

Short Communication

Supervivencia embrionaria de *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) sometida a diferentes tratamientos profilácticos

Juan Barile¹, Manuel Escudero¹, Juan Romero¹ & Francisco Encina²

¹Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile

²Escuela de Ciencias Ambientales, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile

Corresponding author: Juan Barile (jbarile@uct.cl)

RESUMEN. Se evaluó el uso de antifúngicos para mejorar la supervivencia embrionaria de *Galaxias maculatus*. Se diseñaron tres tratamientos utilizando formalina en dosis de 250 ppm; yodo en dosis de 100 ppm y sal de mar en dosis de 30 ups y un tratamiento control. Para cada tratamiento y el control se utilizaron 15 réplicas con 100 embriones por réplica. El tratamiento correspondió a sumergir los embriones en un baño profiláctico por una hora cada dos días y el control sólo en agua de salinidad 10. Posteriormente se evaluó la supervivencia larval de cada tratamiento y control a los 15 días de vida. En el tratamiento con sal se obtuvo la mayor supervivencia embrionaria y larval, mejorando en un 27,4 y 11,6% ($P < 0,05$) por sobre el control. En el tratamiento con formalina se obtuvo supervivencia embrionaria y larval de 9,8 y 4,0% respectivamente sobre el control ($P < 0,05$) y en el caso del yodo se obtuvo una supervivencia embrionaria de 2,6% por sobre el control ($P > 0,05$) y supervivencia larval de un 16,4% menor al control ($P < 0,05$). En conclusión la sal muestra mayor efectividad como tratamiento profiláctico para mejorar la supervivencia embrionaria de *G. maculatus*.

Palabras clave: *Galaxias maculatus*, peces, embriones, profilaxis, hongos, acuicultura.

Embryonic survival of *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842), under different prophylactic immersion bath

ABSTRACT. The use of antifungals was assessed to improve embryo survival of *Galaxias maculatus*. Three treatments using formalin dose of 250 ppm, iodine dose of 100 ppm, and sea salt in doses of 30 ups were designed, and a control treatment under 10 of salinity water. For each treatment and control, 15 replicates were used, with 100 embryos in each replicate. Embryos were immersed into each treatment solution for one hour every two days. Larval survival after 15 days old was assessed. Higher embryonic and larval survival was obtained in sea salt treatment improving by 27.4 and 11.6% ($P < 0.05$) respectively over control results. Formalin treatment resulted in embryonic and larval survival of 9.8 and 4.0% respectively more than control ($P < 0.05$) and in the case of iodine embryonic survival, 2.6% more than control ($P > 0.05$) and larval survival of 16.4% lower than the control ($P < 0.05$). In conclusion, sea salt shows greater effectiveness as a prophylactic treatment to improve the embryonic survival of *G. maculatus*.

Keywords: *Galaxias maculatus*, fish, embryo, profilaxis, fungi, aquaculture.

La sanidad juega un papel cada vez mayor en la industria piscícola en general y en especial en granjas intensivas de producción, impidiendo que los agentes patógenos ataquen a huevos, larvas y peces sanos (Mifsud & Rowland, 2008). En este contexto el manejo sanitario representa una actividad prioritaria para garantizar un producto de calidad en todas las fases del cultivo, más aún durante la incubación de los embriones considerando lo fundamental que resulta la provisión de “semilla” en el proceso productivo. A lo anterior se

suma que en especies nuevas para la acuicultura, como es el caso de *Galaxias maculatus*, especie nativa de interés comercial y de repoblamiento (Mitchel, 1989; Barile *et al.*, 2003, 2013a, 2013b, 2015), las enfermedades se intensifican debido al escaso grado de domesticación al cautiverio especialmente cuando los progenitores son obtenidos directamente desde la naturaleza.

