

TOLERANCIA *IN VITRO* DE *FUSARIUM SOLANI* Y *FUSARIUM SEMITECTUM* (ANAMORFOS, ASCOMYCOTA) A LA EXPOSICIÓN A DESINFECTANTES DE SUPERFICIE UTILIZADOS EN ACUICULTURA

SUANI G. PACHECO MARINO^{1,2}, MARTA N. CABELLO^{1,3} y ALFREDO SALIBIÁN^{3,4}

Summary: *In vitro* tolerance of *Fusarium semitectum* and *Fusarium solani* (anamorphic, Ascomycota) exposed to surface disinfectant commonly used in aquaculture. An *in vitro* evaluation of the antifungal effect of acetic acid (AcH), buffered acetic acid (AcH+AcNa), potassium iodide (KI) and Iodopovidone (IP); on the growth rate (GR) of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 1881 and *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel, 1875 was performed. Both fungal species were isolated from eggs of the Argentinian silverside *Odontesthes bonariensis* (Cuvier & Valenciennes, 1835). The studied substances are commonly used in fish farming as surface disinfectants. The tested concentrations of these substances exhibited antifungal activity for both strains at concentrations higher than their 96h median lethal concentrations (LC50-96h) for the treated eggs; concentrations below the (LC50-96h) exhibited little or no effect.

Key words: Acetic acid; fungicides, *in-vitro* growth inhibition, Iodophors, *Odontesthes bonariensis* eggs.

Resumen: Se evaluó *in vitro* el efecto del: ácido acético (AcH), ácido acético tamponado (AcH+AcNa), yoduro de potasio (IK) y Iodopovidona (IP) sobre la tasa de crecimiento (TC) de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 1881 y *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel, 1875. Ambas especies fueron aisladas de ovas de *Odontesthes bonariensis* (Cuvier & Valenciennes, 1835). Las sustancias estudiadas son comúnmente utilizadas en acuicultura como desinfectantes de superficie. Las concentraciones ensayadas con actividad fungicida para ambas cepas fueron mucho más elevadas que las correspondientes concentraciones letales medias a 96 horas (CL50-96h) para ovas de pejerrey. Concentraciones inferiores a la CL50 - 96h exhibieron un efecto fungistático escaso o nulo.

Palabras clave: Ácido acético; fungicidas; inhibición del crecimiento *in-vitro*; Iodóforos; ovas de *Odontesthes bonariensis*.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones producidas por especies fúngicas del género *Fusarium* han sido descritas en gran variedad de organismos acuáticos, tanto de vida libre como en cautiverio (Hatai *et al.*, 1986; Crow *et*

al., 1995; Souheil *et al.*, 1999; Khoa *et al.*, 2004). Si bien, la magnitud de las repercusiones económicas de dichas infecciones son aún desconocidas, el efecto de la Fusariosis cobra importancia económica en el cultivo intensivo de crustáceos debido a las elevadas mortalidades que provoca.

La evaluación de potenciales agentes fungicidas destinados al tratamiento de infecciones causadas por organismos del Reino Fungi, es un temática que ha sido poco estudiada. Bell *et al.* (1990) evaluaron la eficacia *in vivo* del BG 101 (2-metil-4-isotiazolina-3-ona y 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona) en el control de mortalidades causadas por *F. solani* (Mart.) Sacc. 1881, en el camarón azul *Penaeus stylirostris* (Stimpson, 1874), pero su uso como fungicida está restringido al tratamiento de crustáceos debido a que dicha sustancia es muy tóxica para los peces. En la actualidad, las

¹ Instituto de Botánica C. Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 N° 477, B1900AVJ - La Plata, Buenos Aires, Argentina. (suani.pm@gmail.com).

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, C1033AAJ - Buenos Aires, Argentina.

³ Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Pcia. de Buenos Aires, Calle 526, entre 10 y 11, 1900 - La Plata, Argentina.

⁴ Departamento de Ciencias Básicas (PRODEA-INEDES), Universidad Nacional de Luján, Casilla de Correo 221, B6700ZBA - Luján, Argentina.

medidas de control de esta enfermedad en el cultivo intensivo de crustáceos se limitan a la profilaxis y prevención (Victoria Alday-Sanz com. pers.).

