



FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA

INFORMES TECNICOS FIP

FIP - IT / 95 - 32

INFORME : DESARROLLO DE UN PROGRAMA DE
FINAL : DETECCION Y TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES EN MOLUSCOS
CULTIVADOS EN CHILE

UNIDAD : UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
EJECUTORA

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR
CASILLA 1020 VALPARAISO 1 - CHILE

PROYECTO FIP N° 95-32

"DESARROLLO DE UN PROGRAMA DE DETECCION Y
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES EN MOLUSCOS
CULTIVADOS EN CHILE".

INFORME FINAL
Aspectos generales y Metodológicos
Resultados

Valparaíso, junio de 1997

PROYECTO FIP Nº 95-32

**"DESARROLLO DE UN PROGRAMA DE DETECCION Y
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES EN MOLUSCOS
CULTIVADOS EN CHILE"**

Unidad Ejecutora:

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR

Investigador Principal:
Investigadores Asociados:

Mariel Campalans Barnier
Patricia Rojas Z.
Inés Guerrero S.
José Pascual S.
José I. Sepúlveda

Coinvestigador:
Investigador Asociado:

UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
FACULTAD DEL MAR
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

Carlos Riquelme.
Raúl Castro

1997

RESUMEN EJECUTIVO

Se presenta el Diseño de un programa de detección y tratamiento de las enfermedades de moluscos cultivados en las Regiones IV y X. Para tal efecto se realizó un catastro de las enfermedades y agentes infecciosos que afectan a siete especies de moluscos cultivados en la X Región y al Ostión (*Argopecten purpuratus*) cultivado en la IV Región

Las enfermedades que se describen, en las dos regiones estudiadas, están asociadas, principalmente, a agentes protozoarios presentes en los bivalvos adultos. Las bacterias patógenas aisladas corresponden a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*, todas ellas detectadas en la IV Región.

Se confeccionaron mapas para georreferenciar las enfermedades y agentes protozoarios detectados durante los cuatro muestreos realizados en el año de estudio, se indican, además, las prevalencias estacionales de los diversos hallazgos.

El rol de los moluscos de cultivo como reservorios o vectores de enfermedades para salmones de cultivo fue establecido para la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, agente causal de la enfermedad "Septicemia Rickettsial de Salmónidos". Los resultados registrados mediante el uso de la técnica inmunológica del anticuerpo fluorescente IFAT, indican que la mayoría de los bivalvos estudiados muestran presencia de la bacteria en su glándula digestiva.

Se recopilaron los procedimientos de Diagnóstico, Prevención y Tratamiento básico de las enfermedades consideradas de mayor importancia para los moluscos de cultivo.

PROYECTO FIP N° 95-32

**"DESARROLLO DE UN PROGRAMA DE DETECCION Y
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES EN MOLUSCOS
CULTIVADOS EN CHILE".**

INFORME FINAL

ÍNDICE

Introducción	1
1.- ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS MOLUSCOS CULTIVADOS EN LA IV Y X REGIÓN	4
• Desarrollo Metodológico y resultados	9
Encuestas a Empresas Cultivadoras de Moluscos.	10
Encuestas a Centros Cultivadores de Moluscos.	12
Encuestas a Centros de Cultivos en Hatchery	21
• Identificación de Patologías	22
X Región:	26
Metodología	26
• Análisis Histológico por Microscopía de Luz	28
• Análisis Histológico por Microscopía Electrónica de Transmisión.	28
• Análisis Bacteriano.	29
• Análisis para detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> .	31
Resultados y Discusión	32
• Análisis Histológico	32
• Análisis Bacteriano	51
IV Región	58
• Análisis Parasitológico	58
• Análisis Histológico	61
• Análisis Bacteriológico	64
2.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS PATOLOGÍAS	67
3.- DISEÑO DE UN PROGRAMA DE DETECCIÓN PRECOZ DE ENFERMEDADES DE MAYOR PREVALENCIA EN MOLUSCOS CULTIVADOS.	78
• Desarrollo metodológico.	79
• Implementación del diseño.	82
4.- DIAGNOSIS, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE MOLUSCOS	110
• Procedimiento de Diagnosis.	111
• Procedimiento de Diagnóstico específicos	120
• Métodos de Prevención.	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
ANEXO	141