El tratamiento profiláctico es dependiente de las características biológicas de los distintos estadios de

desarrollo de los peces, de su resistencia al manejo en cautiverio y del grado de domesticación que posean. En el caso de *G. maculatus*, el embrión posee dos características biológicas importantes de considerar: etapa embrionaria extensa (25 a 35 días), y una capa externa altamente adhesiva que lo rodea (Benzie, 1968; Mitchell, 1989), incapaz de ser removida (Barile *et al.*, 2003) por los tratamientos habituales utilizados en la piscicultura de peces con ovas adhesivas (Mizuno *et al.*, 2004; Huysentruyt & Adriaens, 2005). Las características del embrión de *G. maculatus* facilitan la proliferación de organismos patógenos en el sistema de cultivo tales como bacterias, protozoos y hongos que hacen necesario implementar medidas profilácticas preventivas que atenúen su presencia y por consiguiente, mejoren la supervivencia embrionaria en cultivo. En este contexto *Saprolegnia* sp. es el patógeno más frecuente y agresivo en atacar las ovas de peces en las piscifactorías (Yamamoto *et al.*, 2001; Zaror *et al.*, 2004; Mifsud & Rowland, 2008), que se potencian cuando ocurren cambios ambientales bruscos o se realizan manejos inadecuados de la población en cultivo (Mischke & Wise, 2008).

En el caso de *G. maculatus*, no hay estudios relacionados con el tema pero en referencia a las características del embrión, su manejo durante la incubación es distinta a lo realizado en la salmicultura donde las especies poseen ovas grandes y no adhesivas, lo que permite realizar la extracción manual de huevos muertos (Barnes *et al.*, 2002a, 2002b; Sutela *et al.*, 2007), manejo que junto a los baños profilácticos realizados en “estado de ojo” permiten mantener controlada la proliferación de hongos. En cambio, las ovas y embriones de *G. maculatus* por su pequeñez y adhesividad forman masas de ovas gelatinosas que hacen inviable el “picaje” durante la incubación. Esta capa aglutina los embriones y asfixia a los que quedan al interior de estos racimos; además, atrapa partículas de material orgánico, generando la rápida colonización de micro-organismos y zoosporas de hongos provocando la infección de los embriones sanos.

Existe amplia variedad de antifúngicos para controlar la presencia del hongo *Saprolegnia* sp. (Hussein *et al.*, 2000; Chutima *et al.*, 2005; Aller *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2008). Entre ellos, está la formalina, uno de los compuestos más efectivos y de fácil manejo (Rowland *et al.*, 2006, 2008; Barnes & Soupier, 2007). Otro componente de amplio uso es la sal de mar, varios estudios han demostrado su efectividad para eliminar la infestación de hongos en ovas de peces favoreciendo los porcentajes de eclosión, de bajo costo, fácil disponibilidad, poco tóxica y bajo riesgo ambiental (Kitancharoen *et al.*, 1998; Mifsud &

Rowland, 2008). Otro producto es el yodo de uso generalizado para la desinfección de ovas en la industria salmonera. Este producto cubre un amplio espectro de acción contra bacterias, hongos y virus (Jodun & Millard, 2001; Khodabandeh & Abtahi, 2006; Wagner *et al.*, 2008), estimando que su uso incrementa los porcentajes de eclosión y controla de manera efectiva la saprolegniasis.

El presente trabajo pretende contrastar la hipótesis que la aplicación de tratamientos profilácticos preventivos y periódicos mejoran la supervivencia embrionaria y larval de *G. maculatus*, para este efecto el objetivo planteado fue evaluar el uso de la formalina, sal y yodo como compuestos antifúngicos para mejorar la supervivencia embrionaria y larval y mejorar la producción masiva de larvas para fines comerciales y/o de repoblamiento de la especie.

Las ovas se obtuvieron de reproductores provenientes de una población migratoria de *G. maculatus* criada en cautiverio con agua dulce en estanques de tierra de 600 m³, con flujo abierto, alimentados con extruido para salmones con frecuencia de tres veces al día a saciedad. En época reproductiva, se seleccionaron 20 hembras y 10 machos maduros mediante una escala macroscópica de madurez sexual adaptada para esta especie (Barile *et al.*, 2003). Los ejemplares fueron desovados mediante masaje abdominal y las ovas fertilizadas utilizando el método seco e hidratado por 60 min en agua dulce. Las ovas fertilizadas se incubaron a temperatura constante de 10 ± 0,8°C y humedad mediante aspersión de tres veces por día con agua de salinidad 10, preparada con sal de mar comercial de acuerdo a lo señalado por Barile *et al.* (2003). Una vez alcanzado el estado de “ova con ojo” (Fig. 1) aproximadamente con 140 a 160 unidades térmicas acumuladas, se seleccionaron los embriones e iniciaron los distintos tratamientos profilácticos.