Por su parte, en el cultivo de peces, los tratamientos fungicidas se enfocan principalmente en control y prevención de la Saprolegniasis, habiéndose encontrado escasa información sobre el efecto que dichos fungicidas ejercen en organismos del Reino Fungi. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se determinó y comparó la acción fungicida del cloruro de sodio, verde de malaquita y la formalina, encontrando que *F. solani* (Mart.) Sacc. 1881 y *F. semitectum* Berk. & Ravenel 1875 toleran elevadas concentraciones de dichas sustancias (Pacheco Marino *et al.*, 2011).

Este trabajo tiene por objetivo la evaluación *in vitro* del potencial fungicida del ácido acético y de dos iodóforos, sustancias empleadas en acuicultura como desinfectantes de superficie, utilizando como especies blanco a *F. solani* y *F. semitectum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el efecto fungicida del: ácido acético (glacial) (AcH), ácido acético tamponado (AcH+AcNa), ioduro de potasio (IK) y Iodopovidona (IP). Se utilizaron reactivos de grado analítico; la Iodopovidona fue un formulado comercial al 10% ("Pervinox"). Para la selección del rango de concentraciones a ensayar se consideraron las concentraciones letales medias a 96 horas (CL50-96h) y las Concentraciones de No Efecto (NEC) de los fungicidas para ovas de pejerrey en el estadio "ojos pigmentados" 147 horas post fecundación (Chalde *et al.*, 2011), las que fueron determinadas en nuestro laboratorio (Pacheco Marino & Salibián, 2010). Los bioensayos de efecto fungicida se realizaron con *Fusarium semitectum* (LPS 1001) y *F. solani* (LPS 1002), ambas cepas fueron aisladas de ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis* y depositadas en la colección de cultivos del Instituto de Botánica C. Spegazzini.

Se utilizó como medio base Agar Czapek-Dox modificado (Kirk *et al.*, 2001), con agregado de cada sustancia en estado puro, exceptuando al IK que fue añadido en una solución al 1%, hasta obtener las siguientes concentraciones nominales mencionadas mg.L⁻¹:

• AcH: 0 (control), 10–15–25–50–100–200–500–1000.

- AcH+AcNa: 0 (control), 100–200–400–600–800–1000–1500–2000.
- IK: 0 (control), 20–30–50–72,5–145–240–480–960.
- IP: 0 (control), 30–50–80–120–180–360–720–1440.

Las placas fueron sembradas por cuadruplicado con inóculos de 3 mm diámetro, provenientes de cultivos monospóricos. Se incubaron a 17 °C, a partir del tercer día de incubación y durante dos semanas se midió el diámetro de las colonias diariamente en la misma dirección, utilizando un calibre Vernier (precisión = 0,1 mm), hasta que el grupo Control de alguna de las réplicas alcanzara el borde de la placa. En las placas en las que no se observó crecimiento durante las dos semanas, el ensayo se prolongó por una semana adicional.

Las tasas de crecimiento (TC) para cada concentración fueron expresadas como la pendiente de la línea de regresión y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. La inhibición del crecimiento (IC) se indica como porcentaje de reducción del diámetro de las colonias en los medios con cada sustancia comparándolo con el del grupo control. Este parámetro fue calculado aplicando la siguiente fórmula:

$$IC (\%) = 100 - [100 (\text{Diámetro de la colonia tratada} / \text{Diámetro de la colonia Control})]$$

Se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las TC utilizando un ANOVA de una vía y se realizaron comparaciones entre grupos empleando el test de multicomparaciones *a posteriori* de Dunnett (Zar, 2010), en ambos casos con la ayuda del software XLStat version 7.5.

RESULTADOS

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. En la Tabla 1 se presentan: la pendiente de la recta de regresión, el coeficiente de correlación de Pearson y los porcentajes de inhibición del crecimiento (IC) para cada especie y sustancia.

Los valores de las pendientes de los controles indican que la TC de *F. semitectum* fue el doble que la de *F. solani* (relación 2.0-2.2). Los coeficientes de correlación de Pearson oscilaron en torno a 0,99 (excepto en las concentraciones más elevadas de AcH+AcNa).