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- Número de empresas que respondieron la encuesta y total de centros asociados a ellas, por región.	11
TABLA 2.- Centros de la X Región asociados a las empresas que respondieron la encuesta, por especie que cultiva.	12
TABLA 3.- Distribución de los centros según sector geográfico	13
TABLA 4.- Distribución de los centros según su número de	13
TABLA 5.- Distribución de los centros según su número de no-profesionales	13
TABLA 6.- Distribución de los centros según sector geográfico.	14
TABLA 7.- Distribución de los centros según profesionales que laboran en él.	15
TABLA 8.- Distribución de los centros según su número de no-profesionales	15
TABLA 9.- Número de centros por especie que cultiva	16
TABLA 10.- Centros que cultivan Choro, Chorito o Cholga, según lugar donde captan las semillas.	16
TABLA 11.- Centros según sistema de cultivo que utilizan, por especie que cultivan.	18
TABLA 12.- Centros según manejos que realizan por especie que cultivan.	18
TABLA 13.- Número de centros por variable ambiental que registran y periodicidad del registro	19
TABLA 14.- Distribución de los centros según frecuencia con que realizan los monitoreos de bacterias patógenas humanas.	20
TABLA 15.- Distribución de los centros según frecuencia con que realizan los monitoreos de microalgas nocivas.	21
TABLA 17.- Vibrionáceos marinos y pasteurellas.	30
TABLA 18.- Número de individuos muestreados por especie.	32
TABLA 19.- Número de muestras bacteriológicas obtenidas por especie.	51
TABLA 20.- Géneros bacterianos aislados en los cuatro muestreos a partir de glándula digestiva de las siete especies de moluscos estudiados.	54
TABLA 21.- Cuantificación de colonias en los cuatro muestreos.	55
TABLA 22.- Géneros de bacterias aisladas en hatchery	56
TABLA 23.- Distribución de frotis por muestreo	57
TABLA 24.- Número de muestras positivas a <i>P. salmonis</i> (Técnica IFAT).	57

ÍNDICE DE MAPAS

MAPA 1A.- Distribución geográfica de los puntos de muestreo (X Región)	70
MAPA 1B.- Localidades de muestreo en la IV Región.	71
MAPA 2.- Presencia de neoplasia en <i>Mytilus chilensis</i> y <i>Tiostrea chilensis</i>	72
MAPA 3.- Parasitosis Hemocítica en <i>Mytilus chilensis</i> y <i>Tiostrea chilensis</i>	73
MAPA 4.- Retracción del manto en cultivo de ostión del Norte	74
MAPA 5.- Protozoo X4 en <i>Mytilus chilensis</i>	75
MAPA 6.- Presencia del Protozoo Parasítico X2	76
MAPA 7a.- Protozoo Parasítico X3 en <i>Tiostrea chilensis</i>	77a
MAPA 7b.- Protozoo Parasítico X5 en <i>Tiostrea chilensis</i>	77b

INDICE DE FOTOS.