Los baños profilácticos correspondieron a la inmersión de los embriones en la solución profiláctica por 1 h, el control se sumergió sólo en agua de salinidad 10 por el mismo periodo de tiempo. Posterior a cada baño, los

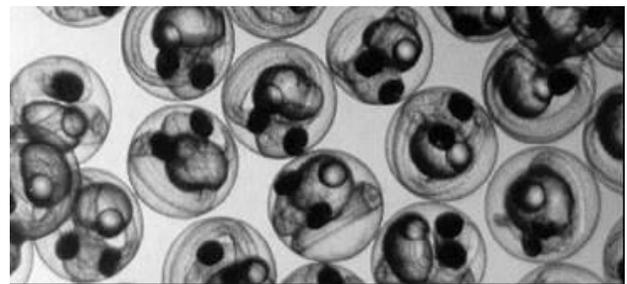


Figura 1. Embriones de *Galaxias maculatus* en “estado de ojos”, con 220 UTA de desarrollo.

embriones fueron lavados con agua de salinidad 10 para sacar los restos del profiláctico empleado, luego drenados y mantenidos en incubación. De cada tratamiento los embriones muertos fueron retirados y contabilizados diariamente.

Para evaluar el efecto preventivo y periódico de los profilácticos en la supervivencia embrionaria y larval, se diseñaron tres tratamientos utilizando formalina (37% de formaldehído) en dosis de 250 ppm; yodo (1,5% de yodo activo y pH neutro) en dosis de 100 ppm y sal de mar gruesa (NaCl 99,15% mín.; sulfatos 0,50% máx.; Ca 0,09% máx.; Mg 0,03% máx. e insolubles 0,07% máx.) en dosis de 30 de salinidad, contrastados con un tratamiento control. La periodicidad de los tratamientos fue cada dos días totalizando siete baños preventivos durante el período de incubación. Para cada tratamiento y el control se utilizaron cinco réplicas con 100 embriones cada uno dispuestos en placas Petri, totalizando 500 embriones por tratamiento y control. Para evaluar el efecto tardío de los profilácticos en las larvas, se mantuvieron 100 larvas recién nacidas obtenidas al azar por cada tratamiento y control en vasos de precipitado de 1 L por 15 días, con agua de 10 de salinidad, provistas de aireación y alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos a una concentración de 10 rot. mL⁻¹ día⁻¹. El biensayo se repitió tres veces en el tiempo.

Para cuantificar el efecto de los tratamientos profilácticos se determinó: supervivencia embrionaria, que correspondió a la diferencia entre el número total de embriones al inicio del periodo experimental y el número total de embriones eclosionados al final de dicho periodo, expresados en porcentaje, y supervivencia larval a los 15 días post-eclosión, que correspondió a la diferencia entre el número total de larvas al inicio y el número total de larvas sobrevivientes al décimo quinto día, expresada en porcentaje.

Los datos de supervivencia embrionaria y supervivencia larval a los 15 días de vida, de los distintos tratamientos profilácticos y control se presentaron como media matemática y desviación estándar. Las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos fueron probadas mediante ANOVA de una vía ($P < 0,05$) y el test de comparaciones múltiples de Tukey para determinar diferencias *a posteriori*. Los tests de Shapiro-Wilks y Levene se emplearon para evaluar los supuestos de normalidad y homocedasticidad respectivamente. Los datos porcentuales se transformaron mediante la transformación angular (Sokal & Rohlf, 1980). Los análisis anteriormente señalados se realizaron empleando el software SPSS 21.

Saprolegnia sp. formó en los embriones muertos un revestimiento de filamentos fungosos que, en ausencia

de tratamiento profiláctico (control), se traspasaron a los embriones sanos más próximos favorecidos por la adhesividad de la ova y la extensión del desarrollo embrionario de esta especie (Fig. 2).

