

Efecto de la acriflavina, formalina y glutaraldehído sobre la desinfección y la eclosión de los huevos del botete diana *Sphoeroides annulatus*

Effect of formalin, acriflavine and glutaraldehyde on disinfecting and hatching of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*

L. Estela Rodríguez-Ibarra¹, M. Isabel Abdo-de la Parra¹, Gustavo A. Rodríguez-Montes de Oca², Cintia Y. Padilla-Aguilar³, V. Yadira Zepeda-Mercado², Gabriela Velasco-Blanco¹ y Noemí García-Aguilar¹

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC., Av. Sábalo-Cerritos S/N, CP 82100 Mazatlán, Sinaloa, México. eibarra@ciad.mx

²Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen S/N, CP 82000 Mazatlán, Sinaloa, México

³Instituto Tecnológico de Mazatlán, Calle Corsario 1 No. 203, Col. Urias. CP 82070, AP 757, Mazatlán, Sinaloa, México

Abstract.- Three prophylactic treatments using three dosages each were used as surface disinfectants in bullseye puffer *Sphoeroides annulatus* eggs to study their effect on bacterial load reduction and hatching rate. Eggs were treated with proteolytic enzyme to remove stickiness. Tested treatments were: acriflavine (A) at a concentration of 2.5, 5 and 10 ppm for 1 min; formalin (F) at 10, 50 and 100 ppm for 30 min and glutaraldehyde (G) at 50, 100 and 200 ppm for 5 min, as well as a control group with no treatment (C), using three replicates per treatment. After disinfection, an egg sample from each replicate was inoculated in duplicate on TCBS and marine agar culture media to assess bacterial growth (CFU mL⁻¹). The eggs were incubated and their hatching rate determined. Culture media tested negative for *Vibrio* spp. in all treatments. However, the growth of heterotrophic bacteria was present in all experimental groups; G-100 showed a significant reduction in CFU ($4.00 \pm 2.8 \times 10^2$ mL⁻¹), whereas A-2.5 and F-50 had significantly higher CFU values ($3.45 \pm 0.4 \times 10^4$ and $5.73 \pm 0.3 \times 10^4$ mL⁻¹ respectively). By not disinfecting the eggs, a higher hatching rate was obtained ($96.1 \pm 6.2\%$), however relatively high CFU counts ($1.22 \pm 0.1 \times 10^4$ mL⁻¹) were observed in this treatment, while the lowest hatching rate was found in eggs disinfected with A-5 ($12.3 \pm 6.3\%$). Thus, the use of stickiness removal procedures prior to incubation of bullseye puffer eggs seems to be enough to produce good hatching rates.

Key words: Bacteria, CFU, incubation

Resumen.- Se evaluaron tres tratamientos profilácticos, a tres dosis diferentes cada uno, para desinfectar huevos de botete diana *Sphoeroides annulatus* y determinar su efecto en la reducción de la carga bacteriana y el porcentaje de eclosión. Los huevos fueron tratados con enzima proteolítica para desgomarlos. Los tratamientos se realizaron por triplicado: acriflavina (A) a concentraciones de 2,5, 5, y 10 ppm por 1 min, formalina (F) a 10, 50 y 100 ppm por 30 min y glutaraldehído (G) a 50, 100 y 200 ppm por 5 min y un grupo control sin tratamiento (C). Se inoculó por duplicado una muestra de huevos de cada réplica en agar TCBS y marino para evaluar el crecimiento bacteriano (UFC mL⁻¹); los huevos se incubaron y se determinó el porcentaje de eclosión. Los resultados del recuento en todos los tratamientos fueron negativos para *Vibrio* spp.; sin embargo, las bacterias heterótrofas se presentaron en todos los tratamientos; en G-100 ppm se observó la menor cantidad de UFC ($4,00 \pm 2,8 \times 10^2$ mL⁻¹) y las más altas se obtuvieron en A-2,5 y F-50 ($3,45 \pm 0,4 \times 10^4$ y $5,73 \pm 0,3 \times 10^4$ UFC mL⁻¹, respectivamente). El porcentaje de eclosión más alto se obtuvo en los huevos sin desinfectar ($96,1 \pm 6,2\%$), a pesar de la cantidad de bacterias presentes ($1,22 \pm 0,1 \times 10^4$ UFC mL⁻¹) y el porcentaje de eclosión más bajo se presentó en los huevos desinfectados con A-5 ($12,3 \pm 6,3\%$). Por lo tanto, se recomienda solo eliminar la capa adherente de los huevos antes de la incubación.