Tabla 1. Valores de Pendiente, coeficiente de correlación de Pearson e Inhibición del crecimiento % (IC) de *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum*, expuestos a diferentes concentraciones de ácido acético, ácido acético tamponado, ioduro de potasio y iodopovidona. Las pendientes en cursiva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al Control.

	Concentración [mg.L ⁻¹]	<i>Fusarium solani</i>			<i>Fusarium semitectum</i>		
		Pendiente	Coeficiente de Pearson	Inhibición del crecimiento (%)	Pendiente	Coeficiente de Pearson	Inhibición del crecimiento (%)
Ácido Acético	0	0,476	1,000		1,007	0,996	
	10	0,484	0,998	0,13	1,000	0,999	-0,80
	15	0,476	1,000	2,67	0,979	0,999	1,06
	25	0,479	0,999	0,13	1,002	0,999	-1,11
	50	0,464	0,999	3,94	0,979	0,999	0,00
	100	0,489	1,000	-0,51	0,973	0,999	-0,16
	200	0,508	1,000	-4,96	0,987	0,999	0,00
	500	0,397	0,993	12,47	0,706	0,999	22,17
	1000	0,014	0,577	91,09	0,063	0,839	86,62
	2000			100,00			100,00
Ácido Acético Tamponado	0	0,370	0,993		0,808	1,000	
	100	0,478	1,000	-25,00	0,933	0,999	-11,58
	200	0,439	0,993	-19,09	0,881	0,999	-6,07
	400	0,354	0,984	-2,92	0,671	0,992	11,21
	600	0,236	0,952	23,90	0,488	0,983	30,33
	800	0,055	0,788	73,97	0,262	0,931	56,99
	1000			100,00	0,005	0,577	98,16
	1500			100,00			100,00
	2000			100,00			100,00
Ioduro de Potasio	0	0,315	0,998		0,642	0,997	
	20	0,312	0,988	-5,77	0,636	0,997	3,49
	30	0,286	0,990	0,96	0,613	0,999	6,11
	50	0,306	0,992	-4,81	0,630	0,998	3,06
	72,5	0,302	0,992	-6,73	0,629	0,996	1,75
	145	0,313	0,991	-5,77	0,605	0,995	4,80
	240	0,262	0,992	7,69	0,553	0,992	10,92
	480	0,268	0,991	7,69	0,530	0,990	11,79
	960	0,245	0,982	10,58	0,400	0,979	28,82
	1440	0,271	0,974	0,00			
Iodopovidona	0	0,308	0,986		0,642	0,997	
	30	0,317	0,990	-2,88	0,642	0,996	-0,44
	50	0,296	0,992	-0,96	0,642	0,996	-1,31
	80	0,322	0,988	-5,77	0,643	0,994	-2,18
	120	0,306	0,992	-5,77	0,643	0,997	-0,44
	180	0,312	0,990	-4,81	0,610	0,993	2,18
	360	0,289	0,990	0,00	0,491	0,985	14,85
	720	0,253	0,973	3,85	0,177	0,870	57,64
	1440	0,271	0,974	0,00			100,00

En la Fig. 1 A-B se ilustra el efecto del AcH y el AcH+AcNa sobre el crecimiento de ambas especies fúngicas al octavo día de exposición. Podemos observar que el AcH no inhibe el crecimiento de ambas especies a concentraciones inferiores a la CL-50 96h para ovas de pejerrey (228 mg.L⁻¹). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las TC de los Controles y las placas expuestas a 500 y 1000 mg.L⁻¹, en donde la IC fue de 12,47 y 91,09% para *F. solani* y 22,17 y 86,62% para *F. semitectum*. A diferencia del caso anterior, el AcH +AcNa (Fig. 1B) exhibió un efecto levemente fungistático a concentraciones inferiores a la CL-50 96h (704 mg.L⁻¹). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las TC del

Control y las placas de *F. semitectum* expuestas a concentraciones mayor iguales a 400 mg.L⁻¹ ($p < 0,05$), donde la IC fue 11,21%. Para *F. solani* se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las TC del Control y las placas expuestas a concentraciones mayores iguales a 600 mg.L⁻¹. En ambos casos, esta sustancia actuó como fungicida a concentraciones superiores a 800 mg.L⁻¹.