La supervivencia embrionaria en los tratamientos profilácticos de sal ($94,6\% \pm 3,83$) y formalina ($77,0\% \pm 3,10$) fueron significativamente mayor ($P < 0,05$), con respecto del control ($67,2\% \pm 5,67$), en cambio en el tratamiento con yodo ($69,8\% \pm 3,25$), no hubo diferencias significativas con respecto del control ($P > 0,05$). En el tratamiento con sal se obtuvo en promedio, la mayor supervivencia a eclosión con diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a los restantes tratamientos y el control (Fig. 3).

Posterior a la eclosión, la mayor supervivencia larval se obtuvo en los embriones que provinieron del tratamiento con sal, cuyo promedio fue de $86,3\% \pm 4,19$, con diferencias significativas con los otros tratamientos y el control ($P < 0,05$) demostrando que, además de mejorar la supervivencia embrionaria, el uso de la sal no afecta posteriormente la supervivencia larval.

Al contrario, el tratamiento con yodo afectó negativamente la supervivencia larvaria alcanzando un $58,3\% \pm 4,54$ significativamente inferior al resto de los tratamientos y al control donde se obtuvo una supervivencia de $74,7\% \pm 1,25$ ($P < 0,05$). Del mismo modo en el caso de los embriones tratados con formalina se obtuvo una supervivencia larval de $70,7\% \pm 2,49$ sin diferencias significativas respecto del control ($P > 0,05$; Fig. 3).



Figura 2. Embriones muertos de *G. maculatus* cubiertos de hifas de *Saprolegnia* sp.

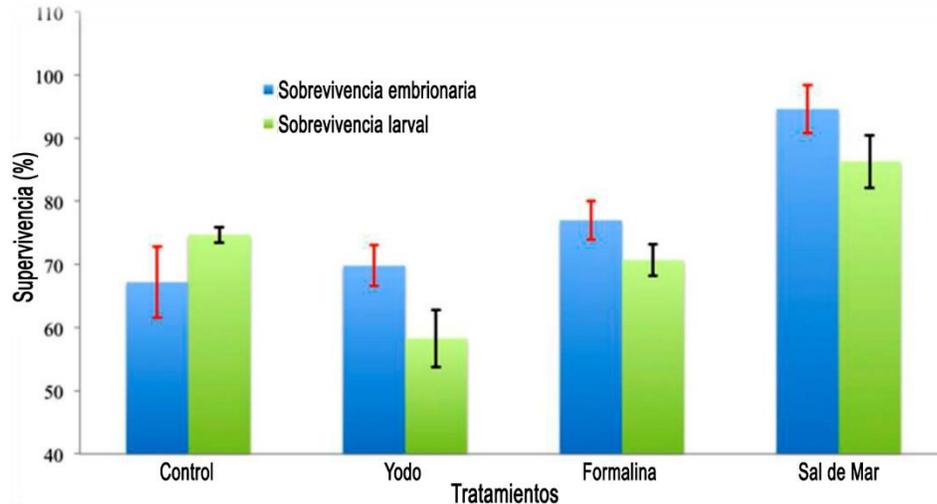


Figura 3. Promedios y desviación estándar de la supervivencia embrionaria y supervivencia larval a los 15 días post-eclosión de *Galaxias maculatus*.

Los tratamientos profilácticos con sal y formalina inhibieron la presencia de hifas de hongos y alcanzaron supervivencias embrionarias significativamente superiores al control. Entre ambos, el tratamiento con sal alcanzó la mayor supervivencia embrionaria (94,6%), significativamente diferente a los tratamientos con empleo de formalina y yodo. La alta supervivencia embrionaria obtenida con sal se correlacionó con una alta supervivencia larvaria (86,3%) promedio, significativamente diferente al resto de los tratamientos incluido el control, demostrando que el uso de la sal como agente profiláctico durante la incubación del embrión no tuvo efectos negativos en las larvas. En cambio, la supervivencia larval con el empleo de formalina no mostró diferencias respecto del control. En el caso del yodo, la supervivencia larval fue significativamente menor respecto del control. Los bajos resultados obtenidos con la formalina y especialmente con el yodo, se explicarían por la alteración de la calidad del agua que estos químicos, dependiendo de la concentración empleada, podrían provocar durante la fase embrionaria, que luego se expresan en la viabilidad de las larvas (Fowler & Banks, 1990; Howe *et al.*, 1995; Buchmann *et al.*, 2004; Meinelt *et al.*, 2005; Pedersen & Pedersen, 2006; Rowland *et al.*, 2006; Oplinger & Wagner, 2009; Chalupnicki *et al.*, 2011).