Palabras clave: Bacterias, UFC, incubación

INTRODUCCIÓN

El botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1843), es un teleósteo que se captura en aguas cálidas del Océano Pacífico (Robertson & Allen 2006) y es considerado una especie de potencial interés en la acuicultura, debido a su tolerancia al manejo en condiciones de cautiverio, su alto precio en el mercado mexicano y su alta calidad y sabor de su carne (Martínez-Palacios *et al.* 2002, Chávez-Sánchez *et al.* 2008, García-Ortega 2009). En condiciones de cautiverio, las hembras de esta especie usualmente no desovan en forma natural, por lo cual el desove es inducido por un análogo de gonadotropina (Duncan *et al.* 2003a, Chávez-Sánchez *et al.* 2008).

Los huevos del botete diana miden $0,71 \pm 0,01$ mm de diámetro, son esféricos, transparentes y con una capa adhesiva, que les permite adherirse a diferentes sustratos (Martínez-Palacios *et al.* 2002, Komar *et al.* 2004, Abdo-de la Parra *et al.* 2010). En condiciones de cultivo, esta característica adherente del huevo representa un problema durante la incubación, ya que se aglutinan entre ellos en forma de racimos, no permitiendo la oxigenación a los que quedan al interior de éstos, provocando una alta mortalidad de huevos. Mediante el uso de productos naturales y químicos (*e.g.*, piña, papaya, enzimas, ácido tánico) esta capa adherente puede disolverse, facilitando la incubación de los huevos y mejorando los porcentajes de eclosión (Rodríguez-Ibarra *et al.* 2010a). Sin embargo, para satisfacer la necesidad de la producción masiva de larvas de esta especie, se requiere mejorar el porcentaje de eclosión y garantizar la obtención de una gran número de juveniles para su engorda.

Dentro de las técnicas de incubación intensiva de huevos, el uso de desinfectantes es necesario, ya que el objetivo primordial es reducir la carga bacteriana, disminuir la mortalidad de los embriones durante este período, aumentar los porcentajes de eclosión e incrementar la supervivencia de las larvas (Ibarra-Castro 2008). Actualmente, existen diversos productos químicos para desinfectar los huevos de peces, entre los que se encuentran el yodo, la formalina, la acriflavina y el glutaraldehído que han sido utilizados en especies marinas con resultados efectivos (Van Waters 1988, Salvesen *et al.* 1997, Tucker 1998, Escaffre *et al.* 2001, Katharios *et al.* 2007, Ibarra-Castro 2008). En peces marinos, el yodo se ha aplicado para desinfectar huevos de diversas especies, y se ha observado su eficiencia en cuanto a la reducción de la carga bacteriana (Katharios *et al.* 2007, Stuart *et al.* 2010). La acriflavina se ha usado tradicionalmente para desinfectar huevos de peces marinos como es el caso del barramundi (*Lates calcarifer*),

obteniendo resultados de eclosión mayores de 80% (Tucker 1998, Álvarez-Lajonchère & Tsuzuki 2008). El uso de la formalina para desinfectar huevos de especies dulceacuícolas y marinas ha sido muy eficiente, además es un agente químico aprobado en Estados Unidos de América para el mantenimiento saludable de cultivos intensivos de peces (Van Waters 1988, Shereier *et al.* 1996, Giesecker *et al.* 2006, Ibarra-Castro 2008); así mismo, el glutaraldehído se ha aplicado en especies marinas debido a su amplio espectro de actividad para desinfectar los huevos (Block 1977, Vadstein *et al.* 1993, Harboe *et al.* 1994, Salvesen & Vadstein 1995).