En la Fig. 1 C-D se grafican los resultados referidos al efecto inhibitorio de los dos compuestos iodados ensayados, ninguna de las concentraciones tuvieron efecto fungicida. El efecto fungistático del IK (Fig. 1C) fue observado en concentraciones superiores a la CL-50 96h para ovas de pejerrey (147 mg.L⁻¹). En ambas especies, se encontraron diferencias estadísticamente

significativas en las TC de los controles y las placas expuestas a concentraciones mayor iguales a 240 mg.L⁻¹ de IK. En las placas expuestas a 960 mg.L⁻¹ las IC resultaron en 28,82 y 10,57% y para *F. semitectum* y *F. solani*, respectivamente. Por su parte, la Iodopovidona tampoco tuvo un efecto inhibitorio a concentraciones inferiores a la CL-50 96h para ovas de pejerrey (198 mg.L⁻¹). El crecimiento de *F. solani* no fue inhibido por IP a ninguna concentración; sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las TC de *F. semitectum* expuesto a concentraciones mayor iguales a 360 mg.L⁻¹ (Fig. 1D).

DISCUSIÓN

Se observó que tanto para *F. solani* como para *F. semitectum* el Ácido Acético tuvo un efecto inhibitorio a concentraciones superiores a 500 mg.L⁻¹; concentraciones inferiores mostraron un efecto levemente estimulador del crecimiento en *F. solani* y levemente inhibitorio en *F. semitectum*. No es de extrañar la capacidad de ambas especies

para crecer en las concentraciones de Ácido Acético ensayadas, puesto que la mayoría de hongos del suelo se desarrollan perfectamente en ambientes ligeramente ácidos. Esta cualidad puede verse exacerbada, sobre todo en condiciones de cultivo, donde los organismos disponen de los nutrientes necesarios para poner en marcha los mecanismos de control del medio interno y así lograr contrarrestar el descenso del pH. (Domsh *et al.*, 1993). Bennett *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 letal. Kang *et al.* (2003) encontraron que a una concentración de ácido acético de 3 mg.L⁻¹ el crecimiento de *Colletotrichum* spp. es totalmente inhibido. Efectos similares fueron observados por Conková *et al.* (1993) en *Penicillium glabrum*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium moniliforme* y *Cladosporium sphaerospermum*; donde el crecimiento de estas especies fue inhibido al ser expuestas a 50 mg.L⁻¹ de ácido acético.