Foto 1. Infiltración del tejido conjuntivo de la glándula digestiva en <i>Mytilus chilensis</i> por células neoplásicas.	43
Foto 2. Neoplasia hemocítica en la glándula digestiva.	43
Foto 3. Vaso hemolinfático con células transformadas.	44
Foto 4. Células neoplásicas en <i>Tiostrea chilensis</i>	44
Foto 5. Parasitosis hemocítica de <i>Tiostrea chilensis</i> .	45
Foto 6. Hemocitos de <i>Tiostrea chilensis</i> con cuerpos intracitoplasmáticos.	45
Foto 7. Epitelio y manto de <i>Argopecten purpuratus</i> con presencia de nódulos del protozoo X1.	46
Foto 8. Nódulos en el tejido conjuntivo del manto que contienen un variado número de esporocistos.	46
Foto 9. MET de un nódulo del Protozoo X1.	47
Foto 10. MET que muestra un Protozoo X1	47
Foto 11. MET que muestra un detalle de los sistemas de membranas lamelares y vesículas con material electrodens.	48
Foto 12. MET de un Cuerpo Esférico en una larva de <i>Crassostrea gigas</i> .	48
Foto 13. MET de células ciliadas del velo de una larva de <i>Crassostrea gigas</i> .	49
Foto 14. MET de células con acumulaciones electrodensas que presentan degeneración citoplasmática.	49
Foto 15. Protozoo X4 en los túbulos digestivos de <i>Mytilus chilensis</i> .	49
Foto 16. Plasmodios del Protozoo X 2 en <i>Crassostrea gigas</i> .	50
Foto 17. Protozoo X5 en <i>Tiostrea chilensis</i> .	50

FOTO 18.	Branquias y presencia de <i>Trichodina</i> .	63A
FOTO 19.	Palpo con presencia de un ANCISTROCOMIDAE	63B
FOTO 20.	Palpo y ANCISTROCOMIDAE magnificado	63B
FOTO 21.	Palpo: presencia de lesiones ceroides	63C
FOTO 22.	Palpo: vista magnificada de las lesiones ceroides	63C
FOTO 23.	Manto: lesiones ceroides	63D
FOTO 24.	Manto: lesiones ceroides	63D
FOTO 25.	Intestino: epitelio con inicio de la infección	63E
FOTO 26.	Manto: borde del manto con infección	63E
FOTO 27	Microfotografía de la cepa de <i>Vibrio</i> sp. patogénica.	66

INTRODUCCION

Los moluscos, especialmente los bivalvos, representan en la acuicultura marina uno de los grupos más importantes desde el punto de vista productivo y económico ya que sus costos de producción no son muy elevados en comparación con otras especies cultivadas.

La regulación en la extracción de moluscos desde sus bancos naturales junto con el surgimiento de la actividad de acuicultura tienden a permitir la recuperación de éstos y a la vez ofrecer una disponibilidad de semillas y juveniles que permite potenciar el desarrollo de la producción.

Los problemas que inciden en la producción de moluscos están relacionados con las características y modificaciones del medio, con la propia biología y ecología del molusco y con los aspectos patológicos. Las líneas de investigación han estado enfocadas hacia la obtención de semillas, mejora genética y control patológico.

Este último aspecto ha tenido un desarrollo menor que el registrado en el caso de los peces, debido principalmente a que la herramienta más utilizada para el diagnóstico ha sido tradicionalmente la histología, lo que ha llevado a tener más bien una descripción morfológica de las enfermedades parasitarias y bacterianas que el conocimiento de los ciclos biológicos de estos agentes infecciosos.

De esta misma manera los avances en el conocimiento de los agentes virales patógenos han sido escasos debido a que no se han desarrollado, o al menos no están disponibles, líneas celulares de moluscos, que permitirían aislarlos y probar su patogenicidad, empleándose hasta la actualidad la microscopia electrónica para su detección.

En nuestro país, hasta hace poco, el conocimiento de las enfermedades de moluscos se refería principalmente a la identificación de parásitos Helminths, (Oliva et al., 1986; Carvajal, 1988).

En relación a enfermedades de origen bacteriano existen pocos antecedentes reportándose la presencia de patógenos bacterianos en cultivos larvales de Ostión, (Riquelme et al., 1995).