Los protocolos de la eliminación de la capa adherente y el uso de jarras de incubación McDonald se implementaron por primera vez en el botete diana por Rodríguez-Ibarra *et al.* (2010a, b), aunque no existe información publicada sobre la optimización de técnicas de incubación de huevos de esta especie; las únicas publicaciones sobre el cultivo del botete, se refieren a otra especie del género *Takifugu* (Tetraodontidae) cultivada en Asia (Fujita & Honma 1991, Fujita & Abe 1992). La evaluación de los desinfectantes propuestos en el presente estudio (acriflavina, formalina y glutaraldehído) a diferentes dosis y tiempos de exposición, se lleva a cabo también por primera vez en esta especie, con el objetivo de estudiar el efecto de estos agentes profilácticos sobre la carga bacteriana de los huevos y el porcentaje de eclosión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los huevos de botete fueron proporcionados por el laboratorio de reproducción de peces marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, de una hembra de 976 g y 32,5 cm de longitud total, inducida al desove por medio de la hormona liberadora de gonadotropina análoga (GnRH_a) en implantes de EVAc de liberación rápida, preparados en el laboratorio del Prof. Zohar¹, (Zohar *et al.* 1990). Para la fecundación se utilizó un macho de 814 g y 31 cm de longitud total. La fecundación de los huevos fue artificial, mezclando los huevos y el semen junto con el agua marina al mismo tiempo, bajo condiciones de asepsia. Posteriormente se les aplicó un tratamiento con una solución de enzima proteolítica proteasa (Sigma-Aldrich[®]) a una concentración de 5 mL L⁻¹ durante 8 min para eliminar su adherencia (Rodríguez-Ibarra *et al.* 2010a).

¹Y Zohar. University of Maryland Biotechnology Institute, Center of Marine Biotechnology Baltimore, Maryland, Estados Unidos de América

Tabla 1. Dosis y tiempo de exposición de los tratamientos usados para desinfectar los huevos de botete diana *Sphoeroides annulatus* / Dosage and exposure time during disinfectant treatments for fertilized bullseye puffer fish eggs *Sphoeroides annulatus*

Tratamientos	Abreviación	Químico	Dosis (ppm)	Tiempo de exposición (min)
1	C	Sin tratamiento	0	0
2	A-2,5	Acriflavina	2,5	1
3	A -5	Acriflavina	5	1
4	A -10	Acriflavina	10	1
5	F- 10	Formalina	10	30
6	F- 50	Formalina	50	30
7	F-100	Formalina	100	30
8	G -50	Glutaraldehído	50	5
9	G-100	Glutaraldehído	100	5
10	G-200	Glutaraldehído	200	5

Los tratamientos profilácticos que se utilizaron fueron acriflavina, formalina (37%) y glutaraldehído a tres diferentes concentraciones, con respecto a un control (huevos sin desinfectar) (Tabla 1); cada tratamiento se realizó por triplicado.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LOS HUEVOS

El tratamiento profiláctico de los huevos se realizó en vasos de precipitado en un volumen total de 600 mL, con aireación constante por unidad experimental. Posteriormente los huevos se enjuagaron con agua de mar filtrada y esterilizada por UV, y en cada tratamiento bajo condiciones estériles se recolectó con una micropipeta una muestra de 500 μ L, la cual contenía aproximadamente 20 huevos por tratamiento. Enseguida la muestra se colocó en un vial de 1 mL que contenía una solución salina estéril y fue macerada; posteriormente se realizaron dos diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y esta última se utilizó para sembrar en dos medios de cultivo por duplicado, con agar TCBS Merck® para el recuento de *Vibrio* spp. y agar marino (medio Zobell) Difco® para bacterias heterótrofas totales. Se incubaron a 30°C y las lecturas se realizaron a las 24 y 48 h, haciendo el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) en un contador Darkfield Québec®.

INCUBACIÓN DE LOS HUEVOS

Después de llevar a cabo los tratamientos de desinfección, los huevos tratados fueron enjuagados con agua de mar filtrada y esterilizada por UV y se incubaron en jarras McDonald con capacidad de 6 L (3333 huevosL⁻¹), provistos de suficiente aireación para mantener los huevos a flote.

Las condiciones de incubación fueron las siguientes: temperatura promedio de $28,90 \pm 0,92$ °C, oxígeno disuelto de $6,97 \pm 0,63$ g mL⁻¹ y salinidad de $32,8 \pm 0,98$ ups.

Los porcentajes de eclosión se calcularon de acuerdo a la fórmula $E = [L / (L+H)] \cdot 100$, donde E = porcentaje de eclosión, L = número de larvas, y H = número de huevos.

Para evaluar el efecto de cada tratamiento sobre el desarrollo embrionario y el tamaño de las larvas recién eclosionadas, se hicieron observaciones hasta la eclosión y se registró la longitud total (LT) de 20 larvas por cada una de las réplicas mediante un vernier digital (precisión 0,001 mm).