En el caso de la formalina, independiente de su toxicidad, este químico como fungicida evita la saprolegniosis obteniendo altos porcentajes de eclosión (Barnes *et al.*, 2001, 2003; Gieseke *et al.*, 2006; Small & Chatakondi, 2006; Soupier & Barnes, 2006; Barnes & Soupier, 2007; Rasowo *et al.*, 2007; Rowland *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2011). En el caso del yodo hay

evidencias de su capacidad como control de hongos (Pravecek & Barnes, 2003; Tendencia, 2003). Sin embargo, Khodabandeh & Abtahi (2006) y Wagner *et al.* (2008) concluyeron que el yodo no supera en eficiencia a la sal y formalina, lo cual es concordante con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Respecto del uso de la sal, ésta genera comparativamente mejores supervivencias embrionarias (Phelps & Walser, 1993; Marking *et al.*, 1994; Schreier *et al.*, 1996; Kitancharoen *et al.*, 1998), posiblemente debido a que la sal, entre otros, es un elemento poco tóxico para los peces (Taylor & Bailey, 1979; Froelich & Engelhardt, 1996) y que *Saprolegnia* es una enfermedad de agua dulce incapaz de sobrevivir en salinidades mayores a 3,5% (Zaror *et al.*, 2004).

Debido a la larga extensión del periodo de embrionario de *G. maculatus*, aproximadamente 30 días y la adhesividad del corión que aumenta la susceptibilidad de infecciones fúngicas fue necesario realizar periódicamente baños profilácticos a los embriones para evitar la saprolegniosis. La frecuencia de un baño cada dos días generó un total de siete baños profilácticos previo a su eclosión, la eficiencia de los baños se demostró al compararlos con el tratamiento control que no recibió baños profilácticos, siendo infectado por los hongos y afectando significativamente la supervivencia embrionaria.

En conclusión, de los tres tratamientos profilácticos empleados, el tratamiento con sal presentó el mayor porcentaje de supervivencia embrionaria mejorando un 27,4% por sobre el control. En cambio la formalina obtuvo supervivencias embrionaria de 9,8% sobre el control y en el caso del yodo se obtuvo sólo una supervivencia embrionaria de 2,6% por sobre el

control. El efecto de la sal y formalina no afectó posteriormente la supervivencia larval, en cambio el yodo en la concentración empleada si afectó la sobrevivencia larval de *G. maculatus*.