Por otro lado los moluscos han sido vinculados como trasmisores a situaciones patológicas de diversa índole en el hombre, entre las cuales se menciona el cólera causado por el *Vibrio cholerae*, la diarrea y la parálisis provocadas por los Dinoflagelados *Dinophysis acuta* y *Alexandrium catenella* respectivamente. En cuanto a la transmisión de agentes patógenos a otros animales existe la presunción que algunas especies de moluscos podrían actuar como reservorio de *Piscirickettsia salmonis* agente causal de la **Septicemia Rickettsial de los Salmones** en nuestro país.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar un sistema de detección y tratamiento de enfermedades en moluscos cultivados en Chile, con el objeto de conocer, detectar, prevenir y controlar a los principales agentes patógenos y enfermedades que atacan y/o transmiten dichos organismos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Identificar la enfermedades que afectan a los moluscos cultivados en la IV y X Región, analizando el posible rol de dichos organismos como vectores o huéspedes intermediarios de enfermedades.
- 2.- Determinar áreas geográficas en las regiones IV y X, clasificadas según la prevalencia de las patologías identificadas en el objetivo 1.
- 3.- Diseñar un programa de detección precoz de enfermedades de mayor prevalencia en moluscos.
- 4.- Establecer métodos y procedimientos estandarizados de diagnosis, prevención y tratamiento básico de cada una de las enfermedades consideradas en el programa citado en el objetivo 3.

1.- ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS MOLUSCOS CULTIVADOS EN LA IV y X REGIONES.

ANTECEDENTES:

Entre las enfermedades que atacan a los bivalvos, las que han revestido mayor importancia son las producidas por parásitos protozoos y los ejemplos más conocidos son *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae* que han sido la causa de grandes epizootias en varios países. La primera fue descrita por Comps en 1970 y además de ostras afecta a mejillones presentando ciclos similares, (Bautista, 1989).

Una de las primeras enfermedades marinas que atrajo considerablemente la atención fue la epizootia causada por el protozoo actualmente conocido como *Perkinsus marinus* en la ostra americana *Crassostrea virginica*. Esta enfermedad protozoaria fue reconocida a comienzos de la década de los cincuenta y llegó a ser el principal factor natural de pérdidas en la producción.

Desde entonces se ha conocido mucho acerca de este agente que mata ostras cuando se registran los mayores peaks de altas temperaturas y salinidades. Se conoce su estatus

taxonómico, su ultraestructura, se sabe también que parasita a otros moluscos en el mundo, incluyendo el abalón y las almejas gigantes de Australia (Perkins, 1996). Junto con el mencionado *Perkinsus* está el Haplosporidio *Haplosporius nelsoni*, que ha desafiado a muchos investigadores por más de 35 años y que afecta a ostras del Atlántico. Durante 3 ó 4 décadas se ha estudiado su ciclo de vida, patogénesis y estatus taxonómico, y se le ha considerado como un severo factor ecológico que limita la producción de ostras, (Couch, 1993).

Fuera de estos éxitos asociados a los principales estudios de enfermedades epizoóticas podríamos anotar algunos más recientes entre los que se puede mencionar a *Bonamia ostreae* e que es una especie de afinidades filogenéticas desconocidas, encontradas en hemocitos y extracelularmente en tejidos de *Ostrea edulis*. *B. ostreae* o algunas otras especies de *Bonamia* son encontradas en ostras de N.Zelandia (*Tiostrea lutaria*), ostra chilena (*T. chilensis*) y la ostra olimpica (*T. lurida*).

Muy relacionada a las especies de *Bonamia* es el *Mikrocytos mackini*, que causa mortalidades en la ostra del Pacífico y es ultra estructuralmente similar a *B. ostreae* mostrando diferencias en la posición del nucléolo y la posible ausencia de mitocondria. La otra diferencia sería que se encuentra en ostras de género *Crassostrea* y no en *Tiostrea*.