Los resultados del porcentaje de eclosión fueron transformados a arcoseno y se determinó la normalidad de su distribución mediante la prueba de Bartlett, así como la homocedasticidad de la varianza (prueba de Levene). Los datos presentaron distribución normal y fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (ANDEVA, STATGRAPHICS Plus 5.1 (Statgraphics™ net), y cuando se presentaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey. En todos los análisis estadísticos aplicados se usó un nivel de significancia de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos del estudio bacteriológico realizado a los huevos de botete diana, no se encontraron bacterias del género *Vibrio* spp. en ninguno de los tratamientos, mientras que las bacterias heterótrofas se hicieron presentes en cada uno de ellos. La mayor cantidad de UFC se observó en los tratamientos con formalina a una dosis de 50 ppm ($5,73 \pm 0,3 \times 10^4$ mL⁻¹), y en acriflavina en la dosis de 2,5 ppm ($3,45 \pm 0,4 \times 10^4$ mL⁻¹). Mientras que la menor cantidad de UFC se registró en los tratamientos donde se suministró glutaraldehído a dosis de 50 y 100 ($4,85 \pm 0,2$ y $4,00 \pm 2,8 \times 10^2$ mL⁻¹ respectivamente).

El porcentaje de fecundación para todos los tratamientos fue de $96,2 \pm 2,4\%$ y, de acuerdo al análisis de varianza (ANDEVA) aplicado a los datos de eclosión, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(9, 20)} = 67,01$, $P < 0,001$), en donde el valor más alto de eclosión se obtuvo en el tratamiento control $96,10 \pm 6,21\%$, mientras que el porcentaje más bajo ($12,38 \pm 6,30\%$) se presentó en el tratamiento con la acriflavina a una dosis de 5 ppm (Fig. 1).

La valoración bacteriológica de los tratamientos con la acriflavina, muestran una gran cantidad de bacterias

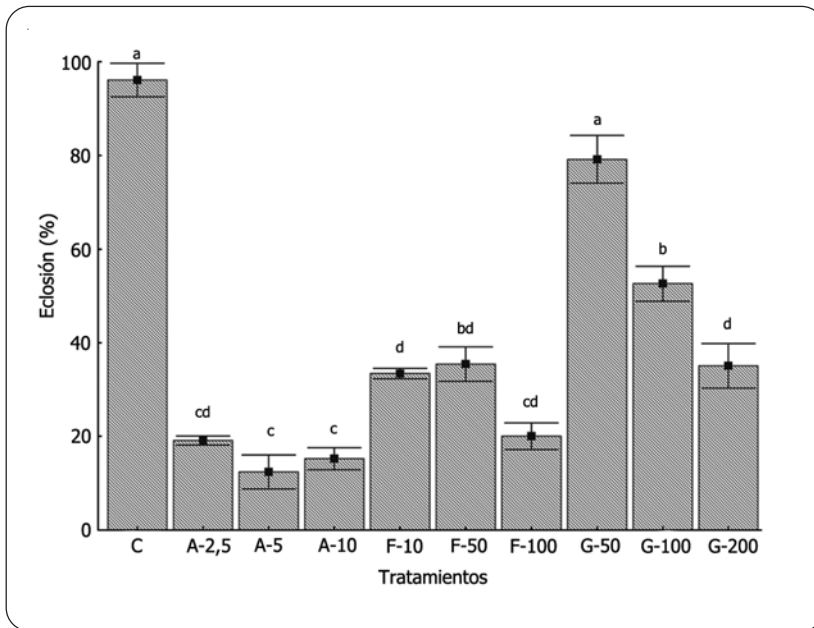


Figura 1. Porcentaje de eclosión (promedio \pm d.e.) de los tratamientos profilácticos más el control (C) de los huevos de botete diana, *Sphaeroides annulatus*. Valores medios con superíndices diferentes indican diferencias significativas / The hatching rate (average \pm s.d.) of selected treatments as disinfectants plus a control group (C), of fertilized eggs of the bullseye puffer fish, *Sphaeroides annulatus*. Different letters above bars indicate significant differences between experimental groups

heterótrofas en dos de las tres dosis aplicadas A-2,5 y A-5 ($3,45 \pm 0,4$ y $1,30 \pm 0,2 \times 10^4$ UFC mL⁻¹). Asimismo, al evaluar el desarrollo embrionario de los huevos de botete diana a las 24 h post-fecundación (hpf) (Fig. 2a), se observó un cambio de color en la mayoría de ellos (ya que los huevos muertos presentan un color oscuro y opaco); y otros se deshicieron y deformaron. Por lo anterior, se obtuvo un alto porcentaje de mortalidad embrionaria y por consecuencia bajos porcentajes de eclosión en las tres dosis aplicadas (Fig. 2b).

