las diferentes concentraciones de cada una de las sustancias. En general, todos los tratamientos tuvieron un efecto inhibitorio sobre la TC de ambas especies respecto a los Controles, proporcional a la concentración, y estadísticamente significativo.

5.3.2. Efecto de los Fungicidas sobre los caracteres morfológicos

A continuación se describen las alteraciones morfológicas en las estructuras vegetativas y reproductivas sexuales observadas en *S. ferax* y *A. racemosa*; observadas al ser expuestas a diferentes concentraciones de: Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, Ácido Acético Glacial, Ácido Acético tamponado y dos compuestos iodados: Ioduro de Potasio y Iodopovidona. Además de las descripciones se presentan fotografías que ilustran las características observadas más llamativas, para cada tratamiento.

Las estructuras reproductivas sexuales femeninas u oogonios presentaron una diversidad en tamaños y formas, y también una considerable variación en cuanto a su abundancia y distribución numérica entre concentraciones en un mismo tratamiento, así como entre réplicas de una misma concentración. Estas se ilustran en Figuras que serán presentadas individualmente para cada sustancia y especie. Las Tablas 5.16 y 5.17 acompañan a estas Figuras mostrando el promedio y desvío estándar para el recuento de oogonios en las diferentes condiciones ensayadas.

Tabla 5.16: Valores promedio y desvio estándar del recuento de oogonios de *Saprolegnia ferax* en diferentes condiciones de cultivo.

Tratamientos	Concentraciones mg.L ⁻¹						
Verde de Malaquita	Control	0,03	0,06	0,125	-	-	-
Promedio	429,00	260,00	276,00	4010,00	-	-	-
Desviación estandar	314,63	208,74	78,32	517,57	-	-	-
Ácido Acético	Control	10	15	25	50	100	200
Promedio	3932,00	8134,67	3938,00	4480,80	3921,33	3424,00	1041,00
Desviación estandar	275,30	964,54	946,96	2252,68	284,66	1314,55	375,49
Ácido Acético tamponado	Control	100	-	-	-	-	-
Promedio	786,67	1139,00	-	-	-	-	-
Desviación estandar	325,51	79,09	-	-	-	-	-
Ioduro de Potasio	Control	10	20	30	50	80	120
Promedio	1155,00	805,00	786,00	1152,00	1044,00	2195,00	2005,00
Desviación estandar	257,94	213,53	337,99	319,22	792,91	476,83	954,76
Iodopovidona	Control	20	30	50	80	120	180
Promedio	1155,00	454,00	1440,00	1101,00	856,00	611,00	1260,00
Desviación estandar	257,94	428,05	294,01	340,19	109,45	167,02	186,61

Tabla 5.17: Valores promedio y desvio estándar del recuento de oogonios de *Achlya racemosa* en diferentes condiciones de cultivo.

Tratamientos	Concentraciones mg.L ⁻¹						
Verde de Malaquita	Control	0,03	0,06	0,125	0,25		
Promedio	285,00	404,00	54,00	69,00	60,80		
Desviación estandar	72,62	171,11	28,19	116,96	54,66		
Ácido Acético	Control	10	15	25	50	100	200
Promedio	298,00	1440,57	1420,00	2120,00	1139,00	704,00	
Desviación estandar	165,26	581,92	694,31	420,91	573,10	159,10	
Ioduro de Potasio	Control	10	20	30	50	80	120
Promedio	53,00	404,00	1024,00	293,00	450,00	367,00	95,00
Desviación estandar	22,72	199,49	953,64	107,94	237,64	379,86	78,95
Iodopovidona	Control	20	30	50	80	120	180
Promedio	53,00	1517,00	68,00	807,00	573,00	400,00	626,40
Desviación estandar	22,72	731,74	48,22	1011,48	361,99	444,32	496,46

Verde de Malaquita

***Saprolegnia ferax* (Figura 5.20)** En el grupo Control de *S. ferax*, no se observaron alteraciones en el micelio; se encontraron yemas irregulares, dispersas; oogonios esféricos o piriformes, variables en número, algunos conteniendo oosporas maduras en su interior. En las placas expuestas a $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ encontramos numerosas yemas simples, esféricas, catenuladas e irregulares, entremezcladas con oogonios; a diferencia del grupo Control, en esta concentración no se observaron oosporas desarrolladas o maduras. En $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$, también se encontraron numerosas yemas irregulares y más delgadas que en los anteriores tratamientos. En el grupo expuesto a $0,125 \text{ mg.L}^{-1}$, solamente se observó crecimiento en 2 réplicas, con incremento considerable en el número de oogonios, los que fueron mayormente esféricos o piriformes, conteniendo en su interior abundantes oosporas (14 - 16) bien formadas y maduras.

La distribución de la frecuencia de oogonios por concentración se ilustra en la Figura 5.20, los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se muestran en la Tabla 5.16. En los tratamientos con VM el número de oogonios de *S. ferax* disminuyó de 429 oogonios/placa, valor promedio obtenido en el grupo Control, hasta 260 en el grupo expuesto a $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ y en $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ el número de oogonios permaneció relativamente constante; en ambas concentraciones se observó un alto

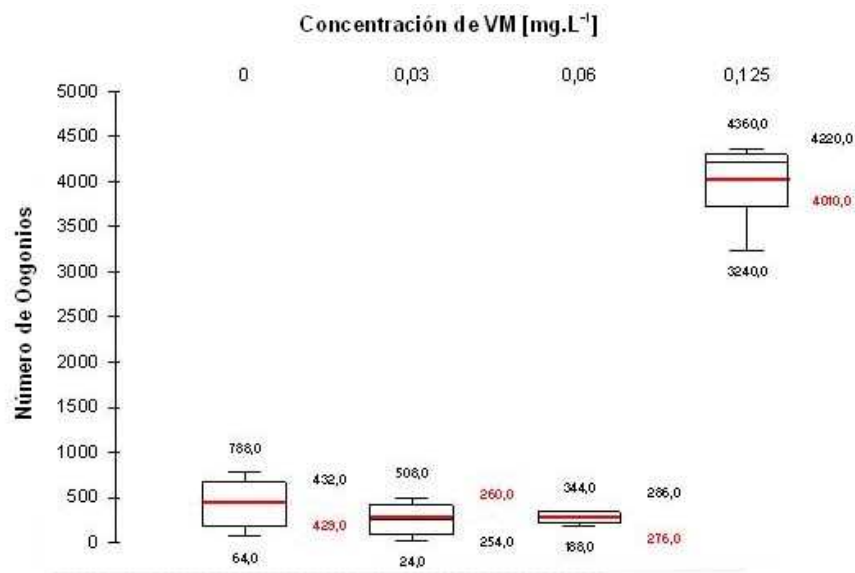


Figura 5.20: Variaciones en el número de oogonios en *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de VM (mg.L^{-1}). En rojo el promedio, en negro la mediana.

grado de variabilidad entre réplicas. Finalmente en los tratamientos con $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$ se observó un notable incremento del número de oogonios alcanzando un promedio 4010 oogonios por placa.

***Achlya racemosa* (Figuras 5.21 y 5.22)** Durante los primeros 6 días de exposición al VM *A. racemosa* creció hasta en $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$, posteriormente también se observó crecimiento en las placas expuestas a $0,12$ y $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$. En grupo el Control se observó un micelio denso con abundantes yemas y escasos oogonios esféricos algunos **proliferando**. Los términos **proliferando** o **proliferante** se refieren a la presencia de un ensanchamiento en la base del oogonio, el que es generalmente esférico, cilíndrico o alargado, único o repetido, sésil o pedicelado; que puede o no resolverse en un oogonio terminal con oosporas maduras o inmaduras en su interior. En las placas expuestas a $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ se observó un micelio con concentraciones intracitoplasmáticas electrodensas con abundantes ramificaciones laterales; y oogo-

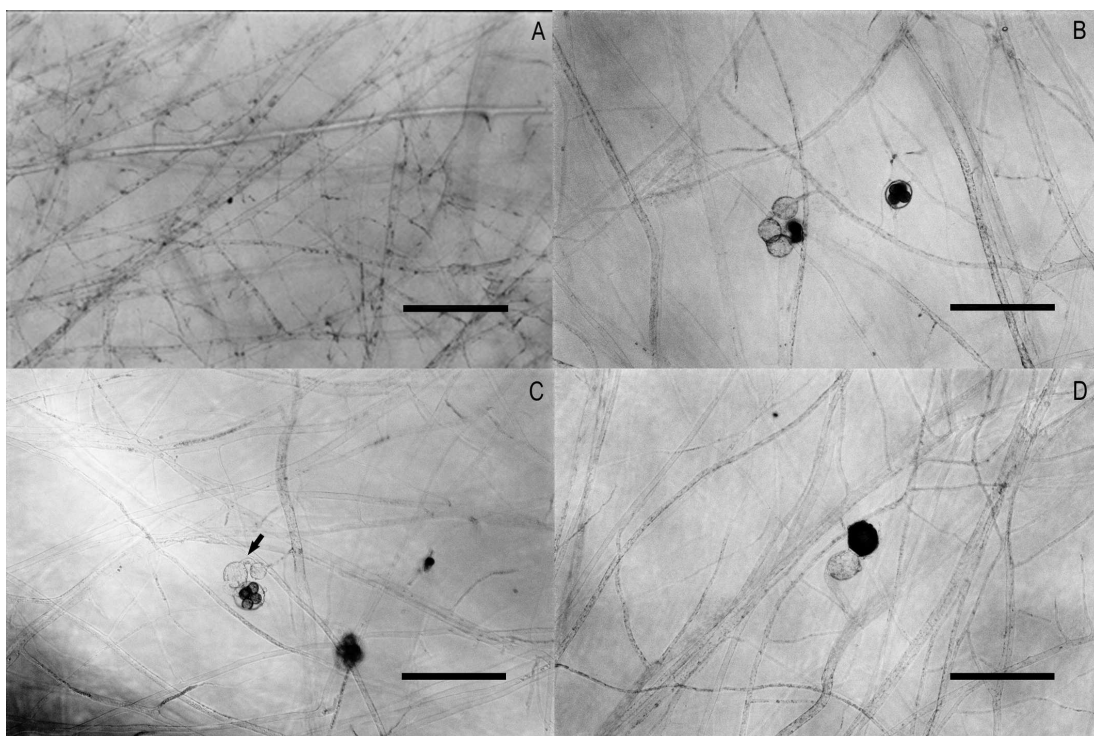


Figura 5.21: Variaciones en la morfología de *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de VM. A.- Hifas con contenido electrodense ramificadas lateralmente. Oogonios **proliferando** B.- varias veces. C.- pedicelado resuelto terminalmente. D.- no resuelto. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

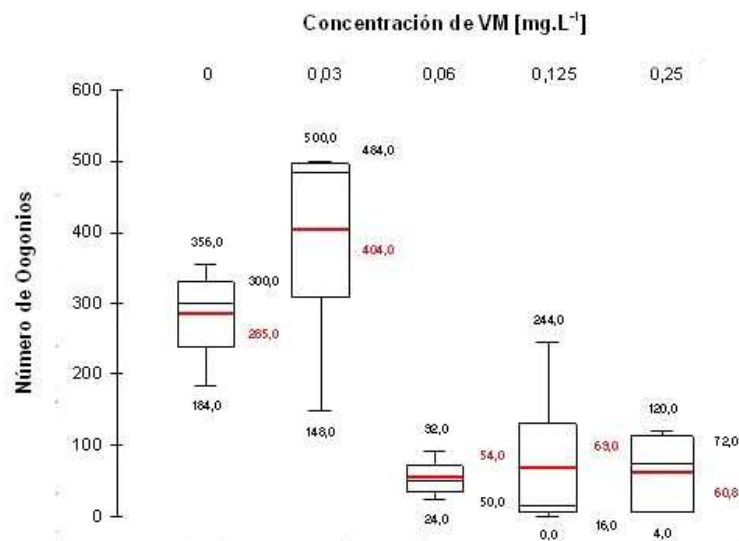


Figura 5.22: Variaciones en el número de oogonios en *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de VM (mg.L⁻¹). En rojo el promedio, en negro la mediana.

nios mucho más abundantes que en el grupo Control. En 0,06 mg.L⁻¹, disminuye el número de yemas y los oogonios son muy escasos. Mientras que en 0,125 mg.L⁻¹, aumenta el número de yemas, pero están dispersas; se observan oogonios esféricos, **proliferando**, con hasta 12 oosporas en su interior. Finalmente en 0,25 mg.L⁻¹ observamos hifas hialinas predominantemente delgadas en la periferia, yemas escasas o ausentes; oogonios variables en número, esféricos, algunos cilíndricos y ornamentados **proliferando**.

La Figura 5.22 ilustra la frecuencia de oogonios por concentración; los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.17. En los tratamientos con VM el número de oogonios de *A. racemosa* aumentó desde un valor promedio de 285 oogonios/placa, obtenido en el grupo Control, a 404 en el grupo expuesto a 0,03 mg.L⁻¹, para posteriormente disminuir a 54 oogonios/placa; en 0,06 mg.L⁻¹ el número de oogonios sufrió leves variaciones en las concentraciones posteriores, no obstante en la placas expuestas a 0,125 mg.L⁻¹ se observó un alto grado de variabilidad entre réplicas.

Podemos concluir que el Verde de Malaquita tuvo un efecto letal sobre ambas especies a concentraciones por debajo de la NEC para ovas de pejerrey (0,51 mg.L⁻¹). *S. ferax* resultó ser más sensible a esta sustancia que *A. racemosa*. Los valores promedio de número de oogonios de *S. ferax* y *A. racemosa* y el desvío estándar se

presentan en las Tablas 5.16 y 5.17 respectivamente.

Cloruro de Sodio (Figuras 5.23 y 5.24)

Saprolegnia ferax En el grupo Control de *S. ferax*, no se observaron características particulares o llamativas en el micelio; la presencia de oogonios fue observada únicamente en este grupo, estos fueron numerosos, esféricos, con abundantes oosporas en su interior. En las placas expuestas a $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ se observaron hifas de paredes sinuosas con extremos curvos, micelio con abundantes acumulaciones intracitoplasmáticas electrodensas distribuidas uniformemente a lo largo de su extensión, otorgándole un aspecto amarronado. Estas hifas oscuras se encontraron entremezcladas con escasas hifas hialinas de aspecto normal, el diámetro de las hifas osciló entre los $10 - 20 \mu\text{m}$.; raramente se observó la presencia de yemas. Al incrementar al concentración a 10 g.L^{-1} se observó que las hifas amarronadas disminuyeron su diámetro a $1 \mu\text{m}$., formando ramificaciones angulosas, dicotómicas rectas o articuladas de tipo arborescente, también se observaron hifas de aspecto sinuoso enredadas o entrelazadas entre si, pero dispuestas de manera más dispersa. En 15 g.L^{-1} el micelio crece inmerso en el agar, es llamativa la presencia de hifas de extremos enrulados, helicoidales, también se observaron hifas con ramificaciones secundarias cortas y de contenido electrodenso, dispuestas cimosamente. Finalmente, en las placas expuestas a 20 y 25 g.L^{-1} la reducción de crecimiento es notoria, con hifas de extremos curvos y ramificados que se entrelazan dispersas y abiertas.

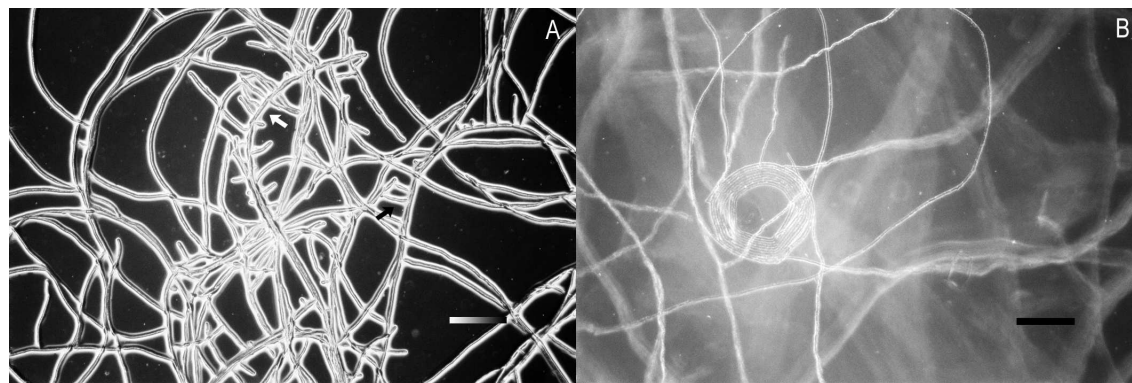


Figura 5.23: Variaciones morfológicas en *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de ClNa. A.- Ramificaciones secundarias cortas. B.- Hifas de extremos enrulados, helicoidales. Barra de escala = $100 \mu\text{m}$.

Achlya racemosa *A. racemosa* resultó ser más sensible al ClNa, esta especie creció únicamente en las placas expuestas a 7,5 y 10 g.L⁻¹. En el grupo Control el aspecto general de micelio es normal, se observaron hifas rectas de contorno definido y grosor variable; oogonios ausentes. En las placas expuestas a 7,5 g.L⁻¹ se observó constricciones y contenido electrodensos en el micelio, y la presencia de hifas ramificadas delgadas más abiertas en su extremo apical, de 20 μm de diámetro. Al incrementar la concentración a 10 g.L⁻¹, observamos que las constricciones hifales persisten, predominan los extremos hifales arqueados y ramificados en hifas más gruesas y abiertas de hasta 40 μm de diámetro.

El Cloruro de Sodio tuvo un efecto letal sobre ambas especies a concentraciones por debajo de la NEC para ovas de pejerrey (28,68 g.L⁻¹). *A. racemosa* resultó ser más sensible a esta sustancia que *S. ferax*. Una característica llamativa del crecimiento en ClNa es que ninguna de las especies empleadas en los ensayos desarrollaron oogonios.

Ácido Acético (Figuras 5.25 a 5.28)

Ácido Acético Glacial (Figuras 5.25 y 5.26)

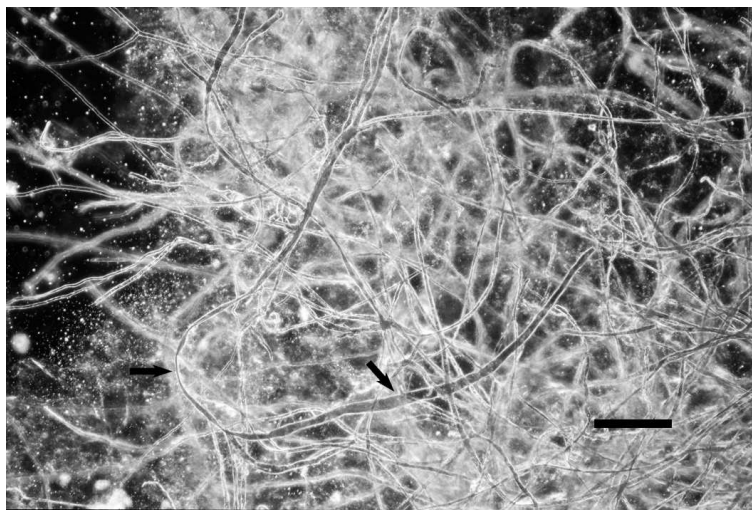


Figura 5.24: Variaciones morfológicas de *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de ClNa. Hifas de espesor variable. Barra de escala = 100 μm.

Saprolegnia ferax En el grupo Control de *S. ferax* se observó abundante micelio delicado, recto, sinuoso o enrulado, muy entramado, con escasas yemas catenuladas e irregulares; y oogonios esféricos con oosporas maduras. En las placas expuestas a 10 y 15 mg.L⁻¹ se observaron características morfológicas similares: hifas rectas y más separadas que en el grupo Control, mezcladas con escasas hifas ensortijadas; mayor cantidad de yemas irregulares, catenuladas e intercalares; numerosos oogonios inmaduros, alargados, con contenido difuso, algunos hialinos y de pared gruesa otros **proliferando**. En las placas expuestas a 15 mg.L⁻¹ se observaron numerosas oosporas 7-10 (14); pies de los oogonios predominantemente helicoidales, inclinados o curvos. Al incrementar la concentración a 25 mg.L⁻¹ el micelio se dispone más disperso o abierto, con hifas rectas, sinuosas o curvas, de grosor variable, adelgazando hacia la periferia; yemas en número variable entre réplicas; oogonios presentes en menor cantidad, éstos no alcanzan la madurez, algunos son piriformes, otros más pequeños con menor número oosporas (6 o más), pie de los oogonios no tan retorcido. En 50 mg.L⁻¹ disminuye aún más la cantidad de oogonios, los que son generalmente esféricos o piriformes. En 100 mg.L⁻¹ se observaron abundantes yemas dispersas, el número de oogonios disminuye en relación con las concentraciones anteriores, éstos son robustos, esféricos, piriformes mayormente inmaduros, conteniendo numerosas oosporas (10-20), las que en algunos casos no alcanzaron la madurez. Finalmente, en 200 mg.L⁻¹ se observó dos tipos de micelio, uno muy ramificado y dendroide, y otro de hifas rectas y citoplasma electrodense concentrado, ambos tipos de micelio se mezclan y entrecruzan; con abundantes yemas alargadas, catenuladas o irregulares; oogonios robustos y piriformes.

La Figura 5.26 ilustra la frecuencia de oogonios por concentración, los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.16. Al exponer a *S. ferax* al AcH se observó que, exceptuando el notable aumento en el recuento de oogonios observado en 10 mg.L⁻¹, el recuento de oogonios no sufrió variaciones significativas en las siguientes concentraciones, excepto en 200 mg.L⁻¹ donde se observó un descenso el recuento, que podría estar relacionado con el incremento en la concentración de Ácido Acético.

Achlya racemosa Por otro lado, en el grupo Control de *A. racemosa* se observó un micelio recto, robusto, con hifas secundarias muy delgadas, escasas yemas

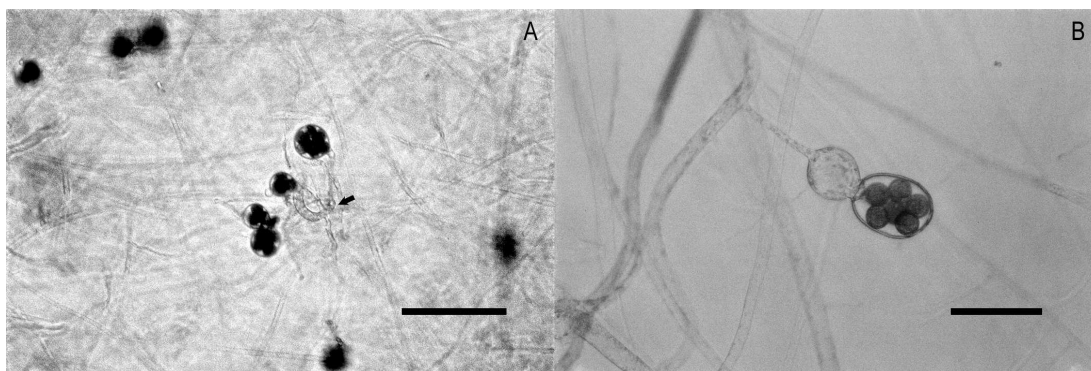


Figura 5.25: Variaciones morfológicas de *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de AcH. A.- Oogonios con abundantes oosporas y pies del oogonio helicoidales. Barra de escala = 50 μm . B.- Oogonio alargado de pared gruesa *proliferando*. Barra de escala = 10 μm .

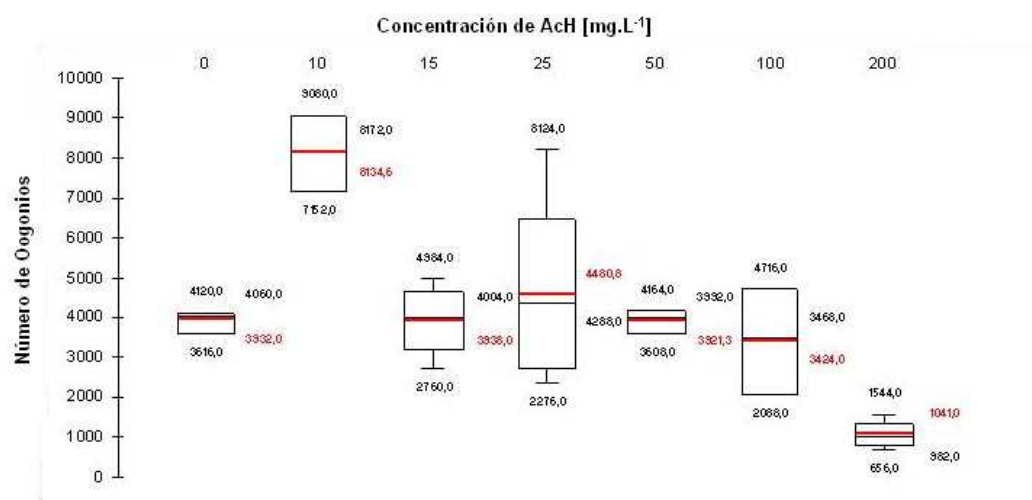


Figura 5.26: Variaciones en el número de oogonios en *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de AcH (mg.L^{-1}). En rojo el promedio, en negro la mediana.

irregulares de contenido electrodenso muy concentrado que se observa con una coloración amarronada intensa. Oogonios escasos, ocasionalmente ausentes, cuando presentes, mayormente esféricos ocasionalmente alargados, o cilíndricos con papilas u ornamentaciones, otros *proliferando*, conteniendo hasta 6 oosporas en su interior ($\bar{X} = 3$). A una concentración de 10 mg.L^{-1} se observaron acumulaciones intracitoplasmáticas electrodensas más concentradas en el micelio, hifas de extremos curvos o doblados, con numerosas ramas secundarias, muy finas; yemas incipientes, algunas catenuladas; oogonios esféricos, cilíndricos, papilados con mayor número de

oosporas en su interior (6 - 8), se observaron algunos oogonios septados con 8 - 10 oosporas, otros apiculados **y proliferando**. A una concentración de 15 mg.L^{-1} fue característica la presencia de un micelio robusto, de citoplasma vacuolado y electrodenso en los extremos; numerosos oogonios muy papilados, en mayor cantidad que a 10 mg.L^{-1} , alargados e irregulares; también aumenta la cantidad los oogonios que proliferan una o varias veces formando una cadena de oogonios, en los que por lo general no se observaron oosporas diferenciadas. Al incrementar la concentración a 25 mg.L^{-1} se encontraron hifas robustas, dispersas en los bordes de la colonia; con una mayor cantidad de yemas rectas, delgadas, catenuladas con contenido electrodenso difuso que le otorga un aspecto arenoso amarronado, algunas **proliferando** varias veces. Oogonios cilíndricos, alargados, irregulares y papilados, en menor cantidad y más chicos que en 15 mg.L^{-1} , algunos **proliferando**, muchos de ellos inmaduros: se encontraron también, numerosos oogonios septados con papilas alargadas. En 50 mg.L^{-1} observamos un micelio robusto con hifas agrupadas paralelamente (en

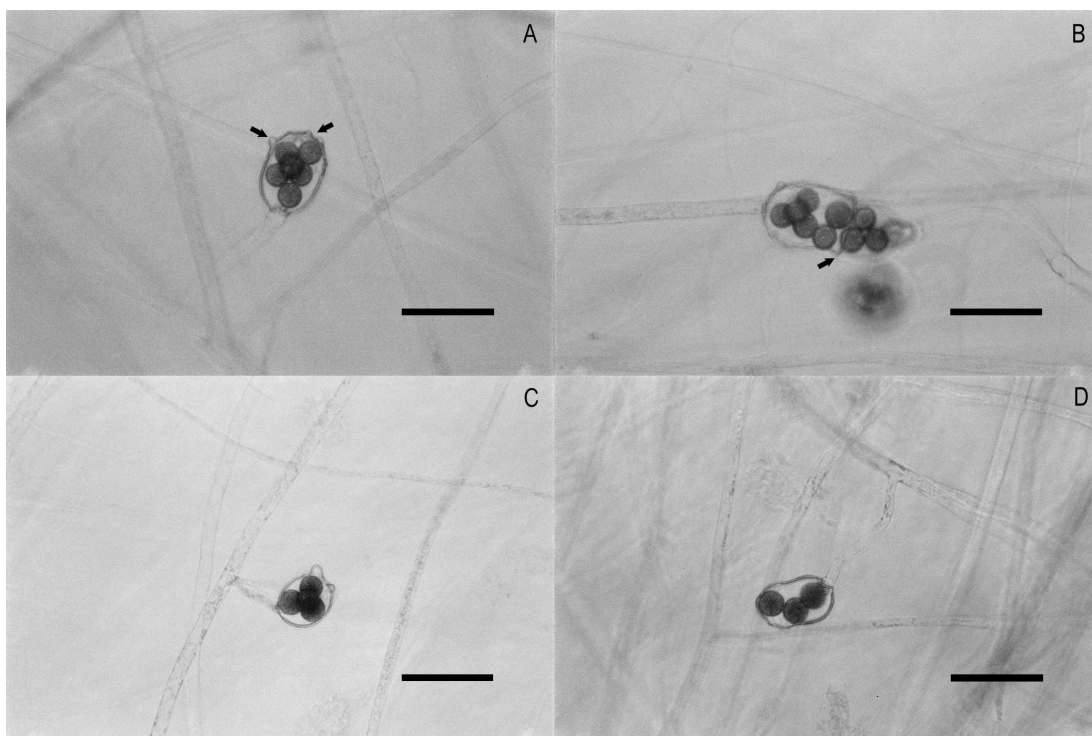


Figura 5.27: Variaciones morfológicas en *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de AcH. A.- oogonios cilíndricos apiculado. B.- oogonios cilíndrico septado. C.- oogonios **proliferando** agrupados en sectores. D.- Oogonio esférico muy papilado.

manojos) y con citoplasma refringente; yemas más robustas esféricas, catenuladas, alargadas formando grupos; oogonios agrupados en sectores, *proliferando*, papilados ocasionalmente septados. Finalmente, en las placas expuestas a 100 mg.L⁻¹ se observaron hifas con concentraciones intracitoplasmáticas electrodensas, abundantes yemas alargadas, catenuladas y nodulosas; escasos oogonios los que fueron esféricos, ornamentados, algunos cilíndricos otros septados, o *proliferando frecuentemente* papilados.

La Figura 5.28 ilustra la frecuencia de oogonios en cada una de las concentraciones, los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.17. En concentraciones inferiores a 100 mg.L⁻¹, el Ácido Acético Glacial no tuvo un efecto inhibitorio del crecimiento de *A. racemosa*, ni tampoco inhibió el desarrollo de estructuras reproductivas sexuales. Por el contrario actuó estimulando la producción de oogonios, pues los valores promedio aumentaron de 298 oogonios por placa en el Control a 1440 en 10 mg.L⁻¹; 1420 en 15 mg.L⁻¹; 2210 en 25 mg.L⁻¹ y 1139 en 50 mg.L⁻¹, observándose finalmente un descenso en el recuento, 704 oogonios/placa en 100 mg.L⁻¹, valor aún superior al obtenido en el Control.

Finalmente podemos decir que el Ácido Acético Glacial no tuvo un efecto letal sobre ambas especies a concentraciones por debajo de la NEC para ovas de pejerrey (156,60 mg.L⁻¹). *S. ferox* resultó ser más resistente a esta sustancia que *A. racemo-*

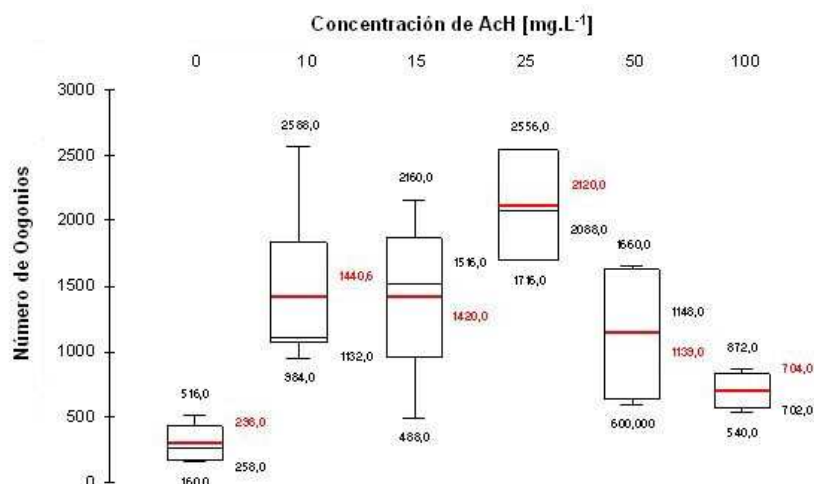


Figura 5.28: Variaciones en el número de oogonios en *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de AcH (mg.L⁻¹). En rojo el promedio, en negro la mediana.

sa. Una concentración de 10 mg.L^{-1} actuó estimulando el crecimiento y también la formación de oogonios, mientras que únicamente a 200 mg.L^{-1} se observó un efecto inhibitorio del crecimiento y desarrollo de esta especie. A pesar de que en *A. racemosa* la TC disminuyó en las placas expuestas a 50 mg.L^{-1} y se mantuvo inalterada en 100 mg.L^{-1} ; se observó un efecto estimulador en la formación de oogonios en todas las concentraciones ensayadas, pero en 100 mg.L^{-1} el recuento disminuyó en relación con la concentración anterior.

Ácido Acético Tamponado (Figuras 5.29 y 5.30)

Saprolegnia ferax En el grupo Control de *S. ferax*, se observó micelio disperso, con abundantes yemas; oogonios escasos y dispersos algunos inmaduros, otros de $40 \mu\text{m}$ diam. conteniendo de 3-4 oosporas,. En las placas expuestas a 100 mg.L^{-1} se observó un micelio más denso, abundantes yemas redondeadas, solitarias o en cadena, irregulares; numerosos oogonios generalmente maduros de $50\text{-}60 \mu\text{m}$ de diam., con abundantes oosporas (6-12). Mientras que en el grupo Control de *A. racemosa* se observó abundante micelio, con yemas alargadas, catenuladas o irregulares; escasos oogonios con pocas oosporas en su interior ($\bar{X} = 4$). En 100 mg.L^{-1} el micelio con hifas principales gruesas de hasta $20 \mu\text{m}$ y oogonios ausentes.

La Figura 5.30 ilustra la frecuencia de oogonios por concentración; los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.16. Si bien ambas especies lograron crecer hasta en 100 mg.L^{-1} , solamente se observó el

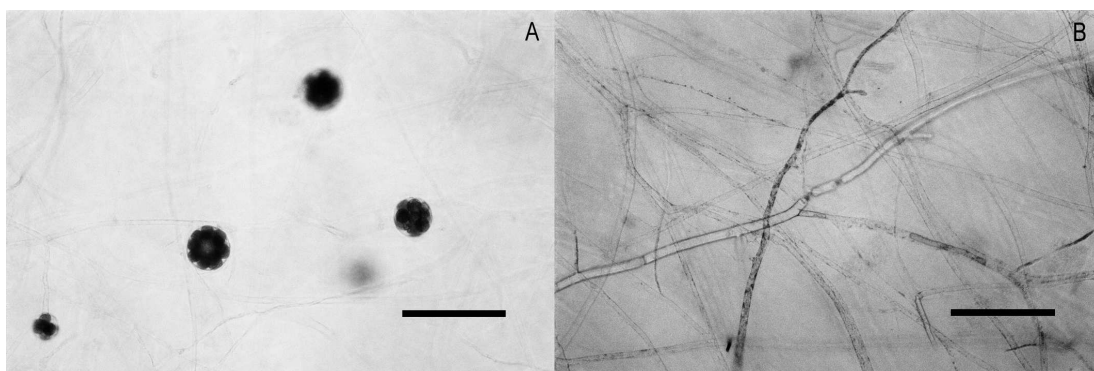


Figura 5.29: Variaciones morfológicas de *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de AcHT. A.- Oogonios esféricos con numerosa oosporas. B.- Hifas hialinas y de contenidos electrodenso. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

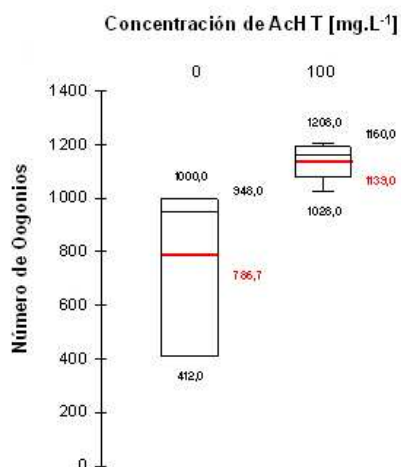


Figura 5.30: Variaciones en el número de oogonios en *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de AcH T (mg.L⁻¹). En rojo el promedio, en negro la mediana.

desarrollo de oogonios en *S. ferax*, los que alcanzaron un valor promedio de 1139 oogonios por placa, valor superior al obtenido en el grupo Control (786).

En conclusión, el Ácido Acético tamponado (AcHT), tuvo un efecto letal sobre ambas especies a concentraciones por debajo de la NEC para ovas de pejerrey (532,90 mg.L⁻¹). *A. racemosa* resultó ser más sensible a esta sustancia que *S. ferax*, pues no se observó crecimiento aún en la concentración más baja de AcHT. El crecimiento de *S. ferax* fue inhibido al ser expuesto a 100 mg.L⁻¹, pero la formación de oogonios fue estimulada.

Compuesto Iodados

Ioduro de Potasio (Figuras 5.31 a 5.34)

Saprolegnia ferax No se observaron características morfológicas distintivas en el grupo Control, de *S. ferax*. Al ser expuesta a 10 mg.L⁻¹ de IK se encontraron algunas yemas alargadas, oogonios escasos, robustos, algunos piriformes conteniendo hasta 20 oosporas en su interior, dispuestos sobre pies largos, rectos o inclinados. En 20 mg.L⁻¹, se observaron yemas catenuladas; escasos oogonios, ubicados sobre pies robustos, algunos pequeños de 50 μ m diam., con 3-4 oosporas, otros robustos de 100 μ m diam., conteniendo abundantes oosporas ($\bar{X} = 30$), pudiendo en algunos casos desarrollar hasta 41 oosporas. En 30 mg.L⁻¹ se observaron hifas de contenido

electrodenso muy concentrado; en una de las réplicas se observó una gran cantidad de yemas catenuladas, oogonios generalmente esféricos algunos robustos y sin oosporas. Por su parte, en las placas expuestas 50 mg.L^{-1} se observaron yemas aisladas, alargadas, irregulares, dendroides o catenuladas; oogonios dispersos o aislados, generalmente esféricos algunos piriformes, otros robustos con muchas oosporas maduras en su interior. En 80 mg.L^{-1} observamos un notable incremento en el número de oogonios, los que fueron robustos con abundantes oosporas en su interior (14 - 30), y escasas yemas irregulares alargadas. Finalmente, en 120 mg.L^{-1} se observaron abundantes oogonios robustos, de forma variable, esféricos, piriformes, obovoides, alargados, con numerosas oosporas (20-30).

La Figura 5.32 ilustra la frecuencia de oogonios por concentración, los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.16. En el grupo Control de *S. ferax* se observó poca variabilidad entre réplicas con un promedio de 1155 oogonios/placa. En las dos siguientes concentraciones 10 y 20 mg.L^{-1} observamos una disminución en el recuento, alcanzando valores promedio de 805 y 786 respectivamente. Mientras que al ser expuesto a 30 mg.L^{-1} , el número aumentó hasta alcanzar un valor de 1152 oogonios/placa, experimentando un leve descenso en 50 mg.L^{-1} . Finalmente, en las placas expuestas 80 mg.L^{-1} éste se duplica, encontrándose un promedio de 2195 oogonios/placa y disminuye levemente hasta los 2005 en 120 mg.L^{-1} . Nótese que las TC de esta especie no se vió afectada negativamente por el incremento en la concentración de IK en los tratamientos.