REFERENCIAS

- Aller, J. & J. Fregeneda. 2007. Comparative efficacy of Pyceze (bronopol) in controlling mortality of brown trout *Salmo trutta* eggs. *Aquacult. Res.*, 38: 618-624.
- Barile, J., M. Escudero & E. Carreño. 2013a. Efecto combinado de la temperatura y salinidad sobre la supervivencia embrionaria de *G. maculatus*. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 48(3): 641-645.
- Barile, J., E. Carreño, M. Escudero & A. Bello. 2013b. Efecto de la temperatura en la sobrevivencia embrionaria del puye *G. maculatus* (Jenyns, 1842). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(5): 839-845.
- Barile, J., M. Escudero, E. Carreño & D. San Martín. 2015. Efecto de la salinidad en la supervivencia embrionaria de puye *G. maculatus* (Jenyns, 1842). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(2): 282-286.
- Barile, J., A. Bórquez, P. Dantagnan, A. Mardones, J. Quevedo, I. Salgado, I. Valdebenito & R. Vega. 2003. Antecedentes para el Cultivo del puye *Galaxias maculatus* (Pisces: Galaxiidae). Ediciones Universidad Católica de Temuco, Temuco, 144 pp.
- Barnes, M. & C. Soupier. 2007. Evaluation of formalin and hydrogen peroxide treatment regimes on rainbow trout eyed eggs. *N. Am. J. Aquacult.*, 69: 5-10.
- Barnes, M., W. Sayler & R. Cordes. 2001. Use of formalin treatments during incubation of eyed eggs of brown trout. *N. Am. J. Aquacult.*, 63: 333-337.
- Barnes, M., W. Sayler & R. Cordes. 2002a. Formalin and handpicking regimes during rearing in vertical-flow tray incubators. *N. Am. J. Aquacult.*, 64: 129-135.
- Barnes, M., W. Sayler & R. Cordes. 2002b. Survival of rainbow trout yolk sac fry subjected to various formalin and handpicking regimes during rearing in vertical-flow tray incubators. *N. Am. J. Aquacult.*, 64: 129-135.
- Barnes, M., H. Stephenson & M. Gabel. 2003. Use of hydrogen peroxide and formalin treatments during incubation of landlocked fall Chinook salmon eyed eggs. *N. Am. J. Aquacult.*, 65: 151-154.
- Benzie, V. 1968. Stages in the normal development of *Galaxias maculatus attenuatus* (Jenyns). *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.*, 2: 606-627.
- Buchmann, K., J. Bresciani & C. Jappe. 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.
- Chalupnicki, M., H. Ketola, C. Starliper & D. Gallagher. 2011. Efficacy and toxicity of iodine disinfection of Atlantic salmon eggs. *N. Am. J. Aquacult.*, 73: 124-128.
- Chutima, K., K. Shuichi, K. Masaaki & Y. Motoi. 2005. Fungicidal effects of sodium hypochlorite solution on *Saprolegnia* isolated from eggs of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Fish. Sci.*, 71: 1188-1190.
- Fowler, L. & J. Banks. 1990. Iodophor toxicity to eggs and fry of fall Chinook salmon. *Prog. Fish-Cult.*, 52: 176-178.
- Froelich, S. & T. Engelhardt. 1996. Comparative effects of formalin and salt treatments on hatch rate of koi carp eggs. *Prog. Fish-Cult.*, 58: 209-211.
- Giesecker, C., S. Serfling & R. Reimschuessel. 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 253: 120-129.
- Howe, G., L. Marking, T. Bills & T. Schreier. 1995. Efficacy and toxicity of formalin solutions containing paraformaldehyde for fish and egg treatments. *Prog. Fish-Cult.*, 57: 147-152.
- Hussein, A., S. Wada, K. Hatai & A. Yamamoto. 2000. Antimycotic activity of eugenol against selected water molds. *J. Aquat. Anim. Health*, 12: 224-229.
- Huysentruyt, F. & D. Adriaens. 2005. Adhesive structures in the eggs of *Corydoras aeneus* (Gill, 1858; Callichthyidae). *J. Fish. Biol.*, 66: 871-876.
- Jodun, W. & M. Millard. 2001. Effect of yodophor concentration and duration of exposure during water hardening on survival of Atlantic salmon eggs. *N. Am. J. Aquacult.*, 63: 229-233.
- Khodabandeh, S. & B. Abtahi. 2006. Effects of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. *J. Appl. Ichthyol.*, 22: 54-56.
- Kitancharoen, N., A. Yamamoto & K. Hatai. 1998. Effects of sodium chloride, hydrogen peroxide and malachite green on fungal infection in rainbow trout eggs. *Biocontrol. Sci.*, 3: 113-115.
- Marking, L., J. Rach & T. Schreier. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Prog. Fish-Cult.*, 56: 225-231.
- Meinelt, T., M. Pietrock, K. Burnison & C. Steinberg. 2005. Formaldehyde toxicity is altered by calcium and organic matter. *J. Appl. Ichthyol.*, 21: 121-124.
- Mitchell, C. 1989. Laboratory culture of *Galaxias maculatus* and potential applications. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.*, 23: 325-336.
- Mifsud, C. & S. Rowland. 2008. Use of salt to control ichthyophthiriasis and prevent saprolegniosis in silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquacult. Res.*, 39: 1175-1180.
- Mischke, C. & D. Wise. 2008. Tolerance of channel catfish fry to abrupt pH changes. *N. Am. J. Aquacult.*, 70: 305-307.