En el caso de la formalina a dosis de 50 ppm, se observó que aún con esta cantidad de bacterias presentes en los huevos ($5,73 \pm 0,3 \times 10^4$ UFC mL⁻¹), el porcentaje de eclosión fue mayor ($35,44 \pm 6,34\%$) con respecto a las otras dos dosis de formalina (10 y 100 ppm) y a las tres dosis de acriflavina. El glutaraldehído resultó ser el mejor desinfectante, ya que los huevos de botete diana tratados a dosis de 50 y 100 ppm, se reduce significativamente la carga bacteriana ($4,85 \pm 0,2$ y $4,00 \pm 2,8 \times 10^2$ UFC mL⁻¹). Y la dosis de 50 fue donde se obtuvo el mejor porcentaje de eclosión ($79,16 \pm 8,18\%$) de todos los desinfectantes aplicados (Fig. 1).

En relación a los huevos sin tratamiento, se observó un mejor desarrollo embrionario desde las 24 h post-fecundación (hpf) (Fig. 3a), y por consiguiente se obtuvo un porcentaje de eclosión más alto y larvas de botete diana

en buen estado. Las larvas recién eclosionadas midieron $1,84 \pm 0,06$ mm de longitud total (Fig. 3b) sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(9, 20)} = 0,755$, $P = 0,656$).

DISCUSIÓN

El corion de los huevos de peces es un sustrato favorable para el crecimiento de agentes patógenos, y es muy común encontrar microorganismos habitando sobre él (Grotmol *et al.* 2003, Treasurer *et al.* 2005, Katharios *et al.* 2007). Tal es el caso de los huevos del botete diana, los cuales son demersales y adherentes y en el medio natural, los huevos fecundados se adhieren a diversos sustratos como rocas en la zona intermareal para su posterior desarrollo (Yamahira 1997, Duncan *et al.* 2003b, Komar *et al.* 2004, Chávez-Sánchez *et al.* 2008, Abdo-de la Parra *et al.* 2010). Aunque esta característica de adherencia de los huevos de botete diana, no representa un problema para la incubación en cultivos, ya que de acuerdo a Rodríguez-Ibarra *et al.* (2010a), al eliminar esta capa a base de productos químicos y naturales se pueden obtener altos porcentajes de eclosión ($96,2 \pm 2,4\%$).

La optimización de los protocolos de incubación en el botete diana *Sphaeroides annulatus*, es una parte fundamental dentro de los procesos del cultivo de esta especie, pues se requiere garantizar crías para su engorda.

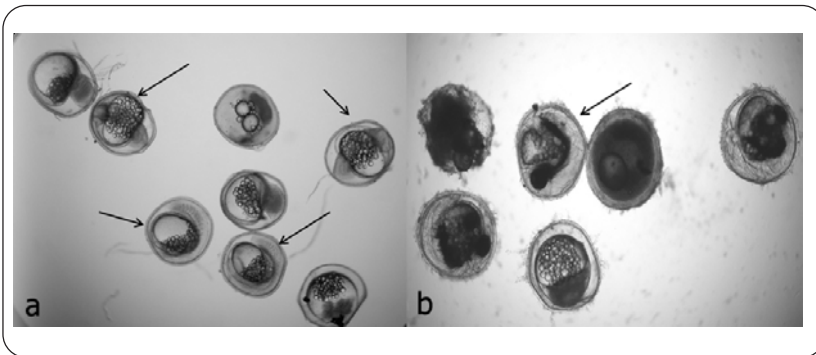


Figura 2. Desarrollo embrionario de los huevos de botete diana, *Sphaeroides annulatus*, desinfectados con acriflavina (a) a las 24 horas post-fecundación y (b) 60 hpf. Las flechas indican embriones vivos / Embryonic development of eggs of the bullseye puffer fish, *Sphaeroides annulatus*, disinfected with acriflavine (a) at 24 h post-fertilization and (b) 60 hpf. Arrows indicate live embryos