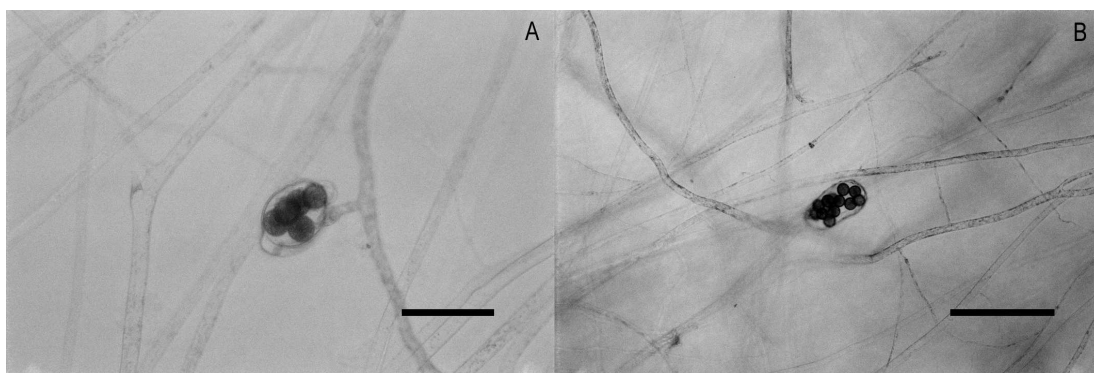


Figura 5.31: Variaciones morfológicas de *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de IK. A.- Oogonio ovoide pequeño. Barra de escala = $100 \mu\text{m}$. B.- Oogonio anómalo, cilíndrico con numerosas oosporas. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

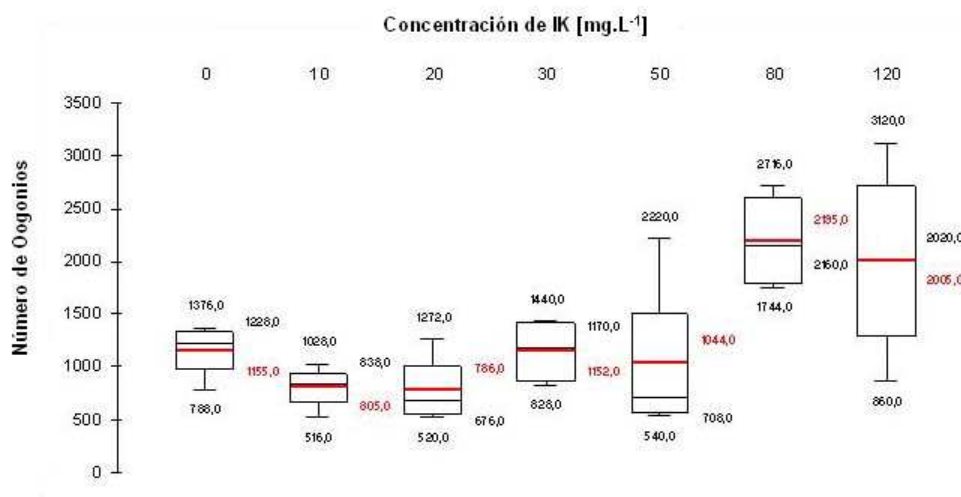


Figura 5.32: Variaciones en el número de oogonios en *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de IK (mg.L⁻¹). En rojo el promedio, en negro la mediana.

Achlya racemosa En el grupo Control de *A. racemosa*, se observó la presencia de abundante micelio con extremos hifales de contenido electrodenso, yemas ausentes y escasos oogonios, algunos **proliferando**. En las placas expuestas a 10 mg.L⁻¹ encontramos un micelio ondulado, ensortijado o espiralado con acumulaciones intracitoplasmáticas electrodensas distribuidas homogéneamente a lo largo de las hifas otorgándoles un aspecto amarronado, en otros casos estas acumulaciones se observaron agrupadas más densamente en las paredes de las hifas otorgándoles un aspecto punteado o moteado; también se observó micelio de “tipo axonomorfo”, con gruesas hifas principales e hifas secundarias numerosas y muy delgadas; yemas presentes en cantidad variable; oogonios mayormente esféricos, ocasionalmente cilíndricos, algunas réplicas con abundantes oogonios **proliferando** y con mayor número de oosporas en su interior (X= 6), dispuestos en agrupaciones de densidad variable. En 20 mg.L⁻¹ se observaron algunas yemas catenuladas de tamaño irregular; oogonios generalmente esféricos, en una réplica se observó un predominio de oogonios cilíndricos y un oogonio septado con 10 oosporas en su interior. Mientras que en 30 mg.L⁻¹ tenemos un micelio denso, robusto con contenido intracitoplasmático electrodenso muy concentrado, yemas robustas y alargadas, amarronadas; poca densidad de oogonios con 6-8 oosporas en su interior, muchos de ellos **proliferando**. En las placas expuestas a 50 mg.L⁻¹ se observó abundante micelio grueso con con-

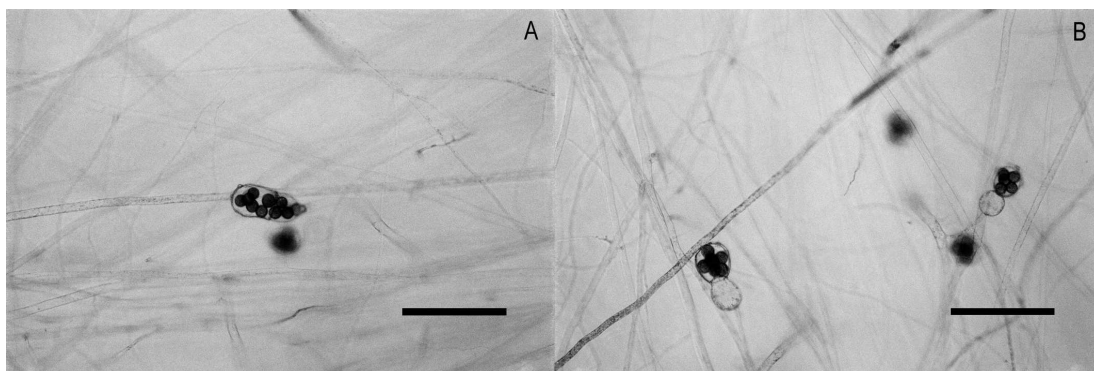


Figura 5.33: Variaciones morfológicas de *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de IK. A.- Oogonio cilíndrico, septado y con papilas. B.- Agrupación de oogonios esféricos **proliferando**. Barra de escala =50 μm .

tenido electrodenso homogéneo, de extremos curvos o helicoidales, con abundantes yemas de forma y disposición variables: piriformes, en racimos, etc; oogonios mayormente esféricos algunos **proliferando**, otros cilíndricos con hasta 12 oosporas en su interior, y si bien el número de oogonios aumenta con respecto a la concentración anterior, éstos están distribuidos de manera más dispersa y son menos abundantes que en otras concentraciones. En 80 mg.L^{-1} el micelio es más denso, dispuesto a modo de espiga con abundante contenido electrodenso muy concentrado y numerosas yemas. Finalmente, en 120 mg.L^{-1} observamos un micelio denso muy compacto y algodónoso, con contenido electrodenso en el citoplasma, y gran cantidad de yemas; escasos oogonios dispuestos cerca o a los costados de las hifas, algunos **proliferando** y otros cilíndricos.

La Figura 5.34 ilustra la frecuencia de oogonios por concentración, los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.17. En el grupo Control se observó un muy escaso número de oogonios, 53 por placa, en todas las concentraciones ensayadas el número de oogonios es mayor al obtenido en el grupo Control. Se observaron variaciones en los recuentos pero éstas no están directamente relacionadas con la concentración de IK; el valor más alto: 1024 oogonios/placa, se registró en 20 mg.L^{-1} (casi 20 veces el valor del Control), el menor recuento fue obtenido en la concentración más elevada (120 mg.L^{-1}) y resultó en 95 oogonios/placa.

En resumen podríamos decir que el Ioduro de Potasio no tuvo un efecto inhibitor sobre la TC de *S. ferax*. En las concentraciones más bajas el efecto del IK sobre

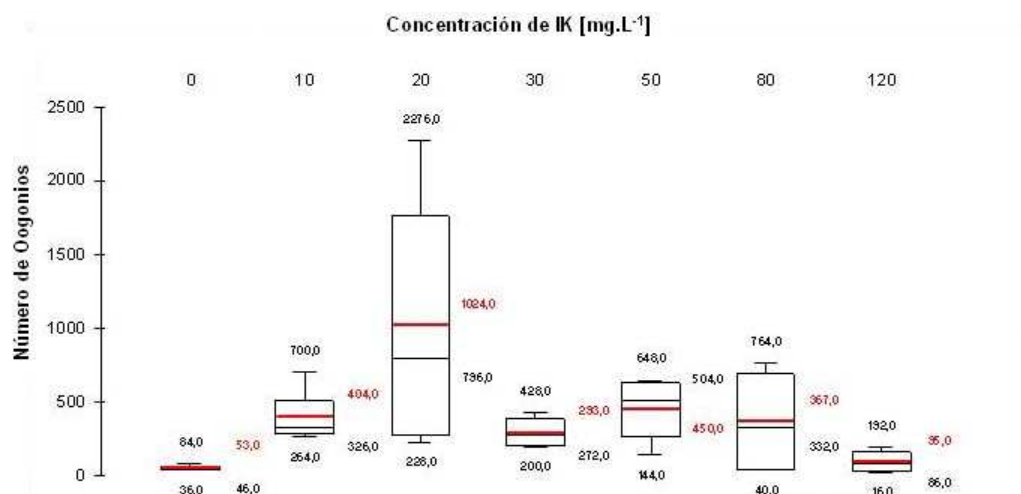


Figura 5.34: Variaciones en el número de oogonios en *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de IK (mg.L⁻¹). En rojo el promedio, en negro la mediana.

el recuento de oogonios fue muy variable, observándose desde ausencia de efecto hasta una disminución del recuento; mientras que en 80 y 120 mg.L⁻¹ el IK actúo estimulando la formación de oogonios. En *A. racemosa* la TC y la formación de oogonios fue estimulada en todas las concentraciones excepto en 180 mg.L⁻¹ donde la TC disminuye, aunque la formación de oogonios continúa siendo mayor a la del grupo Control.

Iodopovidona (Figuras 5.35 a 5.38)

Saprolegnia ferax No se observaron características morfológicas distintivas en el grupo Control, mientras que en las placas expuestas a 20 y 30 mg.L⁻¹ se observó un micelio recto, sinuoso o curvo muy delgado (100 μ m diam.), hifas hialinas y otras de contenido electrodens, las más delgadas formando un entramado; yemas ausentes; oogonios dispersos con abundantes oosporas. A una concentración de 50 mg.L⁻¹, no se encontraron yemas y se observó un leve descenso en el número de oogonios, los que se encontraron dispersos. En 80 mg.L⁻¹ fue característica la presencia de escasas yemas irregulares y oogonios robustos e inmaduros. En la siguiente concentración, 120 mg.L⁻¹, el micelio se adelgaza hasta hacerse muy fino; con oogonios mayormente inmaduros y en menor cantidad. Finalmente, en 180 mg.L⁻¹ se

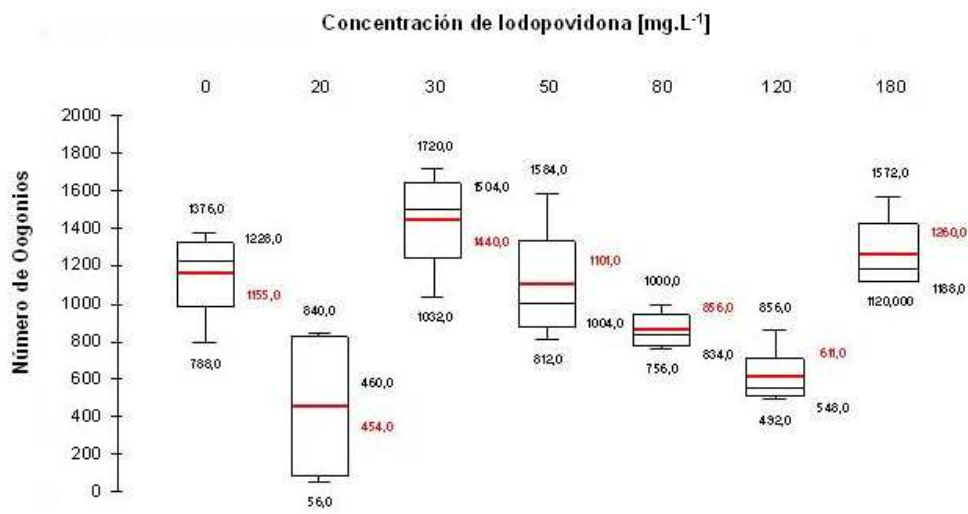


Figura 5.35: Variaciones en el número de oögonios en *S. ferax* expuesta a diferentes concentraciones de Iodopovidona (mg.L^{-1}). En rojo el promedio, en negro la mediana.

observaron escasas yemas de forma irregular, algunos oögonios concatenados, otros alargados, piriformes u obovados, con numerosas oösporas (19-21), algunas pequeñas y otras más grandes, de hasta $40 \mu\text{m}$ diam.

La Figura 5.35 ilustra la frecuencia de oögonios por concentración, los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.16. En cuanto al número de oögonios en el grupo Control se observó poca variabilidad entre réplicas con un promedio de 1155 oögonios/placa. En 20 mg.L^{-1} observamos un descenso en el número de oögonios (454); posteriormente, en 30 mg.L^{-1} , se supera el recuento obtenido en el Control, con un promedio de 1440 oögonios/placa. En 50 mg.L^{-1} se observó un leve descenso en el número de oögonios, (1101) en promedio, con escasa variabilidad entre réplicas. En las placas expuestas a concentraciones superiores a 80 mg.L^{-1} el número empieza a descender progresivamente, primero a 856 y posteriormente al ser expuesto a 120 mg.L^{-1} a 611 oögonios/placa; en ambas concentraciones no se observó mucha variación entre réplicas. Finalmente, en 180 mg.L^{-1} el número promedio de oögonios (1260) duplica el valor obtenido en la concentración anterior.

***Achlya racemosa* (Figuras 5.36 y 5.37)** En el grupo Control de *A. racemosa*, se observó la presencia de un micelio denso, con citoplasma electrodensos

en los extremos hifales, yemas ausentes y además un escaso número de oogonios, algunos *proliferando*. En 20 mg.L^{-1} , no se observaron alteraciones en el micelio; oogonios mayormente esféricos con un mayor contenido de oosporas en su interior (5-6), algunos escasamente ornamentados; otros, en menor cantidad, cilíndricos o *proliferando*; además se observa la aparición de escasas yemas. Al aumentar la concentración a 30 mg.L^{-1} se observó un micelio con contenido electrodense en los extremos hifales y abundantes hifas secundarias muy delgadas que forman un entramado en el que se puede observar la presencia de escasas yemas y también aparecen algunos oogonios *proliferando*. En las placas expuestas a 50 mg.L^{-1} , las características morfológicas son muy variables entre réplicas; no obstante, es típica la presencia de hifas principales con numerosas hifas secundarias delgadas que forman un entramado, abundantes yemas catenuladas, escasos oogonios posicionados sobre hifas gruesas con contenido electrodense; ocasionalmente se observó la formación de

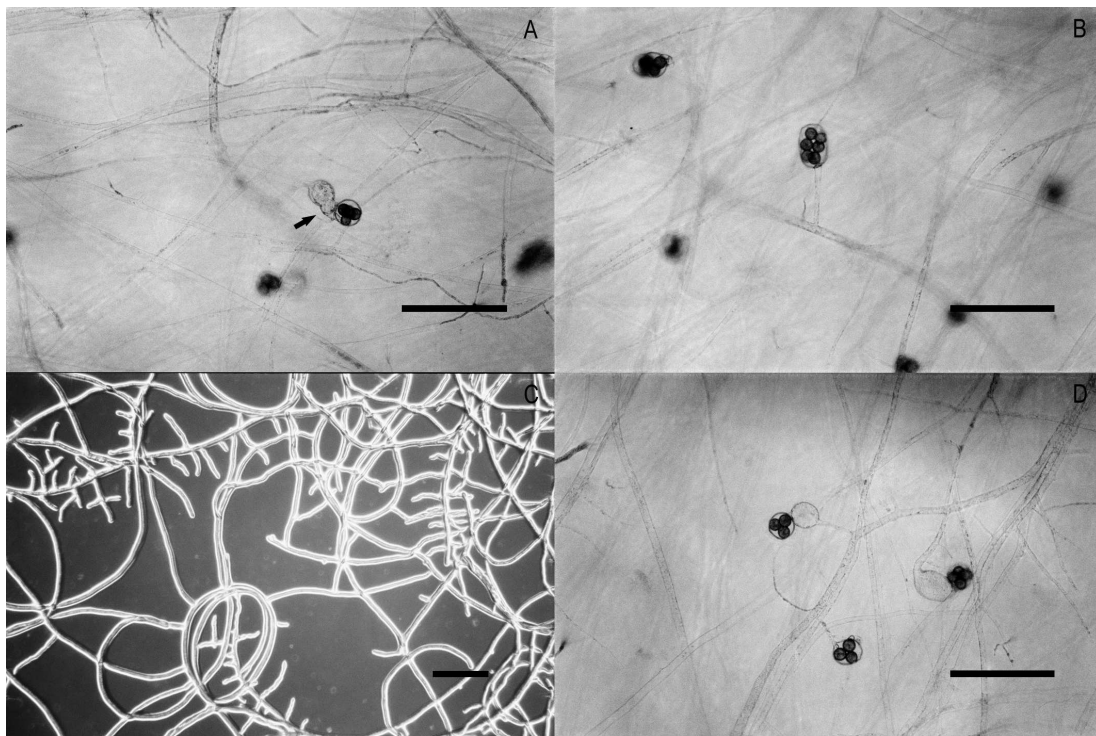


Figura 5.36: Variaciones morfológicas de *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de Iodopovidona. A.- Oogonio *proliferando* con base anómala. B.- Oogonio cilíndrico de 6 oosporas. C.- Micelio con ramificaciones laterales cortas. D.- Oogonios esféricos agrupados *proliferando*. A. – B. y D. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$, C. = $100 \mu\text{m}$.

oogonios **proliferando**, y de oogonios esféricos, cilíndricos, escasamente ornamentados, con numerosas oosporas en su interior ($\bar{X} = 6$). En las placas expuestas a 80 mg.L⁻¹ se observaron hifas con contenido electrodenso, oogonios mayormente esféricos y lisos, variables en número, en algunos casos **proliferando** una o varias veces, también se encontraron oogonios cilíndricos con 6 a 14 oosporas, con dimensiones que oscilan entre 80 y 100 μ m diam., los que pueden verse agrupados en sectores. En 120 mg.L⁻¹ se observó gran variabilidad en la morfología entre réplicas, algunas con micelio de aspecto normal, en otras las hifas tienen abundante contenido electrodenso en su interior, yemas variables en número y morfología: catenuladas, alargadas e irregulares; oogonios mayormente esféricos algunos **proliferando** con muy escasa ornamentación, otros cilíndricos o anómalos. Finalmente, en 180 mg.L⁻¹ se observó un micelio menos denso con extremos enrulados, mezclado con micelio de contenido electrodenso concentrado, e hifas principales rectas y gruesas con numerosas hifas secundarias delgadas y cortas de contenido electrodenso, otorgándoles a las hifas un aspecto dentado característico; se observaron también oogonios esféricos y cilíndricos con 4 a 8 oosporas y ornamentaciones onduladas, y un aumento en la ocurrencia de oogonios **proliferantes**.

La Figura 5.37 ilustra la frecuencia de oogonios por concentración, los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en la Tabla 5.17. En cuanto al recuento de oogonios en *Achlya racemosa* tenemos que en el grupo Control se observó una muy escasa cantidad de oogonios, mientras que en las placas expuesta a 20 mg.L⁻¹ el recuento se incrementó hasta alcanzar su valor más alto (1517); posteriormente, en 30 mg.L⁻¹ éste desciende drásticamente a valores cercanos a los obtenidos en el Control. En la siguiente concentración, 50 mg.L⁻¹, se observó un alto grado de variabilidad entre réplicas, con un valor promedio de 807 oogonios/placa. En las concentraciones posteriores la variabilidad entre réplicas persiste, observándose un descenso paulatino en los recuentos hasta alcanzar los 400 oogonios/placa, al ser expuesto a 120 mg.L⁻¹ con un leve ascenso (626 oogonios/placa) en 180 mg.L⁻¹.

De los ensayos con Iodopovidona concluimos que esta sustancia, en concentraciones por debajo de la NEC para ovas de pejerrey (59,76 mgIK.L⁻¹ en solución salina isotónica y 167,20 mg.L⁻¹ en ADR), no exhibe un efecto letal o inhibitorio del crecimiento de ambas especies. Concentraciones de 80 y 180 mg.L⁻¹ afectaron negativamente la TC de *S. ferax*, y el recuento de oogonios alcanzó sus valores más

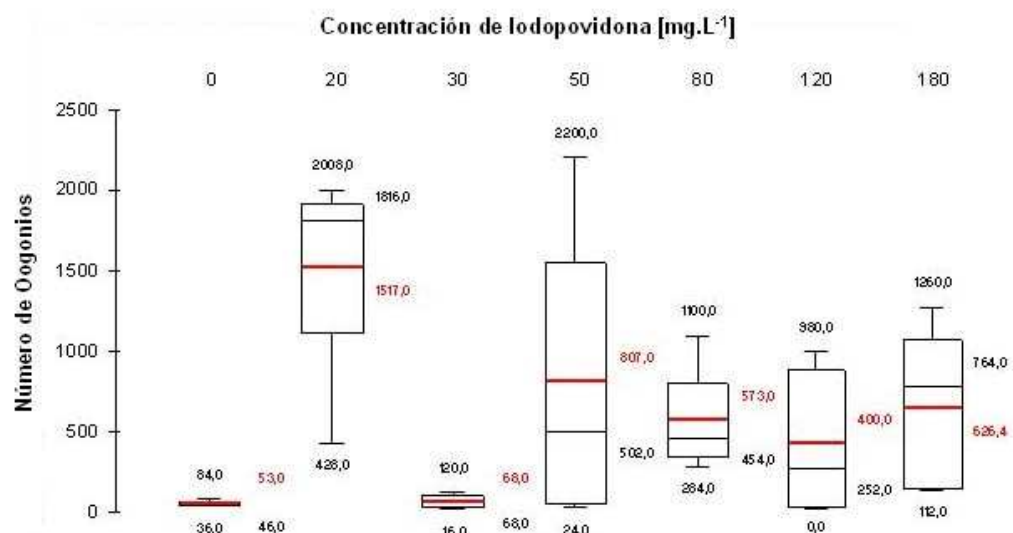


Figura 5.37: Variaciones en el número de oogonios en *A. racemosa* expuesta a diferentes concentraciones de Iodopovidona (mg.L⁻¹). En rojo el promedio, en negro la mediana.

bajos en 20, 80 y 120 mg.L⁻¹. En *A. racemosa*, una concentración de 20 mg.L⁻¹ provocó el incremento de la TC y la formación de oogonios, mientras que en 120 y 180 mg.L⁻¹ la TC se vio afectada negativamente, pero no la formación de oogonios.

5.3.3. Prueba de Eficacia

Se realizaron dos pruebas de eficacia, los resultados presentados a continuación son el promedio de ambas. Las Figuras 5.38 y 5.39 esquematizan la respuesta observada al exponer las ovas de pejerrey a *A. racemosa* y *S. ferax* en soluciones de Ácido Acético tamponado (200 mg.L⁻¹) Verde de Malaquita (0,25 mg.L⁻¹) y Formalina (40 µl.L⁻¹).

Los valores promedio y el desvío estándar para cada condición y especie se presentan en la Tabla 18. La tasa de infección en el grupo Control de *S. ferax* (43,33 %) fue mayor que la de *A. racemosa* (28,33 %).

El porcentaje de sobrevivencia de las ovas expuestas a *S. ferax* fue menor al obtenido en todos los tratamientos: Control (51,65 %) < VM (56,67 %) << AcHT (80,02 %) < F (85,49 %). A pesar de las claras diferencias y debido a la gran variabilidad entre réplicas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

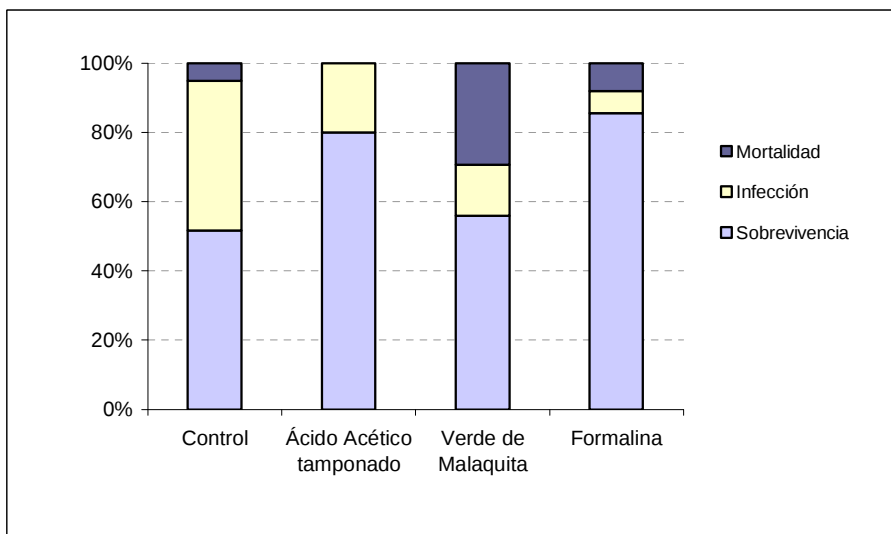


Figura 5.38: Porcentajes medios de: Sobrevivencia, Infección y Mortalidad de ovas de *O. bonariensis* expuestas a por *Saprolegnia ferax* en soluciones de Ácido Acético tamponado, Verde de Malaquita y Formalina, por un periodo de 96 h.

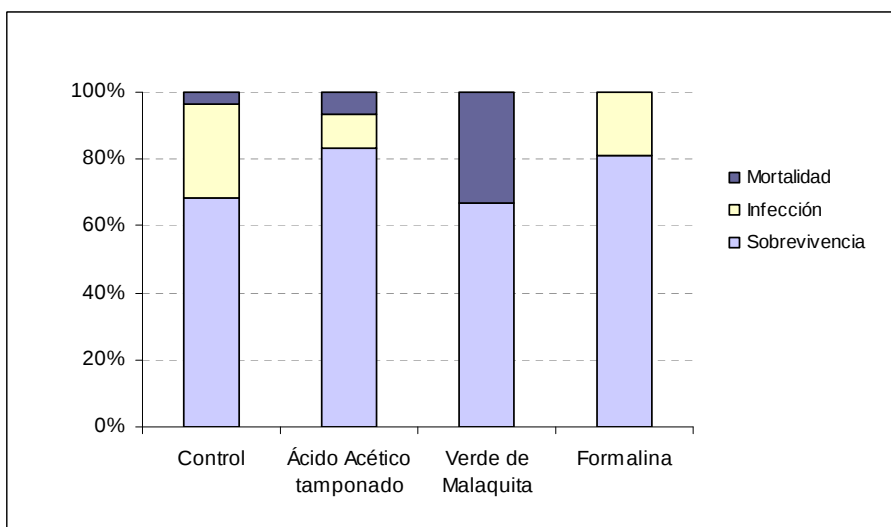


Figura 5.39: Porcentajes medios de: Sobrevivencia, Infección y Mortalidad de ovas de *O. bonariensis* expuestas a *Achlya racemosa* en soluciones de: Ácido Acético tamponado, Verde de Malaquita y Formalina, por un periodo de 96 h.

en los porcentajes de sobrevivencia del Control y los Tratamientos. Por otro lado, el porcentaje de infección por *S. ferax* en las ovas del grupo Control resultó en 43,33 %, éste que fue mayor al obtenido en los tratamientos con AcHT (20,00 %); VM (15,00 %) y F (6,45 %), pero solamente se encontraron diferencias estadísticamente

Tabla 5.18: Porcentajes medios de Supervivencia, Infección y Mortalidad de ovas de pejerrey *O. bonariensis* expuestas a *S. ferax* y *A. racemosa*; 200 mg.L⁻¹ de AcHT; 0,25 mg.L⁻¹ de VM y 40 µl.L⁻¹ de Formalina en soluciones en ADR estéril. Entre paréntesis Desvío Estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con el Control.

Especie	Condición (%)	Control	Ácido Acético tamponado	Verde de Malaquita	Formalina
<i>Saprolegnia ferax</i>	Supervivencia	51,65 (25,95)	80,02 (4,69)	55,91 (15,21)	85,48 (6,84)
	Infección	43,33 (28,28)	20,00 (4,71)	14,84 (7,30)	6,45 * (9,12)
	Mortalidad	4,98 (2,38)	— —	29,25 (22,51)	8,06 (2,28)
<i>Achlya racemosa</i>	Supervivencia	68,33 (7,07)	83,33 (4,71)	66,67 (42,43)	81,31 (11,28)
	Infección	28,33 (7,07)	10 * (4,71)	* —	18,69 (11,28)
	Mortalidad	3,33 0	6,67 0	33,33 (42,43)	— —

significativas al compararlo con el obtenido en Formalina ($p = 0,046$). Finalmente, el porcentaje de mortalidad en las ovas expuestas a Formalina (8,06 %), aunque resultó ser mayor a la del grupo Control (5,00 %), puede ser considerado dentro los niveles aceptables de mortalidad por ser menor al 10 %. En los tratamientos con AcH no se observó mortalidad, pero en las ovas expuestas a VM la mortalidad (28,33 %) fue elevada.

Los resultados indican que la Formalina es el tratamiento más adecuado para contrarrestar las infecciones fúngicas en ovas por *S. ferax*, ya que con esta sustancia se obtuvo un porcentaje de infección de 6,45 %, el que resultó ser el único significativamente menor al obtenido en el grupo Control y además con esta sustancia se obtuvieron bajos porcentajes de mortalidad.

A diferencia de *S. ferax* en *A. racemosa*, el porcentaje de supervivencia más bajo se obtuvo en las ovas expuestas a VM según la secuencia siguiente: VM (66,67 %) < Control (68,33 %) < F (81,32 %) < AcHT (83,33 %); las diferencias son mucho menos notorias y al igual que en *S. ferax* tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El porcentaje de infección en las ovas expuestas a *A. racemosa* sin tratamiento (28,33 %) fue menor que el obtenido en *S. ferax* (43,33 %);

sin embargo, éste resultó ser mayor al obtenido en los tratamientos con AcHT (10 %); VM (0 %) y F (18,69 %), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el PI obtenido en los tratamientos y el obtenido en el control sin tratamiento, AcHT ($p = 0,041$) y VM ($p = 0,025$). Si bien el VM fue el tratamiento más efectivo contra las infecciones por *A. racemosa*, ya que con esta sustancia no se registró infección; el porcentaje de mortalidad fue muy alto 33,33 %. El AcHT no resultó ser tan eficaz como el VM, pero el porcentaje de mortalidad (6,67 %) es mucho menor que el registrado para VM. Finalmente, aunque en el tratamiento con Formalina la tasa de mortalidad fue nula, esta sustancia no demostró ser efectiva en el Control de *A. racemosa*.

5.4. Discusión

Se han desarrollado numerosos métodos para evaluar el potencial fungicida de diversas sustancias; uno de los más utilizados es el descrito por Bailey (1983), en el que una porción de micelio contenido en medio de cultivo sólido, es sumergido durante un período de tiempo determinado en diferentes concentraciones de la sustancia a ensayar, posteriormente se evalúa la capacidad de recuperación y crecimiento del inóculo expuesto. Una variante de esta metodología es la descrita por Loan et al. (2006) quienes evaluaron el efecto sobre la esporulación, sometiendo porciones de micelio con esporangios, a diferentes concentraciones de las sustancias fungicidas, verificando luego la capacidad de recuperación, formación y liberación de esporas infectivas. Recientemente, Stueland et al. (2005) elaboraron un método de *screening* para evaluar *in vitro* el potencial fungicida de algunas sustancias sobre cinco cepas de *Saprolegnia parasitica* aisladas de peces, determinando parámetros como la concentración mínima inhibitoria y la concentración letal mínima de algunas sustancias fungicidas para determinados tiempos de exposición.

Otro de los métodos consiste en inocular la cepa en estudio en agar, y aplicar la sustancia fungicida en pozos o en discos de papel de filtro a intervalos equidistantes de los bordes del crecimiento miceliar (Bly et al., 1996). Hussein et al. (2002) y Muzzareli et al. (2001), proponen un método más simple que consiste en incorporar la sustancia en el medio de cultivo agarizado e inocular la especie fúngica en el medio de una placa de Petri con dicho agar, y medir el crecimiento radial. Debido

a su practicidad éste fue el método que empleamos para hacer un *screening* de la sensibilidad de ambas especies a las sustancias fungicidas propuestas.

Muchos autores han evaluado la capacidad fungicida de una sustancia comparando las tasas de eclosión obtenidas en las ovas expuestas a concentraciones crecientes de sustancias fungicidas con un Control sin tratamiento. Este método, si bien es el que más se asemeja a las condiciones reales de incubación, puede ser inespecífico puesto que, en la mayoría de los casos, no se dispone de información adecuada sobre la identidad del organismo patógeno, siendo un factor importante debido a que, tal como lo sostienen Martin (1968) y Srivastava & Srivastava (1978), la sensibilidad a los antifúngicos es variable entre géneros y también entre especies.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en los ensayos orientados a evaluar la capacidad fungicida de cada sustancia. Con la finalidad de lograr los objetivos propuestos; primeramente se evaluó la sensibilidad de ambas especies a las sustancias fungicidas utilizando la metodología propuesta por Hussein et al. (2002). Una vez finalizados los ensayos de screening las sustancias que exhibieron actividad fungicida *in vitro* en concentraciones por debajo de las NEC's correspondiente fueron seleccionadas. Con estas sustancias se realizaron los test de eficacia, en los que se pone prueba la capacidad de *S. ferax* y *A. racemosa* de infectar a las ovas de pejerrey en presencia de la sustancia fungicida. Finalmente, nuestros resultados son comparados con los obtenidos por diversos autores, cabe señalar que tanto: las condiciones de ensayo, especies y metodologías empleadas por los otros autores son diferentes a las nuestras por lo tanto, al hacer comparaciones, los resultados deben ser considerados únicamente a modo referencial, puesto que tanto la infección como su inhibición dependen de una infinidad de factores.

El Verde de Malaquita fue introducido como agente fungicida por Foster & Woodbury (1936) en la década del 30, desde entonces su utilización en acuicultura se ha difundido y se han realizado numerosos trabajos para probar su efectividad en el control de las micosis en los peces (Hoffman & Meyer 1974; Marking et al., 1994; Stueland et al., 2005), llegando a ser considerado como el agente fungicida más eficaz para el control de Saprolegniasis (Martin 1968; Bailey, 1984; Marking et al., 1994; Noga, 1999; Treves & Brown, 2000). Posteriormente, otros autores evaluaron la toxicidad y los efectos adversos del VM para los peces, el medio ambiente y el ser humano; razón por la cual a partir de 1990 se implementaron una serie de

regulaciones que limitaron su utilización a nivel mundial.

En los ensayos de *screening* realizados en medio de cultivo encontramos que ambas especies son muy sensibles al VM, logrando crecer durante un período de ensayo (que fue de 7 días), únicamente, en concentraciones inferiores a $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$, valor que se encuentra muy por debajo de la NEC para ovas de pejerrey ($0,51 \text{ mg.L}^{-1}$). En ambas especies se observó un retraso en el inicio del crecimiento: en *S. ferax* a $0,03$ y $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ se inició el tercer día, en *A. racemosa* el crecimiento en $0,06$ y $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$ inició al cuarto y octavo día de incubación. En todos los tratamientos las pendientes obtenidas fueron menores a las del grupo Control encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los valores de IC, para *S. ferax* al ser expuestos a $0,03 - 0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ oscilaron entre $60,65$ y $72,69 \%$, superando ambos a la concentración inhibitoria media (CIM) cuyo valor se encuentra por debajo de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ y resultó en $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Allison (1957), quien menciona que una concentración de $0,1 \text{ ppm}$ de VM tendría propiedades fungicidas; y también con los resultados de Arasaki et al. (1958), quienes encontraron que una concentración de $0,02 \text{ ppm}$ de VM es capaz de restringir el crecimiento micelial y la formación de esporangios de las Saprolegniales. También, Stueland et al. (2005) obtuvieron valores de Concentración Inhibitoria media (48h) menores a 1 ppm , además encontraron que en exposiciones cortas (60 min) la concentración letal media se incrementó alcanzando valores menores o iguales a los 10 ppm . Los hallazgos reportados por Scott & O'Warren (1964) superan ampliamente las concentraciones inhibitorias encontradas en el presente estudio, estos autores informaron que una concentración de 2 ppm de VM, aplicada durante 24 horas, detuvo totalmente el crecimiento de *Saprolegnia* sp., *Achlya americana*, y *Pythium* sp.

Nosotros encontramos que, para *A. racemosa* la inhibición del crecimiento fue mucho más gradual. En los grupos expuestos a $0,03$ y $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ los porcentajes medios de inhibición fueron del $36,81$ y $59,51 \%$ respectivamente; la CIM ($0,047 \text{ mg.L}^{-1}$) también se ubicó entre estas concentraciones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martin (1968), quien encontró que *A. racemosa* fue muy sensible al VM, estableciendo la siguiente secuencia de sensibilidad en orden creciente: *A. racemosa* < *A. ambisexualis* femenina < *A. ambisexualis* masculina << *A. oblongata*. También encontró que *S. parasitica* fue más sensible que *S. ferax*, tanto

para *A. racemosa* como para *S. ferax* la exposición a 5 ppm durante 5 minutos fue suficiente para inhibir la esporulación de ambas especies. Según lo observado por Martin (1968) existe una diferencia en la sensibilidad entre especies e incluso entre cepas de una misma especie, como es el caso de *A. ambisexualis* masculina, cuya esporulación logró ser inhibida únicamente en concentraciones superiores a los 5 ppm durante un periodo de exposición mayor a una hora; en cambio para inhibir la esporulación de *A. oblongata* fueron necesarias concentraciones superiores a los 15 ppm durante más de una hora. Es evidente que existe una sensibilidad diferente en las distintas especies de Oomycetes; Alderman & Polglase (1984), encontraron que el micelio de *Aphanomyces astaci* es más sensible a un amplio rango de fungicidas que el de *S. parasitica*, aunque a una concentración de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no se observaron diferencias en la sensibilidad al VM entre ambas especies. En base a los resultados obtenidos por Martin (1968) este autor pone énfasis en la necesidad de identificar a las especies fúngicas causantes la infección, a fin de determinar las concentraciones adecuadas para el tratamiento.

En los ensayos realizados no se observaron alteraciones llamativas en la morfología de *S. ferax* al ser expuesta a VM. El recuento de oogonios disminuyó en un 40 % en $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ y un 35 % en $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$, y en $0,125 \text{ mg.L}^{-1}$ se observó crecimiento en sólo 2 réplicas y un notable incremento en el número de oogonios, que superan en 9,3 veces al obtenido en el Control. En *A. racemosa* se observó micelio con concentraciones intracitoplasmáticas electrodensas y la presencia de oogonios **proliferantes** en el grupo Control, por lo que no podemos inferir que éstos sean producidos por efecto del VM; lo que si fue característico en esta especie es la presencia de oogonios anómalos, cilíndricos. En cuanto al recuento de oogonios, a diferencia de *S. ferax*, en *A. racemosa* se observó un incremento en el número de oogonios (1,4 veces el del Control) en la concentración más baja de VM. En las siguientes concentraciones se observó un descenso en el recuento del 81 al 78 %.

Los primeros estudios realizados propusieron la utilización de elevadas concentraciones de VM por cortos periodos de tiempo para el tratamiento de infecciones fúngicas en ovas de peces. Hoffman & Meyer (1974) sugieren la inmersión en soluciones con 10 mg.L^{-1} de VM durante 10 a 30 segundos, o de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 1 hora. En cambio Debuf (1991), mencionó que para el tratamiento de infecciones externas, fúngicas o parasitarias, en individuos adultos, se requiere la aplicación 50

a 60 mg.L⁻¹ de VM en baños de inmersión durante 10 a 30 segundos; o la inmersión prolongada en soluciones con 1 mg.L⁻¹ de VM durante 30 a 60 minutos (Warren, 1981; Debuf, 1991). O'Donnell (1941) encontró que el tratamiento de inmersión durante 10 a 30 segundos en 67 ppm de VM resultó ser eficaz como fungicida y no exhibió efectos tóxicos en 18 especies de peces. Burrows (1949) recomendó el uso de 5 ppm de VM para el tratamiento y control de *Saprolegnia parasitica* en la incubación de ovas de salmónidos; esta misma concentración también fue recomendada por Sharp et al. (1952) para el control de hongos durante la incubación de ovas de *Esor lucius*. Martin (1968) consideró que la aplicación de concentraciones altas durante corto períodos de tiempo no resultaron ser totalmente eficaces en su acción fungicida. Por otro lado, Scott & O'Warren (1964) hicieron hincapié en la importancia de conocer la concentración efectiva más baja del Verde de Malaquita puesto que así se optimizaría su uso como fungicida. Nos vemos entonces en la necesidad de ajustar las concentraciones a condiciones de cría de cada especie y a la sensibilidad de la micobiota propia, con el fin de que los tratamientos sean más efectivos menos contaminantes.

Conforme avanzaron las investigaciones se encontraron variaciones en la sensibilidad al VM entre las distintas especies de peces; estos aspectos fueron tratados en detalle en el Capítulo IV. Por ello resulta de importancia considerar que al evaluar la capacidad fungicida de una sustancia se deben tener en cuenta tanto, los factores externos que puedan alterar su toxicidad, como también las condiciones biológicas de la especie que será objeto de tratamiento. Dado que los estudios realizados por diversos autores indican que la toxicidad de esta sustancia química varía con la especie, estadio de desarrollo, el peso de los individuos prueba; no se recomienda el uso generalizado de una sustancia a una determinada concentración en el cultivo de una gran variedad de peces de diferentes tamaños y especies.