- Mizuno, S., Y. Sasaki, N. Omoto & K. Imada. 2004. Elimination of adhesiveness in the eggs of shishamo smelt *Spirinchus lanceolatus* using kaolin treatment to achieve high hatching rate in an environment with a high iron concentration. *Aquaculture*, 242: 713-726.
- Oplinger, R. & E. Wagner. 2009. Toxicity of common aquaculture disinfectants to New Zealand mud snails and mud snail toxicants to rainbow trout eggs. *N. Am. J. Aquacult.*, 71: 229-237.
- Pedersen, L. & P. Pedersen. 2006. Temperature-dependent formaldehyde degradation in trickling filters. *N. Am. J. Aquacult.*, 68: 230-234.
- Phelps, R. & C. Walser. 1993. Effects of sea salt on the hatching of channel catfish eggs. *J. Aquat. Anim. Health*, 5: 205-207.
- Pravecek, J. & M. Barnes. 2003. Lack of effect of iodophor on survival of westslope cutthroat trout eggs during water hardening. *N. Am. J. Aquacult.*, 65: 266-268.
- Rasowo, J., O. Okoth & C. Ngugi. 2007. Effects of formaldehyde, sodium chloride, potassium permanganate, and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish *Clarias gariepinus* eggs. *Aquaculture*, 269: 271-277.
- Rodriguez, L., M. Abdo, C. Padilla, V. Zepeda, G. Velasco & N. Garcia. 2011. Effect of formalin, acriflavine and glutaraldehyde on disinfecting and hatching of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 46: 59-65.
- Rowland, S., C. Mifsud, M. Nixon, P. Read & M. Landos. 2008. Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). *Aquacult. Res.*, 40: 44-54.
- Rowland, S., M. Nixon, M. Landos, C. Mifsud, P. Read & P. Boyd. 2006. Effects of formalin on water quality and parasitic monogeneans on silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell) in earthen ponds. *Aquacult. Res.*, 37: 869-876.
- Schreier, T., J. Rach & G. Howe. 1996. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*, 140: 323-331.
- Small, B. & N. Chatakondi. 2006. Efficacy of formalin as an egg disinfectant for improving hybrid catfish (channel catfish x blue catfish) hatching success. *N. Am. J. Aquacult.*, 68: 9-13.
- Sokal, R. & J. Rohlf. 1980. *Introducción a la bioestadística*. Editorial Reverté, Madrid, 362 pp.
- Soupir, C. & M. Barnes. 2006. Reduced formalin and hydrogen peroxide treatments during walleye egg incubation. *N. Am. J. Aquacult.*, 68: 276-280.
- Sutela, T., P. Pasanen, P. Louhi & A. Maki-Petays. 2007. Impacts of water quality and handpicking of dead eggs on the survival of brown trout and Atlantic salmon eggs. *N. Am. J. Aquacult.*, 69: 235-238.
- Tendencia, E. 2003. Iodine disinfection of grouper *Epinephelus coioides* eggs. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, 23: 191-196.
- Taylor, S. & J. Bailey. 1979. Saprolegnia: control of fungus on incubating eggs of pink salmon by treating with seawater. *Prog. Fish-Cult.*, 41: 181-183.
- Yamamoto, A., S. Toyomura, M. Saneyoshi & K. Hatai. 2001. Control of fungal infection of salmonid eggs by hydrogen peroxide. *Fish. Pathol.*, 36: 241-246.
- Wagner, E., R. Arndt, E. Billman, A. Forest & W. Cavender. 2008. Comparison of the efficacy of iodine, formalin, salt, and hydrogen peroxide for control of external bacteria on rainbow trout eggs. *N. Am. J. Aquacult.*, 70: 118-127.
- Zaror, L., L. Collado, H. Bohle, E. Landskron, J. Montana & F. Avendano. 2004. *Saprolegnia parasitica* in salmon and trout from southern Chile. *Arch. Med. Vet.*, 36: 71-78.

Received: 7 May 2015; Accepted: 7 March 2016