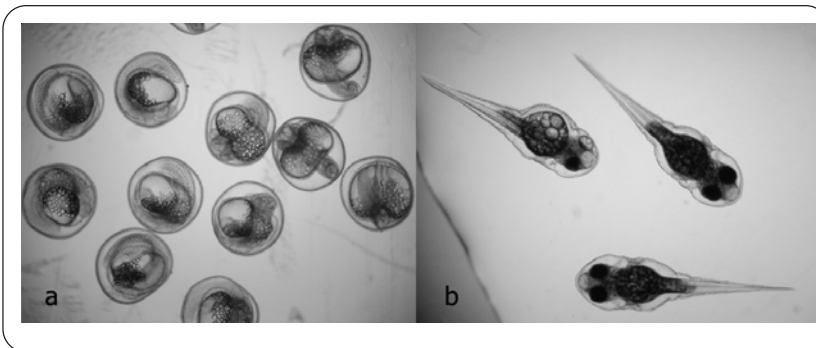


Figura 3. Desarrollo embrionario de los huevos de botete diana, *Sphaeroides annulatus*, sin tratamiento profiláctico (a) a las 24 horas post-fecundación y (b) larvas recién eclosionadas a las 60 hpf / Embryonic development using non-disinfected eggs of the bullseye puffer fish, *Sphaeroides annulatus*, (a) at 24 h post-fertilization and (b) newly hatched larvae at 60 hpf

Las primeras investigaciones realizadas sobre el mejoramiento de métodos en la incubación de los huevos de esta especie, fueron usando una mínima cantidad de huevos, y se obtuvieron resultados positivos (Komar *et al.* 2004). Sin embargo, debido al interés de cultivar esta especie a escala piloto, la cantidad de huevos a evaluar debe de ser mucho mayor, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue optimizar dichos métodos de incubación, con la finalidad de la obtención masiva de larvas.

La desinfección de huevos de especies de peces de importancia comercial, para la eliminación de virus y bacterias, permite mejorar la eclosión y supervivencia de las larvas. Además son muy importantes, porque en cultivos intensivos el riesgo de transferir agentes patógenos entre criaderos es mayor (Grotmol *et al.* 2003, Katahrios *et al.* 2007); siendo las infecciones bacterianas una de las fuentes más importantes de enfermedades en todos los sistemas de producción acuícolas (Meyer 1991). En el presente estudio, de los tres métodos aplicados sólo el glutaraldehído mostró una reducción de UFC en las tres dosis aplicadas y sólo en una de ellas (50 ppm) se obtuvo el porcentaje más alto de eclosión de todos los tratamientos profilácticos aplicados ($79,16 \pm 8,81\%$), por debajo del control ($96,10 \pm 6,21\%$) (Fig. 1).

La aplicación de la acriflavina para desinfectar huevos de peces, es una técnica que se ha usado muy poco en los

últimos años (Tucker 1998), sin embargo ha sido muy eficiente para desinfectar huevos de barramundi (*Lates calcalifer*) (Álvarez-Lajonchère & Hernández-Molejón 2001, Álvarez-Lajonchère & Tsuzuki 2008); desafortunadamente en el presente estudio el tratamiento con acriflavina fue menos eficiente, ya que no se logró reducir la carga bacteriana de los huevos de botete con ninguna de las tres dosis y sí afectó el desarrollo embrionario y por consiguiente la eclosión de los huevos.

En relación con la formalina, compuesto tóxico que en los Estados Unidos ha sido utilizada como un agente fungicida muy eficaz en el cultivo de peces y su uso se ha incrementado haciendo más hincapié sobre la seguridad y el impacto de esta sustancia química en el ambiente (Schreier *et al.* 1996). Existen trabajos con especies dulceacuícolas como el bagre y la trucha (Schreier *et al.* 1996, Rasowo *et al.* 2007), donde se suministraron altas concentraciones de formalina (1000 ppm y hasta $1500 \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente) para desinfectar los huevos, obteniendo en el caso del bagre 82% de eclosión y en la trucha porcentajes de alrededor de 90%. Sin embargo, el bagre y trucha son de aguas frías, mientras que el pargo y botete son de aguas cálidas, por lo tanto la diferencia en relación a los resultados de desinfección de huevos mediante la formalina, puede deberse a la influencia de alguna variable ambiental, como por ejemplo la temperatura.