En los ensayos de eficacia realizados con *S. ferax*, encontramos que el porcentaje de sobrevivencia en las ovas tratadas con VM (56,67 %) resultó ser muy cercano al obtenido en el grupo Control (51,65 %). Aunque la tasa de infección en VM fue numéricamente menor que la del grupo Control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas. Por otro lado, la tasa de mortalidad registrada el grupo tratado con VM alcanzó valores más elevados (28,33 %) que los registrados para otras sustancias. Según los resultados obtenidos podemos concluir

que el VM no resultó ser eficiente al mejorar la tasa de eclosión en las ovas expuestas a *S. ferax*, debido principalmente a que aún, en concentraciones por debajo de la NEC esta sustancia es capaz de provocar una elevada mortalidad en ovas de pejerrey.

En el caso de *A. racemosa* aunque el porcentaje de sobrevivencia en la ovas expuestas a VM (66,67 %) resultó ser aún más bajo que el obtenido en el grupo Control (68,33 %); el VM fue la sustancia más eficaz en su acción fungicida, inhibiendo totalmente la infección de las ovas por *A. racemosa*. Sin embargo, al igual que en los ensayos realizados con *S. ferax*, se registró un elevado porcentaje de mortalidad (33,33 %) en las ovas de pejerrey.

En ensayos de eficacia realizados por diversos autores también se encontraron diferentes sensibilidades a los antifúngicos. Marking et al. (1994); Cline & Post (1972) demostraron la eficacia del Verde de Malaquita en el tratamiento de ovas de salmónidos en dosis de 2- 5 ppm. Liu et al. (1995), al evaluar el efecto fungicida del VM en diferentes etapas del desarrollo embrionario en *Myxocyprinus asiaticus*, encontraron que los mejores porcentajes de sobrevivencia alcanzados, entre 68,7 -75,7 %, fueron obtenidos a una concentración de 1,2 mg.L⁻¹ de VM. Vivar & Bernal (1998) obtuvieron solamente un 12,95 % de mortalidad en ovas expuestas a 2,5 ppm de VM y una mortalidad total a la eclosión de 45,9 %. Srivastava & Srivastava (1978) también evaluaron el potencial fungicida del VM en ensayos de eficacia utilizando a: *Saprolegnia ferax*, *Achlya flagellata*, *Aphanomyces laevis* e *Isoachlya anisospora* var. *indica* y como peces de prueba a: *Puntius sophore*, *Colisa lalia*, *Anabas testudineus* y *Catla catla*; y encontraron que la concentración de VM más baja, con actividad fungicida común a estas especies fue de 0,5 ppm. Willoughby & Roberts (1992) proponen que una concentración de 0,25 mg.L⁻¹ resulta ser efectiva en la eliminación de esporas y micelio vegetativo de *Saprolegnia parasitica*.

Así como existen variaciones en la sensibilidad de los peces a un determinado agente fungicida, es de esperar que las especies fúngicas tengan una respuesta similar y que los efectos de determinada sustancia fungicida dependan también de factores externos que alteren su toxicidad. Por otro lado, algunas características fisicoquímicas del agua como la temperatura, pH y dureza, también son capaces de ejercer influencia sobre muchas especies de Saprolegniales produciendo: la inhibición o estimulación de la esporulación y la entrada o salida de periodos de latencia de las esporas.

El Cloruro de Sodio fue una de las primeras sustancias químicas utilizadas como agente terapéutico en peces y sus ovas. Desde 1947, Canfield aconsejaba el uso de inmersiones en soluciones con 0,5 % de ClNa para el control de micosis en peces. Desde entonces, se han realizado diversos estudios orientados a conocer las concentraciones de ClNa efectivas para el control infecciones fúngicas, evaluando su efecto sobre la sobrevivencia o la tasa de eclosión. Una de las cualidades más destacables de esta sustancia es que, además de ser un compuesto de bajo costo y fácil disponibilidad, al no dejar residuos peligrosos, su uso no conlleva riesgo ambiental alguno, ni es capaz de dañar o alterar negativamente el crecimiento de los peces y por lo tanto no es considerada una sustancia química nociva (Waterstrat & Marking, 1995; Treves & Brown, 2000; Khodabandeh & Abtahi, 2006). Por estas razones Marking et al. (1994); Kitancharoen et al. (1998) y Romero (2003) señalaron que la aplicación de sal como tratamiento profiláctico, resulta ser efectiva en la prevención y ataque de agentes infecciosos, así como también en el control de infecciones fúngicas en ovas de diferentes especies de agua dulce de interés comercial.

La tolerancia a la salinidad en los Oomycetes es un aspecto que desde hace mucho tiempo ha generado controversia. Te Strake (1959) afirmó que la escasez de nutrientes propia de los ambientes estuarinos es un factor que limita la distribución de las Saprolegniales en ambientes con concentraciones salinas menores a los 2,8 ppt. Por otro lado Johnson et al. (2002), en una recopilación de los trabajos realizados por Höhnk (1939, 1956, 1957, 1961), mencionaron que dicho autor logró aislar especies de Saprolegniaceas de ambientes cuyos tenores de salinidad no superaron los 15 ppt, observando además que el aumento de la salinidad provocó un retraso en el crecimiento de dichas especies. Más adelante, Artemchuk (1974) corroboró lo observado por Höhnk (1939), al encontrar en sus muestreos que muchos de estos organismos ocurrieron en regiones litorales de baja salinidad y abundantes detritos, ésta última condición proporciona una fuente de nutrientes, considerados por Te Strake (1959) como uno de los factores condicionantes de la distribución de Saprolegniales en ambientes salobres. En todo caso, la tolerancia a la salinidad no parece ser una característica común a todas las especies de Saprolegniales ya que se han encontrado diferentes géneros y especies en distintos rangos de salinidad entre las que podemos mencionar a: *A. americana* y *Dictyuchus* sp. encontrados en salinidades de hasta 3 g.L⁻¹; *A. flagellata* y *S. australis* en concentraciones de sal de 6

g.L⁻¹; y especies no determinadas de los géneros *Saprolegnia* y *Achlya* que fueron encontradas en ambientes con salinidades de 8 y 12 g.L⁻¹ respectivamente (Padgett, 1978a).

Aunque *S. ferax* y *A. racemosa* han sido previamente aisladas de ambientes acuáticos salobres (Johnson et al., 2002). En los ensayos realizados encontramos que el aumento de la concentración de ClNa tuvo un efecto inhibitor del crecimiento vegetativo de ambas especies. Resultados similares fueron observados por Ali (2005) en *S. parasitica* cuyo crecimiento vegetativo se vió negativamente afectado con el aumento de la salinidad. Nuestros hallazgos concuerdan con las observaciones de Duniway (1979), quien sostiene que los miembros de la Familia Saprolegniaceae se encuentran entre los organismos más intolerantes a la disminución de potencial agua.

El crecimiento de ambas especies fue inhibido en concentraciones por debajo de la Concentración de No efecto (NEC) 28,68 g.L⁻¹ y la CL₁₀ Probit (27,25 g.L⁻¹) para ovas de pejerrey. El hecho de que la ovas de pejerrey exhiban una NEC tan elevada favorece la utilización del ClNa como agente fungicida, puesto que las concentraciones recomendadas por diversos autores para el tratamiento y control de la Saprolegniasis en una gran variedad de especies ícticas, se encuentra entre los 20-30 g.L⁻¹ (Marking et al., 1994; Kitancharoen et al., 1997; Treves & Brown, 2000).

A. racemosa resultó ser más sensible al ClNa, siendo completamente inhibida al ser expuesta a 15 g.L⁻¹ de ClNa; también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las TC del Control y de todas las concentraciones. Los porcentajes de inhibición obtenidos a 7,5 y 10 g.L⁻¹ fueron de 33,53 y 76,88 %, encontrándose dentro de este rango de concentraciones a la CIM (8,50 g.L⁻¹). El rango de salinidad en el que se obtuvo crecimiento *in vitro* en nuestra cepa de *A. racemosa* se encuentra dentro del nivel de salinidad tolerado por Saprolegniales en ambientes naturales, cuyo limite superior, según Höhnk (1956), es de hasta 15 g.L⁻¹. A pesar de lo antes mencionado, Scott (1962) aisló a una cepa de esta especie en ambientes con una salinidad de 16,13 g.L⁻¹, hecho que demuestra que aún entre cepas de una misma especie pueden existir diferencias e la tolerancia a la salinidad.

Por otro lado, la TC de *S. ferax* en los grupos expuestos a concentraciones mayores o iguales a 10 g.L⁻¹ resultó ser estadísticamente menor a la del grupo Control. Los porcentajes de inhibición para *S. ferax* oscilaron entre los 19,08 - 83,85 %; la CIM, ubicada entre los 10 y 15 g.L⁻¹, resultó en 13,20 g.L⁻¹. Finalmente en una

concentración de 30 g.L⁻¹ el crecimiento de *S. ferax* fue totalmente inhibido. Rakmanee et al. (2004) obtuvieron resultados similares en ensayos realizados en Agar Glucosa Extracto de Levadura (GY), con *Saprolegnia diclina*, encontrando que esta especie fue capaz de tolerar concentraciones de ClNa de hasta 30-35 g.L⁻¹, y tanto *Achlya ambisexualis* como *Achlya sp.* fueron capaces de crecer sólo en 10-15 g.L⁻¹ de ClNa. Nuestros resultados también concuerdan con las investigaciones realizadas por Smith et al. (1990), quienes encontraron que la biomasa de *Saprolegnia ferax* y *S. diclina* se redujo considerablemente al disminuir el potencial hídrico. Otros autores, Marking et al. (1994), Pickering (1994) y Willoughby (1994), coincidieron en señalar que el agua de mar, con una salinidad de 29 g.L⁻¹, resulta ser letal para *S. parasitica* y otras especies del género *Saprolegnia*. Si comparamos la concentración inhibitoria encontrada para *S. ferax* (25 g.L⁻¹) con la obtenida por Ali (2005) para *S. parasitica* (8,18 g.L⁻¹) podemos inferir que la tolerancia a la salinidad es un atributo específico.

Como respuesta al aumento de la salinidad observamos también, en ambas especies, un retraso en el inicio del crecimiento. Al exponer a *S. ferax* a 20 y 25 g.L⁻¹, el crecimiento empezó el cuarto día de exposición; en *A. racemosa*, éste fue observado luego del cuarto y quinto día de exposición, en las placas expuestas a 7,5 y 10 g.L⁻¹.

En cuanto al efecto del ClNa sobre los caracteres morfológicos de *S. ferax* y *A. racemosa* podemos mencionar como hallazgo distintivo el hecho de que en ninguno de los tratamientos se observó la formación de oogonios. Nuestras observaciones concuerdan con lo señalado por Smith et al. (1990) quienes encontraron que la formación de oogonios de las especies de *Saprolegnia* fue más sensible a la reducción de potenciales osmóticos que el crecimiento vegetativo. También Höhnk (1956, 1957, 1961) en los numerosos trabajos en los que reporta el hallazgo de Saprolegniales en ambientes salobres, menciona que por lo general éstos no exhibieron la fase reproductiva sexual (Johnson et al., 2002). Por otro lado Ali (2005) observó una escasa formación de anteridios y oogonios de menor tamaño y con signos de plasmólisis, patrón que se acentuó al aumentar el tiempo de exposición y los niveles de ClNa de 0,55 a 9,93 g.L⁻¹. Nótese que las concentraciones más elevadas ensayadas por Ali (2005) (8,176 y 9,93 g.L⁻¹), se corresponden con las concentraciones más bajas utilizadas en nuestros ensayos (7,5 y 10 g.L⁻¹), a pesar de los efectos adversos, este autor aún logró observar la presencia de escasos oogonios pequeños, con plasmólisis

severa y anteridios no funcionales. Otros Oomycetes como *Phytophthora* son capaces de formar oogonios normales en concentraciones de ClNa de 1 - 2 M (58,49 - 116,98 g.L⁻¹) pero al ser incubados en 5 M presentaron un elevado porcentaje de oosporas con un alto grado de plasmólisis (Jiang & Erwin, 1990).

En los ensayos realizados también observamos que las alteraciones en el micelio fueron características para cada especie. En *S. ferax* se observó micelio muy ramificado formando ramificaciones angulosas, o dicotómicas rectas, articuladas de tipo arborescente, la porción terminal de las hifas adoptó una disposición en espiral; mientras que en *A. racemosa* la característica más llamativa fue la presencia de constricciones y ensanchamientos hifales. Ali (2005) encontró que en concentraciones de ClNa tan bajas como 0,07 M (= 4,09 g.L⁻¹), fueron suficientes para provocar alteraciones similares en el micelio *S. parasitica*; tales como la presencia de abundantes ramificaciones con extremos hifales dañados, y en 0,14 M (=8,18 g.L⁻¹) observó abundantes hifas delicadas con plasmólisis. Por su parte Elliott (1972) observó que el micelio de *Phytophthora cactorum* tratada con Cloruro de Sodio, desarrolló ramas cortas y retorcidas semejantes a las observadas en *S. ferax*.

Finalmente, no se llevaron a cabo tests de eficacia con ClNa, esto debido a que se aislaron otras especies fúngicas, no pertenecientes al Reino Straminipila, asociadas a ovas de pejerrey en elevadas concentraciones de ClNa, y se encontró que dichas especies exhibieron una importante tolerancia a la salinidad (Pacheco Marino et al., 2008b). Sin embargo, debido a que su sensibilidad a la salinidad ha sido demostrada en los ensayos *in vitro*, es probable que en ensayos de desafío con *S. ferax* y *A. racemosa*, el Cloruro de Sodio actúe controlando de manera eficaz la tasa de infección por estas especies.

Aunque algunas especies de Saprolegniales son capaces de esporular en condiciones salinas fluctuantes, tal como lo demostró Padgett (1978b, 1980) en *S. australis*, para que esto suceda es necesario que la salinidad disminuya hasta 3 g.L⁻¹, concentración que se encuentra por debajo de las concentraciones inhibitorias medias (CIM) de ambas especies (13,20 y 8,50 g.L⁻¹). La sensibilidad a la salinidad ha sido demostrada también por Smith et al. (1990), quienes encontraron que el aumento de la salinidad ocasiona una notable disminución en la formación de zoosporangios y la esporulación de *S. ferax* y *S. diclina*. A su vez, según los hallazgos de Ali (2005), la formación de esporangios fue muy sensible a la salinidad observándose muy rara-

mente su formación y también la liberación de esporas en salinidades de 0,03 M (= 1,75 g.L⁻¹).

Por otra parte, observaciones realizadas en otras especies fúngicas anamorfias de Ascomycota, revelaron que el aumento de la salinidad actúa distorsionado la esporogénesis y frenando la formación de conidióforos y conidios en *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. wentii*, *Paecilomyces lilacinum*, *Trichoderma harzianum* y *T. viride*; y también afectan la germinación de conidios de *Fusarium moniliforme* (Ali, 2005; Mehdy et al., 1996; Abou-Zeid, 2000). Sin embargo, a que pesar los estudios anteriores indican que el ClNa ejerce efectos negativos sobre muchas especies del Reino Fungi, y que los Oomycetes son especialmente sensibles al estrés osmótico, estos aspectos deberán ser discutidos bajo la luz de pruebas fisiológicas más complejas que las realizadas en el presente trabajo.

La Formalina, además de ser un desinfectante de uso general en acuicultura, ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas en ovas de peces, siendo el agente fungicida de elección de los criaderos de peces de Estados Unidos, país en el que su utilización se encuentra restringida al tratamiento de ovas de salmónidos y esócidos. La urgente necesidad de tratamientos antifúngicos efectivos que reemplacen al Verde de Malaquita, ha llevado a que el Formaldehído resulte siendo uno de los desinfectantes más utilizados en la profilaxis durante el período embrionario y los primeros estadios del desarrollo larval.

Diversos estudios han sido realizados con el objeto de ampliar el espectro de especies en las que esté permitida la utilización del Formaldehído. Estos estudios se han enfocado principalmente en la determinación de la sensibilidad al Formaldehído y la evaluación de su capacidad fungicida en condiciones de cultivo. Por el contrario existen pocas investigaciones enfocadas a determinar el efecto fungicida del Formaldehído sobre determinadas especies de Oomycetes.

En los ensayos realizados con Formalina se encontró que *S. ferax* y *A. racemosa* son muy sensibles a esta sustancia, observándose una inhibición total del crecimiento a concentraciones mucho menores que la NEC para ovas de pejerrey (530,00 µl.L⁻¹) e inferiores también a las concentraciones recomendadas por diversos autores para el tratamiento y control de Saprolegniasis en peces y ovas. Los grupos Control de ambas especies crecieron de manera habitual, en éstos se observó abundante micelio con crecimiento activo, oogonios y yemas de características normales. *S. ferax* no

logró crecer en ninguna de las concentraciones de Formalina ensayadas. *A. racemosa* sólo logró crecer en $20 \mu\text{L.L}^{-1}$, concentración en la que el crecimiento fue significativamente menor al obtenido en el grupo Control ($p < 0,05$), observándose además una IC del 39,75 %, mientras que en $40 \mu\text{L.L}^{-1}$ la IC logró alcanzar el 100 %. Finalmente, entre ambas concentraciones se encontró la CIM ($23,40 \mu\text{L.L}^{-1}$). Las concentraciones inhibitorias encontradas son mucho menores que las reportadas por Stueland et al. (2005) para *S. parasitica* con una concentración mínima inhibitoria (48h) entre 50 y $100 \mu\text{L.L}^{-1}$ y una concentración letal mínima de 250 a $500 \mu\text{L.L}^{-1}$ para exposiciones de 60 minutos.

En cuanto a las características morfológicas, en *A. racemosa* únicamente se observó desarrollo de escaso micelio vegetativo disperso, sin características morfológicas llamativas; oogonios, anteridios u otras estructuras reproductivas asexuales estuvieron ausentes en todas las réplicas. No se encontraron investigaciones previas que hayan abordado el estudio de las alteraciones a nivel morfológico, y/o reproductivo provocadas por el Formaldehído en especies de Saprolegniales.

Los ensayos de eficacia demostraron que, dentro de las sustancias ensayadas en el presente estudio, la Formalina resultó ser la única eficaz en el control y tratamiento de infecciones por *S. ferax*, ya que la tasa de sobrevivencia más elevada fue obtenida en los grupos tratados con $40 \mu\text{L.L}^{-1}$ de Formalina (85,49 %); además de no registrarse infecciones el porcentaje de mortalidad se mantuvo por debajo del 10 %, siendo menor al obtenido en los otros tratamientos. Waterstrat & Marking (1995) y Schreier et al. (1996), también obtuvieron elevados porcentajes de sobrevivencia embrionaria al utilizar Formalina en ovas de salmón chinook y trucha arco iris, concluyendo que la Formalina es el mejor tratamiento para prevenir y eliminar la acción de la Saprolegniasis causada por *S. parasitica*.

Nuestros resultados han sido ratificados por las investigaciones hechas por Cline & Post (1972), Marking et al. (1994), Barnes et al. (1997) y Barnes et al. (2000) quienes utilizaron Formalina durante la incubación de ovas de salmón chinook y trucha arco iris, logrando reducir la tasa de mortalidad y obtener óptimos porcentajes de sobrevivencia (87,9 - 93,1 %). Además el tratamiento con Formalina logró prevenir y eliminar efectivamente los “hongos” causantes de Saprolegniasis. También, en ensayos realizados en ovas de carpa común (*Cyprinus carpio*) por Froelich & Engelhardt (1996) y Khodabandeh & Abtahi (2006) encontraron que el tratamiento

con Formalina en concentraciones de 250 y 400 μL^{-1} respectivamente, mantienen bajo control el desarrollo de Saprolegniasis y mejoran considerablemente la tasa de eclosión.

A diferencia de *S. ferax*, la concentración ensayada de Formalina no exhibió una acción fungicida semejante en *A. racemosa*, en donde a pesar de haber obtenido porcentajes de sobrevivencia superiores a los del Control, la tasa de infección fue del 18,69 %, estadísticamente igual a la obtenida en el Control. Estos resultados se correlacionan con las observaciones realizadas en los ensayos *in vitro*, en los que *A. racemosa* también resultó ser la especie más tolerante y nos llevan a confirmar nuevamente que ambas especies exhiben una sensibilidad diferente al Formaldehído. En investigaciones anteriores diversos autores han evaluado la capacidad de la Formalina para controlar los eventos de Saprolegniasis inespecífica en ovas de *Myxocyprinus asiaticus* (Liu et al., 1995) y en ovas de salmónidos (Rach et al, 1997; Vivar & Bernal, 1998), obteniendo resultados disímiles que pueden deberse a la falta de estandarización de las condiciones de ensayo, como también a la diferente sensibilidad a la Formalina por parte de los peces y las cepas fúngicas empleadas como objeto de estudio .

Esta diferencia en la sensibilidad explica el por qué diversos autores recomiendan el uso de la Formalina en concentraciones que abarcan un rango muy amplio de valores. Así por ejemplo, Gieseke et al. (2006) tras estudiar el efecto fungicida de la Formalina en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* con Saprolegniasis inducida por abrasión, encontraron que concentraciones entre 50 y 150 μL^{-1} son efectivas en el control de *S. parasitica*. Treves & Brown (2000) recomiendan el uso de una dilución 1:600 (=1667 ppm), valor que es 10 veces superior al utilizado normalmente en el tratamiento de peces; sin embargo otros autores recomiendan el uso de 1000 ppm en exposiciones intermitentes durante 15 minutos para prevenir las infecciones fúngicas. Celada et al. (2004) encontraron que una concentración de 1500 ppm de Formalina resultó ser insuficiente para controlar el crecimiento de “hongos”, siendo eficaz a una concentración de 4500 ppm; pero debido a que esta concentración es muy alta los tratamientos deberían ser suspendidos antes del inicio de la eclosión.

Tratando de condensar la información disponible, encontramos que las diferentes concentraciones de Formalina recomendadas como tratamiento fungicida se encuentran dentro de un rango muy amplio, en que el que nuestros resultados se ubican

en el límite inferior. No se descarta la posibilidad de que otras especies de Saprolegniales sean mucho más resistentes a la Formalina o que determinadas condiciones en el microambiente generado en los sistemas de incubación, como ser temperatura, presencia de materia orgánica particulada en suspensión, pH, salinidad y dureza de agua, sean favorables para la proliferación de esporas y/o que atenúen o exacerben los efectos tóxicos de la Formalina.

En base a los datos obtenidos sería de utilidad, realizar ensayos estandarizados con una mayor diversidad de cepas fúngicas, de patogenicidad demostrada, con el fin de establecer el nivel de sensibilidad de dichas especies en determinadas condiciones y determinar con certeza si es necesario o no incrementar la concentración de la Formalina para que los tratamientos empleados logren cubrir un espectro más amplio de microorganismos patógenos causantes de Saprolegniasis.

El Ácido Acético es utilizado en acuicultura, principalmente como tratamiento de ectoparásitos en peces de agua dulce mediante inmersiones cortas de 1- 2 minutos en soluciones entre 1000 y 2000 ppm (Noga, 1999); exposiciones más prolongadas pueden generar estrés ácido en los peces. También es necesario considerar que los peces pequeños son más sensibles a esta sustancia. La eficacia del Ácido Acético como fungicida se asocia con su acción antimicrobiana considerada similar a la de otros ácidos orgánicos (Fennema, 1993); su acción inhibidora del crecimiento se debe a que esta sustancia es capaz de interferir en las actividades enzimáticas y alterar la integridad de la membrana celular.

En los ensayos realizados con Ácido Acético el rango de concentraciones utilizadas no ejerció efecto inhibitorio alguno sobre la TC de ambas especies. El crecimiento de *S. ferax* se vió estimulado a una 10 mg.L⁻¹ de AcH, y solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las TC del grupo Control y las placas expuestas a 200 mg.L⁻¹, concentración en la que el crecimiento inició al cuarto día de exposición. El AcH tampoco mostró un efecto inhibitorio sobre *A. racemosa*, pero a diferencia de *S. ferax*, se observó la total inhibición del crecimiento en la placas expuestas a 200 mg.L⁻¹; la TC también resultó significativamente menor ($p < 0,05$), en 25 mg.L⁻¹. Durante un período de exposición de 6 días *S. ferax* y *A. racemosa*, describieron un patrón de respuesta al Ácido Acético similar, tal como se observa en la Figura 5.10. En la Tabla 5.9 se muestran las IC; la CIM se ubicó entre 100 y 200 mg.L⁻¹, siendo 167,80 y 152,30 mg.L⁻¹ para *S. ferax* y *A. racemosa*,

respectivamente.

Si, tal como lo menciona Fennema (1993) la acción microbicida del Ácido Acético se basa principalmente en los efectos adversos producidos por el descenso del pH, es de esperar que el crecimiento de ambas especies no haya sido inhibido, puesto que estos organismos son capaces de crecer y desarrollar en medios cuyo pH tiende a la acidez. Kitancharoen et al. (1996) mencionan que los rangos óptimos de pH, en especies del género *Saprolegnia*, tienden a ser ácidos, resultando en 5,0 a 5,5 para el crecimiento vegetativo y de 6,2 para la formación de zoosporas.

Lund (1934) estudió la distribución de las Saprolegniales según el pH del ambiente del que fueron aisladas, clasificándolo en: altamente ácido (3,5 - 4,5), levemente ácido (5,3 - 6,8) ácido-neutro (5,2 - 7,5) alcalino constante (7 - 8,4), y encontró que un 77,4 % de especies fueron aisladas de ambientes altamente ácidos, encontrando en esta categoría a *S. ferax* y *A. racemosa*, las que también fueron recuperadas de ambientes alcalinos constantes pero únicamente *A. racemosa* fue aislada de ambientes de pH neutral ácido. Resultados similares fueron obtenidos por Perrot (1960) quien encontró que un 48,9 % de las especies en ambientes con pH ácido-neutro, *A. racemosa* y *S. ferax* estuvieron distribuidas tanto en ambientes de pH ácido-neutro (6,4 - 7) como en pH neutro-constante (7 - 7,7), pero sólo *A. racemosa* fue aislada de ambientes de pH neutro-alcalino (7,4 - 9,7). En los relevamientos realizados por Srivastava (1967) un 44,4 % del total de especies fueron aisladas de ambientes con un pH neutro-ácido (6,4-7,5); sólo se aisló a *S. ferax* distribuida en ambientes de pH variable entre 5 - 8,8. Estos estudios nos llevan a concluir que la acidez del medio no es un factor limitante de la distribución de las Saprolegniales en ambientes naturales, y que es probable que en condiciones de cultivo el pH ligeramente ácido tampoco inhiba el crecimiento y desarrollo de estos organismos.

Barbier (1969, 1971) estudió la respuestas de *Achlya flagellata* a variaciones del pH en un rango de 4,5 - 7,9 y encontró que esta especie fue capaz de crecer inmediatamente en un pH de 4,5 - 5,5 pero en los pH más altos el crecimiento se inició tardíamente, por lo que al parecer el aumento del pH no inhibiría el crecimiento sino que alargaría el período de latencia. Nolan (1975) reportó valores óptimos de pH, para *Saprolegnia megasperma* aislada del nematodo *Neomesomeris fluminalis*, ubicados entre 5,2 - 5,7. Posteriormente, encontró que el pH óptimo para una cepa de *S. ferax* (Gruit.) Thuret., aislada de vísceras de una larva de *Simulium vittatum*,

fue de 5,6 (Nolan, 1976). Kitancharoen et al. (1996) estudiaron el efecto del pH en la germinación y crecimiento de dos especies de *Saprolegnia* aisladas de peces, *S. parasitica* y *S. diclina* y encontraron que ambas fueron capaces de crecer rápida y vigorosamente a un pH de 4,8 y 3,5 respectivamente. Rakmanee et al. (2004) encontraron que el 50 % de las cepas de *S. diclina* fueron capaces de crecer en valores de pH entre 4 y 12; el porcentaje restante creció hasta en un pH de 11. El 83,3 % de las cepas exhibieron una tasa de crecimiento mayor o igual a 1,5 - 2,0 cm/día en un pH comprendido entre 7 y 8, y una tasa de crecimiento menor, entre 0,51-1,0 cm/día, en pH de 5- 11. Tanto *Achlya* sp., como *Achlya ambisexualis* crecieron en un rango de pH de 4 a 11, mostrando una tasa de crecimiento (0,51 - 1,0 cm/día) menor a la de *S. diclina* pero en un rango más amplio de pH, de 6 a 9. Los resultados obtenidos por Charuwam & Rakmanee (2004) indican que en general las especies del género *Saprolegnia* son capaces de resistir y crecer en condiciones fuertemente ácidas, mientras que las del género *Achlya* son capaces de tolerar valores de pH alcalinos más extremos.

En cuanto a las alteraciones morfológicas observadas, en *S. ferax* es característica la presencia de oogonios alargados de pared gruesa y contenido difuso, algunos **proliferando** con abundantes oosporas ubicados sobre pies helicoidales. En 10 mg.L⁻¹ el número de oogonios duplica el valor obtenido para el Control; luego su número desciende progresivamente al incrementar la concentración llegando a ser, en las placas expuestas a 100 mg.L⁻¹, un 73 % menor que el obtenido en el Control. Kitancharoen et al. (1996) observaron que las colonias de *S. parasitica* que crecieron a un pH de 4,8 fueron pequeñas y densas, con hifas contorsionadas con ramas cortas e irregulares, mientras que *S. diclina* no presentó alteraciones morfológicas en las mismas condiciones.

En *A. racemosa* las alteraciones morfológicas fueron más diversas observándose oogonios septados, o con prominentes papilas, los que en algunas casos **proliferan** varias veces y se encuentran agrupados en sectores. En cuanto al número de oogonios, en esta especie se observó un notable incremento en las placas expuestas a 25 mg.L⁻¹, llegando a superar, en 7 veces el valor obtenido para el Control (298 oogonios/placa); posteriormente a pesar de que los recuentos disminuyen hasta resultar en 704 oogonios/placa, en 100 mg.L⁻¹, este valor continua siendo mayor al registrado en el grupo Control. Al respecto, Johnson et al. (2002) mencionan que los

valores de pH levemente ácidos favorecen la reproducción sexual. Diversos autores encontraron que estas condiciones también estimulan la maduración de las oosporas de *A. flagellata* y *A. tuberculata*. Sin embargo, Loundsbury (1930) afirma que no todas las Saprolegniales responden tan expresamente a los cambios de pH en el medio, tal como lo observó en *Protoachlya paradoxa*, en la que las variaciones del pH no produjeron efecto alguno en su reproducción sexual.

Al reemplazar el Ácido Acético Glacial por Ácido Acético Tamponado, observamos que el efecto tóxico de esta sustancia se evidenció claramente en ambas especies, ya que sólo lograron crecer luego del tercer día de exposición y en la más baja de las concentraciones ensayadas (100 mg.L^{-1}) y aún en esta la TC fue significativamente inferior a la obtenida en el grupo Control. Concentraciones superiores a los 100 mg.L^{-1} tuvieron un efecto letal sobre ambas especies; estos resultados indican que existe un amplio rango de concentraciones con efecto fungicida que se encuentra por debajo de la NEC obtenida para ovas de pejerrey ($532,9 \text{ mg.L}^{-1}$).

En la Tabla 5.11 se presentan las IC para ambas especies; la IC de *S. ferax* en las placas expuestas a 100 mg.L^{-1} , fue de 84,78 %, y la CIM ($58,97 \text{ mg.L}^{-1}$) se ubicó por debajo de los 100 mg.L^{-1} ; mientras que para *A. racemosa* a la misma concentración la IC resultó en 34,55 %, y la CIM ($123,61 \text{ mg.L}^{-1}$) se ubicó entre los 100 y 200 mg.L^{-1} . Estos resultados indican que *S. ferax* es más sensible al Ácido Acético tamponado que *A. racemosa*. No se observaron alteraciones morfológicas en el micelio de *S. ferax*, pero sí un aumento en el número de oogonios en el grupo expuesto a 100 mg.L^{-1} , el que fue 1,4 veces mayor al obtenido en el Control, además estas estructuras fueron más robustas y con mayor número de oosporas. Estos resultados confirman que el descenso del pH no es un factor desencadenante de la inhibición del crecimiento en estas especies. Finalmente, no se encontraron referencias bibliográficas referidas a la sensibilidad de Oomycetes u organismos similares al Ácido Acético tamponado.

En los ensayos de eficacia encontramos que el Ácido Acético tamponado mejoró el porcentaje de sobrevivencia de las ovas de pejerrey expuestas a *S. ferax*, pero no fue eficaz en el control de la infección. Por el contrario, en los desafíos con *A. racemosa* se observaron las más altas tasas de sobrevivencia (83,33 %) en el grupo tratado con Ácido Acético tamponado y el porcentaje de infección (10,00 %) fue estadísticamente inferior al del grupo Control sin tratamiento (28,33 %). Además el porcentaje de

mortalidad en estos ensayos no superó el 10,00 %. En ensayos de eficacia realizados por Marking et al. (1994) en ovas de *Onchorhynchus mykiss*, encontraron que Ácido Acético mostró un efecto inhibitor del crecimiento de *S. ferax* y *S. hypogina* a una concentración de 300 ppm. En nuestros ensayos *in vitro* encontramos que a una concentración de 200 mg.L⁻¹, el crecimiento en *A. racemosa* fue totalmente inhibido y que en *S. ferax* el porcentaje de inhibición fue del 68,65 %; es probable que a una concentración mayor, cercana a los 300 mg.L⁻¹, el Ácido Acético tenga un efecto inhibitor mayor y semejante al reportado por Marking et al. (1994). Vivar & Bernal (1998), al estudiar la capacidad fungicida del Ácido Acético no encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasa de infección, 16,6 y 15,55 %, entre los grupos tratados con 100 y 300 mg.L⁻¹ respectivamente, por tal razón recomendaron el uso de 500 mg.L⁻¹ de Ácido Acético como fungicida debido a que en esta concentración la tasa de infección y la mortalidad total fueron significativamente menores que las obtenidas en los tratamientos con concentraciones menores. La concentración recomendada por Vivar & Bernal (1998) no puede ser aplicada en ovas de pejerrey ya que ésta supera la CL₅₀-96h (≈ 230 mg.L⁻¹). Por otro lado, según las investigaciones realizadas por Shreck et al. (1991), el Ácido Acético exhibe una limitada capacidad fungicida, en ensayos de inhibición realizadas *in vitro* con *S. hypogina* y ensayos de eficacia realizados *in vivo* con ovas de infectadas con *S. ferax*, estos autores encontraron que concentraciones tan altas como 400 mg.L⁻¹ no fueron capaces de mejorar la tasa de eclosión, ni disminuir la tasa de infección en ovas de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*).

La desinfección del ovas de peces mediante el uso de Iodóforos ha sido practicada desde 1970 con el fin de reducir la transmisión de patógenos virales y bacterianos asociados con ovas, fluido coleómico o esperma; llegando a establecerse como una practica habitual en las estaciones de cría para mitigar la amenaza de agentes patógenos de transmisión vertical utilizando habitualmente concentraciones entre 50 y 100 mg.L⁻¹.

La valoración de las cualidades de los Iodóforos como potenciales agentes fungicidas ha sido investigada por diversos autores (Piper et al., 1982; Subasinghe & Sommerville, 1985; Schreck et al., 1990, 1992). Piper et al. (1982) reconoce al Iodo como un tratamiento efectivo en el control y tratamiento de la Saprolegniasis en

ovas de salmónidos. Shreck et al. (1991) determinaron que la concentración mínima inhibitoria para *S. hypogina* fue menor a 100 mg.L⁻¹ de Iodo. Además, en pruebas de eficacia con ovas de salmónidos infectadas con *S. ferax* encontraron que, tratamientos con una concentración de 50 mg.L⁻¹ durante periodos de exposición de 15 y 60 minutos, son capaces de suprimir la propagación de hongos en los huevos y mejorar el porcentaje de eclosión. Romero (2003) encontró que el Iodo fue efectivo al inhibir la infección de ovas por Saprolegniales, pero esta sustancia es capaz de provocar elevados porcentajes de mortalidad, ($\approx 30\%$) en ovas de *Galaxias maculatus*, al ser utilizada en concentraciones mayores o iguales a 100 ppm.

En los ensayos realizados con Ioduro de Potasio y Iodopovidona encontramos que ambas sustancias no fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. ferax* y *A. racemosa* en las concentraciones ensayadas; las que en ambos casos no superaron los valores de NEC para ovas de pejerrey, los que fueron: de 41,80 y 119,60 mg.L⁻¹ para el IK disuelto en ClNa 0,9 % y ADR respectivamente y para la Iodopovidona resultaron en 59,70 mg.L⁻¹ en ClNa 0,9 % y 167,2 mg.L⁻¹ en ADR.

En la Figura 5.16 podemos ver que hasta el sexto día de exposición el crecimiento de ambas especies permanece inalterado por el incremento de la concentración de IK. Esta sustancia tuvo un efecto levemente estimulador del crecimiento de *A. racemosa*; en las placas expuestas a 10 y 80 mg.L⁻¹. En todos los casos las variaciones en las TC fueron aleatorias y no estuvieron relacionadas con la concentración. En *S. ferax*, a lo largo del perfil de concentraciones se alternan indistintamente efectos levemente inhibitorios y estimuladores, pero en ninguno de los casos se encontró diferencias estadísticamente significativas con el Control. El porcentaje de inhibición máximo alcanzado en *S. ferax* fue de 4,86 % a 80 mg.L⁻¹, por el contrario, en *A. racemosa* se observan valores de IC negativos, los que indican que el IK actuaría estimulando el crecimiento de esta especie.

Como podemos observar en la Figura 5.19, la Iodopovidona sólo ejerció un efecto negativo sobre el crecimiento de *S. ferax* en las placas expuestas a 80 mg.L⁻¹, mientras que a una concentración de 180 mg.L⁻¹ de Iodopovidona mostró un efecto estimulador del crecimiento. En *A. racemosa* el efecto inhibitorio de la Iodopovidona fue observado en las placas expuestas a 120 y 180 mg.L⁻¹, y en las expuestas a 20 mg.L⁻¹ se observó una leve pero significativa estimulación del crecimiento. En la Tabla 5.15 se presentan los porcentajes de IC de *S. ferax* y *A. racemosa*, expuestas a

la Iodopovidona, esta sustancia no tuvo un efecto inhibitor directamente relacionado con su concentración, ya que en ambas especies se observa de manera alternada y aleatoria la inhibición y estimulación del crecimiento. En ambos casos, tampoco se obtuvo una inhibición del crecimiento significativa que permita el cálculo de las concentraciones medias de inhibición (CIM).

Resultados similares fueron reportados por Khodabandeh & Abtahi (2006) quienes encontraron que el Iodo fue poco eficaz en el control de infecciones por *Saprolegnia* sp. en ovas de carpa común (*Cyprinus carpio*), aunque el porcentaje de eclosión se incrementó en un 27 % en las ovas expuestas a 200 mg.L⁻¹; aún en esta concentración se observaron ovas infectadas. Loan et al. (2006) coincide en señalar que el Iodo tiene un efecto levemente inhibitor del crecimiento y la esporulación de *Achlya* sp. en concentraciones de 15 ppm.

En *S. ferax* no se observaron características llamativas en el micelio, el recuento sufrió variaciones no relacionadas con la concentración de IK. El número de oogonios descendió hasta un 32 % en las placas expuestas a 20 mg.L⁻¹ de IK; posteriormente el número fue aumentando hasta sobrepasar, los valores obtenidos en el Control en 1,9 y 1,7 veces, en las placas expuestas a 80 y 120 mg.L⁻¹ de IK respectivamente. Durante la exposición a la Iodopovidona tampoco se observaron alteraciones morfológicas llamativas en esta especie; el número de oogonios disminuyó en un 60,7 % en 20 mg.L⁻¹ para luego ascender y descender aleatoriamente hasta alcanzar un valor semejante al del grupo Control en la concentración más alta de Iodopovidona (180 mg.L⁻¹).

Al exponer a *A. racemosa* al IK se observó una característica distribución “tipo axonomorfa”, y la presencia de acumulaciones electrodensas en la pared de las mismas; también se observaron oogonios septados y **proliferando**. El número de oogonios en todos los tratamientos fue superior al observado en el grupo Control, el valor más alto alcanzado se obtuvo en 20 mg.L⁻¹ (19 veces el del Control) y el más bajo en 120 mg.L⁻¹ (1,8 veces el del Control). Resultados similares fueron observados en *A. racemosa* durante su exposición a la Iodopovidona, donde fue característica la presencia de micelio con ramas secundarias muy cortas dan aspecto dentado; abundantes oogonios con bases anómalas y ornamentaciones onduladas. Los recuentos también resultaron ser más elevados en los tratamientos, llegando a ser, en las placas expuestas a 20 mg.L⁻¹, 28 veces mayores a los del grupo Con-

trol. No se encontró información disponible respecto al efecto de los Iodóforos en la morfología de Saprolegniales u otros organismos filogenéticamente relacionados.