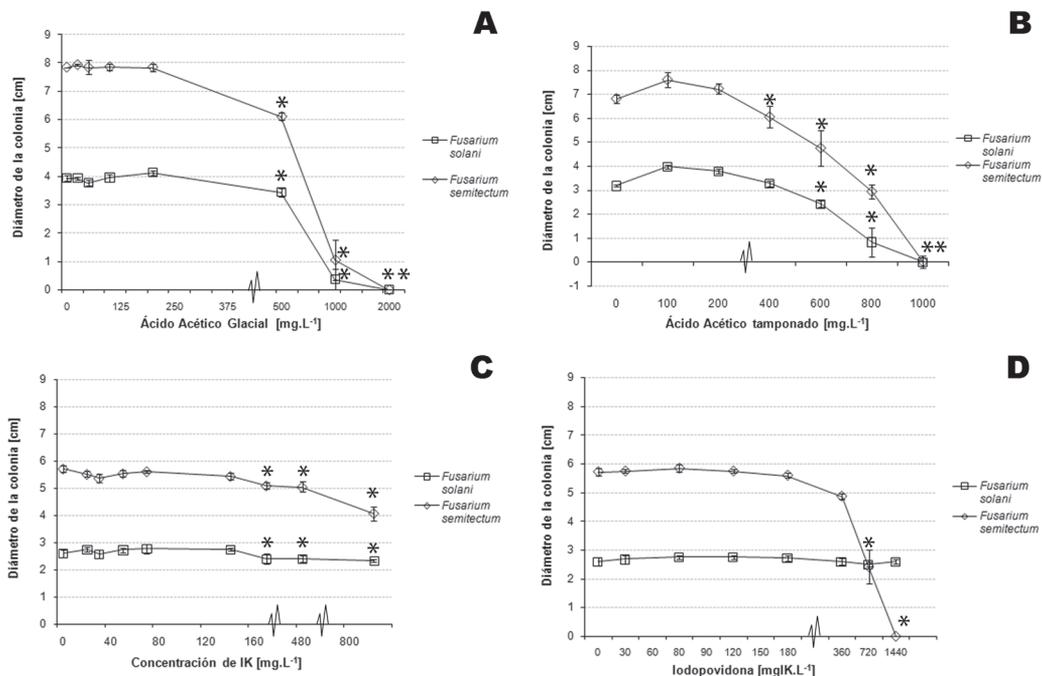


Fig. 1. Crecimiento de *Fusarium solani* y *Fusarium semitectum* en Czapeck Dox luego de 8 días de exposición. **A:** Efecto del Ácido Acético Glacial. **B:** Ácido Acético tamponado. **C:** Loduro de Potasio. **D:** Iodopovidona. Los datos son expresados como medias ± desviación estándar (D.E.) del diámetro de las colonias. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del Control.

Nosotros registramos una respuesta diferente al exponer a *F. solani* y *F. semitectum* al ácido acético tamponado, donde se observó un efecto inhibitorio en 400 y 600 mg.L⁻¹ para *F. semitectum* y *F. solani* respectivamente, sugiriendo que *F. semitectum* podría ser más sensible al ácido acético que *F. solani*. En la actualidad se desconoce la naturaleza de la toxicidad del 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 inhibe el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Chaetomium globosum*, pero sí el de otras especies. Bennett *et al.* (1976) encontraron que *Aspergillus parasiticus* puede 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 la síntesis de metabolitos secundarios como toxinas y pigmentos; estos hallazgos llevaron a dichos autores a concluir que el ácido acético tendría solamente un efecto fungistático.

El yodo es considerado, principalmente, un efectivo agente contra bacterias y virus (Wright & Snow, 1975; Alderman, 1984), y como un efectivo tratamiento para la Saprolegniasis (Subasinghe & Sommerville, 1985; Schreck *et al.*, 1990, 1992). Sin embargo, 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 el ioduro de potasio sobre el Ascomycota levaduriforme *Sporothrix schenckii* y encontraron que estas sustancias provocaron alteraciones ultraestructurales y también una disminución en su tasa de germinación. Hallazgos similares fueron reportados por Torres-Mendoza *et al.* (1997), quienes afirman que tanto el yodo, como ioduro, a una concentración de 39 µM, son capaces 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 yodo 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. En nuestro caso, el ioduro de potasio no ejerció un efecto inhibitorio

importante sobre las cepas de *Fusarium* estudiadas en este trabajo, lo que concuerda con lo observado por Khodabandeh & Abtahi (2006). El crecimiento de *F. semitectum* fue parcialmente inhibido (28,82%) a una concentración de 960 mg.L⁻¹, una concentración muy elevada para ser utilizada como tratamiento en ovas de pejerrey, ya que se encuentra por encima de su respectiva CL50 - 96h para ovas de pejerrey. Al exponer a ambas especies a la Iodopovidona se observó que las concentraciones ensayadas no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *F. solani*, pero inhibieron el crecimiento de *F. semitectum*, habiéndose observado una IC de 56,64 % en las placas expuestas a 720 mg.L⁻¹ y un efecto letal a 1440 mg.L⁻¹. Esta sensibilidad diferencial no fue observada en los ensayos con IK, lo que sugiere que el efecto inhibitorio de la Iodopovidona sobre *F. semitectum* puede ser atribuido a algún componente del formulado y no al ingrediente activo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDERMAN, D. J. 1984. The toxicity of iodophors to salmonid eggs. *Aquaculture* 40: 7-16.
- BELL, T. A., D. V. LIGHTNER & R. R. WILLIAMS. 1990. A promising new chemotherapeutant for use in treatment of *Fusarium solani* infections in penaeid shrimp. *J. World Aquacult. Soc.* 21:131-136.
- BENNETT, J. W., L. S. LEE & G. G. GAAR. 1976. Effect of Acetone on production of Aflatoxins and Versicolorin pigments by resting cell cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Mycophatologia* 58: 9-12.
- CHALDE, T., D. A. FERNÁNDEZ, V. E. CUSSAC & G. M. SOMOZA. 2011. The effect of rearing temperature in larval development of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* - Morphological indicators of development. *Neotrop. Ichthyol.* 9: 747-756.
- CONKOVÁ, E., L. PARA & A. KOCISOVA. 1993. Inhibition of the molds growth by selected organic-acids. *Vet. Med.* 38: 723-727.
- CROW, G. L., J. A. BROCK & S. KAISER. 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.
- DOMSCH, K. H., W. GAMS & T. A. ANDERSON. 1993. *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. IHW-Verlag, Eching.
- HATAI, K., S. KUBOTA, N. KIDA & S. UDAGAWA. 1986. *Fusarium oxysporum* in Red Sea Bream (*Pagrus* sp.). *J. Wildlife Dis.* 22: 570-571.