Se ha demostrado que el glutaraldehído tiene un efecto positivo sobre la desinfección de huevos de especie de peces marinas, mejorando los porcentajes de eclosión, desarrollo y supervivencia de larvas (Harboe *et al.* 1994, Salvesen *et al.* 1997, Skjermo & Vadstein 1999). Se ha probado con éxito a altas concentraciones (hasta 1600 mg L⁻¹) en diversas especies principalmente de aguas frías como la platija (*Pleuronectes platessa*), bacalao (*Gadhus morhua*), lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Salvesen & Vadstein 1995) y en especies de la familia Sparidae como el sargo (*Diplodus sargo*), besugo (*Pagrus pagrus*) y la dorada (*Sparus aurata*) (Escaffre *et al.* 2001, Katharios *et al.* 2007). La selección de las dosis del glutaraldehído en el presente estudio, fue en base al trabajo realizado por Ibarra-Castro (2008), quien lo evaluó en huevos del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), y obtuvo resultados de eclosión menores a 80%. Con el objeto de mejorar este porcentaje, se optó por utilizar una dosis menor (50 ppm) a la aplicada en los huevos del pargo lunarejo: sin embargo, los resultados no fueron los esperados, ya que el porcentaje más alto fue 79,16 ± 8,81%, justamente en esta dosis.

El glutaraldehído es una sustancia química que interactúa con las proteínas formando puentes intra e intermoleculares y que al entrar en contacto con los huevos provoca un endurecimiento proteico de su cubierta. En algunas investigaciones, se observó efectos negativos sobre el desarrollo del embrión por la falta de oxigenación (Block 1977, Gorman *et al.* 1980, Salvesen *et al.* 1997). Sin embargo, en el presente estudio, el glutaraldehído tuvo mejor efecto desinfectante que los otros tratamientos usados, posiblemente porque los huevos del botete diana utilizados no presentaban la cubierta, ya que previamente había sido eliminada por la enzima proteasa y no hubo interacción molecular con el glutaraldehído.

En conclusión, el glutaraldehído fue el mejor desinfectante de huevos de botete diana y en particular a una dosis de 50 ppm, ya que se registró una menor presencia de UFC y se obtuvo el mejor porcentaje de eclosión de todos los tratamientos. Sin embargo, en el presente estudio los huevos sin tratamiento profiláctico tuvieron el mayor porcentaje de eclosión que los tratamientos de desinfección. Por lo tanto, el problema de infección de huevos queda sujeto principalmente a la capa adherente, por lo que se recomienda utilizar sólo la enzima proteolítica proteasa para eliminar esa capa sin necesidad de tratamiento desinfectante posterior. Los tratamientos profilácticos tienen efectos negativos en el desarrollo y eclosión de los huevos, debido a que la enzima proteasa elimina la capa adherente, haciendo que el corion sea más delgado y sensible a las sustancias químicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica de la M.C. Ma. del Carmen Bolán Mejía quien realizó los análisis bacteriológicos y a la Sra. Valerie Williams por la traducción del resumen. Este trabajo fue financiado por el Fondo Mixto de Sinaloa (FOMIX) proyecto Sin-2007-C01-71342 dirigido por L. Estela Rodríguez Ibarra.

LITERATURA CITADA

- Abdo-de la Parra MI, A García-Ortega, I Martínez-Rodríguez, B González-Rodríguez, G Velasco-Blanco, C Hernández & N Duncan. 2010. An intensive hatchery rearing protocol for larvae of the bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Jenyns). *Aquaculture Research* 41(10): 554-560.
- Álvarez-Lajonchère LS & OG Hernández-Molejón. 2001. Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y en el Caribe: diseño, operación y tecnologías, 424 pp. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Álvarez-Lajonchère L & MY Tsuzuki. 2008. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research* 39(7): 684-700.
- Block SS. 1977. Disinfection, sterilizations and preservation, 1049 pp. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Chávez-Sánchez MC, LS Álvarez-Lajonchère, MI Abdo-de la Parra & N García-Aguilar. 2008. Advances in the culture of the Mexican bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, Jenyns (1842). *Aquaculture Research* 39(7): 718-730.
- Duncan NJ, GA Rodríguez-Montes de Oca, D Alok & Y Zohar. 2003a. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* 218: 625-635.
- Duncan NJ, N García-Aguilar, G Rodríguez-Montes de Oca, M Bernadet, C Martínez-Chávez, C Komar, P Estañol & A García-Gasca. 2003b. Reproductive biology of captive bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), LHRHa induced spawning and egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 505-506.
- Fujita S & T Abe. 1992. Induction of ovarian maturation and development of eggs, larvae, and juveniles of the purple puffer *Takifugu porphyreus* reared in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 1627-1632.
- Fujita S & Y Honma. 1991. Induction of ovarian maturation and development of eggs, larvae and juvenile of the puffer, *Takifugu exascurus*, reared in the laboratory. *Japanese Journal of Ichthyology* 38: 211-218.
- Escaffre AM, D Bazin & P Bergot. 2001. Disinfection of *Sparus aurata* eggs with glutaraldehyde. *Aquaculture International* 9: 451-458.