Capítulo 6

Evaluación sobre *Fusarium semitectum* y *Fusarium solani*

6.1. Introducción

En acuicultura es importante conocer los procedimientos para prevenir y controlar los efectos adversos que los agentes patógenos pueden provocar en los peces en sus distintos estadios de desarrollo. El uso de quimioterapéuticos está ampliamente difundido sobre todo en el cultivo de especies de importancia económica como los salmónidos, cíclidos, ciprínidos, etc. La utilización de sustancias fungicidas como el Verde de Malaquita, Peróxido de Hidrogeno, Cloruro de Sodio, entre otras, ha sido motivo de una diversidad de investigaciones para determinar sus efectos sobre parámetros fisiológicos, índices de crecimiento y sobrevivencia (Treves & Brown, 2000). Por su parte, el estudio del efecto de los fungicidas sobre los hongos ha sido abordado con menor frecuencia, y se ha enfocado en especies pertenecientes al Reino Straminipila y específicamente en los Saprolegniales (Oomycetes) agentes causales de la enfermedad denominada Saprolegniasis, enfermedad que afecta a los peces y sus ovas. Estos organismos, son denominados “water molds” o “mohos acuáticos”, y a pesar de que estos poseen un aspecto macroscópico semejante al los hongos verdaderos, no tienen filiación con el Reino Fungi y presentan características morfológicas y fisiológicas distintas (Milanez, 1997). El hecho de que ambos sean denominados “hongos” puede llevar a confusión y a que adopten medidas terapéuticas por extrapolación de los resultados obtenidos en un grupo taxonómica y fisiológicamente disímil,

y que por lo tanto estas medidas no proporcionen resultados esperados. Puesto que, si bien existe abundante información sobre el efecto tóxico de gran variedad de agentes fungicidas sobre las Saprolegniales, los mismos pueden ser utilizados únicamente de modo referencial debido a que la sensibilidad a un determinado agente terapéutico es variable entre especies y estas variaciones pueden ser más pronunciadas aún entre Reinos.

Las especies del género *Fusarium* constituyen uno de los patógenos de organismos acuáticos más representativos del Reino Fungi. La distribución cosmopolita de las especies de este género y su patogenicidad no se ponen en cuestión ya que se las ha encontrado como patógenos de una gran variedad de organismos vegetales y animales, inclusive del hombre. Las infecciones por *Fusarium spp.*, en peces, se caracterizan por presentar focos de inflamación granulomatosa con tendencia a la cronicidad generando, en el caso de tratarse de lesiones externas, una puerta de entrada para otros patógenos como parásitos, bacterias y virus. Aunque los hallazgos anatomopatológicos han sido descritos por diversos autores, la eficacia de los tratamientos contra la Fusariosis no ha sido determinada *in vitro*, ni tampoco se ha demostrado su eficiencia *in vivo*. Esta ausencia de información sobre la sensibilidad de los hongos a la acción de quimioterapéuticos de uso habitual en acuicultura, hace que la extrapolación de tratamientos empleados para controlar las infecciones por “*mohos acuáticos*” sea discutible.

En esta sección se aborda el estudio del efecto fungicida *in vitro* del Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, Formaldehído, Ácido Acético Glacial, Ácido Acético tamponado, Ioduro de Potasio e Iodopovidona, sobre la tasa de crecimiento (TC) de dos especies del género *Fusarium*: *F. solani* y *F. semitectum* (Anamorfos de Ascomycota), aislados de ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*, y de su aptitud como agentes fungicidas.

6.2. Materiales y Métodos

Los ensayos fungicidas se realizaron con dos especies de género *Fusarium*: *F. solani* (LPS 1001) y *F. semitectum* (LPS 1002); las que fueron aisladas de ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*. El procedimiento de aislamiento y tipificación de ambas especies se describe en detalle, en la Sección 2.2.2. Las cepas, objeto de

estudio, fueron solicitadas a la colección de Instituto de Botánica C. Spegazzini.

Se evaluó el efecto de cinco sustancias fungicidas: Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, y Formalina (estabilizada con Metanol), Ácido Acético Glacial, Ácido Acético Tamponado, Ioduro de Potasio y Iodopovidona de una marca comercial denominada Pervinox. Se realizaron ensayos en medio sólido utilizando Agar Czapek-Dox modificado (Kirk et al., 2001) como medio base, con agregado de cada sustancia hasta obtener las concentraciones mencionadas en la Tabla 6.1. La composición del medio de cultivo basal se detalla en el Apéndice A. Para la determinación del rango de concentraciones a ensayar se consideraron parámetros de toxicidad para ovas de pejerrey como la CL_{50} -96h y la Concentración de No Efecto (NEC) de las sustancias ensayadas.

Los inóculos empleados para los ensayos de inhibición del crecimiento fueron provenientes de cultivos monospóricos de *F. solani* y *F. semitectum*. Para la obtención de los mismos, se realizaron suspensiones sucesivas de conidios hasta obtener una cantidad de 50 por campo microscópico (20x); se sembraron 100 μ l de esta suspensión en placas de Petri con Agar agua (Agar 2 % en agua destilada), y fueron incubadas a 25 °C. Luego de 24 horas se observó la germinación de los conidios.

Las placas fueron sembradas con inóculos (3 mm diámetro) provenientes de cultivos monospóricos germinados; con la finalidad de disminuir las pérdidas por evaporación, cada placa fue sellada posteriormente con film adherente y almacenada en una cámara de incubación a 17°C; en el caso del ClNa se realizó, adicionalmente, un ensayo a 25°C. Se realizaron cuatro réplicas para los tratamientos y cinco réplicas

Tabla 6.1: Concentraciones empleadas en los ensayos de inhibición del crecimiento (en cursiva concentraciones por encima de las CL_{50} -96h para ovas de pejerrey).

Sustancia	Concentraciones ensayadas								
	0,25	0,375	0,5	0,75	1	1,5	2	4	8
Verde de Malaquita [mg.L ⁻¹]									
Cloruro de Sodio [g.L ⁻¹]	40	80	120	160					
Formalina [μ l.L ⁻¹]	20	40	80	150	250	450	900		
Ácido Acético Glacial [mg.L ⁻¹]	10	15	25	50	100	200	500	1000	
Ácido Acético Tamponado [mg.L ⁻¹]	100	200	400	600	800	1000	1500	2000	
Ioduro de Potasio [mg.L ⁻¹]	20	30	50	72,5	145	240	480	960	
Iodopovidona [mgIK.L ⁻¹]	30	50	80	120	180	360	720	1440	

para los Controles.

Luego del tercer día de incubación se midió y registró el diámetro de la colonia diariamente en la misma dirección, durante dos semanas, utilizando un calibre Vernier (precisión = 0,1 mm), hasta que el grupo Control de alguna de las especies alcanzara el borde de la placa. La observación de las placas que no alcanzaron el borde, se prolongó por una semana adicional para detectar crecimiento tardío en alguna de las concentraciones.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión simple y se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson (R) y el Coeficiente de Determinación (R²). La Tasa de Crecimiento (TC) se expresó como la pendiente de la recta de regresión para cada condición.

La tasa de inhibición del crecimiento se expresó como porcentaje de reducción del diámetro de la colonia de cada tratamiento comparado con el grupo Control y fue calculado como sigue:

$$\text{Inhibición}[\%] = \left(1 - \frac{\text{Diámetro de colonia tratamiento}}{\text{Diámetro de colonia Control}} \right) \cdot 100 \%$$

La Concentración Inhibitoria Media (CIM), concentración en la que el crecimiento se inhibe en un 50 %, fue calculada mediante la interpolación de los datos de inhibición obtenidos para las concentraciones ensayadas.

6.2.1. Análisis Estadístico

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las Tasas de Crecimiento en las placas adicionadas con las sustancias fungicidas y los Controles, se realizó un análisis de varianza mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis, para el caso de ClNa, y un ANOVA de una vía para las otras sustancias. Las comparaciones entre grupos se efectuaron mediante el método a posteriori de multicomparaciones de Dunnet, utilizando el programa XL Stat 7.5.

6.3. Resultados

En la presente sección se incluyen los resultados de los ensayos realizados con las sustancias fungicidas. A continuación se presenta de manera gráfica el efecto

de cada sustancia sobre el crecimiento de ambas especies en función al tiempo de exposición; seguido de las pendientes obtenidas a partir de la recta de regresión y de los estadísticos: Coeficiente de Correlación de Pearson (R) y Coeficiente de Determinación (R^2); seguidamente se ilustra comparativamente el crecimiento de ambas especies al octavo día de exposición y finalmente se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento para cada especie y sustancia.

El crecimiento de ambas especies respondió a un modelo de regresión lineal simple de origen en cero, tal como lo demuestran los valores del Coeficiente de correlación de Pearson presentados más adelante. En términos generales, los valores del Coeficiente de Determinación indican que las variaciones en el diámetro de colonia, para cada concentración, están determinadas por el tiempo de exposición. Por este motivo la Tasa de Crecimiento (TC) fue expresada como la pendiente de la recta de regresión de los diámetros de colonia obtenidos en cada tratamiento y a cada concentración.

Los valores de las pendientes indicaron que, *en ausencia del agente fungicida*, la TC de *Fusarium semitectum* fue el doble que la de *Fusarium solani* (relación 2.0-2.2). En ambas especies el Coeficiente de correlación de Pearson mostró un alto grado de asociación entre el tiempo de exposición y la concentración de las sustancias. En general, la mayoría de los tratamientos tuvieron un efecto inhibitorio sobre la TC de ambas especies respecto a los Controles, proporcional a la concentración, y estadísticamente significativo.

6.3.1. Verde de Malaquita (Figuras 6.1 a 6.3)

En las Figuras 6.1 y 6.2 se muestra el efecto del Verde de Malaquita sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*; en ambos casos se observa una tendencia a disminuir el crecimiento conforme se incrementa la concentración de Verde de Malaquita. Aunque, en ambas especies se registró crecimiento en todas las concentraciones ensayadas, se observa un retraso de éste en las placas expuestas a 2 mg.L^{-1} de VM, en las que el crecimiento se inició el quinto día de incubación, además el crecimiento en 4 mg.L^{-1} fue observado sólo en *F. solani* y se inició al sexto día de incubación.

Los valores de las pendientes son presentados en la Tabla 6.2. En ambos casos fueron decreciendo al incrementar la concentración de VM; en todos los tratamientos las TC fueron menores a las del grupo Control encontrándose diferencias estadísti-

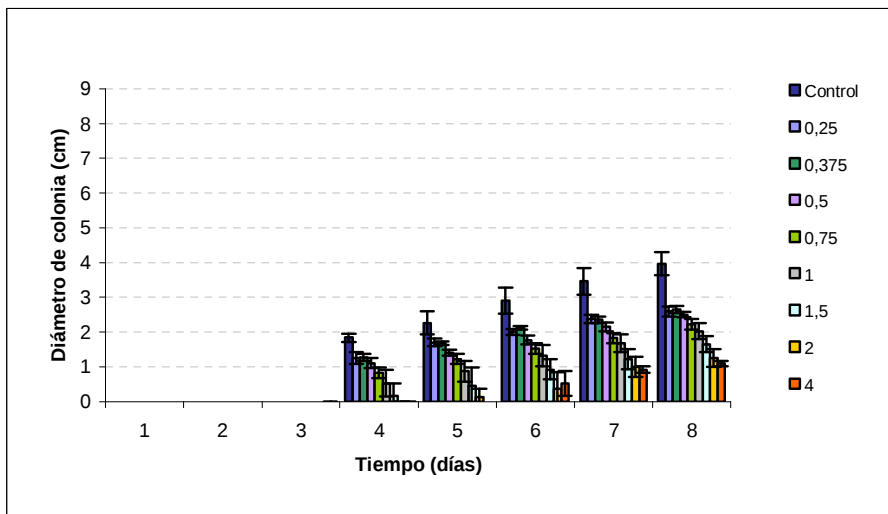


Figura 6.1: Efecto del Verde de Malaquita sobre el crecimiento de *F. solani*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

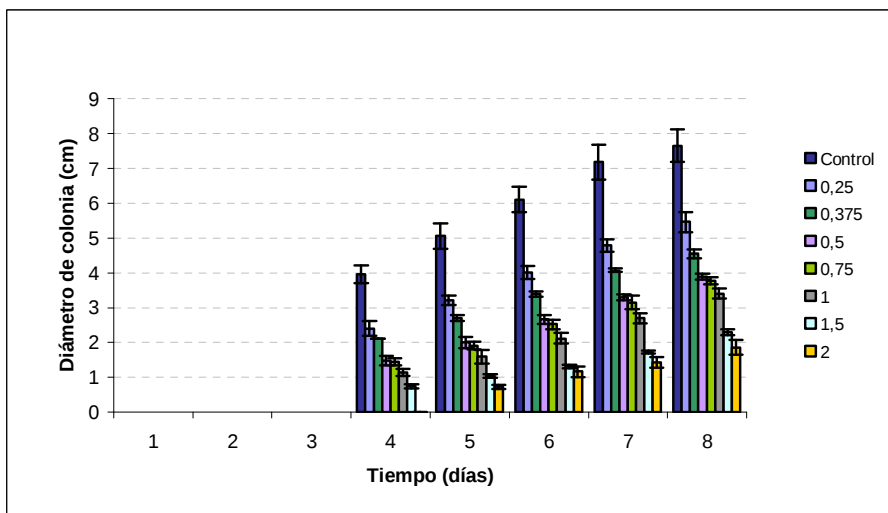


Figura 6.2: Efecto del Verde de Malaquita sobre el crecimiento de *F. semitectum*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

camente significativas ($p < 0,05$). Los coeficientes de correlación de Pearson fueron mayores a 0,95 excepto para *F. solani* expuesto a 2 y 4 mg.L^{-1} de VM.

La Figura 6.3 esquematiza las diferencias en la sensibilidad en ambas especies, al VM a los ocho días de incubación; los asteriscos señalan las concentraciones a las que los valores de pendiente fueron significativamente menores a los del grupo Control.

Tabla 6.2: Valores de Pendiente, R y R² para *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Verde de Malaquita. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas (p< 0,05) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
Control	0,47	0,99	0,92	1,00	0,99	0,98
0,25	<i>0,32</i>	0,99	0,92	<i>0,67</i>	1,00	0,97
0,375	<i>0,33</i>	0,99	0,92	<i>0,56</i>	1,00	0,97
0,5	<i>0,29</i>	0,99	0,92	<i>0,45</i>	1,00	0,95
0,75	<i>0,24</i>	0,97	0,83	<i>0,43</i>	1,00	0,95
1	<i>0,21</i>	0,97	0,80	<i>0,37</i>	0,99	0,89
1,5	<i>0,15</i>	0,95	0,71	<i>0,23</i>	0,97	0,81
2	<i>0,10</i>	0,87	0,56	<i>0,18</i>	0,94	0,70
4	<i>0,09</i>	0,87	0,56	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-

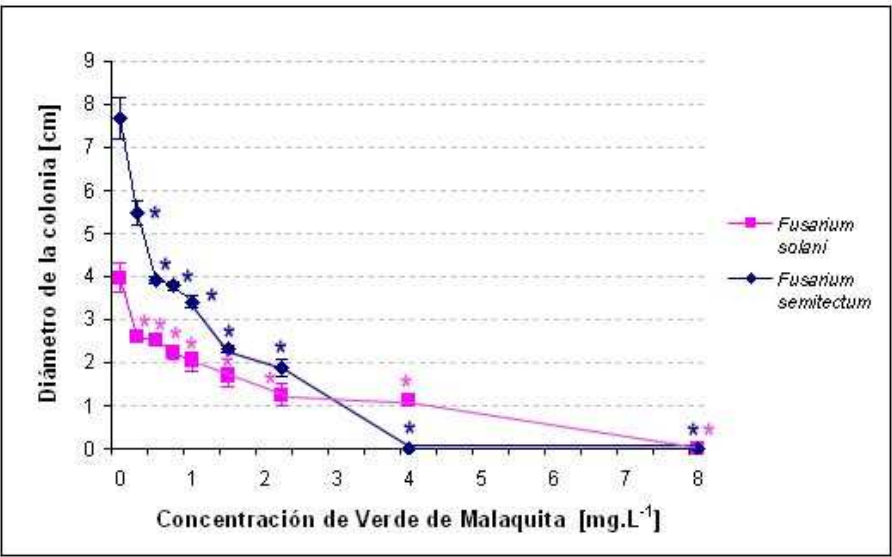


Figura 6.3: Efecto de la concentración de VM sobre el crecimiento, de *F. solani* y *F. semitectum* en Czapeck Dox, luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas (p< 0,05) respecto del Control.

En la Tabla 6.3 se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento (IC) para cada tratamiento y especie. Los valores de IC para *F. solani* al ser expuestos a 0,25 - 4 mg.L⁻¹ oscilan entre 34,34 y 72,22 %, respectivamente. Se observa que los porcentajes de inhibición permanecen casi constantes entre 0,25 y 0,5 mg.L⁻¹

Tabla 6.3: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Verde de Malaquita.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
Control	-	-
0,25	34,34	28,59
0,375	33,08	40,52
0,5	36,87	49,02
0,75	43,81	50,65
1	48,86	55,56
1,5	58,33	69,93
2	68,43	75,60
4	72,22	100,00
8	100,00	100,00

exhibiendo un aumento significativo entre 0,5 y 0,75 mg.L⁻¹ para luego incrementar aún más su valor entre 1,0 y 1,5 mg.L⁻¹. La concentración que inhibe el crecimiento en un 50 % (CIM) se ubicó entre 1,0 y 1,5 mg.L⁻¹, resultando en 1,06 mg.L⁻¹; finalmente, se alcanzó una inhibición total del crecimiento en las placas expuestas a 4 mg.L⁻¹ de VM.

Para *F. semitectum* los porcentajes de inhibición observados entre 0,25 y 2 mg.L⁻¹ fueron desde 28,59 % hasta 75,60 %. No se observaron diferencias considerables en la IC en las placas expuestas a 0,5 y 0,75 mg.L⁻¹, dentro de este rango también se ubicó la CIM (0,65 mg.L⁻¹), y a partir de esta concentración de VM el incremento en el porcentaje de inhibición se hace gradual y sostenido hasta alcanzar un 100 % en las placas expuestas a 4 mg.L⁻¹ de VM.

6.3.2. Cloruro de Sodio (Figuras 6.4 a 6.9)

En el caso de Cloruro de Sodio se realizaron ensayos a dos temperaturas de incubación: 17 y 25°C. Como podemos observar en las Figuras 6.4 y 6.5, el crecimiento de *F. solani* fue estimulado por el incremento de la temperatura, cubriendo un espectro más amplio de concentraciones (40 a 80 g.L⁻¹) que el alcanzado a 17°C; en todos los tratamientos el crecimiento fue menor al del grupo Control y fue decreciendo al incrementar la concentración de ClNa. En las placas expuestas a 80 g.L⁻¹ e incubadas a 17°C se observó un retraso del crecimiento, el que se inició al quinto

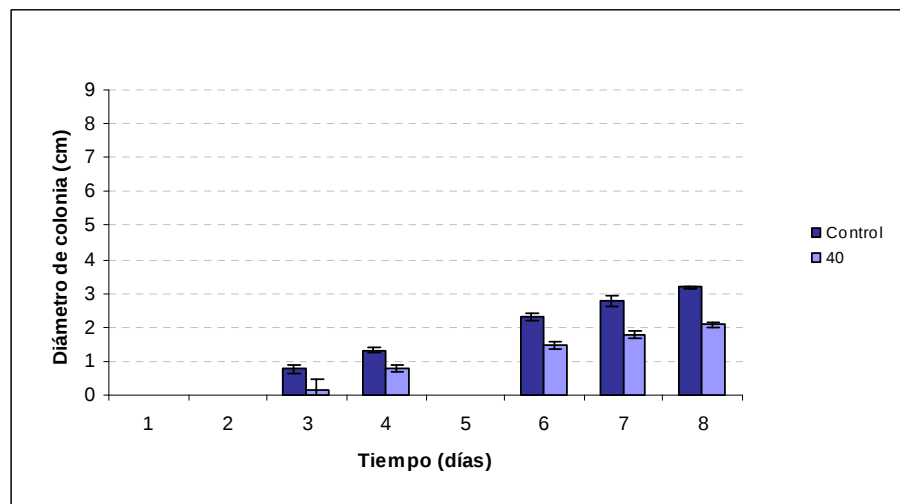


Figura 6.4: Efecto del CINa sobre el crecimiento de *F. solani* incubado a 17°C. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

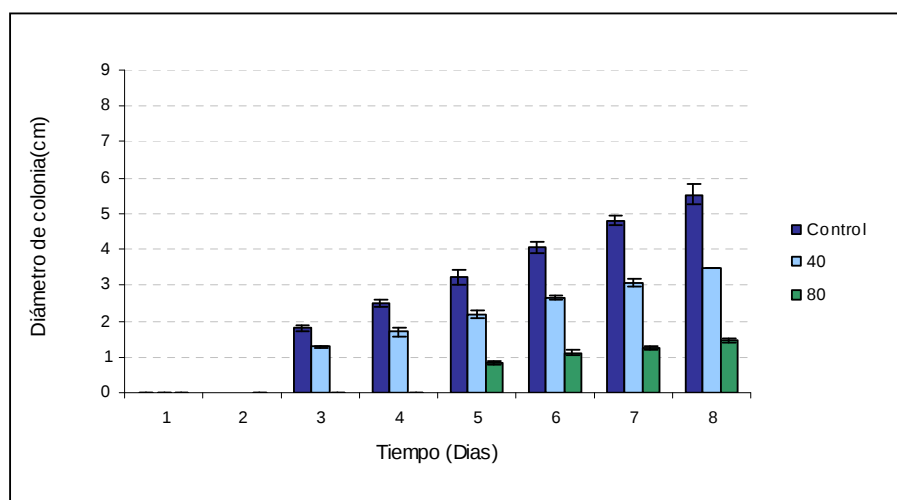


Figura 6.5: Efecto del CINa sobre el crecimiento de *F. solani* incubado a 25°C. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

día de exposición.

El crecimiento de *F. semitectum* también se vió estimulado por el incremento de la temperatura, tal como se observa en las Figuras 6.6 y 6.7; si bien el rango de concentraciones es el mismo que a 17°C, el desarrollo del micelio en la placas expuestas a 120 g.L⁻¹, e incubadas a 25°C, se inició más tempranamente que a 17°C.

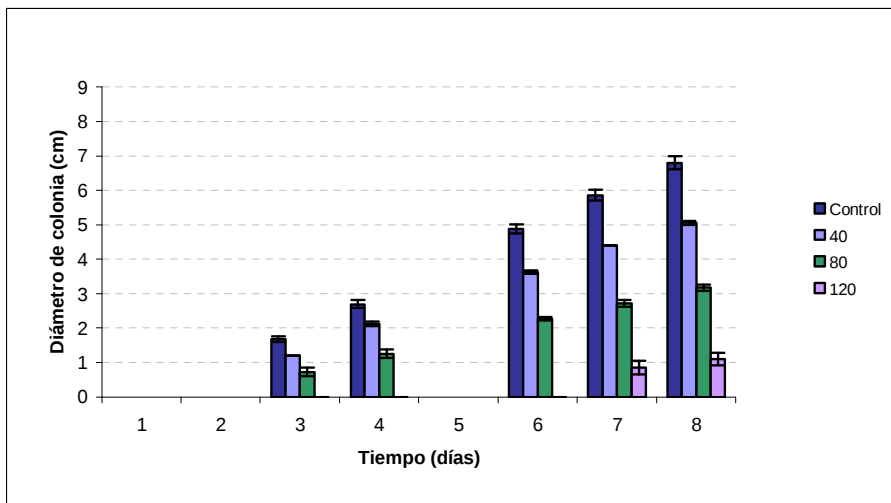


Figura 6.6: Efecto del CINa sobre el crecimiento de *F. semitectum* incubado a 17°C. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

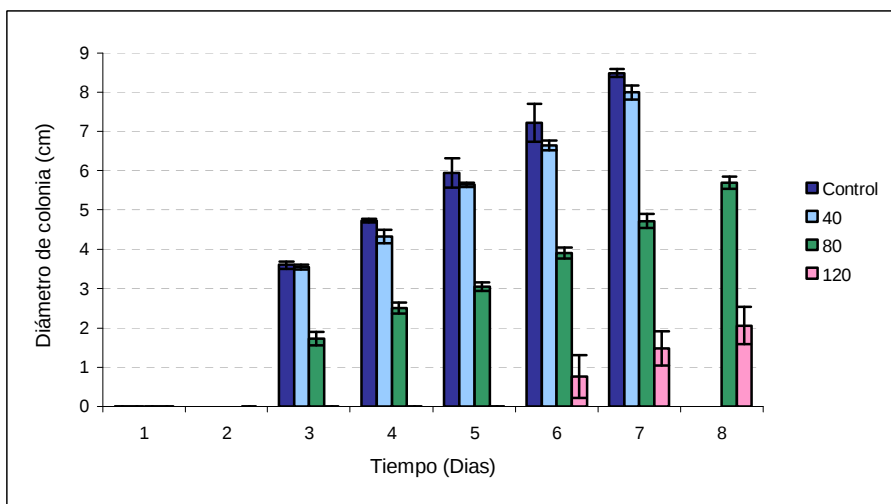


Figura 6.7: Efecto del CINa sobre el crecimiento de *F. semitectum* incubado a 25°C. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

Tal como se observa en la Tabla 6.4, los valores de las pendientes fueron decreciendo al incrementar la concentración de CINa. Las de *F. solani* y *F. semitectum*, incubados a 25°C fueron considerablemente mayores a las obtenidas a 17 °C (relación 1,90-1,54); además en ambas especies los Coeficientes de correlación de Pearson mostraron un alto grado de asociación entre el diámetro de la colonia y el tiempo de exposición.

Tabla 6.4: Valores de Pendiente, R y R² para *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio, e incubados a 17 y 25°C. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas (p< 0,05) respecto del Control.

		<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>			
Concentración [mg.L ⁻¹]		Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²	
Temperatura de incubación	17 °C	0	0,37	0,99	0,91	0,80	0,99	0,95
		40	0,23	0,98	0,86	0,60	1,00	0,95
		80	-	-	-	0,37	0,99	0,91
		120	-	-	-	0,08	0,80	0,48
		160	-	-	-	-	-	-
	25 °C	0	0,67	1,00	0,97	1,19	0,99	0,97
		40	0,43	1,00	0,98	1,12	0,99	0,97
		80	0,15	0,99	0,72	0,66	1,00	0,97
		120	?	?	?	0,15	0,86	0,54
		160	-	-	-	-	-	-

En las Figuras 6.8 y 6.9 se presenta un esquema comparativo del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* incubados a 17 y 25°C. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de *F. solani* entre el grupo Control

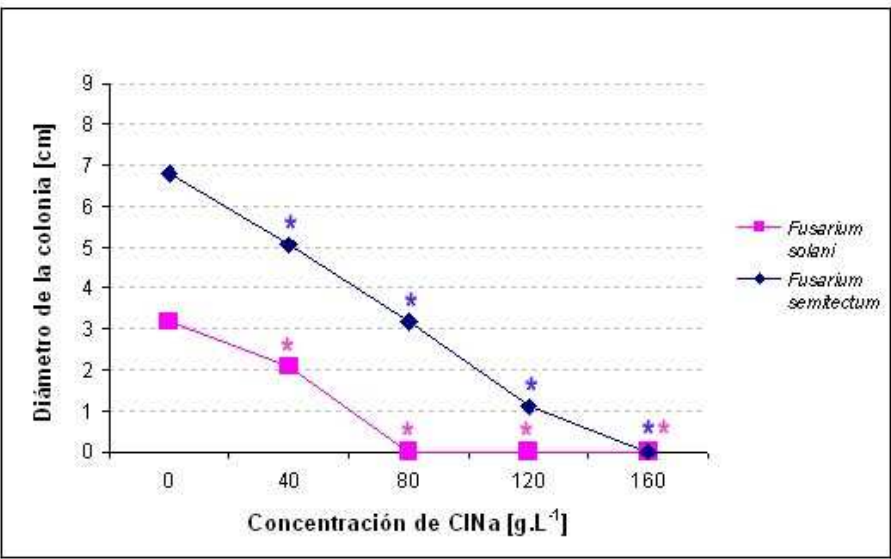


Figura 6.8: Efecto de la concentración de ClNa sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* en Czapeck Dox incubados a 17°C. Diámetro registrado luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias ± desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas (p< 0,05) respecto del Control.

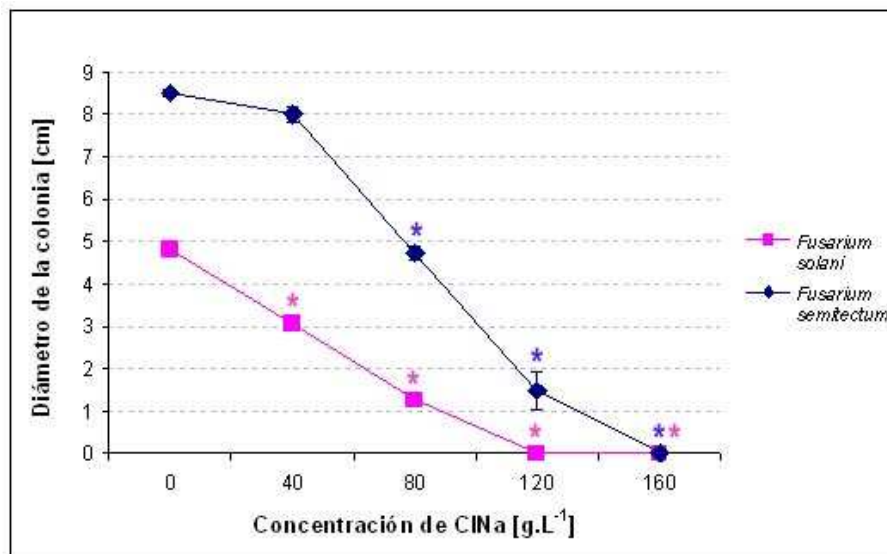


Figura 6.9: Efecto de la concentración de ClNa sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* en Czapeck Dox incubados a 25°C: Diámetro registrado luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

y todos los tratamientos en ambas temperaturas ($p < 0,05$). Por otro lado, en *F. semitectum*, incubado a 17°C, no se observaron diferencias en el crecimiento del grupo Control y el grupo expuesto a 40 g.L⁻¹, sin embargo a 25°C existieron diferencias significativas entre el grupo Control y todas las concentraciones ensayadas.

El Cloruro de Sodio inhibió el crecimiento de ambas especies, este efecto inhibitor fue proporcional a su concentración. *F. semitectum* mostró ser más tolerante al esta sustancia que *F. solani*, puesto que independientemente de la temperatura de incubación esta especie logró crecer hasta en 120 g.L⁻¹ de ClNa mientras que en *F. solani* sólo se registró crecimiento hasta en 40 g.L⁻¹ a 17°C y 80 g.L⁻¹ a 25°C. La tolerancia de *F. solani* al ClNa estuvo claramente influenciada por la temperatura de incubación, ya que a una temperatura de 17°C el crecimiento de *F. solani* fue totalmente inhibido a 80 g.L⁻¹, mientras que a 25°C la inhibición sólo fue parcial (73,96 %) en concentraciones inferiores (40 g.L⁻¹) no se encontraron diferencias en la IC a 17 y 25°C. Por otro lado, en *F. semitectum*, las diferencias en el crecimiento atribuibles a la temperatura de incubación, sólo se pudieron observar a 40 g.L⁻¹, concentración en la que fue más tolerante al ClNa a 25 que a 17°C.

Como se puede observar en la Tabla 6.5, para ambas especies y en las diferentes

Tabla 6.5: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio.

Concentración [g.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento			
	Incubada a 17 °C		Incubada a 25 °C	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
Control	-	-	-	-
40	34,38	25,74	36,46	5,88
80	100,00	53,31	73,96	44,41
120	100,00	83,82	100,00	82,65
160	100,00	100,00	100,00	100,00

temperaturas de incubación la CIM se ubicó entre los 40 y 80 g.L⁻¹. En *F. solani* incubado a una temperatura de 17°C, ésta se aproximó al límite inferior siendo de 49,5 g.L⁻¹; mientras que a 25°C se alejó del límite inferior resultando en 54,44 g.L⁻¹. Para *F. semitectum*, incubado tanto a 17°C (75,20 g.L⁻¹) como a 25°C (85,85 g.L⁻¹), la CIM se ubicó alrededor de los 80 mg.L⁻¹.

6.3.3. Formalina (Figuras 6.10 a 6.12)

En las Figuras 6.10 y 6.11 se ilustra el efecto de la Formalina sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*. En términos generales se observa que el crecimiento tiende a disminuir conforme se incrementa la concentración de Formalina. *F. solani* creció hasta una concentración de 450 μ L.L⁻¹ y el efecto de la Formalina resultó ser más atenuado que para *F. semitectum*, donde se observó un efecto más acentuado; logrando crecer sólo hasta en 250 μ L.L⁻¹. En ambas especies, no hubo retraso en el inicio del crecimiento en las concentraciones ensayadas.

Se observa en la Tabla 6.6, que la pendiente de *F. solani* no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo Control y los tratamientos con 20 y 40 μ L.L⁻¹. Es a partir de 80 μ L.L⁻¹ que el descenso de la pendiente se hace más notorio. En *F. semitectum* el efecto de la Formalina sobre la pendiente resultó ser más evidente, se observa un descenso progresivo de la pendiente relacionado con la concentración de Formalina.

En la Figura 6.12, se ilustra comparativamente el efecto de la Formalina sobre ambas especies. Aquí se observa con claridad lo mencionado en párrafos anteriores, siendo el efecto inhibitor de la Formalina más agudo para *F. semitectum* que para

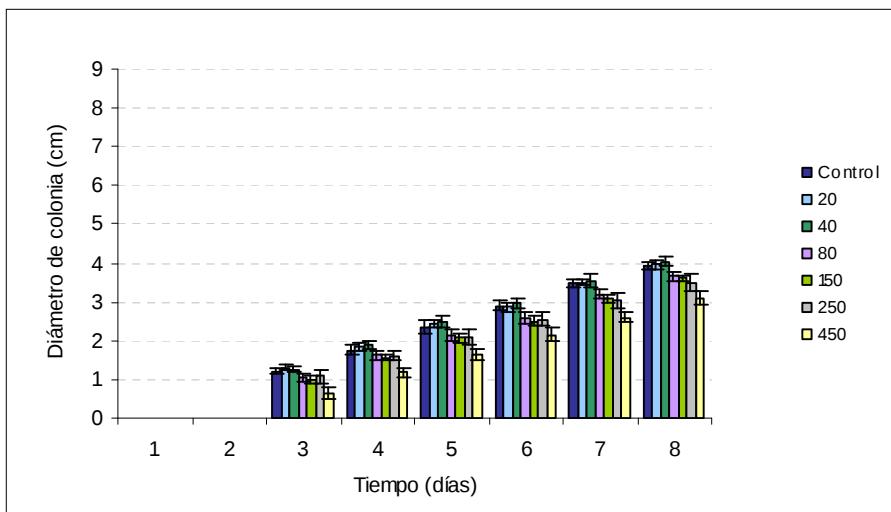


Figura 6.10: Efecto de la Formalina sobre el crecimiento de *F. solani*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

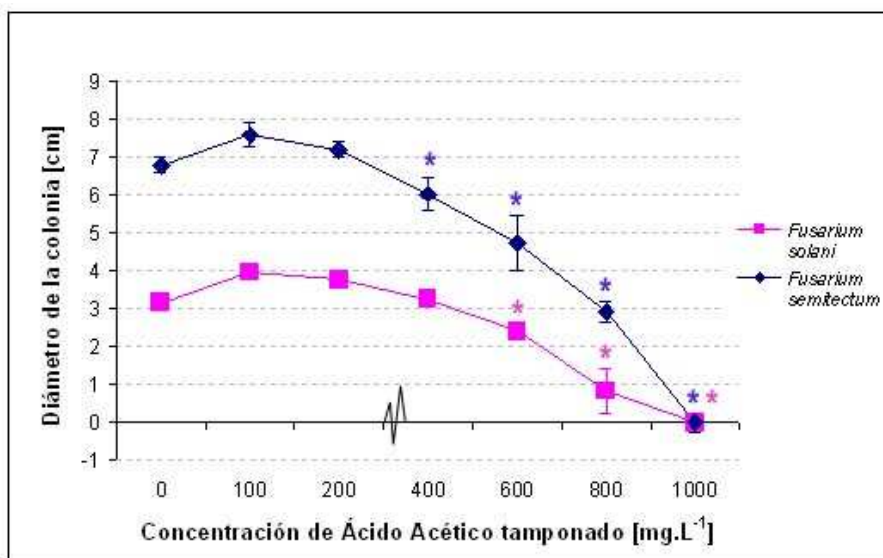


Figura 6.11: Efecto de la Formalina sobre el crecimiento de *F. semitectum*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

F. solani.

Como se observa en la Tabla 6.7, concentraciones entre 20 y 40 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de Formalina, resultaron ser levemente estimuladoras del crecimiento de *F. solani*, el efecto ligeramente inhibitorio observado en las siguientes concentraciones (80 y 250 $\mu\text{L.L}^{-1}$) se incrementa a concentraciones superiores a los 450 $\mu\text{L.L}^{-1}$ y a una concentración

Tabla 6.6: Valores de Pendiente, R y R² para *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Formalina. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas (p< 0,05) respecto del Control.

Concentración [μL.L ⁻¹]	<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
0	0,48	1,00	0,98	1,01	1,00	0,99
20	0,49	1,00	0,99	<i>0,94</i>	1,00	0,99
40	0,50	1,00	0,99	<i>0,87</i>	1,00	0,99
80	<i>0,44</i>	1,00	0,97	<i>0,68</i>	1,00	0,93
150	<i>0,43</i>	1,00	0,97	<i>0,66</i>	1,00	0,93
250	<i>0,43</i>	1,00	0,98	<i>0,45</i>	1,00	0,76
450	<i>0,36</i>	1,00	0,92	-	-	-
900	-	-	-	-	-	-

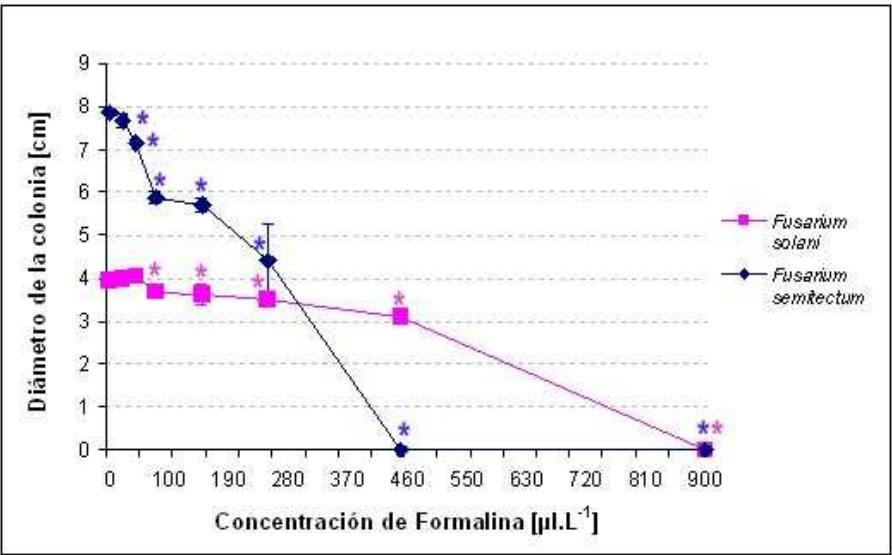


Figura 6.12: Efecto de la concentración de la Formalina sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* en Czapeck Dox luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas (p< 0,05) respecto del Control.

de 900 $\mu\text{L.L}^{-1}$ la IC logra ser total, entre ambas concentraciones se ubicó la CIM (614,03 $\mu\text{L.L}^{-1}$). La respuesta de *F. semitectum* es distinta, y en las placas expuestas a 20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de Formalina se observa un leve efecto inhibitorio que se incrementa progresivamente hasta ser total a una concentración de 450 $\mu\text{L.L}^{-1}$; la CIM para esta especie se encuentra ubicada entre 250 y 450 $\mu\text{L.L}^{-1}$, y resultó en 271,60 $\mu\text{L.L}^{-1}$ resultando menor a la de *F. solani*.

Tabla 6.7: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Formalina.

Concentración [μl.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
0	-	-
20	-1,02	2,29
40	-2,63	8,92
80	6,60	25,10
150	8,38	27,26
250	11,17	43,95
450	21,32	100,00
900	100,00	-

6.3.4. Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Figuras 6.13 a 6.15)

Las Figuras 6.13 y 6.14 muestran el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* expuestos al Ácido Acético Glacial. Esta sustancia no tuvo efecto sobre el crecimiento de *F. solani*, durante el periodo de ensayo esta especie logró crecer hasta en 500 mg.L⁻¹ de AcH; sin embargo, luego del octavo día de exposición se observó crecimiento en placas expuestas a 1000 mg.L⁻¹. En el caso de *F. semitectum* sólo se observaron diferencias en el crecimiento entre el grupo Control y los tratamientos expuestos a las concentraciones más elevadas (500 y 1000 mg.L⁻¹); además, las placas expuestas a 1000 mg.L⁻¹ iniciaron su crecimiento al séptimo día de exposición.

En la Tabla 6.8 se presentan los valores de la Pendiente Coeficiente de Correlación de Pearson y Coeficiente de Determinación, correspondientes a la recta de regresión. Para ambas especies los valores de las pendientes del grupo Control y los tratamientos no difieren de manera significativa, excepto en concentraciones de 500 y 1000 mg.L⁻¹. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson para *F. solani* oscilan entre 0,99 y 1,00 e indican un buen ajuste de los datos a la recta de regresión; para *F. semitectum* estos valores se encontraron entre (0,84-1,00); el límite inferior de este rango corresponde al valor obtenido en la placas expuestas a 1000 mg.L⁻¹ y su valor es bajo debido a que la recta fue trazada únicamente con dos puntos de medición, por tas motivo debiera ser considerado con cautela.