- HIRUMA, M. & S. KAGAWA 1987. Ultrastructure of *Sporothrix schenckii* treated with iodine potassium iodide solution. *Mycopathologia* 97: 121-127.
- KIRK, P. M., P. F. CANNON, J. C. DAVID & J. A. STALPERS (Eds). 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th. ed. CABI, Wallingford.*
- KANG, H. C., Y. H. PARK & S. J. GO. 2003. Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiol. Res.* 158: 321-326.
- KHOA, L.V., K. HATAI & T. AOKI. 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. & 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.
- MUNIR, E. & M. SHIMADA. 2005. An inhibitory effect of acetate added to the culture 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, pp. 405-410. Bali.
- PACHECO MARINO, S. G. & A. SALIBIAN. 2010. Acute toxicity of three antifungal chemicals on silverside *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835) eggs. *Int. J. Environ. Health* 4: 333-341.
- PACHECO MARINO, S. G., N. M. CABELLO & A. SALIBIAN. 2011. Effect of three fungicides on *in vitro* growth of *Fusarium solani* and *Fusarium semitectum*, parasitic on *Odontesthes bonariensis* eggs. *Int. J. Environ. Health* 5: 293-303.
- SCHRECK, C. B., M. S. FITZPATRICK, L. L. MARKING, J. J. RACH, & S.M. JEFFREY. 1990. *Research to identify effective antifungal agents.* Annual Report, to Bonneville Power Administration, US Department of Energy, Portland, Oregon.
- SCHRECK, C. B., M. S. FITZPATRICK, L. L. MARKING, J. J. RACH & T. M. SCHREIER. 1992. *Research to identify effective antifungal agents.* Annual Report, Bonneville Power Administration, US Department of Energy, Portland, Oregon.
- SHIMOKAWA, O. & H. NAKAYAMA. 1999. Acetate-mediated growth inhibition in esterol 14 - α demethylation-deficient cells of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:100-105.
- SOUHEIL, H., A. VEY, P. THUET & J. P. TRILLES. 1999. Pathogenic and toxic effects of *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) on survival and osmoregulatory capacity of *Penaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture* 178: 209-224.
- SUBASINGHE, R. P. & C. SOMMERVILLE. 1985. Disinfection of *Oreochromis mossambicus* (Peters) eggs against commonly occurring potentially pathogenic bacteria and fungi under artificial hatchery conditions. *Aquacult. Fish. Manag.* 16: 121-127.
- TORRES-MENDOZA, B. M., E. VÁZQUEZ-VALLS & A. GONZÁLEZ-MENDOZA. 1997. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. *Revista Iber. Micol.* 14: 98-100.
- WRIGHT, L. D. & J. R. SNOW 1975. The effect of six chemicals for disinfection of largemouth bass eggs. *Prog. Fish-Cult.* 37: 213-21.
- ZAR, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis.* 5th Ed. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River.

Recibido el 5 de mayo de 2012, aceptado el 22 de abril de 2013.