- García-Ortega A. 2009.** Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(1): 69-80.
- Giesecker CM, SG Serfling & R Reimschuessel. 2006.** Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 253: 120-129.
- Gorman SP, EM Scott & AD Russel. 1980.** Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. *Journal of Applied Bacteriology* 48: 161-190.
- Grotmol S, E Dahl-Paulsenb & GK Totland. 2003.** Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. *Aquaculture* 221(1-4): 245-254.
- Harboe T, I Huse & G Øie. 1994.** Effects of egg disinfection on yolk sac and first feeding stages of halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. larvae. *Aquaculture* 119: 157-165.
- Ibarra-Castro L. 2008.** Efecto de variables exógenas y endógenas sobre la maduración sexual, desove y producción de larvas en pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación y Desarrollo, Mazatlán, México, 168 pp.
- Katharios P, A Agathagelou, S Paraskevopoulos & CC Mylonas. 2007.** Comparison of iodine and glutaraldehyde as surface disinfectants for red porgy (*Pagrus pagrus*) and white sea bream (*Diplodus sargus sargus*) eggs. *Aquaculture Research* 38(5): 527-536.
- Komar C, JF Turnbull, A Roque, E Fajer & NJ Duncan. 2004.** Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture* 229: 147-158.
- Martínez-Palacios CA, MC Chávez-Sánchez, GS Papp, MI Abdo-de la Parra & LG Ross. 2002.** Observations on spawning early development and growth of the puffer fish *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1843). *Journal of Aquaculture in the Tropics* 17: 59-66.
- Meyer FP. 1991.** Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science* 69: 4201-4208.
- Rasowo J, OE Okot & CC 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.
- Robertson DR & GR Allen. 2006.** Shorefishes of the tropical eastern Pacific: an information system. Version 2. Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panamá. [CD-ROM]
- Rodríguez-Ibarra LE, MI Abdo-de la Parra, GA Rodríguez-Montes de Oca, MS Moreno-Hernández, G Velasco-Blanco, N García-Aguilar & LS Álvarez-Lajonchère. 2010a.** Evaluación de métodos para la eliminación de la capa adherente de los huevos del botete diana *Sphoeroides annulatus* (Pisces: Tetraodontidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1): 147-151.
- Rodríguez-Ibarra LE, GA Rodríguez-Montes de Oca, CY Padilla-Aguiar, VY Zepeda-Mercado, G Velasco-Blanco & N García-Aguilar. 2010b.** Evaluación de dos métodos de incubación de huevos de botete diana *Sphoeroides annulatus*. *Revista Industria Acuicola* 6(5): 4-7.
- Salvesen I & O Vadstein. 1995.** Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals. *Aquaculture International* 3: 155-171.
- Salvesen I, G Øie & O Vadstein. 1997.** Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with glutaraldehyde: evaluation of concentrations and contact times. *Aquaculture International* 5: 249-258.
- Schreier TM, JJ Rach & GE Howe. 1996.** Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture* 140: 323-331.
- Skjermo J & O Vadstein. 1999.** Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343.
- Stuart KR, M Keller & M Drawbridge. 2010.** Efficacy of formaline and povidone-iodine disinfection techniques on the eggs of three marine finfish species. *Aquaculture Research* 41(11): 838-843.
- Treasurer J, E Cochrane & A Grant. 2005.** Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol. *Aquaculture* 250: 27-35.
- Tucker JW. 1998.** Marine fish culture, 750 pp. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Vadstein O, G Øie, Y Olsen, I Salvesen, J Skjermo & G Skjåk-Bræk. 1993.** A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. En: Reinertsen H, LA Dahle, L Jørgensen & K Tvinnereim (eds). *Fish farming technology*, pp. 69-75. A.A. Balkema Publishers, Rotterdam.
- Van Waters Inc. 1988.** Material safety data sheet, 40 pp. Van Waters and Rogers, Seattle.
- Yamahira K. 1997.** Hatching success affects the timing of spawning by the intertidal spawning puffer *Takifugu niphobles*. *Marine Ecology Progress Series* 155: 239-248.
- Zohar Y, G Pagelson, Y Gothilf, WW Dickhoff, P Swanson, S Duguay, W Gombotz, J Kost & R Langer. 1990.** Controlled release of gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Material* 17: 51-52.