La Figura 6.15 ilustra comparativamente la respuesta de ambas especies, en un

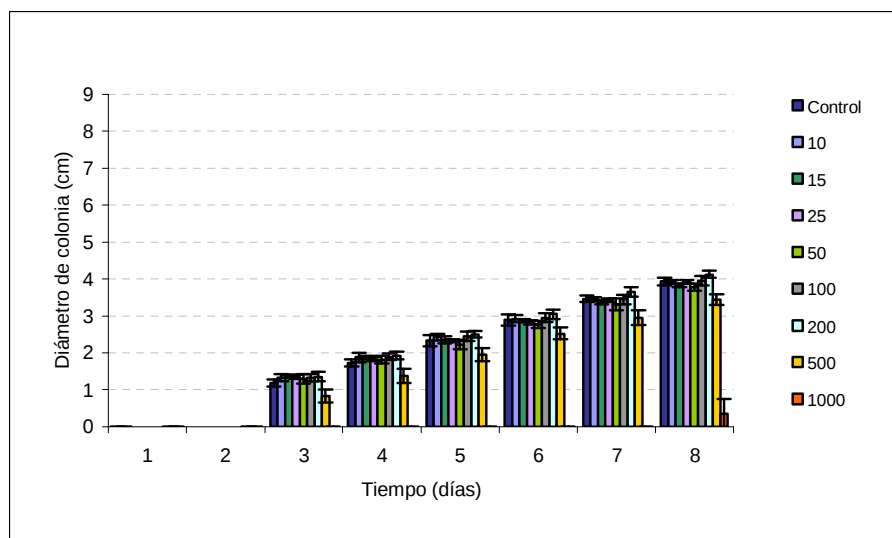


Figura 6.13: Efecto del Ácido Acético Glacial sobre el crecimiento de *F. solani*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

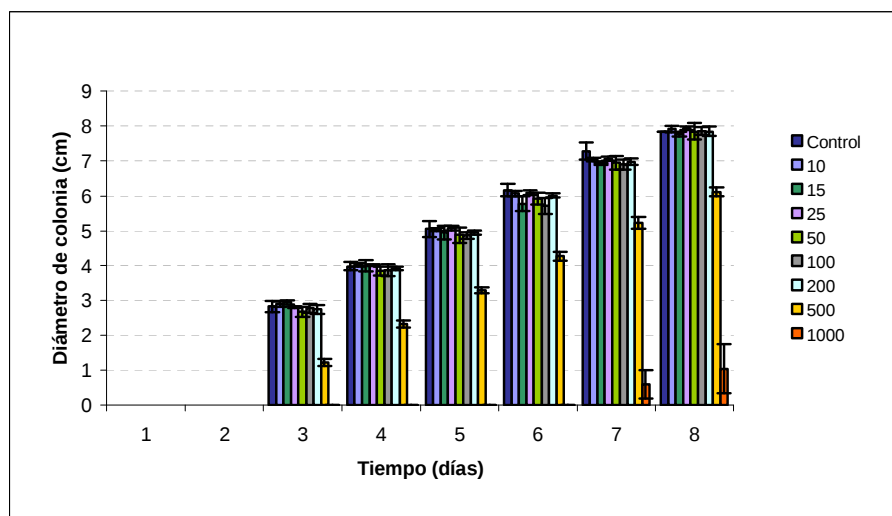


Figura 6.14: Efecto del Ácido Acético Glacial sobre el crecimiento de *F. semitectum*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

período de exposición de 8 días; como podemos observar las dos especies describieron una respuesta similar al incremento en la concentración de Ácido Acético.

En la Tabla 6.9 se muestran las IC, sólo en concentraciones superiores a 500 mg.L^{-1} se observa una tendencia de inhibición sostenida, en respuesta al aumento de la concentración de Ácido Acético. La CIM se ubicó entre 500 y 1000 mg.L^{-1} , siendo 738,70 y 715,90 mg.L^{-1} para *F. solani* y *F. semitectum* respectivamente, el

Tabla 6.8: Valores de Pendiente, R y R^2 para *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Glacial. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

concentración [mg.L ⁻¹]	<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
0	0,48	1,00	0,97	1,01	1,00	0,99
10	0,48	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00
15	0,48	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00
25	0,48	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00
50	0,46	1,00	0,99	0,98	1,00	1,00
100	0,49	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00
200	0,51	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00
500	<i>0,40</i>	0,99	0,91	<i>0,71</i>	1,00	0,92
1000	<i>0,01</i>	0,58	0,22	<i>0,06</i>	0,84	0,34
2000	-	-	-	-	-	-

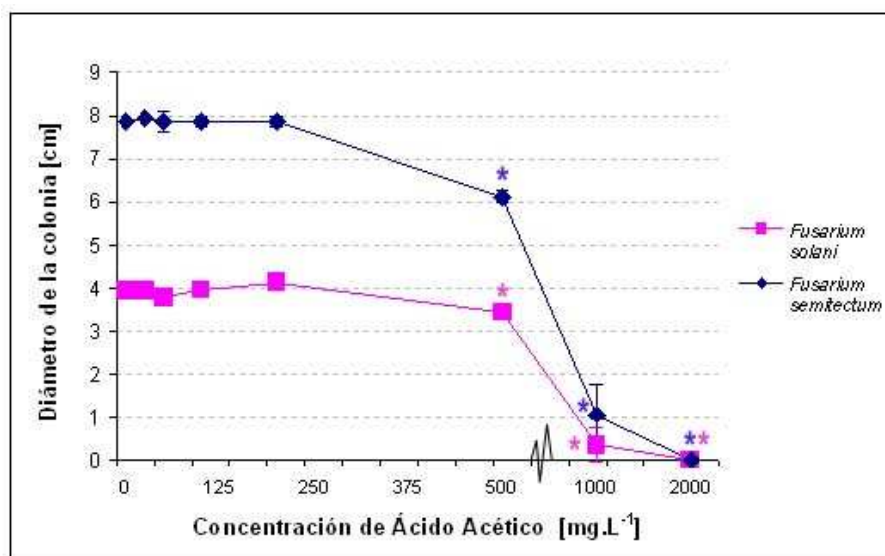


Figura 6.15: Efecto del Ácido Acético Glacial sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* en Czapeck Dox luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

crecimiento de ambas especies fue totalmente inhibido a concentraciones entre 1000 y 2000 mg.L⁻¹.

Tabla 6.9: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Glacial.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
0	-	-
10	0,13	-0,80
15	2,67	1,06
25	0,13	-1,11
50	3,94	0,00
100	-0,51	-0,16
200	-4,96	0,00
500	12,47	22,17
1000	91,09	86,62
2000	100,00	100,00

Ácido Acético Tamponado (Figuras 6.16 a 6.18)

En las Figuras 6.16 y 6.17 se presenta la respuesta de *F. solani* y *F. semitectum* a la exposición al Ácido Acético Tamponado. Podemos observar que las placas expuestas a 100 y 200 mg.L⁻¹ el crecimiento de ambas especies fue mayor al del grupo Control. En las placas expuestas a 400 mg.L⁻¹ el crecimiento de *F. solani* empezó siendo menor al Control, pero alcanzó valores similares luego del sexto día de exposición; sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los tratamientos con 600 y 800 mg.L⁻¹; en dichas concentraciones el crecimiento empezó al cuarto y séptimo día de exposición respectivamente.

A partir de los 400 mg.L⁻¹ se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamiento y el grupo Control de *F. semitectum*, además se observó un descenso del crecimiento sostenido en el tiempo. El inicio del crecimiento no se retrasó en las placas expuestas a 600 mg.L⁻¹, pero si en 800 y 1000 mg.L⁻¹ donde, éste se inició al sexto y octavo día de exposición respectivamente.

En la Tabla 6.10 se presenta los valores de las Pendientes, Coeficiente de correlación de Pearson y Coeficiente de Determinación; en ambos casos los valores de la Pendiente en los tratamientos con 100 y 200 mg.L⁻¹ fueron superiores a los obtenidos en el grupo Control. El efecto tóxico del Ácido Acético tamponado sobre *F. solani* se observó claramente a partir de los 400 mg.L⁻¹. Por su parte, *F. semitectum* resultó ser más tolerante a esta sustancia que *F. solani*. Los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos son adecuados, siendo superiores a 0,79 y 0,93 para *F.*

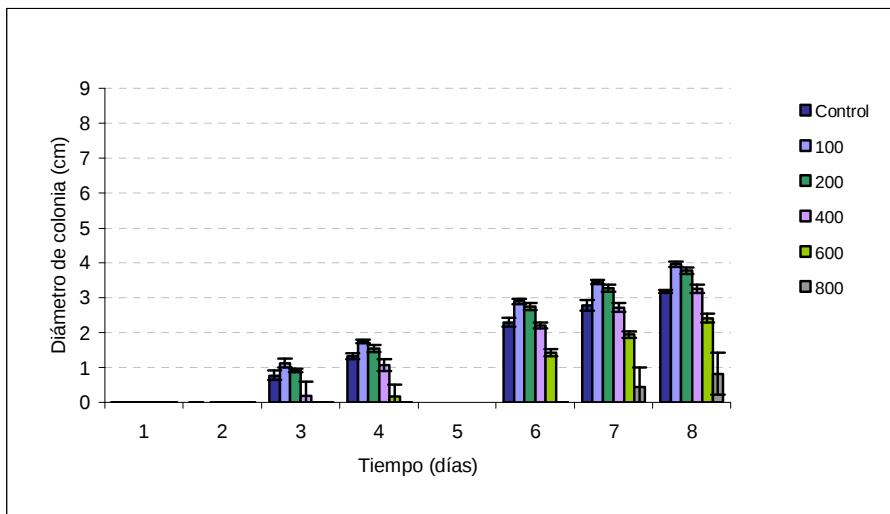


Figura 6.16: Efecto del Ácido Acético Tamponado sobre el crecimiento de *F. solani*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

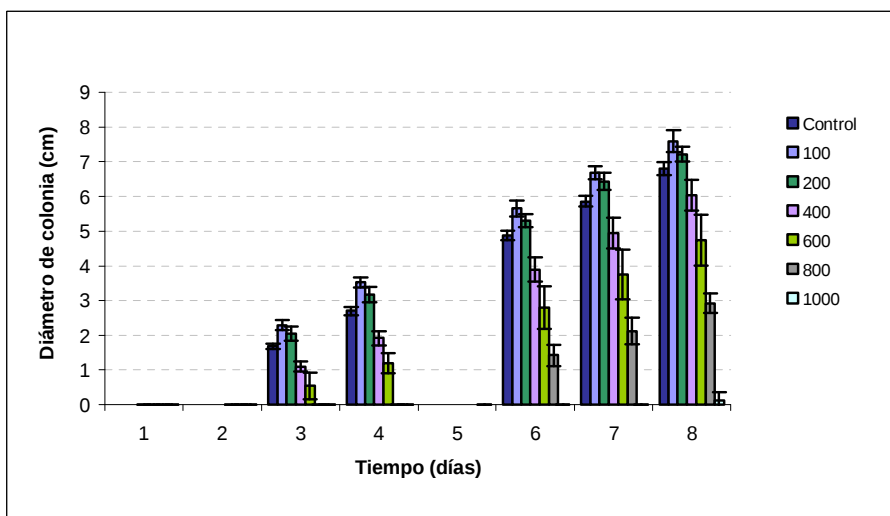


Figura 6.17: Efecto del Ácido Acético Tamponado sobre el crecimiento de *F. semitectum*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

solani y *F. semitectum* respectivamente.

En la Figura 6.18, podemos ver que tanto *F. semitectum* como *F. solani* exhibieron una respuesta comparable al Ácido Acético tamponado. Excepto que en el caso particular de *F. semitectum* se observó crecimiento hasta en 1000 mg.L^{-1} luego del octavo día de exposición (Tabla 6.9).

En la Tabla 6.11 se presentan las IC para ambas especies; así tenemos que para

Tabla 6.10: Valores de Pendiente, R y R² para *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Tamponado. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L ⁻¹]	<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>		
	Pendiente	R	R ²	Pendiente	R	R ²
0	0,37	0,99	0,91	0,81	1,00	0,95
100	0,48	1,000	0,97	0,93	1,00	0,98
200	0,44	0,99	0,91	0,88	1,00	0,97
400	0,35	0,98	0,85	<i>0,67</i>	0,99	0,91
600	<i>0,24</i>	0,95	0,74	<i>0,49</i>	0,98	0,84
800	<i>0,06</i>	0,79	0,46	<i>0,26</i>	0,93	0,69
1000	-	-	-	<i>0,01</i>	0,58	0,22
1500	-	-	-	-	-	-
2000	-	-	-	-	-	-

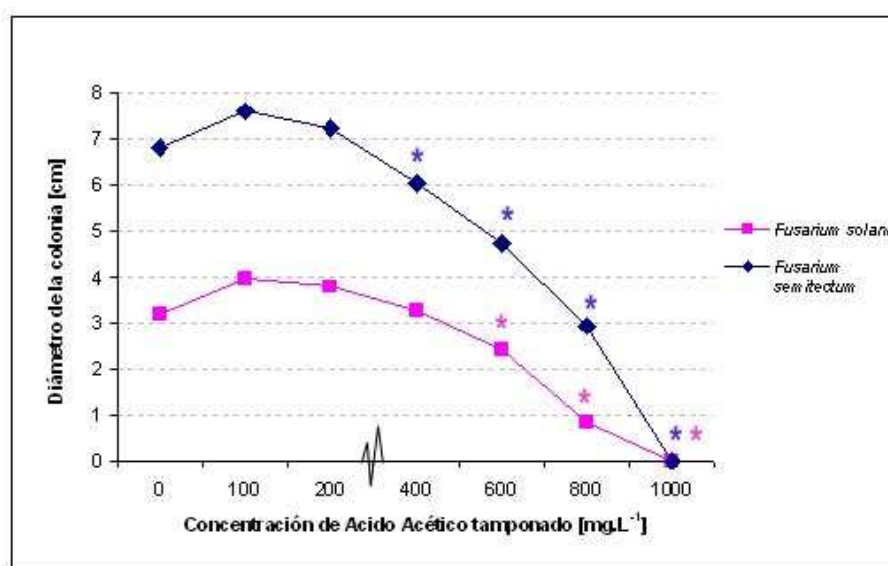


Figura 6.18: Efecto de la concentración de Ácido Acético tamponado sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* en Czapeck Dox luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

F. solani se observa un efecto inhibitorio en las placas expuestas a una concentración mayor e igual a 600 mg.L⁻¹, mientras que para *F. semitectum* el efecto inhibitorio de esta sustancia se observa desde los 400 mg.L⁻¹. En ambas especies la CIM-50 se ubicó entre los 600 y 800 mg.L⁻¹, resultando en 704,25 mg.L⁻¹ para *F. solani* y

Tabla 6.11: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Ácido Acético Tamponado.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
0	-	-
100	-25,00	-11,58
200	-19,09	-6,07
400	-2,92	11,21
600	23,90	30,33
800	73,97	56,99
1000	100,00	98,16
1500	100,00	100,00
2000	100,00	100,00

747,60 mg.L⁻¹ para *F. semitectum*.

6.3.5. Compuestos Iodados

Ioduro de Potasio (Figuras 6.19 a 6.21)

El efecto del Ioduro de Potasio sobre el crecimiento de *F. solani* se presenta en la Figura 6.19, como podemos observar *F. solani* logró crecer en la todas concentraciones ensayadas. El IK no tuvo un efecto letal sobre esta especie, sin embargo se puede

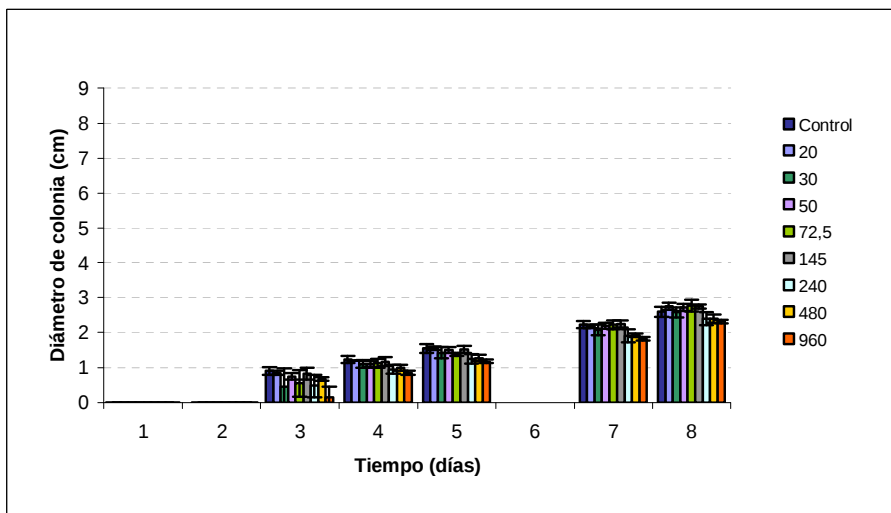


Figura 6.19: Efecto del Ioduro de Potasio sobre el crecimiento de *F. solani*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

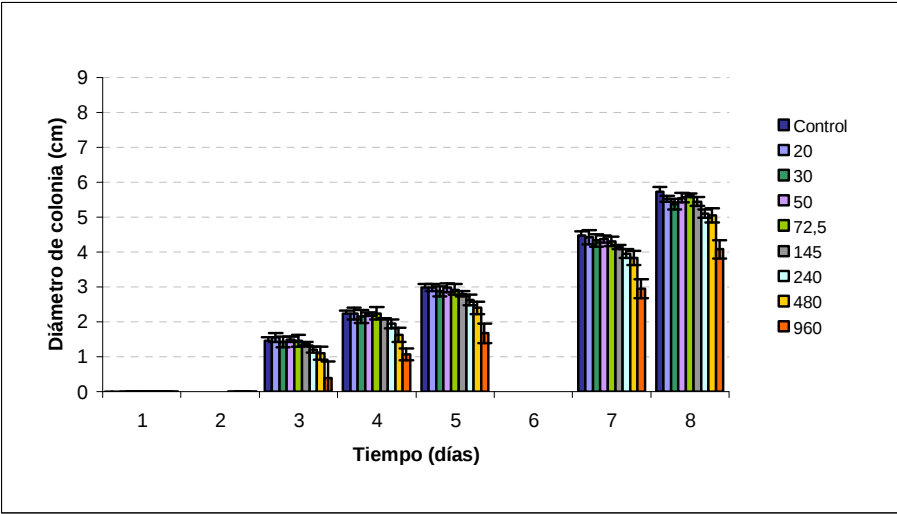


Figura 6.20: Efecto del Ioduro de Potasio sobre el crecimiento de *F. semitectum*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

apreciar un efecto levemente inhibitor en concentraciones superiores a 145 mg.L^{-1} . Por su parte, *F. semitectum* exhibió una respuesta similar (Figura 6.20), aunque el efecto inhibitorio de la concentración más alta (960 mg.L^{-1}) fue más notorio.

Los valores de las Pendientes, presentados en la Tabla 6.12, se correlacionan con lo observado en los gráficos anteriores; la pendiente exhibe poca variación entre el Control y los 20 mg.L^{-1} , posteriormente descende levemente en 30 mg.L^{-1} , para

Tabla 6.12: Valores de Pendiente, R y R^2 para *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Ioduro de Potasio. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L^{-1}]	<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>		
	Pendiente	R	R^2	Pendiente	R	R^2
0	0,32	1,00	0,98	0,64	1,00	0,95
20	0,31	1,00	0,91	0,64	1,00	0,96
30	0,29	0,99	0,89	0,61	1,00	0,95
50	0,31	0,99	0,91	0,63	1,00	0,95
72,5	0,30	0,99	0,89	0,63	1,00	0,95
145	0,31	0,99	0,91	0,61	1,00	0,94
240	<i>0,26</i>	0,99	0,89	<i>0,55</i>	0,99	0,90
480	<i>0,27</i>	0,99	0,91	<i>0,53</i>	0,99	0,88
960	<i>0,25</i>	0,98	0,84	<i>0,40</i>	0,98	0,82

luego aumentar y permanecer constante hasta 145 mg.L^{-1} , a concentraciones superiores a esta se observa, el efecto inhibitorio del IK, tanto para *F. solani* como para *F. semitectum*, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la pendiente del grupo Control y los tratamientos expuestos a concentraciones superiores a 240 mg.L^{-1} .

En la Figura 6.21 podemos observar que al octavo día de exposición el crecimiento de *F. solani* permanece inalterado por el incremento de la concentración de IK; sin embargo, en *F. semitectum* éste fue ligeramente inhibido a partir de los 240 mg.L^{-1} .

La Tabla 6.13 muestra los porcentajes de inhibición del crecimiento de ambas especies, obtenidos a las distintas concentraciones de IK. Concentraciones entre $20 - 145 \text{ mg.L}^{-1}$ estimularon el crecimiento de *F. solani*, y entre $240 - 960 \text{ mg.L}^{-1}$, el porcentaje de inhibición máximo alcanzado fue de $10,58 \%$. En *F. semitectum* la concentraciones tuvieron un efecto inhibitorio, el que fue poco representativo en concentraciones inferiores a 145 mg.L^{-1} , posteriormente si bien se incrementaron los valores, éstos no llegan a alcanzar los porcentajes medios de mortalidad o CL_{50} .

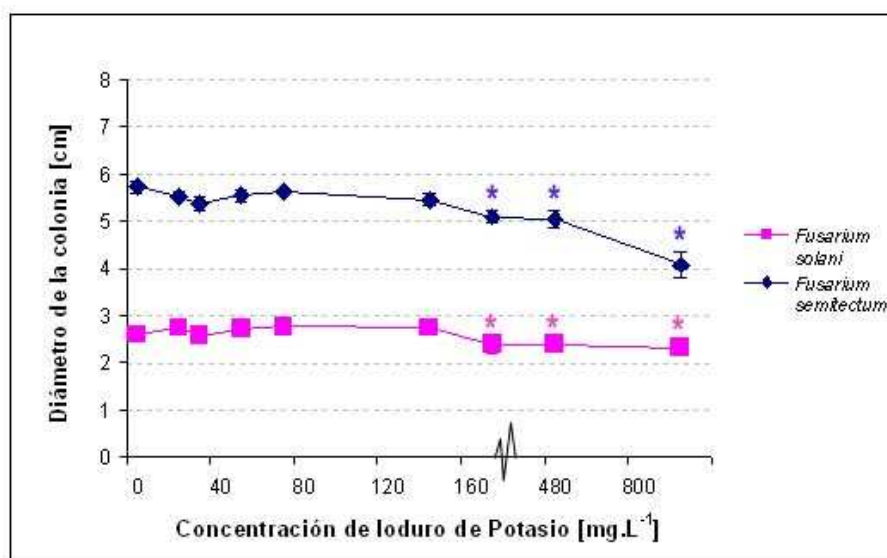


Figura 6.21: Efecto del Ioduro de Potasio sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* en Czapeck Dox incubados a 17°C . Diámetro registrado luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Tabla 6.13: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Ioduro de Potasio.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
0	-	-
20	-5,77	3,49
30	0,96	6,11
50	-4,81	3,06
72,5	-6,73	1,75
145	-5,77	4,80
240	7,69	10,92
480	7,69	11,79
960	10,58	28,82

Iodopovidona (Figuras 6.22 a 6.24)

El efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum* se ilustra en las Figuras 6.22 y 6.23. El crecimiento de *F. solani* reflejó una respuesta similar a la obtenida con IK. En las placas expuestas a 720 y 1440 mg.L⁻¹ el crecimiento inició el cuarto día de exposición. En ambos casos el crecimiento de esta especie no logró ser totalmente inhibido por dichas sustancias. Por otro lado, *F. semitectum* respondió de una manera distinta, logrando ser inhibido en 1440

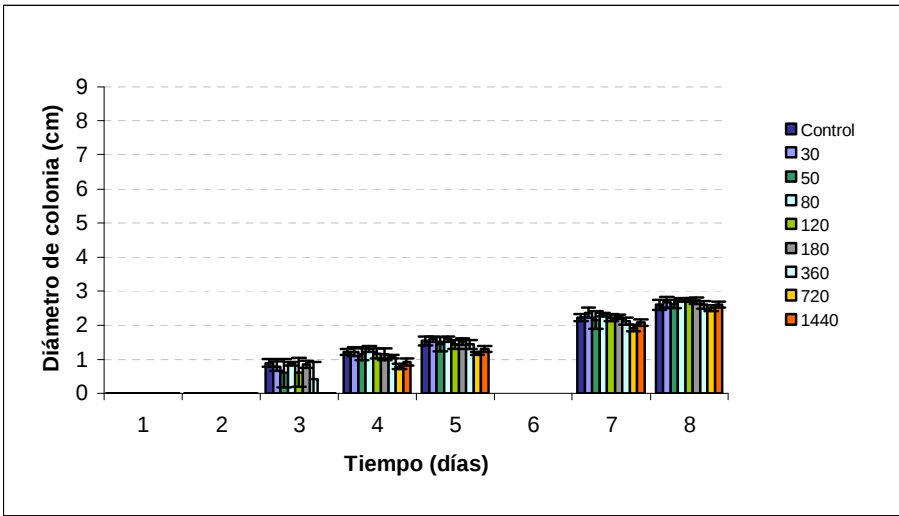


Figura 6.22: Efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *F. solani*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L⁻¹.

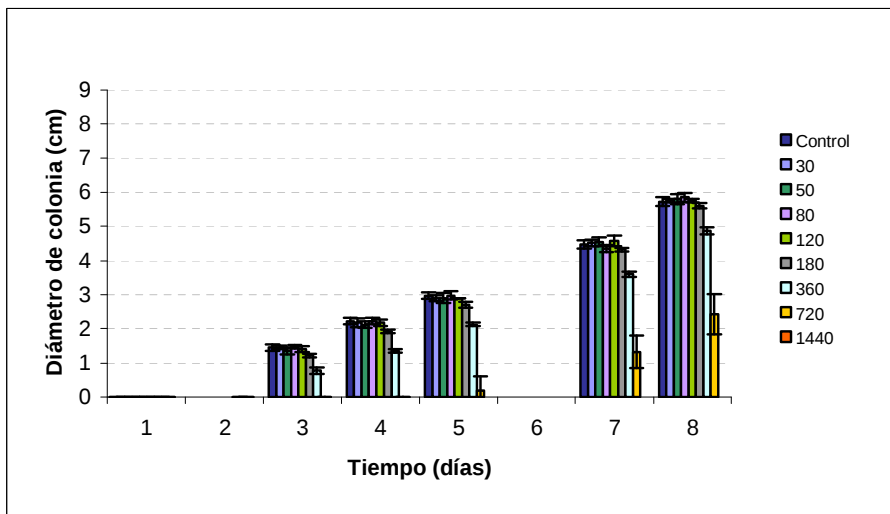


Figura 6.23: Efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *F. semitectum*. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). Concentraciones en mg.L^{-1} .

mg.L^{-1} , además se observó que el crecimiento en 720 mg.L^{-1} se inició el quinto día de exposición.

En la Tabla 6.14 se presentan los valores de las Pendientes, Coeficiente de correlación de Pearson, Coeficiente de determinación para ambas especies expuestas a Iodopovidona. En concentraciones menores a los 180 mg.L^{-1} no se observaron variaciones significativas en las pendientes de *F. solani*, en concentraciones superiores

Tabla 6.14: Valores de Pendiente, R y R^2 para *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de la Iodopovidona. Pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Concentración [mg.L^{-1}]	<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>		
	Pendiente	R	R^2	Pendiente	R	R^2
0	0,31	0,99	0,92	0,64	1,00	0,95
30	0,32	0,99	0,92	0,64	1,00	0,94
50	0,30	0,99	0,90	0,64	1,00	0,93
80	0,32	0,99	0,92	0,64	0,99	0,94
120	0,31	0,99	0,90	0,64	1,00	0,94
180	0,31	0,99	0,91	0,61	0,99	0,92
360	0,29	0,99	0,89	<i>0,49</i>	0,99	0,85
720	0,25	0,97	0,80	<i>0,18</i>	0,87	0,55
1440	0,27	0,97	0,81	-	-	-

a ésta se observa un descenso leve de la pendiente. En *F. semitectum* los valores de pendiente son similares hasta los 120 mg.L⁻¹, luego descienden levemente y en las dos últimas concentraciones (360 y 720 mg.L⁻¹), se observa el efecto inhibitor de la Iodopovidona sobre esta especie. La Figura 6.24 ilustra comparativamente la respuesta de ambas especies a la Iodopovidona.

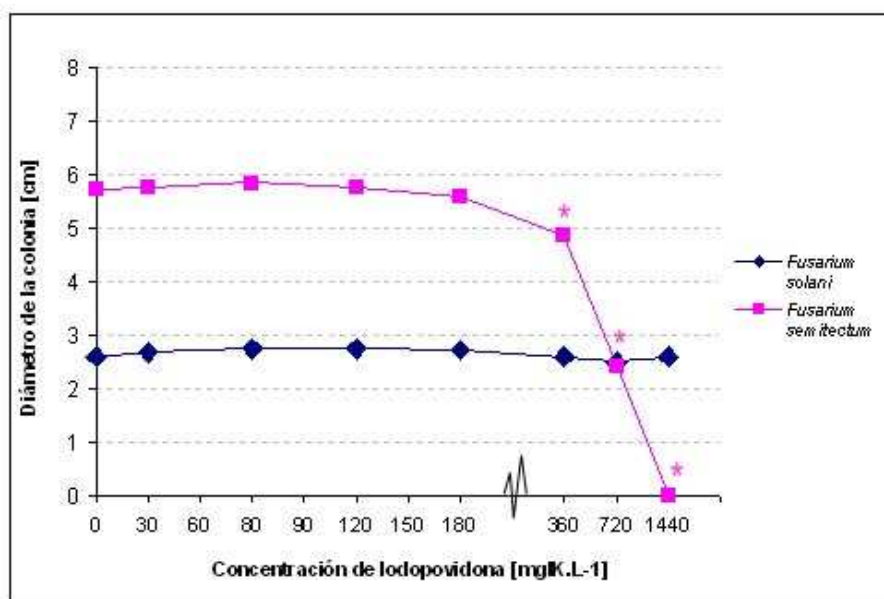


Figura 6.24: Efecto de la Iodopovidona sobre el crecimiento de *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum* en Czapeck Dox incubados a 17°C: Diámetro registrado luego de 8 días de exposición. Los datos son expresados como medias $\pm$ desviación estándar (D.E.). *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Tal como se observa en la Tabla 6.15 la Iodopovidona no tuvo un efecto inhibitor del crecimiento en *F. solani*. Sin embargo, *F. semitectum* mostró ser más sensible a esta sustancia al ser expuesta a concentraciones superiores a 180 mg.L⁻¹ con una CL₅₀ de 655,70 mg.L⁻¹ próxima a los 720 mg.L⁻¹.

Tabla 6.15: Porcentaje de Inhibición del crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de Iodopovidona.

Concentración [mg.L ⁻¹]	Porcentaje de Inhibición del crecimiento	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
0	-	-
30	-2,88	-0,44
50	-0,96	-1,31
80	-5,77	-2,18
120	-5,77	-0,44
180	-4,81	2,18
360	0,00	14,85
720	3,85	57,64
1440	0,00	100,00

6.4. Discusión

Las infecciones producidas por especies fúngicas del género *Fusarium* han sido descritas en gran variedad de organismos tanto de vida libre como en cautiverio (Hatai & Kubota, 1986; Crow et al., 1995; Souheil et al., 1999; Khoa et al., 2004). Tal como se trató detalladamente en el Capítulo 3, las dos especies del género *Fusarium* estudiadas (*Fusarium solani* y *Fusarium semitectum*) fueron aisladas de ovas de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Ambas también han sido reportadas previamente como causantes de infecciones en organismos acuáticos, pero sus repercusiones económicas son desconocidas. Es únicamente en el cultivo intensivo de crustáceos, donde el efecto de las Fusariosis cobra importancia económica, debido a que causa serios eventos de mortalidad. A pesar de esto, la evaluación de potenciales agentes fungicidas destinados al tratamiento de infecciones causadas por organismos ubicados dentro del Reino Fungi, es un temática que ha sido poco estudiada. En la actualidad, en el cultivo intensivo de crustáceos, las medidas de control de esta enfermedad se limitan a la profilaxis y prevención (Alday-Sanz, comunicación personal). Aunque se han realizado escasos estudios para evaluar la aplicación de medidas terapéuticas para el control de infecciones por *Fusarium* estos han sido diseñados para la prevención y tratamiento de infecciones de crustáceos. Bell et al., (1990) probaron la eficacia *in vivo* de la 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona y 2-metil-4-isotiazolina-3-ona, en el control de mortalidades causadas por *F. solani*, en *Penaeus stylirostris*, pero su uso como fungicida esta restringido al tratamiento de crustáceos debido a

que esta sustancia resulta ser altamente tóxica para los peces.

El *Verde de Malaquita* es un colorante diaminotrifetil metano N-metilado, como vimos en Capítulo 5, resulta ser un efectivo agente fungicida para el control de infecciones por “*mohos acuáticos*”, hecho que ha sido demostrado por diversos autores (Bailey 1984; Sudova et al., 2007). Sin embargo, en el presente estudio se encontró que el rango de concentraciones de VM que tienen un efecto inhibitor o letal sobre el crecimiento en los Oomycetes estudiados (0,03- 0,25 mg.L⁻¹), no es capaz de ejercer un efecto semejante sobre el crecimiento de *F. solani* y *F. semitectum*. De acuerdo con los resultados obtenidos, la concentración que inhibió totalmente el crecimiento de los Oomycetes estudiados (0,25 mg.L⁻¹) tiene un efecto levemente inhibitor del crecimiento de ambas especies de *Fusarium*, las que exhibieron un rango de tolerancia mucho más amplio al VM, que alcanzó valores de hasta 4,0 y 8,0 mg.L⁻¹, para las concentraciones inhibitorias del crecimiento de *F. semitectum* y *F. solani* respectivamente.

La sensibilidad al Verde Malaquita en especies fúngicas anamorfos de Ascomycota es variable, así tenemos que a una concentración de 1,0 mg.L⁻¹, los porcentajes de inhibición varían desde 4,5 % para *Aspergillus flavus* hasta 96,4 % para *Cladosporium herbarum* (Bragulat et al., 1991). Esta variabilidad entre géneros también se observa entre especies de un mismo género. En los estudios realizados por Bragulat et al., (1991), el crecimiento de *F. oxysporum* fue inhibido en un 7,9 % al ser expuesto a una concentración de 1 mg.L⁻¹ de VM; a dicha concentración encontramos que en las especies en estudio los porcentajes de inhibición del crecimiento fueron mucho más elevados alcanzando valores de 48,86 y 55,56 % para *F. solani* y *F. semitectum*, respectivamente.

Además de ser un efectivo agente microbicida, (Treves & Brown, 2000) el VM es ampliamente conocido por su poder fungicida. A pesar de esto, los resultados obtenidos indican que las especies del género *Fusarium* son capaces de tolerar elevadas concentraciones. Esta capacidad fue utilizada por diversos autores para formulación de medios de cultivos para el aislamiento selectivo de especies de este género (Leslie & Summerell, 2006). Singh & Nene (1965) formularon un medio de cultivo diferencial compuesto por un medio basal con el agregado de 15-50 ppm de VM; más recientemente Castellá et al. (1997), desarrollaron un formulado, actualmente denominado Agar Verde de Malaquita, utilizando 2,5 mg.L⁻¹ de VM.

Aunque se desconocen los mecanismos exactos que subyacen a la tolerancia al VM, es sabido que una gran variedad de organismos como bacterias, Actinomycetes, levaduras y hongos son capaces de decolorar y detoxificar compuestos recalcitrantes como el Verde de Malaquita y otras tinciones diaminotrifénil metano mediante mecanismos que han sido revisados en profundidad por Azmi et al. (1998).

Una gran variedad de especies fúngicas son capaces de decolorar diversos colorantes. Así por ejemplo, algunos Basidiomycetes no sólo decoloran sino que también degradan y mineralizan una gran variedad de estructuras químicas (azo - antraquinona, trifénil metanos heterocíclicos, y colorantes poliméricos) y otros compuestos orgánicos tóxicos y recalcitrantes. *Trametes versicolor*, es capaz de decolorar compuestos como la antraquinona, azo e indigo (Wong & Yu, 1999; Yang et al., 2009). Por su parte, algunos Ascomycetes como: *Phanerochaete chrysosporium* capaz de degradar colorantes trifénilmetano como el Verde de Malaquita, Cristal Violeta, Verde Brillante y el Etil Violeta, mediante la acción de una lignina peroxidasa que efectúa procesos sucesivos de N-demetilación sobre los grupos N-alquil de dichas sustancias (Azmi, 1998; Fournier et al., 2004). *Pestalotiopsis guepinii* actúa sobre una gran cantidad de sustancias coloreadas (Saparrat & Hammer, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de degradar el Verde de Malaquita generando su decoloración (Youssef et al., 2008). También podemos mencionar a algunos anamorfos de Ascomycota como *Aspergillus niger*, que actúa decolorando al azul básico mediante la bioabsorción de dicha sustancia (Fu & Viraraghavan, 2000) y *Acremonium killiense* que es capaz de degradar el VM por decoloración (Youssef et al., 2008). Así mismo en otros organismos, como el Zigomycete *Cunninghamella elegans*, la biotransformación del VM se lleva a cabo mediante reacciones de reducción y N-demetilación, en una reacción es catalizada por el citocromo P-450 (Cha et al., 2001).

Como podemos ver existen diversos mecanismos que median no sólo la tolerancia, sino también la biodegradación del VM. En consecuencia, las formas filamentosas de Ascomycetes y Basidiomycetes son capaces de degradar al VM produciendo su decoloración y por lo tanto la disminución de su toxicidad, mediante el empleo de vías enzimáticas inespecíficas. Abedin (2008), aisló una cepa de *Fusarium solani* capaz de decolorar y degradar concentraciones de 0,5 – 3,5 mg de VM; no obstante, observó que esta sustancia tuvo un efecto inhibitor del crecimiento, el que se vio reflejado en el descenso paulatino de la biomasa de *F. solani* hasta en un 80 %. A pesar

de que *F. solani* fue capaz de decolorar rápida y completamente dichas concentraciones de VM, esta sustancia tuvo un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento y actuó a su vez provocando alteraciones morfológicas en el micelio de esta especie.

La utilización del *Cloruro de Sodio* como tratamiento contra la Saprolegniosis en la incubación y cría de salmónidos, es recomendada por diversos autores ya que esta sustancia ha sido reconocida como un fungicida seguro para los peces (Khodabandeh & Abtahi, 2006). Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre su efecto en micosis provocadas por otros organismos del Reino Fungi. El Cloruro de Sodio actúa principalmente generando un incremento de la osmolaridad en el entorno creando un desequilibrio osmótico, que conlleva a la pérdida de agua por parte de los microorganismos. Muchos procesos vitales tales como el crecimiento invasivo a través de suelos, desechos biológicos y tejidos sólidos de plantas y animales requieren turgencia hifal, para lo cual es necesario un influjo continuo de agua al interior de la célula. En hongos unicelulares levaduriformes, la absorción de agua también es necesaria durante el crecimiento y la germinación de las esporas, las que requieren una hidratación significativa del citoplasma (Davis et al., 2000). Por lo tanto el crecimiento se ve alterado ante la presencia de un ambiente hiperosmótico. Además, Adler (1996) menciona que la salinidad además de ejercer un efecto tóxico directo debido al estrés osmótico puede también interferir en las actividades enzimáticas.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con ClNa se correlacionan con las observaciones realizadas durante el aislamiento de ambas especies e indican que éstas tendrían una considerable tolerancia a la salinidad, la que se vio incrementada en condiciones *in vitro*. Resultados similares fueron observados por diversos autores en una gran variedad de especies anamórficas del Phylum Ascomycota aislados de ambientes hipersalinos (Adler, 1996; Cantrell et al., 2006). Mandeel (2006), encontró que *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti* y *F. compactum*, recuperados de hábitats naturales con concentraciones de ClNa de hasta un 5 %, vieron aumentada su tolerancia a la salinidad en condiciones *in vitro*. Además encontró que *F. solani*, fue la especie que mostró mayor tolerancia a altas concentraciones de ClNa, logrando crecer en medio de cultivo con hasta un 25 % de ClNa. De acuerdo con Cooke & Whipps (1993) el incremento, *in vitro*, de la tolerancia al ClNa podría deberse a la disponibilidad inmediata de nutrientes aportados por el medio de cultivo, los que son utilizados para poner en marcha los mecanismos ne-

cesarios para contrarrestar el desequilibrio osmótico. Esta inmediata disponibilidad de nutrientes no ocurre en ambientes naturales.

Son pocas las especies fúngicas consideradas halófilas obligadas; sin embargo, algunas especies crecen mejor en presencia de sal. El-Abyad et al. (1988) estudiaron, *in vitro*, la influencia del estrés salino sobre el crecimiento, esporulación y germinación de los conidios y esclerocios en especies del género *Fusarium*. Dichos autores encontraron que el incremento en la concentración de ClNa provoca respuestas variables en diferentes especies del género *Fusarium*. En *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. diversisporum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* sp. *betae*, observaron una estimulación del crecimiento; mientras que éste se redujo en *F. verticillioides*. La esporulación fue estimulada en *F. culmorum* y *F. verticillioides*; y la germinación de conidios en *F. equiseti* y *F. oxysporum* sp. *betae*.

Las condiciones de cultivo pueden influir en la tolerancia al ClNa; en los ensayos realizados se observó que la influencia de la temperatura sobre el crecimiento y tolerancia al ClNa, principalmente en *F. solani*, que al ser incubado a 17°C logró crecer hasta en 40 g.L⁻¹ y al aumentar la temperatura de incubación a 25°C, creció en 80 g.L⁻¹. El efecto de la temperatura no fue tan evidente en *F. semitectum* pues esta especie no amplió su rango de concentraciones, en ambas temperaturas sólo logró crecer hasta en 120 g.L⁻¹, pero al ser incubado a 25°C, alcanzó tasas de crecimiento mayores a las obtenidas a una temperatura de incubación de 17°C.

Al ser incubados a 17°C, la concentración inhibitoria CI para *F. solani* y *F. semitectum* fue de 80 y 160 g.L⁻¹ respectivamente, al aumentar la temperatura de incubación 25 °C la CI de *F. solani* aumentó hasta 120 g.L⁻¹ mientras que la de *F. semitectum* se mantuvo constante. Las concentraciones inhibitorias medias (CIM) para *F. solani* a 17 y 25°C se ubicaron entre 40 y 80 g.L⁻¹ resultando en 49,50 y 54,40 g.L⁻¹ respectivamente. La CIM de *F. semitectum* al ser incubado a 17° se ubicó entre 40 y 80 g.L⁻¹ resultando en 75,20 g.L⁻¹, y al aumentar la temperatura a 25 °C su valor aumento a 85,80 g.L⁻¹ encontrándose entre 80 y 120 g.L⁻¹.

Existen diversos mecanismos para disipar el desequilibrio osmótico generado por las condiciones hipersalinas. En algunas levaduras la producción de melanina es uno de ellos (Kogej et al., 2006). En formas filamentosas una de las respuestas adaptativas al estrés osmótico más frecuente es la acumulación de una gran variedad de iones inorgánicos y moléculas orgánicas como alcoholes polihidricos (polioles) y

trehalosa; éstos son los principales osmolitos compatibles producidos por especies dentro del Reino Fungi para mantener el flujo de agua hacia el interior, en un proceso denominado “**ajuste osmótico**” (Davis et al., 2000). Algunos autores sugieren que los Oomycetes (Reino Straminipila), no son capaces de sintetizar polioles; en cambio parece ser que la prolina cumple funciones similares en estos organismos (Davis et al., 2000).

Esta capacidad de crecer en concentraciones salinas, que restringen el crecimiento de otras especies fúngicas, les otorga a estos organismos una ventaja competitiva (Zac & Wildman, 2004). Al respecto es importante remarcar, la escasa tolerancia a la salinidad, que exhiben organismos similares y ubicuos del ambiente acuático que infectan peces y sus ovas pertenecientes a la Familia Saprolegniaceae (Cooke & Whipps, 1993).

En los ensayos realizados encontramos que las concentraciones inhibitorias de ClNa son mayores a las CL₅₀-96h para ovas de pejerrey (30.3 g.L⁻¹) (Pacheco Marino et al., 2006b; Pacheco Marino & Salibián, 2008) y otras especies de importancia en acuicultura como trucha arco iris (7,4 g.L⁻¹) según la PAN Pesticides Database, (2009). También superan las concentraciones recomendadas para tratamientos por pulsos (20-30 g ClNa.L⁻¹) (Marking et al., 1994; Kitancharoen et al., 1997; Treves & Brown, 2000). Por lo tanto el ClNa no sería apto como agente profiláctico, debido a que las concentraciones inhibitorias son tan elevadas que resultan incompatibles con la vida del organismo que será objeto de tratamiento, esto hace que el ClNa deba ser descartado como tratamiento de infecciones por *Fusarium* spp.

Históricamente, el *Formaldehído* ha sido utilizado en la industria hortícola para la prevención de infecciones por *Fusarium*, mediante su aplicación en solución acuosa en invernaderos (O'Neill et al., 2005; Wensley, 1968); en la actualidad ha sido reemplazado por otras sustancias como el Dioxido de Cloro, Hipoclorito, Yodo, Amonio cuaternario, Glutaraldehído y Fenol (Chastagner & Riley, 2002).

La eficacia de la Formalina en el control de *Fusarium* ha sido demostrada por Wensley (1968), quien comprobó el efecto fungicida del Formaldehído sobre conidios de *Fusarium oxysporum* f. *melonis*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* spp. y algunos miembros de la Familia Mucoraceae, encontrando que todas las especies estudiadas fueron sensibles al Formaldehído. Sin embargo, la susceptibilidad de *Fusarium* se vio favorecida por el aumento de la humedad ya que ésta estimula la germinación de las

clamidoporas, las que por la composición y el espesor de su pared podrían resistir mejor la penetración del Formaldehído, haciéndolas más susceptibles a la acción del fungicida durante la germinación.

La tasa de crecimiento de *F. solani* en los grupos tratados con 20 y 40 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de Formalina no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Control, y en la concentración ensayada más elevada (450 $\mu\text{L.L}^{-1}$) sólo se obtuvo una inhibición del crecimiento del 21 %. La TC de *F. semitectum* disminuyó proporcionalmente al incremento de la concentración hasta ser inhibido en 450 $\mu\text{L.L}^{-1}$ con diferencias significativas entre el grupo Control y las concentraciones ensayadas.

Resultados similares fueron descritos por Dennis & Gaunt (1974), quienes estudiaron el efecto del Formaldehído sobre *Scopulariopsis brevicaulis*, *Penicillium crustosum* y siete especies de *Aspergillus*, y los agruparon de acuerdo a su tolerancia al Formaldehído en solución acuosa en: **tolerantes** con CL_{50} superiores a 2000 ppm: *A. sydowi* *A. versicolor*; **moderadamente tolerantes** como *A. candidus*, *A. flavus* y *A. repens* con CL_{50} ente 1000 y 1500 ppm; **sensibles** entre las que se encuentra a *S. brevicaulis* y *Penicillium crustosum*, con una CL_{50} de 630 y 550 ppm respectivamente; y **muy sensibles** como *A. ruber* y *A. chevalieri* CL_{50} inferiores a 200 ppm. De estos resultados se puede concluir que el efecto de esta sustancia sobre las diferentes especies del género *Aspergillus* es variable. El Formaldehído, aun en bajas concentraciones, afecta negativamente a varios microorganismos y en concentraciones superiores a 1000 mg.L^{-1} éste no puede ser tolerado por la mayoría de biocenosis preadaptados como lodos activados (Kaszycki et al., 2006). Nótese que las cepas de *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax* utilizadas en este estudio resultaron ser muy sensibles a esta sustancia.

Marcano et al. (1985) observó que *Fusarium solani* exhibe una notable resistencia a los vapores de Formol durante exposiciones prolongadas en ensayos *in vitro*; en estas condiciones la tolerancia al Formaldehído puede ser atribuida a la inducción de enzimas degradativas de la Formalina. La capacidad que tienen algunos organismos como hongos miceliares y levaduriformes, de utilizar y asimilar el Formaldehído, ha sido demostrada por diversos autores. *Hansenula polymorpha*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Trichosporum penicillatum* fueron capaces de degradar concentraciones de Formaldehído de 1750, 3700 y 1000 mg L^{-1} respectivamente (Kato et al., 1982; Glancer-Soljan et al., 2001; Kaszycki et al., 2001). Kaszycki et al., 2006

aislaron una cepa de *Trichosporon* spp. capaz de tolerar elevadas concentraciones de xenobióticos como el Fenol, Formaldehído, metanol e hidrocarburos derivados del petróleo; para esta cepa la concentración letal de Formaldehído fue superior a los 2000 mg.L⁻¹; esta tolerancia se debe a un incremento en la capacidad de la biodegradación de este compuesto, mediante una enzima (formato deshidrogenasa).

Existen pocos estudios sobre la capacidad de los hongos filamentosos de degradar el Formaldehído, pudiéndose mencionar los realizados por Mc Fadden & Sutton (1975), quienes desarrollaron un medio selectivo para el aislamiento de especies del género *Trichoderma*, basados en su capacidad de crecer medios que contienen Formaldehído. También, Sawada et al. (2006) aislaron a *Trichoderma virens* de suelos expuestos a Formaldehído y comprobaron que las cepas aisladas eran capaces de degradar concentraciones de Formaldehído del 0.6 % (= 6000 µl.L⁻¹).

En Estados Unidos y Canadá, la Formalina es el único fungicida aprobado por la US. FDA para su aplicación para el tratamiento de la Saprolegniasis en peces y sus ovas, diversos autores han demostrado su capacidad para reducir las tasas de infección (Schreier et al., 1996). Mientras que las concentraciones de Formalina recomendadas para el tratamiento de la Saprolegniasis en ovas de salmónidos se encuentran entre los 250 – 1000 µl.L⁻¹, en exposiciones por pulsos de 15 minutos de duración (Marking et al., 1994; Schreier et al., 1996; Treves & Brown, 2000), estas concentraciones no serian efectivas en el tratamiento de infecciones provocadas por otras especies fúngicas con mayor tolerancia a los tratamientos convencionales, pudiendo no ser erradicadas de los sistemas de cultivo. Si bien esta sustancia no suprimió el crecimiento de *F. solani*, puede ser utilizada como fungistático a concentraciones seguras para las ovas de pejerrey, más no como fungicida.

El *Ácido Acético* y su base conjugada, el Acetato, son ácidos monocarboxílicos dicarbonados, que pueden ser utilizados por muchos microorganismo como única fuente de carbono mediante la vía de glioxilato, ruta metabólica que puede estar presente en una gran variedad de plantas, bacterias, protozoarios y hongos. Bennet et al. (1976) encontraron que *Aspergillus parasiticus* es capaz de utilizar Acetato de Sodio y *Ácido Acético*, como fuente de carbono en ausencia de glucosa, para sustentar su crecimiento vegetativo, pero sólo es capaz de emplear el Acetato de Sodio, aunque de manera menos eficiente, para síntesis de metabolitos secundarios como toxinas y pigmentos; estos hallazgos lo llevaron a concluir que el *Ácido Acético*

tendría solamente un efecto fungistático.

Tanto para *F. solani* como para *F. semitectum* el Ácido Acético tuvo un efecto inhibidor a concentraciones superiores a 500 mg.L⁻¹. A concentraciones menores el Ácido Acético tuvo un efecto levemente estimulador del crecimiento en *F. solani* y levemente inhibidor en *F. semitectum*. El porcentaje de inhibición alcanzado a 1000 mg.L⁻¹ fue del 91,09 y del 86,62 % para *F. solani* y *F. semitectum* respectivamente. No es de extrañar la capacidad de ambas especies para sobrellevar tales concentraciones de Ácido Acético en el medio, puesto que la mayoría de hongos del suelo se desarrollan perfectamente en ambientes ligeramente ácidos. Esta cualidad pueden verse exacerbada, sobre todo en condiciones de cultivo donde los organismos disponen de los nutrientes necesarios para poner en marcha mecanismos de control del medio interno y así lograr contrarrestar el descenso del pH. (Domsh et al., 1993).

Existen diversos mecanismos de regulación del pH intracelular; estos son dependientes de ATP. En medios pobres, que no aportan sustratos energéticos suficientes, estos mecanismos colapsan y llevan a la muerte de la célula. Por esta razón Bennet et al. (1976) consideran que el Ácido Acético tendría un efecto fungistático ya que en presencia de glucosa su efecto tóxico puede ser contrarrestado. No obstante la exposición a concentraciones muy elevadas de AcH puede ser letales. Kang et al. (2003) encontraron que a una concentración de Ácido Acético de 50 mM (=3002,5 µl.L⁻¹) el crecimiento de *Colletotrichum spp.*, fue totalmente inhibido. Efectos similares fueron observados por Conková et al. (1993) en: *Penicillium glabrum*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium moniliforme*, *Cladosporium sphaerospermum*, en estas especies el crecimiento fue inhibido a concentraciones de 50000 µl.L⁻¹ de Ácido Acético.

En Ácido Acético tamponado, es a partir de los 600 mg.L⁻¹ que se observó un efecto inhibidor de *F. solani*, en *F. semitectum* la inhibición del crecimiento se empieza a observar en las placas expuestas a 400 mg.L⁻¹. Entonces podría decirse que *F. semitectum* resultó ser más sensible al Ácido Acético que *F. solani*. En la actualidad se desconoce la naturaleza de la toxicidad de Acetato, sólo se sabe que su efecto sería más fungistático que fungicida (Shimokawa & Nakayama, 1999). Munir & Shimada (2005) estudiaron el efecto del Acetato sobre el crecimiento de Basidiomycetes causantes de la pudrición de la madera y encontraron que una concentración de 10000 mg.L⁻¹, no inhibió el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Chaetomium globosum*,

pero sí el de otras especies.

El Iodo es considerado, principalmente, un efectivo agente contra bacterias y virus (Wright & Snow, 1975; Alderman, 1984), algunos autores también han afirmado que es un efectivo fungicida (Subasinghe & Sommerville, 1985; Schreck et al., 1990-1992). Existen escasos estudios que hayan abordado el análisis del efecto de los Iodóforos sobre organismos del Reino Fungi. Hiruma & Kagawa (1987) estudiaron el efecto del Yodo y Ioduro de Potasio sobre el Ascomycota levaduriforme *Sporothrix schenckii* y encontraron que estas sustancias provocaron alteraciones ultraestructurales y también una disminución en la tasa de germinación de esta especies. Hallazgos similares fueron reportados por Torres et al. (1997) quienes afirman que el Iodo, a concentración de 39 μM , es capaz de generar daño celular en hongos levaduriformes

Khodabandeh & Abtahi (2006), realizaron ensayos en ovas de carpa común infectadas con *Saprolegnia* sp. y encontraron que el Iodo en concentraciones de 50, 100 y 200 mg.L^{-1} , tiene un efecto ligeramente fungicida, no siendo efectivo en la inhibición del crecimiento de *Saprolegnia* sp. Los hallazgos obtenidos concuerdan con lo observado por Khodabandeh & Abtahi (2006); pues encontramos que el Ioduro de Potasio no ejerce un efecto inhibitor importante sobre las especies de *Fusarium* estudiadas. Si bien, el crecimiento de *F. semitectum* fue parcialmente inhibido a una concentración de 960 mg.L^{-1} , esta es una concentración muy elevada para ser utilizada como tratamiento en ovas de pejerrey, ya que se encuentra por encima de la CL_{50} , y además en esta concentración se alcanza un porcentaje de inhibición demasiado bajo (28,82 %). Una situación particular sucede al exponer a ambas especies a la Iodopovidona; en donde se observa, que las concentraciones ensayadas no tiene efecto alguno sobre el crecimiento de *F. solani*, pero si logran inhibir a *F. semitectum*, habiéndose encontrado que la CIM es cercana a los 720 mg.L^{-1} y se observa un efecto letal a una concentración 1440 mg.L^{-1} . Esto nos lleva a pensar que tal vez el efecto inhibitorio de la Iodopovidona sobre *F. semitectum* pueda ser atribuido a algún otro componente del formulado y no al Iodo.

Capítulo 7

Conclusiones

Se enuncian a continuación las principales conclusiones a las que se ha arribado en el presente trabajo.

- Las ovas del pejerrey *Odontesthes bonariensis* son sensibles a la Saprolegniasis, diferentes especies de Saprolegniales están involucradas en dichos eventos.
- Se ha identificado morfológica y molecularmente a *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa*, como dos de las especies causantes de Saprolegniasis en ovas de pejerrey. Estos organismos son capaces de causar lesiones que alteren la integridad de la membrana coriónica y conduzcan a la muerte del embrión.
- El crecimiento *in vitro* de *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa* está principalmente determinado por la temperatura de incubación. Ambas especies son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, de 5 a 25°C. La temperatura óptima de incubación se encuentra entre 15 y 25°C. La composición del medio de cultivo no ejerce un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento de dichas especies.
- La presencia de determinados nutrientes en el medio de cultivo, determinará la formación de estructuras reproductivas sexuales en *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa*. Los medios de cultivo agarizados que favorecieron la formación de estructuras reproductivas sexuales en ambas especies fueron: Glucosa Glutamato y Glucosa extracto de levadura.

- Las ovas de pejerrey también son sensibles al ataque de otros organismos ubicados dentro de Reino Fungi. Se ha encontrado una gran diversidad de especies de anamorfos de Ascomycota asociados a las ovas de pejerrey; muchos de ellos han sido previamente reportados, por otros autores, como patógenos de peces y otros organismos acuáticos.
- Se ha identificado a *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum* como causantes de infecciones fúngicas en ovas de pejerrey, habiéndose demostrado histológicamente su capacidad invasiva.
- Las ovas de pejerrey exhibieron distintos grados de sensibilidad a las sustancias fungicidas propuestas. El Verde de Malaquita resultó ser la sustancia que exhibió una mayor toxicidad y el Cloruro de Sodio fue la sustancia menos tóxica en exposiciones de 96 horas.
- Los márgenes de seguridad, resultado del cociente entre CL_{50-96h} /concentración subletal, resultaron en orden creciente en: 1,00 Iodopovidona $ADR < 1,06$ IK-ClNa $0,9\% < Iodopovidona-ADR < 1,21$ ClNa $< 1,26$ IK-ADR $< 1,28$ Iodopovidona-ClNa $0,9\% < 1,44$ F $1,48$ AcH $< 1,56$ AcHT $< 2,78$ VM.
- La toxicidad de las sustancias fungicidas es claramente influenciada por las características físico-químicas del agua, como la dureza y el pH.
- Al comparar los valores de los parámetros toxicológicos calculados con los diferentes métodos de determinación propuestos (el método de los Probits, el test no paramétrico de Trimmed Speraman-Karber, y el Modelo Biológico) encontramos que valores obtenidos son próximos entre si, encontrándose dentro de los límites de confianza para cada condición.
- El Modelo Biológico es un procedimiento robusto que permite la determinación de parámetros de toxicidad en condiciones en las que el método de los Probits no es capaz de calcularlas.
- Luego de los tratamientos agudos únicamente se obtuvo eclosión en las ovas expuestas a Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, Formalina y Ácido Acético Glacial. Estos hallazgos nos permiten afirmar que la tasa de eclosión es un indicador de toxicidad mucho más sensible que la tasa de sobrevivencia.

- *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa* resultaron ser sensibles, aunque en distinto grado, al: Verde de Malaquita, Cloruro de Sodio, Formalina y Ácido Acético Tamponado, en concentraciones seguras para las ovas de pejerrey.
- Todas las sustancias fungicidas ensayadas indujeron alteraciones morfológicas en el micelio, y las estructuras reproductivas sexuales de *Achlya racemosa*, estas alteraciones que fueron características de cada sustancia. Solo algunas de las sustancias tuvieron efectos similares en *Saprolegnia ferax*.
- El incremento de la concentración del agente fungicida no estuvo relacionado con la abundancia de estructuras reproductivas sexuales femeninas (oogonios).
- En los ensayos *in vivo* encontramos que *Saprolegnia ferax* posee una capacidad infectiva significativamente mayor que *Achlya racemosa*.
- El Verde de Malaquita fue la sustancia más efectiva en el control de infecciones causadas por *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa*. Pero a pesar de que la concentración utilizada en los ensayos *in vivo* ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) fue inferior a la NEC para ovas de pejerrey, esta sustancia exhibió elevados porcentajes de mortalidad en las ovas expuestas resultando en 29,25 y 33,33 % para *Saprolegnia ferax* y *Achlya racemosa* respectivamente.
- La sustancia más efectiva para el tratamiento de *Saprolegnia ferax* fue la Formalina a una concentración de $40 \text{ } \mu\text{L.L}^{-1}$, con un porcentaje de infección de (6,45 %) significativamente menor al obtenido en el Control sin tratamiento (43,33 %) y un porcentaje de mortalidad asociado al tratamiento de 8,06 %.
- La sustancia más efectiva para el tratamiento de *Achlya racemosa* fue el Ácido Acético Tamponado a una concentración de ($200 \text{ } \mu\text{L.L}^{-1}$), con un porcentaje de infección de 10,00 %, resultando ser estadísticamente tan eficaz como el Verde de Malaquita, pero con una mortalidad asociada al tratamiento de tan solo 6,67 % y una tasa de sobrevivencia de 83,33 %, significativamente superior a la obtenida en el grupo Control (68,33 %).
- Las cepas de las especies fúngicas *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum* fueron más resistentes a las sustancias fungicidas ensayadas que los *Saprolegnia*.

les. Ninguna de las sustancias exhibió un efecto inhibitorio a concentraciones seguras para las ovas de pejerrey.

Apéndice A

Medios de cultivo

Se enuncia a continuación la composición de los medios de cultivos empleados para el aislamiento, identificación y ensayos de crecimiento e inhibición.

1. Glucosa Glutamato de Seymour (GGL)

Extraído de Seymour (1970)

EDTA May Baker		0,4 g
PO ₄ H ₂ K		0,18 g
PO ₄ HK ₂		0,14 g
Cl ₂ Mg		0,32 g
Cl ₂ Ca		0,125 g
Cl ₂ Mn		0,15 g
Cl ₂ Zn		0,08 g
Cl ₃ Fe		2,6 mg
DL metionina		0,1 g
Glutamato monosódico		1 g
D-glucosa		6 g
Agar Mallinckrodt		15 g
Agua destilada		1000 ml

2. Extracto de levadura almidón de Emerson's (YpSs)

Extraído de: Fuller & Jaworski (1987) o de Stevens (1974)

Almidón soluble		20 g
Extracto de levadura		1 g
K ₂ HPO ₄		1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0,5 g
Agar Mallinckrodt		20 g
Agua destilada		1000 ml

3. Agar harina de maíz (CM)

Extraído de Fuller & Jaworski (1987)

Harina de maíz		20 g
Agar Mallinckrodt		20 g
Agua destilada		1000 ml

4. Glucosa Extracto de Levadura (GY)

Extraído de Hatai & Hoshina (1992)

Glucosa		3 g
Extracto de levadura		1 g
PO ₄ HK ₂		1,4 g
SO SO ₄ Mg		0,1 g
Fosfato disódico		0,6 g
Agar Mallinckrodt		20 g
Agua destilada		1000 ml

5. Agar papa glucosado (APG)

Extraído de Kirk et al. (2001)

Papas		200 g
Glucosa		15 g
Agar Mallinckrodt		20 g
Agua destilada		1000 ml

6. Agar papa sacarosa (APS)

Extraído de Kirk et al. (2001)

Infusión de papa		500 ml
Sacarosa		20 g
Agar Mallinckrodt		20 g
Agua destilada		500 ml

7. Agar harina de avena (OA)

Extraído de Kirk et al. (2001)

Harina de avena		30 g
Agar Mallinckrodt		20 g
Agua destilada		1000 ml

8. Agar Extracto de levadura y malta (MEA)

Extraído de Kirk et al. (2001)

Glucosa		20 g
Extracto de Malta		20 g
Peptona		1,0 g
Agar		20 g
Agua destilada		1000 ml

9. Agar de nutrientes especiales (SNA)

Extraído de Nirenberg (1976)

Glucosa		0,2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O		0,5 g
KCl		0,5 g
KNO ₃		1 g
KH ₂ PO ₄		1 g
Agar		20 g
Agua destilada		1000 ml

Apéndice B

Metodología empleada para la identificación molecular

El análisis molecular fue realizado mediante la extracción y posterior amplificación y secuenciación de la region ITS del ADN ribosomal. Para realizar la extracción ambas especies fueron cultivadas en medio papa dextrosa. El ADN fue purificado a partir del micelio utilizando un Kit de extracción denominado DNAEasy Plant Mini kit (Qiagen, Basel, Switzerland). Las fracciones de ADN extraídas fueron sembrada en una cuba electroforética con (0.5 mg/ml de Bromuro de Etidio para ser separadas por electroforesis en gel de azarosa 1 % (Biofinex), este procedimiento se realizó durante un periodo de una hora a 100 V. Finalmente, se verificó mediante la observación bajo luz UV la presencia del ADN comparando la ubicación de las bandas con un patrón de peso molecular. La amplificación de la fracción ITS fue realizada utilizando los primers universales ITS1 e ITS4, los que fueron proporcionados por Genome express (Meylan, France). La mezcla de reacción, de un volumen total de 50 μ l estuvo compuesta por:

Buffer para PCR (75 mM Tris-HCl pH 9.0) 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$ 0.1 mM dNTPs 0.25 μ M de cada primer 1.5 mM MgCl_2 1 μ l de Taq Polymerase (Biotools, Spain) 1 μ l of DNA

La amplificación fue realizada en un termociclador de gradiente Master Gradient thermocycler (Techne, Progene, France) de acuerdo con el siguiente programa:

Desnaturalización inicial 95°C durante 2 min seguida de 30 ciclos que incluyen desnaturalizaciones a 95°C durante 20 segundos, annealing durante 25 segundos a

55 °C y extensión durante 50 segundos a 72°C. La amplificación finalizó luego de culminado el último paso de extensión final realizada durante 10 minutos a 72°C.

Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1 % agarose (Biofinex, Switzerland) en 1x TBE, teñidos con (0.5 mg/l) bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

Los amplicones fueron purificados usando un kit Minelute PCR Purification Kit (Qiagen), este procedimiento se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La cantidad y calidad del material obtenido fue verificada, tal como se describe en párrafos anteriores para la extracción del ADN. Los amplicones fueron secuenciados directamente en direcciones sense y antisense. Ambas muestras fueron secuenciadas dos veces y una secuencia de consenso fue creada a partir de ambos duplicados. La secuencias fueron realizadas por Genome express (Meylan, France) y depositadas en el GenBank.

Apéndice C

Ecotoxicidad en peces

En este apéndice se presentan tablas que sintetizan la ecotoxicidad reportada en distintas especies de peces para las sustancias estudiadas. La Tabla C.1 corresponde a la ecotoxicidad aguda del Verde de Malaquita en distintas especies de peces, y fue extraída de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC35105&Taxa_Group=Fish. La Tabla C.2 corresponde a la ecotoxicidad aguda del Cloruro de Sodio y fue extraída de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC34362&Taxa_Group=Fish. Por su parte la Tabla C.3 sintetiza la ecotoxicidad aguda del Formaldehído en distintas especies de peces, y fue extraída de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC40254&Taxa_Group=Fish. La ecotoxicidad en distintas especies de peces del Ácido Acético y el Acetato de Sodio se presenta en la Tabla C.4. Esta información fue extraída de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC32883&Taxa_Group=Fish y de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC36755&Taxa_Group=Fish. Por último, la Tabla C.5 corresponde a la ecotoxicidad aguda del complejo Iodo - Polyvinyl pyrrolidone, el Iodo y el Ioduro de Potasio, en distintas especies de peces. La información fue extraída de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC35305&Taxa_Group=Fish, de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC33031&Taxa_Group=Fish, y de http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC35223&Taxa_Group=F.

La toxicidad promedio se reporta en las tablas de acuerdo a la valoración de la toxicidad adoptada por la PAN Pesticidas Data Base. Se basa en una escala que

clasifica los valores de la CL_{50} de cada sustancia, expresada en $\mu g.L^{-1}$, en: Extrema (< 100); Alta ($100 - 1\,000$); Media ($1\,000 - 10\,000$); Leve ($10\,000 - 100\,000$) y las que no exhiben toxicidad aguda (N.E.T.A.) ($> 100\,000$).

Tabla C.1: Síntesis de la ecotoxicidad aguda del Verde de Malaquita en distintas especies de peces.

Nombre Científico Nombre común	CL_{50} ($\mu g/L$) Promedio	CL_{50} Desvío Estándar	Número de estudios	Toxicidad Promedio
<i>Anguilla rostrata</i> Anguila americana	1223,0	1163,0	3	Moderada
<i>Clarias macrocephalus</i> Gunther's Walking Catfish	66,0	-	1	Extrema
<i>Heteropneustes fossilis</i> Bagre indio	2312,0	1903,0	4	Moderada
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i> Carpa	497,4	280,7	5	Alta
<i>Ictalurus punctatus</i> Bagre de canal	353,4	329,5	30	Alta
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill (brema)	834,1	986,2	40	Alta
<i>Micropterus dolomieu</i> Smallmouth bass (perca de boca pequeña)	99,7	54,3	2	Extrema
<i>Micropterus salmoides</i> Largemouth bass (perca de boca grande)	177,4	104,6	2	Alta
<i>Morone saxatilis</i> Striped bass (perca rayada)	2120,0	2908,0	60	Moderada
<i>Oncorhynchus kisutch</i> Salmon coho, plateado	1317,0	1192,0	3	Moderada
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trucha arcoiris	787,1	685,5	60	Alta
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> Salmón chinook	904,0	657,5	4	Alta
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	450,0	150,0	2	Alta
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow (pez torpe)	140,0	34,6	4	Alta
<i>Rasbora heteromorpha</i> Pez arlequín	280,0	-	1	Alta
<i>Salmo salar</i> Salmón del Atlántico	1358,0	1306,0	4	Moderada
<i>Salmo trutta</i> Trucha marrón	729,8	563,9	6	Alta
<i>Salvelinus fontinalis</i> Trucha de arroyo	504,0	468,9	5	Alta
<i>Salvelinus namaycush</i> Trucha de lago	485,0	85,0	2	Alta
<i>Tilapia nilotica</i> Tilapia del Nilo	498,3	93,3	3	Alta

Tabla C.2: Síntesis de la ecotoxicidad aguda del Cloruro de Sodio en distintas especies de peces.

Nombre Científico Nombre común	CL ₅₀ (ug/L) Promedio	CL ₅₀ Desvío Estándar	Número de estudios	Toxicidad Promedio
<i>Anguilla rostrata</i> Anguila americana	19665000,0	1785000,0	2	N.E.T.A.
<i>Carassius auratus</i> Goldfish	8170358,0	1217902,0	53	N.E.T.A.
<i>Carassius carassius</i> Crucian carp	13750000,0	-	1	N.E.T.A.
<i>Channa punctata</i> Snake-head catfish	12000000,0	-	1	N.E.T.A.
<i>Ctenopharyngodon idella</i> Grass carp, white amur	22700000,0	-	1	N.E.T.A.
<i>Cyprinus carpio</i> Carpa	17083334,0	3821176,0	6	N.E.T.A.
<i>Gambusia affinis</i> Western mosquitofish	17916666,0	259272,0	3	N.E.T.A.
<i>Gambusia holbrooki</i> Eastern mosquitofish	11540000,0	-	1	N.E.T.A.
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> Carpa plateada	16200000,0	4782050,0	5	N.E.T.A.
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill	9430320,0	5016779,0	5	N.E.T.A.
<i>Morone saxatilis</i> Striped bass	3281818,0	2074441,0	11	N.E.T.A.
<i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Trucha arcoiris</i>	9498000,0	5475237,0	5	N.E.T.A.
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow	7646939,0	448304,0	49	N.E.T.A.
<i>Poecilia latipinna</i> Sailfin molly	17665000,0	1070000,0	2	N.E.T.A.
<i>Poecilia reticulata</i> Guppy	20000000,0	-	1	N.E.T.A.
<i>Silurus glanis</i> Wels, european catfish	23400000,0	-	1	N.E.T.A.

Tabla C.3: Síntesis de la ecotoxicidad aguda del Formaldehído en distintas especies de peces.

Nombre Científico Nombre común	CL ₅₀ (ug/L) Promedio	CL ₅₀ Desvío Estándar	Número de estudios	Toxicidad Promedio
Ameiurus melas Black bullhead	52033,0	19474,0	3	Leve
Anguilla japonica Japanese eel	420000,0	20000,0	2	N.E.T.A.
Anguilla rostrata American eel	212700,0	100648,0	3	N.E.T.A.
Carassius auratus Goldfish	35000,0	-	1	Leve
Chanos chanos Milkfish, salmon-herring	263750,0	35117,0	4	N.E.T.A.
Danio rerio Zebra danio	41000,0	-	1	Leve
Gambusia affinis Western mosquitofish	121850,0	39664,0	4	N.E.T.A.
Ictalurus punctatus Bragre de canal	119074,0	85503,0	65	N.E.T.A.
Lepomis cyanellus Green sunfish	123733,0	42539,0	3	N.E.T.A.
Lepomis macrochirus Bluegill	313898,0	330992,0	50	N.E.T.A.
Leuciscus idus Ide, silver or golden orfe	22000,0	-	1	Leve
Leuciscus idus melanotus Carpa	79000,0	29000,0	2	Leve
Menidia Mendia Atlantic silverside	69000,0	-	1	Leve
Micropterus dolomieu Smallmouth bass	93067,0	33449,0	3	Leve
Micropterus salmoides Largemouth bass	181300,0	136707,0	4	N.E.T.A.
Morone saxatilis Striped bass	410804,0	430047,0	75	N.E.T.A.
Oncorhynchus mykiss Trucha arcoiris	279488,0	227203,0	54	N.E.T.A.
Oryzias latines Medaka	63500,0	21922,0	6	Leve
Pimephales promelas Fathead minnow	24967,0	956,8	3	Leve
Salmo salar Salmón del Atlántico	259640,0	174918,0	5	N.E.T.A.
Salmo trutta Trucha marrón	255000,0	70000,0	2	N.E.T.A.
Salvelinus fontinalis Trucha de arroyo	176500,0	19500,0	2	N.E.T.A.
Salvelinus namaycush Trucha de lago	137400,0	77329,0	6	N.E.T.A.
Tanichthys albonubes White cloud mountain minnow	2300,0	122,5	4	Moderada
Tilapia nilotica Tilapia del Nilo	163500,0	15500,0	2	N.E.T.A.
Trachinotus carolinus Florida pompano	75460,0	4488,0	10	Leve

Tabla C.4: Síntesis de la ecotoxicidad agua del Ácido Acético y el Acetato de Sodio en distintas especies de peces.

Nombre Científico Nombre común	CL ₅₀ (ug/L) Promedio	CL ₅₀ Desvío Estándar	Número de estudios	Toxicidad Promedio
ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL				
<i>Cyprinus carpio</i>	59000,0	10000,0	2	Leve
<i>Gambusia affinis</i> Western mosquitofish	251000,0	-	3	N.E.T.A.
<i>Ictalurus punctatus</i>	446000,0	-	6	N.E.T.A.
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill	75000,0	-	1	Leve
<i>Leuciscus idus melanotus</i> Carpa	410000,0	-	1	N.E.T.A.
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow	103889,0	28439,0	9	N.E.T.A.
<i>Tilapia mossambica</i> Mozambique tilapia	272870,0	-	1	N.E.T.A.
ACETATO DE SODIO				
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill	5000000,0	-	1	N.E.T.A.
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow	13330000, 0	-	1	N.E.T.A.

Tabla C.5: Síntesis de la ecotoxicidad aguda del complejo Iodo - Polyvinyl pyrrolidone, el Iodo y el Ioduro de Potasio, en distintas especies de peces.

Nombre Científico Nombre común	CL ₅₀ (ug/L) Promedio	CL ₅₀ Desvío Estándar	Número de estudios	Toxicidad Promedio
COMPLEJO POLYVINYL PYRROLIDONE - IODINE				
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trucha arco iris	1318125,0	609887,0	8	N.E.T.A
iodo				
<i>Ictalurus punctatus</i> Channel catfish	1630,0	992,0	4	Moderada
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trucha arco iris	2009,0	1512,0	7	Moderada
<i>Poecilia reticulata</i> Guppy	3000,0	-	1	Moderada
ioduro de potasio				
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trucha arco iris	1543000,0	647000,0	2	N.E.T.A.

Bibliografía

- Abedin, R.M.A. 2008. Decolorization and Biodegradation of Crystal Violet and Malachite Green by *Fusarium solani* (Martius) Saccardo. A Comparative Study on Biosorption of Dyes by the Dead Fungal Biomass. American-Eurasian J. Bot. 1: 17-31.
- Abou-Zeid, A.M. 2000. Growth, zearalenone production and some metabolic activities of *Fusarium moniliforme* under salt stress. Acta Microbiol. Pol. 49: 225–235.
- Agersborg, H.P.K. 1933. Salient problems in the artificial rearing of salmonid fishes, with special references to intestinal fungisitis and the cause of white spot diseases. Trans. Am. Fish. Soc. 63: 240-250.
- Alderdice, D.F. & Forrester, C.R. 1968. Some effects of salinity and temperature on early development and survival of the English sole (*Parophrys vetulus*). J. Fish. Res. Bd. Can. 25: 495–521.
- Alderman, D.J. 1984. The toxicity of iodophors to salmonid eggs Aquaculture 40: 7-16.
- Alderman, D.J. & Polglase, J.S. 1984. A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Ocphomyces astaci*. Trans Brit. Mycol. Soc. 83: 313-318.
- Alderman, D.J. 1985. Malachite green: A review. J. Fish Dis. 8: 289-298.
- Alderman, D.J. & Polglase, J.L. 1986. Are fungal diseases significant in the marine environment. En: The Biology of marine fungi. Moss ST, (Eds). Cambridge University Press, New York, p. 189-198.
- Alderman, D.J. & Clifton-Hadley, R.S. 1993. Malachite green: A pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 16: 297-311.

- Adler, L. 1996. Fungi and salt stress. En: Fungi and environmental change. Frankland, J.C.; Magan, N. & Gadd, G.M. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, p. 217-234.
- Alderdice, D.F. & Forrester, C.R. 1968. Some effects of salinity and temperature on early development and survival of the English sole (*Parophrys vetulus*). J. Fish. Res. Bd. Can. 25: 495–521.
- Alexopoulus, C.J.; Mims, C.W. & Blackwell, M. 1996. Introductory Microbiology, 4^a edición. John Wiley & Sons. New York, 868 pp.
- Ali, A.H.H. 1994. Studies on some fungal nematode antagonists in relation to nematode egg hatching and reproduction. Egypt. J. Biol. Pest. Control 4: 57-66.
- Ali, E.H. 2005. Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. Mycopathol. 159: 231–243
- Ali, A.H.H. & Barakat, M.I.E. 1994. Utilization of *Trichoderma Harzianum* as a Bio-control agent against Root-Knot Nematode *Meloidogyne Incognita*. Egypt. J. Biol. Pest Control 4: 67-78.
- Allen, J.L. 1990. Residues of Malachite Green in Muscle, Eggs, and Fry of Treated Atlantic Salmon and Chinook Salmon. Investigations in Fish Control 101. United States of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- Allison, R. 1957. Some new results in treatment of ponds to control some external parasites of fish. Prog. Fish. Cult. 19: 58-63.
- Amend, D.F. 1974. Comparative Toxicity of Two Iodophors to Rainbow Trout Eggs. Trans. Am. Fish. Soc. 103: 73-78.
- Anonymous, 2002. Malachite green and formalin a good general purpose anti-parasite treatment. FishDoc, The Home of Fish Health. <http://www.fishdoc.co.uk/treatments/malachite.htm> [Accedido el 25 de Junio, 2009].
- Arasaki, S.K.; Nozawa, K. & Mizaki, M. 1958. On the pathogenicity of water mold. Bull. Jap. Fisheries Soc. 23: 593-598.
- Artemchuk, N. 1974. Gribo Belolgo Moyra. Saprophytnye fycomitsety Kandalakshskogo Zaliva v raione Proliva Velikaya Salma. I. Mikol. i. Fitopatol. 8: 281-291.

- ASTM, American Society for Testing and Materials 1991. Standard Guide for conducting acute toxicity test with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. E 729-88A.
- Au, W.; Pathak S.; Collie, C.J. & Hsu, T.C. 1978. Cytogenetic toxicity of gentian violet and crystal violet on mammalian cells *in vitro*. Mut. Res. 58: 269–276.
- Austwick, P.K.C. 1983 Some mycoses of reptiles. Rev. Med. Vet. Mycol. 18: 779.
- Azmi, W.; Sani, R.K. & Banerjee, U.C. 1998. Biodegradation of triphenylmethane dyes. Enzyme Microb. Technol. 22:185-191.
- Bailey, T. A. 1983. Method for *in vitro* screening of aquatic fungicides. J. Fish Dis. 6: 91- 100.
- Bailey, T.A. 1984. Effects of 25 compounds on 4 species of aquatic fungi (*Saprolegniales*) pathogenic of fish . Aquaculture 38: 97 - 104.
- Barbier, J. 1969. Le pH et le potentiel d'oxydo-réduction, la reproduction sexuée y a sexuée d'une Saprolegniée interaction organisme-milieu. Ann. Sci. Nat. Bot. 10: 473-564.
- Barbier, J. 1971. Les variation de la phase de latence, sous l'influence de la concentration en ions H⁺, chez l'*Achlya flagellata* Coker. Compt. Rend. Hebd. Séances.Acad. Sci. 280: 1555-1558.
- Barker, G.A.; Smith S.N. & Bromage N.R. 1991. Comensal bacteria and their possible relationship to mortality of incubating salmonid eggs. J. Fish Dis. 14:199-201.
- Barksdale, A.W. 1962. Effect of nutritional deficiency on growth and sexual reproduction in *Achlya ambisexualis*. Amer. Jour. Bot. 47: 713-716.
- Barnes, M.E.; Cordes, R.J. & Sayler, W.A. 1997. Use of formalin during incubation of eyed eggs of Inland fall chinook salmon. Prog. Fish-Cult. 59: 303-306.
- Barnes, M.E.; Gabel M. & Cordes, R.J. 1999. Bacterial populations during inland fall chinook salmon eggs culture vertical-flow incubators. N. Am. J. Aquac. 61: 252-257.
- Barnes, M.E.; Gabel M. & Cordes, R.J. 2000a. Bacterial populations during rainbow trout eggs culture vertical-flow incubators. N. Am. J. Aquac. 62: 48-53.
- Barnes, M.E.; Wintersteen, K.; Sayler, W.A. & Cordes, R.J. 2000b. Use of Formalin during incubation of rainbow trout eyed eggs. N. Am. J. Aquac. 62: 54-59.

- Barnes, M.E.; Sayler, W.A. & Cordes, R.J. 2001. Use of Formalin during incubation of eyed eggs of brown trout. N. Am. J. Aquac. 63: 333-337.
- Barnes, M.E.; Stephenson, H. & Gabel, M. 2003. Use of Hydrogen Peroxide and Formalin treatments during incubation of lanlocked fall chinook salmon eyed eggs. N. Am. J. Aquac. 65: 151-154.
- Barnes, M.E.; Bergmann, D.; Stephenson, K.; Gabel M. & Cordes, R.J. 2005. Bacterial numbers from Lanlocked fall chinook salmon eyed eggs subjected to various Formalin treatments at determined by scanning electron microscopy and bacteriological culture methos. N. Am. J. Aquac. 67: 23-33.
- Baas, J.; Jager, T. & Kooijman, S.A.L.M. 2009. A model to analyze effects of complex mixtures on survival. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 669-676.
- Battle, H.I. 1930. Effects of extreme temperatures and salinities on development of *Enchelyopus combrius* L. Contrib. Can. Biol. Fish. 5: 107-182.
- Bell, T.A.; Lightner, D.V. & Williams, R.R. 1990. A Promising New Chemotherapeutant for Use in Treatment of *Fusarium solani* Infections in Penaeid Shrimp. J. World Aquac. Soc. 21:131-136.
- Bennet, J.W.; Lee, L.S. & Gaar, G.G. 1976. Effect of Acetone on production of Aflatoxins and Versicolorin pigments by resting cell cultures of *Aspergillus parasiticus*. Mycophatol. 58: 9-12.
- Berasain, G., Colautti, D. & Velasco, C.A.M. 2000. Experiencias de cría de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, durante su primer año de vida. Revista de Ictiología 8: 1-7.
- Berasain, G.; Velasco, C. & Chiclana, M. 1999. Historia de la piscicultura del pejerrey en Chascomús, 1779-1999. In I Jornadas de Historia de Chascomús, Chascomús, Argentina, p. 20.
- Berasain, G.; Velasco, C.A.M. & Colautti, D. 2001. Capítulo: .Experiencias de cultivo intensivo de larvas, juveniles y reproductores de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)” del libro ”Fundamentos Biológicos, Económicos y Sociales para una Correcta Gestión del Recurso Pejerrey”. F. Grosman (Ed.), Editorial Astyanax, Azul, Argentina, p. 33 - 39.
- Berasain, G.E.; Velasco, C.A.M. & Chiclana M.S. 2004. Historia de la piscicultura del

- pejerrey en Argentina. En: Jornadas del Pejerrey: aspectos básicos y acuicultura. Chascomús, Argentina, p. 29.
- Berasain, G.E.; Velasco, C.A.M.; Shiroyo, Y.; Colautti, D. & Remes Lenicov, M. 2006. Cultivo intensivo de juveniles de Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) en estanques. CIVA 2006, 940-947. Disponible en: <http://www.civa2006.org> [Accedido el 03 de Febrero, 2007].
- Berasain, G.E.; Velasco, C.A.; Mir, F. & Padín, D. 2008. Producción intensiva de ovas embrionadas de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) a partir de reproductores mantenidos en cautiverio Biología Acuática 24: 11-16.
- Bergh, Ø. & Jelmert, A. 1996. Iodophor Disinfection of Eggs of Atlantic Halibut. J. Aquat. Anim. Health 8: 135-145.
- Bhattacharya, U.; Prasad J. & Dubey, N.K. 1988. *Aspergillus terreus* Thom –A new record of fish pathogen. Current science 57: 622-623.
- Bills, T.D. & Hunn, J.B. 1976. Changes in blood-chemistry of coho salmon exposed to malachite green. Prog. Fish-Cult. 38: 214-216.
- Bills, T.D.; Marking, L. & Cahndler Jr., J.H. 1977a. Malachite green: Its toxicity to aquatic organisms, persistence and removal with activated carbon. Investigations in Fish Control 75: 1-6.
- Bills, T.D.; Marking, L.L. & Chandler, J.H. 1977b. Formalin: Its toxicity to non-target aquatic organisms, persistence, and counteraction. Invest. Fish Control n° 73. Fish Wildl. Serv., Bur. Sport Fish Wildl., USDI, Wasington DC. 7 p.
- Blaylock, R.B.; Overstreet, R.M. & Klich, M.A. 2001. Mycoses in red snapper (*Lutjanus campechanus*) caused by two deuteromycete fungi (*Penicillium corylophilum* and *Cladosporium sphaerospermum*). Hydrobiologia 460: 221-228.
- Bly, J.E.; Quiniou, M.A.; Lawson, L.A. & Clem, L.W. 1996 Therapeutic and prophylactic measures for winter saprolegniosis in channel catfish. Dis. Aquatic Org. 24: 25-33.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 237 pp.
- Bouchard, H.J. & Aloisi, D.B. 2002. Investigations in concurrent disinfection and de-

- adhesion of lake sturgeon eggs. J. Aquat. Anim. Health 8: 135-145.
- Bragulat, M.R.; Abarca, M.L., Bruguera, M.T. & Cabanes, F.J. 1991. Dyes As Fungal Inhibitors: Effect on Colony Diameter. Appl. Env. Microbiol. 5: 2777-2780.
- Breidt Jr., F.; Hayes, J.S. & Mc Feeters, R.F. 2004. Independent effects of acetic acid and pH on survival of *Escherichia coli* in simulated acidified pickle products. J. Food Prot. 67: 12-18.
- Brigmann, G. & Kuhn, R. 1977. The effects of water pollutants on *Daphnia magna*. Z Wasser-Abwasser-Forsch, 10:161-166.
- Brown, D.J.A. 1981. The effects of various cations on the survival of brown trout (*Salmo trutta*) at low pH's. J. Fish Biol. 18: 31-40.
- Brown, D.R. & Shrable J.B. 1992. Survival of Arctic grayling eggs water-hardened in various concentrations of iodophor. U.S. Department of the Interior, U.S. Fish and Wildlife Service. Ennis National Fish Hatchery. 180 Fish Hatchery Rd., Ennis MT, 59729.
- Bruno, D.W. & Wood, B.P. 1999. Saprolegnia and other oomycetes. En: Fish Diseases and Disorders: Part III. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Woo, P.T.K. & Bruno, D.W. (Eds.), CAB Publishing, Oxon, England, 896 pp.
- Buchmann, K.; Bresciani, J. & Jappe, C. 2004. Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. J. Fish Dis. 27: 99-104.
- Bullock, G.L.; Summerfelt, S.T.; Noble, A.C.; Weber, A.L.; Durant, M.D. & Hankins, J.A. 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system: I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. Aquaculture 158: 43- 55.
- Burrows, R.E. 1949. Prophylactic treatment for control of Fungus (*Saprolegnia parasitica*) on salmon eggs. Prog. Fish-Cult. 11: 97- 103.
- Cabanillas, E.; Barker, K.R. & Daykin, M.E. 1988. Histology of the Interactions of *Paecilomyces lilacinus* with *Meloidogyne incognita* on Tomato. J. Nematol. 20: 362-365.
- Calvo, J. & Dadone, L.A. 1972. Fenómenos reproductivos en el pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) I. Escala y tabla de madurez. Rev. Mus. La Plata (N.S.), Zool. 9:

153-163.

- Camacho, M.C.B. 2004. Valoración del riesgo toxicológico sobre larvas de *artemia* de desinfectantes utilizados en torres de refrigeración. Disertación Doctoral, Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid, España, 201 pp.
- Campos, H. 1984. Los géneros de Atherinidos (Pisces: Atherinidae) del Sur de Sudamérica. Rev. Mus. Argentino Cien. Nat. "Bernardino Rivadavia" 13: 71-84.
- Canfield, H.L. 1947. Artificial propagation of those channel cats. Prog. Fish-Cult 9:27-30.
- Cantrell, S.A.; Casillas-Martínez, L. & Molina M. 2006. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. Mycol Res. 110: 962-970.
- Carriquiriborde, P. 2005. Respuestas biológicas a contaminantes ambientales en peces: Estudio de la bioconcentración de los efectos letales y subletales y la evaluación de biomarcadores en *Odonthestes bonariensis*, expuesto a diferentes concentraciones de Cd y Cr en el agua. Disertación Doctoral. Fac. Cs. Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 283 pp.
- Carriquiriborde, P.; Díaz, J.; López, G.; Ronco, A. & Somoza, G.M. 2009. Effects of cypermethrin chronic exposure and water temperature on survival, growth, sex differentiation, and gonadal developmental stages of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei). Chemosphere 76: 374 - 380.
- Castellá, G.; Bragulat, M.R.; Rubiales, M.V. & Cabañes, F.J. 1997. Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp. Mycopathol. 137: 173-178.
- Cavalier-Smith, T. 1986. The Kingdom Chromista: Origin and Systematics. En: Progress in Phycological Research, Vol. 4. Round FE & Chapman D.J. (Eds). Biopress, Bristol, United Kingdom, p. 309-347.
- Celada, J.D.; Carral, J.M.; Sáez-Royuela, M.; Melendre, P.M. & Aguilera, A. 2004. Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs. Aquaculture 239: 249-259.
- Cha, C.; Doerge, D.R. & Cerriglia, C.E. 2001. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4353-4360.

- Chacko, A.J. 1991. Fungi and oomycetes associated with fish and shellfish. En: Handbook of Applied Mycology 2: Human, animal and insects. Arora, D.K.; Ajello, L. & Mukerji, K.G. (Eds). Marcel Dekker, New York, p. 735-755.
- Chacko, J.A. 1993. Fungal and algal diseases of Salmonids. En: Fish Medicine, Stoskopf, M.K. (Eds). W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Chalde, T. 2009. Caracterización del desarrollo embrionario del pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, y el efecto de la temperatura sobre el desarrollo larval. Tesis de Grado, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 71 pp.
- Chandler, J.H.J. & Marking, L.L. 1979. Toxicity of fishery chemicals to the asiatic clam, *Corbicula manilensis*. Prog. Fish-Cult., 4:148-151.
- Chang P.S.; Chen, L.J. & Wang, Y.C. 1998. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. Aquaculture 166: 1-17.
- Chastagner, G.A. & Riley, K.L. 2002. Potential use of chlorine dioxide to prevent the spread of Fusarium basal rot during the hot water treatment of Daffodil bulbs. Acta Horticult. 570: 267-272.
- Chaze, J. 1925. Essais de culture pure d'une Saprolegniée. Bull. Soc. Mycol. France 41: 256-277.
- Chinabut, S.; Limsuwan, C.; Tonguthai, K. & Pungkachonboon, T. 1988. Toxic and sublethal effect of formalin on freshwater fishes. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA) WP8873, Bangkok-Thailand-NACA, 20 pp.
- Cipriano, R.C. Novak, B.M.; Flint, D.E. & Cutting, D.C. 2001. Reappraisal of the Federal Fish Health Recommendation for Disinfecting Eggs of Atlantic Salmon in Iodophor. J. Aquat. Anim. Health 13: 320-327.
- Cline, T.F.; Post, G. 1972. Therapy for trout eggs infected with Saprolegnia. Prog. Fish-Cult. 34, 148- 151.
- Colautti, D.C. & Remes Lenicov, M.. 2001. Primeros resultados sobre cría de pejerreyes en jaulas: crecimiento, supervivencia, producción y alimentación. En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. F. Grosman (Ed.), Astyanax, Azul, Argentina, p. 53-61.

-
- Conková, E.; Para, L. & Kocisova, A. 1993. Inhibition of the Molds Growth by Selected Organic-Acids. Vet. Med. 38: 723-727.
- Cooke, R.C. & Whipps, J.M. 1993, Ecophysiology of Fungi. Blackwell Scientific Publications, London, 337 pp.
- Cooke, R.C. & Whipps, J.M. 1993. Ecophysiology of Fungi. Blackwell Scientific Publications, London, 337 pp.
- Criswell, D.W. 1978. The effect of environmental Calcium on osmoionic regulation in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. M.S. Tesis, Memphis State University, Memphis Tennessee.
- Crow, G.L.; Brock, J.A. & Kaiser, S. 1995. *Fusarium solani* fungal infection of the lateral line canal system in captive scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in Hawaii. J. Wildlife Dis. 31:562-565.
- Crooks, K.M. 1937. Studies on Australian aquatic Phycomycetes. Proc.Roy. Soc. Victoria (N.S.) 49: 206-233.
- Culp, S.J.; Beland, F.A. 1996. Malachite green: A toxicological review. J. Am. Coll. Toxicol. 15: 219-238.
- Culp S.J.; Blankenship, L.R.; Kusewitt D.F.; Doerge, D.R.; Mulligan, L.T. & Beland, F.A. 1999. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice. Chemico-Biological Interactions 122: 153-170
- Czeczuga, B; Muszyńska, E; Woosugui, G; Kamaly, A. & Kiziewicz, B. 1995 Aquatic fungi growing on the eggs of several species of acipenserid fishes. Acta Ichthyol. Piscat. 25: 71-79.
- Czeczuga B. & Muszyńska E. 1996 Growth of zoosporic fungi of the eggs on north Pacific Salmon of the genus *Oncorhynchus* in Laboratory conditions. Acta Ichthyol. Piscat. 26: 25-37.
- Czeczuga B; Muszyńska E. & Tryggvadottir, S.V. 1996 Aquatic fungi growing on the eggs on nine salmonid species of the genus *Hucho Salmo* and *Salvelinus*. Acta Ichthyol. Piscat. 26: 113-124.
- Czeczuga, B. & Muszyńska, E. 1997. Growth of Zoosporic fungi of the eggs on north

- Pacific salmon of the genus *Oncorhynchus* in Laboratory conditions. *Acta Ichthyol. Piscat.* 27: 83-93.
- Czeczuga, B. & Kiziewicz, B. 1999. Zoosporic Fungi Growing on the Eggs of *Carassius carassius* (L.) in Oligo- and Eutrophic Water. *Pol. J. Envir. Stud.* 8: 63-66.
- Czeczuga, B. & Muszyńska, E. 1999. Aquatic fungi growing on the eggs of fishes representing 33 cyprinid taxa (Cyprinidae) in laboratory conditions. *Acta Ichthyol. Piscat.* 29: 54-72.
- Czeczuga B; Pietrucha, M. & Muszyńska, E. 2001 Zoosporic fungi growing on the eggs of *Coregonus lavaretus maraena* (Block, 1779) from lake Miedwie in Pomerania. *Acta Ichthyol. Piscat.* 31: 141-150.
- De Cock, A.W.A.M. & Lévesque, A. 2004. New species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Stud. Mycol.* 50: 481-487.
- Davis, D.J.; Burlak, C. & Money, N.P. 2000. Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycol Res.* 104: 800-804.
- Debuf, Y.M. 1991. The veterinary formulary: Handbook of veterinary medicines used in veterinary practice. The Pharmaceutical Press. London –UK, 448 pp.
- Dennis, C. & Gaunt, H. 1974. Effect of Formaldehyde on Fungi from Broiler Houses. *J. Appl. Bacteriol.* 37: 595-601.
- Department of Agriculture, Fisheries and Forestry DAFF (2008). Operational Procedures Manual — Decontamination (Version 1.0). In: Australian Aquatic Veterinary Emergency Plan (AQUAVETPLAN), Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, ACT, 122 pp.
- Dick, M.W. 2001a. The Peronosporomycetes. En: The Mycota VII, Part A Systematics and Evolution. Laughlin, DJ, Mc Laughlin EG, Lemke, PA (eds). Springer Verlag, Berlin, p. 39-72.
- Dick, M.W. 2001b. Straminipilous Fungi. Systematic of the Peronosporomycetes including accounts of the marine Straminipilous Protists the Plasmodiophoris and similar Organisms.. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 660 pp.
- Dieguez-Uribeondo, J.; Cerenius, L. & Soderhall, K. 1996. Physiological characterization of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout. *Aquaculture* 140: 247-257.

-
- Diler, Ö. & Bolat, Y. 2001. Isolation of *Acremonium* species from crayfish, *Astacus leptodactylus* in Egirdir Lake. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 21:164-168.
- Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T.A. 1993. Compendium of soil fungi. Vol.1, IHW-Verlag, Eching, German, 854 pp.
- Drago, F.B. 2004. Dinámica estacional y ecología de las poblaciones de parásitos del pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier & Valenciennes, 1835), en lagunas de la provincia de Buenos Aires. Tesis Doctoral, Fac. Cs. Naturales y Museo Universidad Nacional de La Plata – Argentina, 248 pp.
- Dubey, N.K. & Bhattacharya, U. 1995. Sensitivity of certain antimicrobial agents to *Aspergillus niger* fish fungal isolates of *Clarias batrachus*. Proceedings of The DST sponsored Regional Seminar on Pisciculture of North Bihar, p. 34.
- Duniway, J.M. 1979. Water relations of water molds. Ann Rev Phytopathology 17: 431–460.
- Dyer, B.S. & Chernoff, B. 1996. Phylogenetic Relationships Among Atheriniform Fishes (Teleostei, Atherinomorpha). Zool. J. Linnean Soc., London, 117:1-69.
- Dyer, H.B.S. 2006. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes) Biocell 30: 69-88.
- Edgell, P.; Lawseth, D.; McLean, W.E. & Britton, E.W. 1993. The use of salt solutions to control fungus (*Saprolegnia*) infestations on salmon eggs. Prog. Fish-Cult. 55: 48-52.
- El-Abyad, M.S.; Hindorf, H. & Rizk, M.A. 1988. Impact of salinity stress on soil-borne fungi of sugarbeet II. Growth activities *in vitro*. Plant and Soil 110: 33-37.
- El-Androusse, A.; El Aissami, A. & Paul, B. 2006. *Achlya abortispora*, a new Oomycete Isolated from Water Samples Taken from a Water Reservoir in Morocco. Curr Microbiol. 53: 60–67.
- El-Feki, M.; Hatai, K. & Hussein, M.M.A. 2003. Chemotactic and Chemokinetic activities of *saprolegnia parasitica* toward different metabolites and fish tissue extracts. Mycoscience 44: 159-162.
- El-Sharouny, H.M. & Badran, R.A. 1995. Experimental transmission and pathogenicity of some zoosporic fungi to Tilapia fish. Mycopathol. 132: 95-103.

- Elíades, L. 2009. Estudio de la micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante del suelo de los bosques de *Celtis tala* Gill (ex-Planch) y *Scutia buxifolia* Reiss en el partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires. Disertación Doctoral. Fac. Cs. Natur. y Museo. Universidad Nacional de La Plata. 197 pp.
- Elferink, J.G.R. & Booij, H.L. 1975. The action of some triphenylmethane dyes on yeast and erythrocyte membranes, *Arzneim. Forsch. – Drug Res.* 25: 1248-1252.
- Elliott, C.G. 1972. Calcium chloride and growth and reproduction of *Phytophthora cactorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 58: 169–172.
- Escalante, A. 2001. Alimentación natural del pejerrey. En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. F. Grosman (Ed.). Astyanax, Azul, Buenos Aires, p. 67-75.
- Espinach, Ros A. & Dománico, A. 2006. Growth of argentine silverside (*Odontesthes bonariensis*) stocked at low densities in two oligohaline shallow lakes (Buenos Aires Province, Argentina) *Rev. Invest. Desarr. Pesq.* 18: 75-80.
- Faisal, M.; Elsayed, E.; Fitzgerald, S.D.; Silva, V. & Mendoza, L. 2007. Outbreaks of phaeohyphomycosis in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by *Phoma herbarum*. *Mycopathol.* 163: 41-48.
- Fajer-Avila, E. J.; Abdo-de la Parra, I.; Aguilar-Zarate, G.; Contreras-Arce, R.; Zaldívar-Ramírez, J. & Betancourt-Lozano, M. 2003. Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture* 223: 41–50.
- FAO, 1997. Review of the state of world aquaculture. FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service, Fishery Resources Division FAO Fisheries Circular. No. 886, Rev.1. Rome, 163 p.
- FAO. 2009a. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, Roma. Disponible en: www.fao.org/docrep/011/i0250s/i0250s00.htm. [Accedido el 24 de Agosto, 2010].
- FAO, 2009b. Residue evaluation of certain veterinary drugs. Monographs No 6. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 70th Meeting 2008. FAO JECFA,

- Roma, 316 pp.
- FDA, 2008. Guidance for Industry FDA Approval of New Animal Drugs for Minor Uses and for Minor Species. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine CVM GFI N° 61. Disponible en: www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052375.pdf [Accedido el 27 Abril, 2011].
- Fennema O.1993. Química de los alimentos. Acribia Ed. Zaragoza, 142 pp.
- Ferguson, H.W. 1989. Systemic Pathology of Fish. State University Press, Iowa, 138 pp.
- Fernandino, J.I.; Guilgur, L. & Somoza, G.M. 2006. Dmrt1 expression analysis during spermatogenesis in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Fish Physiology and Biochemistry. 32: 231 – 240.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis: A statistical treatise of the sigmoid response curve. Ed. Cambridge University Press, London, 333 pp.
- Fitzpatrick, M.S.; Schreck, C.B. & Chitwood, R.L. 1995. Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. Prog. Fish-Cult. 57: 153-155.
- Forbes, E.J. 1935. Observations on some British water moulds (Saprolegniales and Blastocladales). Trans. Br. Mycol. Soc. 19: 221-239.
- Forrest, B.M.; Hopkins, G.A.; Dodgshun, T.J. & Gardner, J.P.A. 2007. Efficacy of acetic acid treatments in the management of marine biofouling. Aquaculture 262: 319-332.
- Foster, F. J. & Woodbury, L. 1936. The use of Malachite green as a fish fungicide and antiseptic. Prog. Fish. Cult. 18: 7-9.
- Fournier, D.; Halasz, A.; Thiboutot, S.; Ampleman, G.; Dominic, M., & Hawari, J. 2004. Biodegradación de octahidro 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX) by *Phanerochaete chrysosporium*. New insight into the degradation pathway. Environ. Sci. Technol. 38: 4130-4133.
- Fowler, L.G. & Banks, J.L. 1990. Iodophor toxicity to eggs and fry of fall chinook salmon. Prog. Fish-Cult. 52: 176-178.

- Fowler, L.G. & Banks, J.L. 1991. A save level for treating eggs of fall chinook salmon during water hardening. *Prog. Fish-Cult.* 53: 250-251.
- Francis-Floyd, R. D.V.M. 1995. M.S. - Use of salt in aquaculture- Fact Skeet VM 86. Series of the Department of Large Animal Clinical Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/VM/VM00700.pdf> [Accedido el 15 de Octubre, 2009]
- Froelich, S.; Engelhardt, T. 1996. Comparative effects of Formalin and Salt treatments on hatch rate of koi carp eggs. *Prog. Fish-Cult.* 58: 209-211.
- Fu, Y. & Viraraghavan, T. 2000. Removal of a dye from aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. *Water Qual. Res J. Can.* 35: 95-111.
- Fuller, M.S. & Jaworski, A. 1987. Zoosporic Fungi in Teaching and Research. Southeastern Publishing, Athens, Georgia, 303 pp.
- García Romero, N. 2001. Alteraciones patológicas del pejerrey (*Odontesthes bonariensis* C.) en ambientes naturales y bajo condiciones de cultivo. En: Fundamentos Biológicos, Económicos y Sociales para una Correcta Gestión del Recurso Pejerrey. Grossman F, Eds., Editorial Astyanax. Azul, Argentina, p. 80 - 90.
- Gerundo, N.; Alderman, D.J.; Clifton-Hadley, R.S. & Feist, S.W. 1991. Pathological effects of repeated doses of malachite green: A preliminary study. *J. Fish Dis.* 14: 521-532.
- Gieseke, C.M.; Serfling, S.G. & Reimschuessel, R. 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* *Aquaculture* 253: 120 - 129.
- Glagoleva, T.P. & Malikova, E.M. 1968. Effect of malachite green on the composition of blodd in Baltic salmon fingerlings. *Rybnoe Khozyaistvo* 45: 15 - 18.
- Glancer-Soljan, M.; Soljan, V.; Dragicevic, T.L. & Cacic, L. 2001. Aerobic degradation of Formaldehyde in wastewater from the production of melamine resins. *Food Technol. Biotechnol.* 39: 197-202.
- Gobas, F.A.P.C.; Opperhuizen, A. & Hutzinger, O. 1986. Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish: relationship with membrane permeation. *Environ. Toxicol.*

Chem. 5: 637-646.

- Goettel, M.S.; Hajek A.E.; Siegel, J.P.; Evans, H.C. 2001. Safety of fungal Biocontrol agents. En: Fungi as biocontrol Agents: Porgress, Problems and Potential. Butt, T..M.; Jackson, C. & Magan, N. (Eds.) Disponible en: <http://www.cabipublishing.org/Book-shop/ReadingRoom>. [Accedido el 27 de Abril de 2008]
- Gómez, S.E. 1998. Niveles letales de pH en *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes, Atherinidae). Iheringia, Sér. Zool. 85: 101-108.
- Gómez, S. & Ferriz, R. 1998. Una hipótesis de trabajo sobre la biología del pejerrey en la dinámica de las lagunas pampásicas. I Taller sobre el recurso pejerrey en la provincia de Buenos Aires Ministerio de Asuntos Agrarios. Buenos Aires, p. 29-30.
- Gómez, S. & Ferriz, R. 2001. Algunos aportes de la ecofisiología del pejerrey. Cap. VI, En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestion del recurso pejerrey. Grosman, F. (Ed.). Astyanax, Azul, Buenos Aires, p. 46-52.
- Gómez, S.E.; Menni, R.C.; Gonzalez Naya, M.J. & Ramirez, L. 2007. The physical chemical habitat of the Buenos Aires pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinopsidae), with a proposal of a water quality index. Envi. Biol. Fish. 78: 161-171.
- Gonzalez Regalado, T. & Mastrarrigo, V. 1948. Piscicultura. El pejerrey. Mrio. Agric. Nac., Public. Misc. N ° 268: 52 pp.
- Gouranchat, C. 2000. Le vert de malachite en aquaculture (État des connaissances et perspectives). Étude bibliographique École nationale vétérinaire ENVT, Nantes, France, 152 pp.
- Goven-Dixon, B.A. 1993. Fungal and algal diseases of Freshwater tropical fish. In Fish Medicine, M.K. Stoskopf, Editor. W.B. Saunders Company: Philadelphia, p. 563-568.
- Grizzle, J.M. & Mauldin, A.C. 1994. Age-related changes in survival of larval and juvenile striped bass in different concentrations of Calcium and Sodium. Trans. Am. Fish. Soc. 123: 1002-1005.
- Grizzle, J.M. & Mauldin, A.C. 1995. Effect of Calcium on Acute Toxicity of Sodium Chloride to Larval and Newly Transformed Juvenile Striped Bass. J. Aquat. Anim.

- Health 7: 298-303.
- Grosman, F. 2001. Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Editorial Astyanax, Azul, Argentina, 210 pp.
- Grosman F., 2001. Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Editorial Astyanax, Azul, Argentina, 210 pp.
- Hatai, K. & Kubota, S. 1986. *Fusarium oxysporum* in Red Sea Bream (*Pagrus* sp.) J. Wildlife Dis. 22: 570-571.
- Hatai, K. & Hoshina, G. 1992. Mass mortality in cultured coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Cooker. J. Wildl. Dis. 28: 532-536.
- Hatai, K.; Willoughby, L.G. & Beakes, G.W. 1990 Some characteristics of *Saprolegnia* obtained from fish hatcheries in Japan. Mycol. Res. 94: 182-190.
- Hatai, K.; Labvhavinit, O.; Toda, K. & Sugou, Y. 1993. Mycobacterium infection in pejerrey, *Odontesthes bonariensis* Cuvier Valenciennes. J. Fish Dis. 16: 397-402.
- Hernández, M.C.; Pildain, M.B.; Novas, M.V.; Sacco, J. & Lopez, S.E. 2007. Mycobiota associated with larval mines of *Thrypticus truncatus* and *T. sagittatus* (Diptera, Dolichopodidae) on waterhyacinth, *Eichhornia crassipes*, in Argentina. Biological Control. 41: 321-326.
- Heath, A.G. 1995. Water Pollution and Fish Physiology. 2nd edn. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, 359 pp.
- Hendrix, M.A. & Baker, S.E. 1992. Evaluation of toxicity of Iodophor to eggs atlantic salmon (*Salmo salar*). En: Proceedings of the Atlantic salmon Workshop. US. Fish & Wildlife Service, Northeast Fishery Center, Lamar, Pennsylvania, 199 pp.
- Heuts, M.J. 1947. The phenotypic variability of *Gasterosteus aculeatus* (L.) populations in Belgium. Meded. Kon. VI. Acad. Wetensch. 9: 1-63.
- Heuts, M.J. 1956. Temperature studies in *Gasterosteus aculeatus* L. Pubbl. Staz. zool. Napoli, Napoli. 28: 44 – 61.
- Hine, FB. 1878. Observations on several forms of Saprolegnieae. Amer.Quart. Microscop. J. 1: 18-28, 136-146.
- Hinton, M.J. & Eversole, A.G. 1979. Toxicity of the chemicals commonly used in

- aquaculture to the black eel stage of the american eel. Proc. World Maricult Soc. 10: 554-560.
- Hiruma, M. & Kagawa, S. 1987. Ultrastructure of *Sporothrix schenckii* treated with iodine potassium iodide solution. Mycopathol. 97: 121-127.
- Hoffman, G.L. 1949. Isolation of Saprolegnia and Achlya with Penicillin-Streptomycin, and attempts to infect fish. Prog. Fish.-Cult. 11: 171-174.
- Hoffman, G.L. & Meyer, F.P. 1974. Parasites of freshwater fishes, NI TFH Publication, Neptune City, 224 pp.
- Holliday, F.G.T. 1963. Osmoregulation in marine teleost eggs and larvae. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep. 10: 89-95.
- Holliday F.G.T. 1969 The effects of salinity on the eggs and larvae of teleosts. En: Fish Physiology Vol 1 Excretion, Ionic Regulation, and Metabolism. Hoar, W.S. & Randall, D.J. (Eds). Academic Press New York and London, p. 293-311.
- Höhnk, W. 1939. Ein Beitrag zur Kenntnis der Phycomyceten des Brackwassers. Kieler Meeresf. 3: 337-361.
- Höhnk, W. 1961. A further contribution to the oceanic mycology. Rapp. Procés-Verbaux Int. Coun. Explor. Mer. 149: 202-208.
- Höhnk, W. 1956. Studien zur Brack- und Seewassermykologie VI. Über die pilzliche Besiedlung verschieden salziger submerser Standorte, Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven 4: 195-213.
- Höhnk, W. 1957. Fortschritte der marinen Mykologie in jüngster Zeit. Naturwiss. Part 2. Rundschau -Stuttgart, 39-44 pp.
- Hoshina, T.; Sano, T. & Sunayama, M. 1960. Studies on the saprolegniosis of eel. J. Tokyo Univ.Fish. 47: 59-79.
- Hörter, R. 1960. *Fusarium* als Erreger einer Hautmykose bei Karpfen. Z. Parasitk. 20: 355-358.
- Howe, G.E.; Marking, L.L.; Bills T.D. & Schreier, T.M. 1995. Efficacy and toxicity of formalin solutions containing paraformaldehyde for fish and egg treatments. Prog Fish- Cult. 57: 147-152.

- Howe G.E.; Gingeroch, H; Dawson, V.K. & Olson, J.J. 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating Saprolegniasis in channel catfish. J. Aquat Anim. Health 11: 222-230.
- Humphrey, J.E. 1893. The Saprolegniaceae of the United States, with notes on others species. Trans. Amer. Phil. Soc. (N.S.) 17: 63-148.
- Hussein, M.M.A. & Hatai, K. 1999. *Saprolegnia salmonis* sp nov isolated from sockeye salmon *Onchorhynchus nerka* .Mycoscience 40: 387-391.
- Hussein, M.M.A.; El-Feki M.A.; Hatai, K. & Yamamoto A. 2002. Inhibitory effects of thymoquinone from *Nigella sativa* on pathogenic *Saprolegnia* in fish. Biocontrol Sci. 7: 31-35.
- Jager, T.; Heugens, E.H.W. & Kooijman S.A.L.M. 2006. Making sense of ecotoxicological test results: towards application of process-based models. Ecotoxicology 15: 305-314.
- Jiang, J. & Erwin, D.C. 1990. Morphology, plasmolysis, and tetrazolium bromide stain as criteria for determining viability of *Phytophthora* oospores. Mycologia 82: 107-113.
- Jodun, W.A. & Millard, M.J. 2001. Effect of Iodophor Concentration and Duration of Exposure during Water Hardening on Survival of Atlantic Salmon Eggs. N. Am. J. Aquacult. 63: 229-233.
- Johnson Jr., T.W. 1956. The genus *Achlya*: Morphology and Taxonomy. Univ. Michigan Press, Ann. Arbour, Michigan. XV, 180 pp.
- Johnson Jr., T.W 1973. Aquatic fungi of Iceland: *Achlya racemosa* Hildebrand. Svensk Bot. Tidskr. 67: 438-444.
- Johnson Jr., TW; Seymour, R.L. & Padgett, D.E. 2002. Biology and Systematics of the Saprolegniaceae. Disponible en Internet en: <http://dl.uncw.edu/digilib/biology/fungi/taxonomy%20and%20systematics/padgett%20book/> [Accedido el 15 de Marzo de 2009].
- Jørgensen, T.R. & Buchmann, K. 2007. Stress response in rainbowtrout during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* and formalin bath treatment. Acta Ichthyol. Piscat. 37: 25-28.

- Kane, A.S.; Bennett, R.O. & May E.B. 1990. Effect of hardness and salinity on survival of striped bass larvae. N. Am. J. Fish. Manag. 10: 67-71.
- Kang, H.C.; Park, Y.H. & Go, S.J. 2003. Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. Microbiol. Res. 158: 321-326.
- Kanouse, B.B. 1932. A physiological and morphological study of *Saprolegnia parasitica*. Mycologia 24: 431-452
- Karube, M.; Fernandino, J.I.; Strobl Mazzulla, P.; Strüssmann, C.; Yoshizaki, G.; Somoza, G.M. & Patiño, R. 2007. Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome p-450 aromatase (*cyp19a1*) gene during the thermolabile sex determination period in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol. 307: 625 - 636.
- Kaszycki, P.; Tyszka, M.; Malec, P. & Koloczek, H. 2001. Formaldehyde and methanol biodegradation with the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. An application to real wastewater treatment. Biodegradation 12: 169-177.
- Kaszycki, P.; Czechowsk, K.; Petryszak, P.; Międzobrodzki, J.; Pawli, B. & Koloczek, H. 2006. Methylotrophic extremophilic yeast *Trichosporon* sp.: a soil-derived isolate with potential applications in environmental biotechnology. Acta Biochimica Polonca 53: 463-473.
- Katharios, P.; Agathaggelou, A.; Paraskevopoulos, S. & Mylonas, C.C. 2007. Comparison of iodine and glutaraldehyde as surface disinfectants for red porgy (*Pagrus pagrus*) and white sea bream (*Diplodus sargus sargus*) eggs. Aquacult. Res. 38: 527-536.
- Kato, N.; Miyawaki, N. & Sakazawa, C. 1982. Oxidation of formaldehyde by resistant yeasts *Debaryomyces vanriji* and *Trichosporon penicillatum*. Agric. Biol. Chem. 46: 655-661.
- Kauffman, C.H. 1908. A contribution to the physiology of the Saprolegniaceae, with special reference to the variations of the sexual organs. Ann. Bot. 22:361-388.
- Khoa, L.V.; Hatai, K. & Aoki, T. 2004. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill diseases culture in Vietnam. J. Fish Dis. 27: 507-515

- Khodabandeh, S. & Abtahi, B. 2006. Effects of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. J Appl. Ichthyology 22: 54-56.
- Khomvilai, C.; Kashiwagi, M.; Sangrungruang, C.; & Yoshioka, M. 2006. Preventive efficacy of sodium hypochlorite against water mold infection on eggs of chum salmon *Oncorhynchus keta*. Fish. Sci. 72: 28–32.
- Kimble, C.H. 1977. Chemical food preservatives, In: Block, S.S. (Ed.), Chapter 41: Disinfection, Sterilization, and Preservation, 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia. pp. 834-858.
- Kinne, O. & Kinne E.M. 1962. Rates of development in embryos of cyprinodont fish exposed to different temperature-salinity-oxygen conditions. Can. J. Zool. 40: 231-235.
- Kirk, P.H.; Cannon, P.F.; David, J.C. & Stalpers, J.A. 2001. Dictionary of the Fungi. 9th (ed) CAB International. Oxon, UK, 655 pp.
- Kitancharoen, N.; Yuasa, K. & Hatai, K. 1995 Morphological aspects of *Saprolegnia diclina* Type 1 isolated from pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Mycoscience 36: 365-368
- Kitancharoen, N.; Yuasa, K. & Hatai, K. 1996. Effects of the pH on growth of *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* isolated from various sources. Mycoscience 37: 385-390.
- Kitancharoen, N. & Hatai, K. 1997. *Aphanomyces frigidophilus* sp. nov. from eggs of Japanese char, *Salvelinus leucomaenis*. Mycoscience, 38: 135-140.
- Kitancharoen, N.; Ono, A.; Yamamoto, A. & Hatai, K. 1997. The fungistatic effect of NaCl on rainbow trout egg Saprolegniasis. Fish Pathol. 32: 159-162.
- Kitancharoen, N.; Yamamoto, A. & Hatai, K., 1998. Effect of sodium chloride, hydrogen peroxide and malachite green on fungal infection in rainbow trout eggs. Biocontrol Sci. 3: 113– 115.
- Klebs, G. 1899. Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. II *Saprolegnia mixta* de Bary. Jahrb Wiss. Bot. 33: 519-593.
- Kogej, T.; Gorbushina, A.A. & Gunde-Cimerman, N. 2006. Hypersaline conditions

- induce changes in cell wall melanization and colony structure in halophilic and xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. Mycol. Res. 110:713-724.
- Koeypudsa, W.; Phadee P.; Tangtrongpiros J. & Hatai K. 2005 Influence of pH, Temperature, and Sodium Chloride concentration on growth rate of *Saprolegnia* sp. J.Sci. Res. Chulalongkorn Univ. 30:123-130
- Kosztowny, A.L.; Hirano, T. & Grau E.G. 2008. Developmental changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity in mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae in various salinities. Annals of 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egipto, p. 447-457.
- Kryzhanvsky, P. 1956. Development of *Clupea harengus* membras in water of high salinity. Vopr. Ikhtiol 6: 100-104.
- Lagerspetz, K.Y.H; Tiiska, A. & Senius, K.E.O. 1993. Low sensitivity of ciliary activity in the gills of *Anodonta cygnea* to some ecotoxicals. Comp. Biochem. Physiol. 105: 393-395.
- Law, F.C.P. 1994. Total residue depletion and metabolic profile of selected drugs in trout. US Food and Drug Administration, Contract # 223-90-7016, Simon Fraser University, Burnaby, B.C, Canada.
- Lawhavinit, O.; Hatai, K. & Kubota, S.S. 1986. Studies on Fungus Diseases of Pejerrey *Odontesthes bonariensis* (C & V.) I : *Aeromonas hydrophila* Isolated from Pejerrey with Saprolegniasis. Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll. 35: 135-140.
- Lawhavinit, O.; Hatai, K.; Kubota, S.S.; Tosa, K. & Susuki, N. 1998. Ocurrance of Mycobacterium infection from pond-cultured Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* C & V, in Japan. Bull. Nippon. Vet. Zootech. Coll. 37: 28-34.
- Le Blanc, N.; Davidson, J.; Tremblay, R.; McNiven, M. & Landry, T. 2007. The effect of anti-fouling treatments for the clubbed tunicate on the blue mussel, *Mytilus edulis*. Aquaculture 264: 205–213.
- Leslie, J. & Summerell, B. 2006. The Fusarium laboratory manual. Blackwell, USA, 388 pp.
- Liles, B.G. Jr. 1969. Factors affecting discharge in a water mold of the *Thraustotheca*-complex. Doctoral disertation, Univ. California Berkeley, 124 pp.

- Liu, J.S.; Chen, J.S. & Yu, Z.T. 1995. The effect of common fungicides on Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* eggs. J. World Aquac. Soc. 26: 84-87.
- Loan, Ly Thi Thanh, Vo Hong Phuong, thien Phuc Than & Nguyen Thi Huyen. 2006. Experimental screening of some pharmaceutical chemical compounds effecting on *Achlya* sp. Isolates from catfish eggs. Proceedings of Biotechnology Workshop, Nong Lam University HCMC, Vietnam, p. 3.
- López, H.L. & García, M.L. 2001. Aspectos históricos e importancia del pejerrey bonaerense: 15- 20. *En*: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. F. Grosman (Ed.), Editorial Astyanax, Azul, Argentina, p. 13-20.
- Loundsbury, J.A. 1930. Investigation on the nature of *Achlya paradoxa* Cooker. Trans Wisconsin Acad. Sci. Arts, Ltrs 25: 215 – 225.
- Luchini, L.; Quiros, R. & Avendaño, T. 1984. Cultivo del pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) en estanques. Mem. Asoc. Latinoamer. Acuicult., 5: 581-587.
- Lund, A. 1934. Studies on Danish freshwater Phycomycetes and notes on their occurrence particularly relative to the hydrogen ion concentration of the water. Kongel. Dansk. Vidensk. Selsk. Naturvidensk. Math. Afh. 9, 6:1-97.
- Machova, J.; Svobodova, Z. & Svobodnik, J. 2001. Risk of malachite green application in fish farming – a review (in Czech). Veterinarstvi 51: 132–132.
- Mancini, M.; Larriestra, A. & Sanchez, J. 2000. Estudio ictiopatólogico en poblaciones silvestres de la región centro-sur de la provincia de Córdoba, Argentina. Rev. Med. Vet., B.Aires, 81: 104-108.
- Mancini, M.; Rodríguez, C.; Prosperi, C.; Salinas, V. & Bucco, C. 2006. Main diseases of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in central Argentina. Pesq. Vet. Bras. 26: 205-210.
- Mancini, M.; Brol, G.; Barberis, C.; Rodríguez, C., Astoreca, A. & Salinas, V. 2008. Registro de saprolegniasis en ejemplares silvestres de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). V Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos, Luján, Bs-As, Argentina, 58 p.
- Mancini, M. & Grosman, F. 2009. El Pejerrey de las lagunas pampeanas. Análisis de

-
- casos tendientes a una gestión integral de las pesquerías. Univ.Nac. de Río Cuarto - Univ.Nac. del Centro de Prov. de Bs-As , 446 pp.
- Mandeel Qaher, A. 2006. Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. J. Basic Microbiol. 46: 480 – 494.
- Marcano, C.; Palacios, C. & Vivas, C. 1985. Resistencia de algunos hongos patógenos a los vapores del formol. Dermatol.Venez. 23: 37-40.
- Marking, L.L.; Rach, J.J. & Schreier, T.M. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. Progr. Fish-Cult. 56: 225– 231.
- Martin, R. 1968. The Effect of Malachite Green as a fungicide. Ohio J. Sci. 68: 118-120.
- Martti, G.A.; López Lastra, C.C.; Pelizza, S.A. & Garcia, J. 2006. Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota Hypocreales) from the Chagas disease vector *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera:rediviidae) in an endemic area in Argentina. Mycophthologia 162: 369-372.
- Maslen, M.; Whitehead, J.; . Forsyth, W.M; McCracken, H. & Hocking, A.D. 1988. Systemic mycotic disease of captive crocodile hatchling (*Crocodylus porosus*) caused by *Paecilomyces lilacinus*. Med. Mycol, 26: 219 – 225.
- May R.C. 1975. Effects of temperature and salinity on fertilization, embrionic development, and handling in *Bairdiella icistia* (Pisces: Sciaenidae), and the effect parental salinity acclimation on embryonic and larval salinity tolerance. Fish. Bull. 73: 1-22.
- Mac Donagh, E.J. 1946. Piscicultura del pejerrey en el arrozal de la Facultad de Agronomía de La Plata. Rev. Fac. Agronomía, La Plata. (3ra. época), XXVI: 33-50.
- Mc Fadden, A.G. & Sutton, J.C. 1975. Relationship of populations of *Trichoderma* spp. in soil to disease in maize. Can J. Pl. Sci. 55: 579-586.
- Mc Mynn, R.G. & Hoar W.S. 1953. Effects of salinity on the development of the Pacific herring. Canad. J. Zool. 31: 417- 432.
- Mc Williams, P.G. 1982. The effects of calcium on Sodium fluxes in the brown trout, *salmo trutta*, in neutral and acid water J. Exp. Biol. 96: 439-442.
- Mehdy, H.M.; El-Sheikh, H.H.; Ahmed, M.S. & Refaat, B.M. 1996. Physiological and biochemical changes induced by osmolality in halotolerant aspergilli. Acta Microbiol

- Pol. 45: 55–65.
- Meinelt, T.; Pietrock, M.; Wienke, A. & Volker, F. 2003. Humic substances and the water calcium content change the toxicity of malachite green. *J. Appl. Ichthyol.* 19: 380–382.
- Meinelt, T.; Pietrock, M.; Burnison, K. & Steinberg, C. 2005. Formaldehyde toxicity is altered by calcium and organic matter. *J. Appl. Ichthyol.* 21: 121–124.
- Mekrani, S. 1980. Investigations on fungi associated with diseases of some common edible fishes. PhD dissertation, Univ. Gorakhpur, India, 122 pp.
- Meyer, F.P. & Jorgensen, T.A. 1983. Teratological and other effects of malachite green on the development of rainbow trout and rabbits. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112: 818–824.
- Milanez, A.I. 1997. Diversidade no Reino Stramenopila, Livro 1- Microbiologia e Virus, Prometo Biota, Revista FAPESP. 118 pp.
- Miranda, L.A. & Somoza, G.M. 2001. Biología reproductiva del pejerrey *Odontesthes bonariensis*: Diferenciación sexual y endocrinología de la reproducción. Aspectos básicos y su potencial aplicación en acuicultura: 41-45. *En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. F. Grosman (Ed.), Editorial Astyanax, Azul, Argentina, p. 41-45.
- Miranda, L.; Cassará, M. & Somoza, G.M. 2005. Increase of milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. *Aquacult. Res.* 36: 1473 – 1479.
- Miranda, L.A.; Strüssmann, C. & Somoza, G.M. 2009. Effects of light and temperature conditions on the expression of GnRH and GtH genes and plasma steroids levels in *Odontesthes bonariensis* females. *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 101 - 108.
- Miller, T.G. & Mackay, W.C., 1980. The effects of hardness, alkalinity and pH of test water on the toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* 14: 129-133.
- Mitrowska K. & Posyniak, A. 2005. Malachite green: pharmacological and toxicological aspects and residue control (in Polish). *Medycyna Weterynaryjna* 61: 742–745.
- Morin, R. & Boucher, C. 2005. Le vert de malachite est interdit d'utilisation en pis-

- ciculture. Pourquoi et comment s'en passer? L'Aquacole. Bulletin de l'Association des Aquaculteurs du Québec 10: 1-7
- Mousavi, S.M.; Mirzargar, S.S.; Ebrahim Zadeh Mousavi, H.; Omid Baigi, R; Khosravi, A.; Bahonar, A. & Ahmadi, M.R. 2009. Evaluation of Antifungal Activity of New combined essential oils in Comparison with Malachite Green on hatching rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. J. Fish. Aquat. Sci. 4:103-110.
- Muhvich, A.G.; Reimschuessel, R.; Lipsky, M.M. & Bennet, R.O. 1989. *Fusarium solani* isolated from newborn bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo* (L.). J. Fish. Dis. 12:57-62.
- Munir, E. & Shimada, M. 2005. An inhibitory effect of acetate added to the cultura on growth of Wood rotting Basidiomycetes. Proceedings of the 6th International Wood Science Symposium LIPI-JSPS Core University Program in the Field of Wood Science, Bali-Indonesia, p. 405-410.
- Muzzarelli, R.A.A.; Muzzarelli, C.; Tarsi, R.; Miliani, M.; Gabbanelli, F.; Cartolari, M. 2001. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. Biomacromolecules 2: 165-169.
- Neish, G.A. & Hughes, G.C. 1980. Fungal diseases of fishes. Book 6. En: Diseases of Fishes Publications, Snieszko S.F. & Axelrod H.R. (Eds.). T.F.H. Neptune City, New Jersey, 159 pp.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* Species. An illustrated Manual for identification. University Press (Eds), University Park, PA. Pennsylvania, 193 pp.
- Nirenberg, H. 1976. Untersuchungen über die morphologische differenzierung in der *Fusarium*-sektion-Liseola. Mitt. Biol. Bundesanst. Ld-u. Forstw. Berlin-Dahlem 169: 1-117.
- Noga, E.J. 1999. Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. Iowa State University Press, (Eds). Iowa, USA, 367 pp.
- Nolan, R.A. 1975. Physiological studies with to the fungus *Saprolegnia megasperma*. Can. J. Bot. 53: 2110-2114.
- Nolan, R.A. 1976. Physiological studies on an isolate of *Saprolegnia ferax* from the

- larvae gut the black fly *Simulium vittatum*. Mycologia 68:523-540.
- Nolard-Tintigner, R.N. 1978. Ability of zoospores versus oospores to cause saprolegniasis in fish. Acta Zool. Pathol. Antverp. 57: 1-27.
- O'Donnell, J. 1941. A new method of combating fungus infection. Prog. Fish-Cult.56: 18-20.
- Ogbonna, C.I.C. & Alabi, R.O. 1991. Studies on species of fungi associated with mycotic infections of fish in a Nigerian freshwater fish pond. Hydrobiol. 220: 131-136.
- OIE, 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. 3rd. edn, Office International des Epizooties, Paris, 237 p.
- Olah, J. & Farkas, J. 1978. Effect of the temperature, pH, antibiotics, formalin and malachite green on the growth and survival of *Saprolegnia* and *Achlya* parasitic on fish. Aquaculture 13: 273-288.
- Olufemi, B.E.; Agius, C. & Roberts, R.J. 1983. Aspergillomycosis in intensively cultured tilapia (*Sarotherodon* spp.) from Kenya. Vet. Rec.112: 203-204.
- Olufemi, B.E. 1985. The Aspergilli as pathogens of cultured fishes. En: Recent Advances in Aquaculture Vol. 2. Muir J. F., Roberts, R.J. (Eds). Croom Helm, Colorado, USA, p.193-218.
- Olufemi, B.E. & Roberts, R.J. 1986. Induction of clinical Aspergillomycosis by feeding contaminated diet to Tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) J. Fish Dis. 9: 123-128.
- O'Neill, T.M.; Green, K.R. & Ratcliffe, T. 2005. Evaluation of soil steaming and a Formaldehyde Drench of control of *Fusarium* wilt in column stock. Acta Horticult. 698: 129-134
- Oono, H.; Hatai, K; Miura, M.; Tuchida N.; Kiryu, T. 2007. The use of bronopol to control fungal infection in rainbow trout eggs. Biocontrol Sci. 12:55-7.
- Overton, J.L.; Bruun, M.S. & Dalsgaard, I. 2010. Chemical surface disinfection of eggs of Baltic cod, *Gadus morhua* L. J. Fish Dis. 33: 707-716.
- Pacheco Marino, S.G. 2004. Principales enfermedades infecciosas en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* criadas en cautiverio en la Estación Pesquera Arequipa – To-

- torani campaña de producción 2000 – 2001. Tesis de grado Fac. Cs. Biológicas y Agropecuarias; Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa-Perú, 102 pp.
- Pacheco Marino, S.G.; Steciow, M.M.; García Romero, N. & Salibián, A. 2006a. Aproximación a la caracterización de la micobiota parásita de ovas fecundadas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*. II Congreso para la Conservación de la Biodiversidad, Buenos Aires, p. 188.
- Pacheco Marino, S.G.; Steciow, M.M.; Marano, A.V., & Salibián, A. 2006b. Tolerancia de huevos fecundados de *Odonthestes bonariensis* al ClNa y Verde Malaquita. En: XXII Reunión Argentina de Ecología: Comportamiento y Evolución. Fenoglio, M.S.; Musicante, M. & Tourmente, M. (Eds). Córdoba-Argentina, p. 247.
- Pacheco Marino, S.G. & Steciow, M.M. 2008. Primer reporte de *Achlya racemosa* y *Saprolegnia ferax* parásitas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*. III Congreso Nacional para la Conservación de la Biodiversidad, Buenos Aires, p. 288.
- Pacheco Marino, S.G. & Salibián, A. 2008. La Formalina como antifúngico para huevos fertilizados de pejerrey en concentraciones compatibles con su toxicidad. II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental, Mar del Plata, Argentina, p. 247.
- Pacheco Marino, S.G.; Cabello, M. & Barbeito, C. 2008. Fusariosis en ovas de pejerrey (*Odontesthes bonariensis* Cuv.) en Argentina. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología, Rosario, p.148.
- Pacheco Marino, S.G.; Steciow, M.M. & Barbeito, C. 2009. First report of Saprolegniosis on eggs and a juvenile of “Argentinian silverside” (*Odontesthes bonariensis*). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 29: 10-15.
- Padgett, D.E. 1978a. Observations of estuarine distribution of Saprolegniaceae. Trans Brit. Mycol. Soc. 70: 141-143.
- Padgett, D.E. 1978b. Salinity tolerance of an isolate of *Saprolegnia australis*. Mycologia 70:1288-1293.
- Padgett, D.E. 1980. Vegetative propagation of some Saprolegniaceae under simulated-estuarine-culture conditions. Mycologia 72: 410-415.
- PAN Pesticides Database, Chemical Toxicity Studies on Aquatic Organisms, Toxicity

- Studies for Sodium chloride on Fish. 2009. http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAll.jsp?Rec_Id=PC34362&Taxa_Group=Fish&offset=150[Accedido el 29 de Junio de 2010].
- Panchani, K.; Hanjavanit, C. & Kitancharoen, N. 2007. Aquatic fungi developing on eggs of tilapia *Oreochromis niloticus* Linn., and their control. 11 th BRT Annual Conference Udon Thani (Tailandia) N° 160.
- Patterson, D.J. 1989. Stramenopila: Chromophytes from a protistan perspective.. En: The chromophyte algae: problems and perspectives. Systematics Association Special Vol. 38. Green J.C.; Leadbeater, B.S.C. & Diver, W.L. (Eds). Clarendon, Oxford, United Kingdom, p. 357-379.
- Paul, B. 2006. *Pythium apiculatum* sp. nov. isolated from burgundian vineyards: morphology, taxonomy, ITS region of its rRNA, and comparison with related species. FEMS Microbiol Lett. 263: 194-199.
- Paul, B. & Bala K. 2008. A new species of Pythium with inflated sporangia and coiled antheridia, isolated from India FEMS Microbiol Lett. 282: 251–257.
- Péry, A.R.R.; Flammmarion, P.; Vollat, B.; Bedaux, J.J.M.; Kooijman, S.A.L.M. & Garric, J. 2002. Using a biology-based model (Debtox) to analyze bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendations. Environ. Toxicol. Chem. 21: 459-465.
- Perrot, P.E. 1960. The ecology of some aquatic Phycomycetes. Trans. Brit. Mycol. Soc. 43:19-30.
- Phonlor, G. & Sampaio, L.A. 1992. Effect of salinity on Growth and survival of Odon-testhes argentinensis larvae. Arq. Biol. Tecnol. 35: 153-158.
- Pickering, A.D.; Willoughby, L.G & Mc Grory C.B. 1979. Fine structure of secondary zoospore cyst cases of *Saprolegnia* isolates from infected fish. Trans. Br. Mycol. Soc. 72: 427-436.
- Pickering, A.D. 1994.. Factors which Predispose Salmonid Fish to Saprolegniasis. Mueller G.J., (Ed). US Department of Energy, Bonneville Power Administration Portland, Oregon, p. 67–84.
- Pieters, A.J. 1915. The relation between vegetative vigor and reproduction in some Saprolegniaceae. Amer. J. Bot. 2: 529-576.

-
- Piper, R.G. & Smith, C.E. 1973. Factors influencing formalin toxicity in trout. *Prog. Fish-Cult.* 35: 78-80.
- Piper, R.G.; McElwain, I.B.; Orme, L.E.; McCraren, J.P.; Fowler, L.G.; Leonard, R. 1982. *Fish hatchery management*. US Fish and Wildlife Service, Washington, DC, 517 pp.
- Piper, R.G.; McElwain, I.B.; Orme, L.E.; McCraren, J.P.; Fowler, L.G. & Leonard J.R. 1982. *Fish Hatchery Management*. United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., USA, 517 pp.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.; Milanez, A.I. & Schoenlein-Crusius, I.H. 1996. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Sao Paulo, SP. *Fungo*, 4: Saprolegniales. *Hoehnea* 23: 39-66.
- Plakas, S.M.; El Said, K.R.; Stehly, G.R.; Gingerich, W.H. & Allen, J.L. 1996. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 1427-1433.
- Polglase, J.L.; Dix, N.J.; Bullock, A.V. 1984. Infection of skin wounds in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* by *Cladosporium sphaerospermum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 577-580.
- Post, G. 1987. *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications Inc., Neptune City, New Jersey.
- Pottinger, T.G. & Day, J.G. 1999. *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Dis. Aquat. Org.* 36: 129-141.
- Pravecek, J. & Barnes, M.E. 2003. Lack of Effect of Iodophor on Survival of Westslope Cutthroat Trout Eggs during Water Hardening. *N. Am. J. Aquacult.* 65: 266-268.
- Prophet, E.B.; Mills, B.; Arrington, J.B. & Sobin, L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, American Society of Pathology, Washington, 279 pp.
- Quirós, R.; Rosso, J.; Renella, A.; Sosnovsky, A. & Boveri, M. 2002. Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). *Interciencia* 27: 584-591.
- Rach, J.; Schreier, T.; Howe, G. & Redman, S. 1997a. Effect of species, life stage, and

- water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish. Prog. Fish-Cult. 59: 41-46.
- Rach, J.; Howe, G. & Schreier, T. 1997b. Safety of formalin treatments on warm- and coolwater fish eggs. Aquaculture 149: 183-191.
- Rach, J.J.; Valentine, J.J.; Schreier, T.M.; Gaikowski, M.P. & Crawford, T.G. 2004. Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs. Aquaculture 238: 135-142.
- Rakmanee, C.; Hanjavanit C. & Yuasa N. 2004. Effect of the temperature, pH and sodium chloride on the growth of *Saprolegnia* and *Achlya* isolated from infected eggs of african catfish (*Clarias gariepinus* Burch) and common carp (*Cyprinus carpio* L.). Disponible en: <http://gs.kku.ac.th/proceeding/Proceeding/bio/charuwan.pdf>[Accedido el 23 de Marzo de 2007].
- Rand, T.G. & Munden, D. 1993. Chemotaxis of Zoospores of Two Fish-Egg-Pathogenic Strains of *Saprolegnia diclina* (Oomycotina: Saprolegniaceae) toward salmonid egg chorion extracts and selected amino acids and sugars. J. Aquat. Anim. Health 5: 240-245.
- Rand, T.G. 1996. Fungal diseases of fish and shellfish. In: Howard D.H., Miller J.D. (eds) The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. VI. Human and Animals Relationships. Springer-Verlag, Berlin, p. 297-313.
- Rand, T.G.; Bunkley-Williams, L. & Williams, E.H. 2000. A Hyphomycete fungus, *Paecilomyces lilacinus*, associated with wasting diseases in two species of Tilapia from Puerto Rico. J. Aquat. Anim. Health 12: 149-156.
- Rankovič, B. 2005. Five Serbian reservoirs contain different fungal propagules Mycologia 97: 50-56.
- Reardon, I.S. & Harrell, R.M. 1990. Acute toxicity of formalin and copper to striped bass fingerlings held in varying salinities. Aquaculture 87: 255-270.
- Reartes, J. 1987. Evaluación del pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) para el cultivo en estanques. En: Verreth, J.A. et al. (eds) Proc. Taller de Trabajo sobre acuicultura en América Latina, Inf. Found. Sci. (IFS) Stockholm, Sweden, Lima, Perú: 149-157.

- Reartes, J. & Donati O. 1987. Alimentación inicial de larvas de pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) criados con *Spirulina* sp. Primera reunión Asociación Argentina de Acuicultura, San Carlos de Bariloche, 6 pp.
- Reartes, S.; Escaray, R. & Bustingorry, S. 1989. Cría de alevinos y juveniles de pejerrey en un sistema cerrado utilizando diversos tipos de alimento y densidades de siembra. Tercera Reunión Argentina de Acuicultura, Ushuaia, 5 pp.
- Reartes, J. 1995. El Pejerrey (*Odonthestes bonariensis*). Métodos de cría y cultivo masivo. FAO:Copescal Documento Ocasional N° 9. FAO, Vialle Terme di Caracalla 001, Roma, Italia, 35 pp.
- Reichenbach-Klinke, H.H. 1956. Über einige bisher unbekannte Hyphomyceten bei verschiedenen Süßwasser- und Meeresfischen. Mycopathol Mycol App. 17: 333-347.
- Remes Lenicov, M.; Colautti, D.; Berasain, G. 2004. Potencial poblacional del pejerrey pampeano (*Odonthestes bonariensis*) en la laguna de Chasicó. Jornadas de Biología del pejerrey. Aspectos Básicos y Acuicultura. IIB.INTECH. Chascomús.
- Ringuelet, R.A. 1943. Piscicultura del pejerrey o atherinicultura. Col. Agro, Vol. 6, Editorial Suelo Argentino, Buenos Aires, Argentina, 162 pp.
- Ringuelet, R.A. 1948. Enfermedades y enemigos del pejerrey. Period. Campo y suelo Argentino año 32(376, Feb): 48-49.
- Ringuelet, R.A., Aramburu, R.H. & Alonso de Aramburu A. 1967. Los Peces de Agua Dulce de la República Argentina. C.I.C. La Plata, Argentina, 602 págs.
- Roberts, R.J. 2001. Fish Pathology ed. 3rd edn. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 472 pp.
- Romero, J.C. 2003. Uso y comparación de tratamientos profilácticos en ovas de *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842), para mejorar la sobrevivencia embrionaria a eclosión. Tesis de grado Licenciatura en Ciencias de la Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, Chile, 52 pp.
- Ross, A.J. & Smith, C.A. 1972. Effect of two iodophors on bacterial and fungal fish pathogens. J. Fish. Res. Board of Canada 29: 1359-1316.
- Saglan, N.; Ispir, U. & Yonar, M.E. 2003. The effect of a therapeutic bath in malachite green on some haematological parametrers of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,

- Walabaum, 1792) Fresenius Environmental Bulletin 12: 1207-1210.
- Sampaio, L.A. 1992. Fertilização artificial, incubação e crescimento larval de *Odontesthes* sp. e *O. argentinensis*: efectos da salinidade e densidade de estocagem. M.S. Tesis Universidad Federal de Rio Grande, Brasil, 58 pp.
- Sampaio, L.A. & Pholnor, G. 1996. Efectos de la salinidad en huevos y larvas vitelinas de *Odontesthes humensis* (Teleostei: Atherinidae). IX Congreso Latinoamericano de acuicultura. A. Silvi; G. Merino (Eds.) Universidad católica del Norte Coquimbo-Chile, p. 346-349.
- Sampaio, L.A. 2006. Production of “pejerrey” *Odontesthes argentinensis* fingerlings: A review of current techniques. Biocell 30: 121-123.
- Sciara, A.; Rubiolo, J.; Somoza, G.M. & Arranz, S. 2006. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology. 142: 284 – 292.
- Saparrat, M.C.N. & Hammer, E. 2006. Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycetes *Pestalotiopsis guepinii* CLPS No. 786 strain. J. Basic Microbiol. 46: 28-33.
- Satur, M.M. 1967. Rape seed extract agar: a new medium for production and detection of oospores of heterothallic species of *Phytophthora*. Mycologia 59: 161-166.
- Sawada, A.; Ikeda, R.; Tamiya, E.; Yoshida, T.; Oyabu, T. & Nanto, H. 2006. A novel Formaldehyde-Degrading Fungus, *Trichoderma virens*: Isolation and some properties. IEICE Trans Electron.; E89-C: 1786-1791.
- Schlotfeld, H.J. 1998. Therapienotstand bei Fischen in der Bundesrepublik Deutschland. Fisch. Teichwirt 2: 42–47.
- Schoenlein-Crusius, I.H. & Milanez, A.I. 1998. Fungos zoospóricos (Mastigomycotina) da mata atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paraniacaba, município de Santo André, SP. Rev. Bra. Bot. 2: 177-181.
- Schreck, C.B.; Fitzpatrick, M.S.; Marking, L.L.; Rach, J.J. & Jeffrey, S.M. 1990. Research to identify effective antifungal agents. Bonneville Power Administration, US Department of Energy, Portland, Oregon - USA, 21 pp.
- Schreck, C.B.; Fitzpatrick, M.S.; Garris, R.; Marking, L.L.; Rach, J.J. & Semann,

-
- T.M. 1991. Research to identify effective antifungal agents. Annual report 1991. Bonneville Power Administration, Portland, Oregon - USA, 36 pp.
- Schreck, C.B.; Fitzpatrick, M.S.; Marking, L.L.; Rach, J.J. & Schreier, T.M., 1992. Research to identify effective antifungal agents. Bonneville Power Administration, US Department of Energy, Portland, Oregon - USA, 30 pp.
- 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.
- Scott, W.W. 1962. The aquatic phycomycetous flora of marine and brackish waters in the vicinity of Gloucester Point, Virginia. Special Sci. Rep. N° 36. Virginia Inst. Marine Sci, Virginia, 16 pp.
- Scott, W.M. & O'Bier, A.H. 1962. Aquatic fungi associated with diseased fish and fish eggs. *Prog. Fish-Cult.* 24: 3-15.
- Scott, W.W. & O'Warren, C. 1964. Studies of the host range and chemical control of fungi associated with diseased tropical fish., Va. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 171: 1-24.
- Shafiezade, P.; Nazari, R.M. & Rassouli, A. 2006. Comparison of antifungal therapeutic indices of formalin, malachite green, and potassium permanganate in treating Persian Sturgeon eggs. *J.Appl. Ichthyol* 22: 291-293.
- Shi, Z.; Huang, X.; Fu, R.; Wang, H.; Luo, H.; Chen, B.; Liu, M. & Zhang, D. 2008. Salinity stress on embryos and early larval stages of the pomfret *Pampus punctatissimus*. *Aquaculture* 275: 306-310.
- Shimokawa, O. & Nakayama, H. 1999. Acetate-mediated growth inhibition in sterol 14 - α demethylation-deficient cells of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 43:100-105.
- Shnick R.A.; Meyer, F.P. & Gray, D.L. 1989. A guide to approved chemicals in fish production and fishery resource management, United States Fish and Wildlife Services, and University of Arkansas Cooperative Extension Service, Little Rock, 27 pp.
- Singh, R.S. & Nene, Y.L. 1965. Malachite green in synthetic medium for the isolation

- of *Fusarium* spp. from plant tissues. *Naturwissenschaften* 52: 94.
- Seçer, S. & Özkul, A. 1988. A research on spot diseases (Happch's spot disease) of fresh water crayfish in Turkey. *J.Aquatic Product* 12: 9-22.
- Seymour, R.L. 1970. The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia* 19: 1-124.
- Sharp, R.W.; Benmet, L.H.; Saeugling, E.C. 1952. Preliminary report on the control of fungus in the eggs of the Pike (*Esox lucius*) with Malachite green. *Prog. Fish-Cult.* 14: 30.
- Shearer, C.A.; Langsam, D.M. & Longcore J.E. 2004. Fungi in freshwater habitats. In. pp. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, G. Mueller, G. Bills & M. Foster, (eds), Elsevier, Academic Press, Boston, p.513-532.
- Silphaduang, U.; Hatai, K.; Wada, S. & Noga E. 2000. Cladosporiosis in a tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 31: 259-261.
- Skjermo, J. & Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343.
- Smail, D.A.; Grant, R.; Simpson, D.; Bain, N. & Hastings, T.S. 2004. Disinfectants against cultured Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus: the virucidal effect of three iodophors, chloramine T, chlorine dioxide and peracetic acid/hydrogen peroxide/ acetic acid mixture. *Aquaculture* 240: 29-38.
- Smith, A.G.; Muhvich, A.G.; Muhvich, K.H. & Wood, C. 1989. Fatal *Fusarium solani* infections in baby sharks. *J. Med. Vet. Mycol.* 27: 83-91.
- Smith, S.N. & Ince, E. & Armstrong, R.A. 1990. Effect of osmotic and matrix potential on *Saprolegnia diclina* and *S. ferax*. *Mycol. Res.* 94: 71-77.
- Somoza, G.M.; Miranda, L.A.; Strobl-Mazzulla, P.H. & Guilgur, L.G. 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. *Cel. Mol. Neurobiol.* 22: 589-609.
- Souheil, H.; Vey, A.; Thuet, P. & Trilles, J.P. 1999. Pathogenic and toxic effects of *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) on survival and osmoregulatory capacity of *Penaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture* 178: 209-224.
- Sparrow Jr., F.K. 1960. *Aquatic Phycomycetes*. 2nd ed. Ann. Arbour, Univ. Michigan

- Press. Michigan, 1185 pp.
- Spaulding, E.H., Cundy, K.R. & Turner, F.J. 1977. Chemical disinfection of medical and surgical materials, Capítulo 33. En: Disinfection, Sterilization, and Preservation, 2nd ed. Block, S.S. (Eds.), Lea & Febiger, Philadelphia. p. 654-684.
- Sprague, J.B. 1985. Factors that modify toxicity. En: Fundamentals of Aquatic Toxicology. Rand, G.M. & Petrocelli, S.R (Eds). Harper & Row, New York, p. 124-163.
- Srivastava, G.C. 1967. Ecological studies of some aquatic fungi of Gorakhpur, India. *Hidrobiologia* 30: 385-404.
- Srivastava, G.C. & Srivastava, R.C. 1978. A Note on the potential applicability of Malachite Green Oxalate in combating fish mycoses. *Mycopathologia* 64:169-171.
- Srivastava, S.J.; Singh, N.D.; Srivastava, A.K. & Sinha, R. 1995. Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquat. Toxicol.* 31: 241-247.
- Srivastava, A.K.; Sinha R.; Singh, N.D. & Srivastava, S.D. 1998. Histopathological changes in a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* following exposure to malachite green. *Proceedings of the National Academy of Sciences of India. Section B. Biological Sciences* 68: 253-257.
- Srivastava, S.; Sinha, R. & Roy, D. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquat. Toxicol.* 66: 319-329.
- Steciow, M.M. 2001. *Achlya fuegiana*, a new species from Tierra del Fuego Province, Argentina. *Mycologia* 93: 1195-1199.
- Steel, R.G.D. 1959. A Multiple Comparison Rank Sum Test: Treatment Versus Control. *Biometrics* 15: 560-572.
- Stephenson, H.; Gabel, M. & Barnes, M.E. 2005. External Egg Membrane Characteristics of Landlocked Fall Chinook Salmon Eyed Eggs Treated with Hydrogen Peroxide or Formalin. *N. Am. J. Aquacul.* 67: 171-176.
- Stevens, R.B. 1974. Mycology guidebook. Micological Society of America, Univ. of Washington Press, Seattle and London, 703 pp.

- Strobl Mazzulla, P.; Lethimonier, C.; Gueguen, M.M.; Karube, M.; Fernandino, J.I.; Yoshizaki, G.; Patiño, R.; Kah, O. & Somoza G.M. 2008. Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. Neuroanatomical and functional relations. Gen. Comp. Endocrinol. 158: 191 - 201.
- Strongman, D.B.; Morrison, C.M. & Mc Clelland, G. 1997. Lesions in the musculature of captive American plaice *Hippoglossoides platessoides* caused by the fungus *Homoconis resinae* (Deuteromycetes) Dis. Aquat. Org. 18: 107-113.
- Strüssmann, C.A. 1989. Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Tesis Doctoral, Universidad de Pesquerías de Tokio, Tokio, 351 pp.
- Strüssmann, C.A.; Takashima, F. & Toda, K. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Aquaculture 139: 31-45.
- Stuart, N.C. 1983. Treatment of fish disease. Vet Rec. 112: 173-177.
- Stueland, S.; Heier, B.T. & Skaar, I. 2005. A simple *in vitro* screening method to determine the effects of drugs against growth of *Saprolegnia parasitica*. Mycol. Prog. 4: 273-279.
- Subasinghe, R.P. & Sommerville, C. 1985. Disinfection of *Oreochromis mossambicus* (Peters) eggs against commonly occurring potentially pathogenic bacteria and fungi under artificial hatchery conditions. Aquacult. Fish. Managem. 16: 121-127.
- Summerfelt. S.T.; Hankins, J.A.; Weber, A.L. & Durant, M.D. 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system II. Effects on microscreen filtration and water quality. Aquaculture 158: 57-67.
- Sutton, D.A.; Fothergill, A.W. & Rinaldi, M.G. 1998. Guide to clinically significant Fungi. Williams & Wilking (Eds), Baltimore, p.170-183.
- Subasinghe, R. P. & Sommerville, C. 1985. Disinfection of *Oreochromis mossambicus* (Peters) eggs against commonly occurring potentially pathogenic bacteria and fungi under artificial hatchery conditions Aquacult. Res. 16: 121-127.
- Sudova, E.; Machova, J.; Svobodova, Z. & Vesely, T. 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Vet. Med. 52: 527-539.
- Svobodova, Z. & Vykusova, B. 1997. Ecotoxicological evaluation of pharmaca used in

-
- fisheries. Bull. Res. Inst. Fish Cult. Hydrobiol. 33: 244–254.
- Swanson, C. 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). J. Exp. Biol. 201: 3355–3366.
- Takayanagi, K.; Sakami, T.; Shiraishi, M. & Yokohama, H. 2000. Acute toxicity of formaldehyde to the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. Water Res. 34: 93–98.
- Te Strake, D. 1959. Estuarine distribution and saline tolerance of some Saprolegniaceae. Phytol. Internat'l. Jour. Exp. Bot. 12: 147–152.
- Tendencia, E.A. 2001. Effect of iodine disinfection on the bacterial flora and hatching rate of grouper, *Epinephelus coioides*, eggs at the cleavage stage and eyed stages. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 21: 160–163.
- Theron, J.; Prinsloo, J.F. & Schoonbee, H.J. 1991. Treatment of *Cyprinus carpio* L. and *Clarias gariepinus* (Burchell) embryos with formalin and malachite green: effect of concentration and length of treatment on their survival. Onderstepoort J. Vet. Res. 58: 239–243.
- Tiffney, W.N. 1939. The identity of certain species of the Saprolegniaceae parasitic to fish. J. Elisha Mitchell Scient. Soc. 55: 134–151.
- Tintos Gómez A. 1999. Histopatología branquial asociada a la adaptación de agua dulce a concentraciones de 15 25 y 35 ‰ de salinidad en tilapia roja (híbrida) *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) x *Oreochromis mossambicus* (Peters). MS Tesis, Facultad de Ciencias Marinas Universidad de Colima- México.
- Tišler, T. & Zagorac-Konèan, J. 1997. Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. Water Air Soil Poll. 97: 315–322.
- Toda K., Tonami, N.; Yasuda, N. & Suzuki S. 1998. Cultivo del pejerrey en Japón. Ed. Prel. De Técnicas de cultivo del pejerrey, New Fish Development Association (Eds). Japón, 69 pp.
- Torres-Mendoza, B.M.; Vázquez-Valls, E. & González-Mendoza, A. 1997. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. Rev. Iberoam. Micol. 14: 98–100.

- Treves-Brown, K.M. 2000. Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: Netherlands, 309 pp.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1996. Fish Early-Life Stage Toxicity Test. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1400. US EPA Office of Water, Washington, DC. EPA 712-C-96-121.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1998. Health and Environmental Effects Profile for Formaldehyde. EPA/600/x-85/362. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. US EPA Office of Water, Washington, DC. EPA-821-R-02-012.
- United States Fish and Wildlife Service. 2004. Iodophor disinfection of fish eggs, in Handbook of Aquatic Animal Health Procedures and Protocols.
- van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. Mycologist 20: 99-104.
- Varsamos, S.; Nebel, C. & Charmantier, G. 2005. Ontogeny of Osmoregulation in postembryonic fish: a review. Comp. Biochem. Physiol. 141A: 401-429.
- Velasco, C.A.M.; Berasain, G.E. & Ohashi, M. 2008. Producción intensiva de juveniles de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) Biología Acuática 24: 53 - 58.
- Verschuere, K., 1996. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 3rd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, p. 105-109.
- Vivar, V.M. & Bernal, F.L. 1998. Control de Saprolegniales por Ácido Acético, Cloruro de Sodio y Verde de Malaquita en huevos de trucha arco iris. Bol. Micol. 13: 29-34.
- Wagner, E.J.; Arndt, R.E.; Billman, E.J.; Forest, A. & Cavender, W. 2008. Comparison of the Efficacy of Iodine, Formalin, Salt, and Hydrogen Peroxide for Control of External Bacteria on Rainbow Trout Eggs. N. Am. J. Aquac. 70: 118-127.
- Wagner, E.J.; Oplinger, R.W.; Arndt, R.E.; Forest, A.M. & Bartley, M. 2010. The Safety and Effectiveness of Various Hydrogen Peroxide and Iodine Treatment Regimens for Rainbow Trout Egg Disinfection. N. Am. J. Aquac. 72: 34-42.

- Warren, J.W. 1981. Diseases of hatchery fish. A fish disease manual. U.S. Fish Wildl. Serv., Reg. 3, Twin Cities, MN, 91 pp.
- Waterstrat, P.R.; Marking, L.L. 1995. Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride for the treatment of *Saprolegnia parasitica* on fall Chinook salmon eggs. Progr. Fish-Cult. 57, 287-291.
- Weirich, C.R.; Tomasso, J.R. & Smith, T.I.J. 1993. Toxicity of ammonia and nitrite to sunshine bass in selected environments. J. Aquat. Anim. Health 5: 64-72.
- Weisbart, M. 1968. Osmotic and ionic regulation in embryos, alevins, and fry of the five species of Pacific salmon. Can. J. Zool. 46: 385-397.
- Wensley, R.N. 1968. The effect of prewetting naturally infested soils on destruction of the muskmelon wilt fungus by formaldehyde. Can. J. Microbiol. 14: 309-312.
- White, T.J.; T. Bruns; Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds). Academic Press, London, p. 315-322.
- Willoughby, L.G. & Pickering, A.D. 1977. Viable Saprolegniaceae spores on the epidermis of the salmonid fish *Salmo trutta* and *Salvelinus alpinus*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 68: 91-95.
- Willoughby, L.G. 1977. An abreviate life cycle in the salmonid fish *Saprolegnia*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 69: 133-136.
- Willoughby, L.G.; Mc Grory, C.B. & Pickering, A.D. 1983. Zoospore germination of *Saprolegnia* pathogenic to fish. Trans. Brit. Mycol. Soc. 80: 421-435.
- Willoughby, L.G. & Roberts, R.J. 1992. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. J. Fish Dis. 15: 1-13.
- Willoughby, L.G. 1994. Fungi and Fish Diseases. Pisces Press. Stirling, Scotland, 57 pp.
- Wolf, F.T. 1937. A nutritional study of *Achlya bisexualis* and *Saprolegnia ferax*. Am. J. Bot. 24: 119-123.
- Wolf, C. & Smith, S.A. 1999. Systemic Zygomycosis in Farmed Tilapia Fish. J. Comp.

- Pathol. 121:301-306.
- Wong, F. & Yu, J. 1999. Laccase-catalysed descolourization of syntetic dyes. Water Res. 33: 3512-3520.
- Wood, S.E.; Willoughby, L.G. & Beakes, G.W. 1988. Experimental studies on uptake and interaction of spores of the *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* complex with external mucus of brown trout *Salmo trutta*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 90: 63-74.
- Wörle, B. 1995. Gene toxicological studies on fish eggs. Genotoxikologische Untersuchungen an Fischeiern. 92 pp.
- Wright, L.D. 1976. Effect of malachite green and formaline on the survival of large mouth bass eggs and fry. Prog. Fish-Cult.38: 155-157.
- Wright, A.D.; Osterhage, C. & König, G.M. 2003. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfishderived culture of *Epicoccum purpurascens*. Org. Biomol. Chem. 1: 507 – 510.
- Wurts, W.A. & Stickney, R.R. 1989. Responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to Calcium and Magnesium concentrations in fresh and salt water. Aquaculture 76: 21-35.
- Yang, X.Q.; Zhao, X.X.; Liu, C.Y.; Zheng, Y. & Qian, S.J. 2009. Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. Proc. Biochem. 44: 1185-1189.
- Youssef, A.S.; Sherif, M.F. & Assar, S.A. 2008. Studies on the decolorization of malachite green by the local isolate *Acremonium kiliense*.Biotechnol. 7: 213-223.
- Yuasa, K. & Hatai, K. 1996. Some biochemical changes of the genera *Saprolegnia*, *Achlya* and *Aphanomyces* isolated from fishes with fungal infection. Mycoscience 37: 477-479.
- Zahn, T. & Braunbeck, T. 1995. Cytotoxic effects of sublethal concentrations of malachite green in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicology *in vitro* 9: 729-741.
- Zak, J.C. & Wildman, H.G. 2004. Fungi in Stressful Environments. En. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, Mueller, G.; Bills, G.& Foster, M. (Eds). Elsevier, Academic Press, Boston, p. 303-316.