Otro grupo de protistas clasificado también como de phylum de afinidades inciertas y que recientemente han sido reconocidos como patógenos de moluscos, pertenecen a *Labyrinthomorpha*, siendo la especie patogénica más estudiada *Labyrinthuloides haliotidis*, la que causa mortalidades hasta del 100% en poblaciones juveniles de abalón (*Haliotis kamtsshatkana* y *H. rufescens*), invade los tejidos muscular y nervioso de la cabeza y pie causando lisis del tejido en juveniles de talla inferior a 4mm. No invade otros tejidos, y es más activo entre 5 y 10°C (Perkins, 1993).

Otra de las enfermedades causadas por protozoos, la Hexamitiasis de la ostra, ha registrado mortalidades de hasta 75% en *Tiostrea lurida* y se le define como una enfermedad de temperaturas bajas (Elston, 1994).

La mayoría de las enfermedades causadas por bacterias en los moluscos bivalvos son Gram-negativas, existiendo además otros microorganismos causantes de la aparición de enfermedades como Rickettsiales, Chlamydios y Mycoplasmas, sin olvidar a algunos representantes de los Actinomicetales, Spiroquetales y de las Cyanophyceas, (Bautista, 1989).

Dada su alimentación filtradora de fitoplancton, los bivalvos pueden acumular gran cantidad de microorganismos del agua circundante que proporcionan la presencia de una rica flora bacteriana entre los que se mencionan: Gram-negativo: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Vibrio*; Gram-positivo: *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Micrococcus*.

Los moluscos pueden actuar como transportadores pasivos de microorganismos que sean patógenos para el hombre, hecho conocido a nivel mundial y referido a los casos de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. cholera*, responsables de graves desórdenes. El primero, como efecto de cortes con el borde de las conchas de ostras y almejas enfermas y, el segundo, por la ingestión del molusco.

Las especies de bacterias más conocidas en moluscos pertenecen a los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*, cuya presencia es detectada en el tracto digestivo de los bivalvos. El modo de acción de estas bacterias no es muy bien conocido, por lo que es difícil proteger las instalaciones de cultivo de estos agentes.

La mayoría de las bacterias que ingieren y digieren los moluscos bivalvos no son perjudiciales para los adultos a no ser que estén en altas concentraciones. Por el contrario, las larvas sí son afectadas, de ahí que los cultivos larvarios tengan que estar

sometidos a una mayor vigilancia a causa de su vulnerabilidad a sufrir este tipo de enfermedades. La apariencia sana no indica ausencia de bacterias, pues normalmente existen infecciones bacterianas en ausencia de síntomas aparentes.

En experiencias realizadas en adultos de ostra americana y choritos del género *Mytilus* se ha visto que después de una exposición de 24 horas a concentraciones masivas de *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp., no hay efectos. En cambio, las larvas sí presentan lesiones ocurriendo mortalidades a partir de concentraciones superiores a 10 células por ml, (Bautista ,1989). La patogenicidad de las enfermedades bacterianas varía en función de la edad y respecto a algunos estados de desarrollo que parecen ser los correspondientes a los embriones, larvas de 48 horas (estado pericigótico) y larvas de 15 días. No se conoce bien la forma de actuar de la bacteria que, en ocasiones, lo hace a través de exotoxinas, por lo que es difícil proteger los cultivos larvarios de estas infecciones.

Las bacterias consideradas claramente patógenas larvarias son principalmente *Pseudomonas* sp., *V. anguillarum* y *V. alginolyticus*. Algunas bacterias, que han sido aisladas de las larvas de bivalvos, proceden de su alimento ya que los cultivos de algas que se usan como alimento se contaminan fácilmente con bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*. Tanto los *Vibrios* como las *Pseudomonas* constituyen entre un 9% y un 54% de la flora total bacteriana normal y su concentración, en el mar, es de alrededor de un 37%.

La necrosis bacilar es una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos larvarios acentuándose en la época estival por las condiciones ecológicas desfavorables, época que coincide con la estación reproductora y con las proliferaciones bacterianas, produciéndose epizootias naturales de necrosis bacilar que limitan el reclutamiento de las larvas. En todo caso, su patogenicidad no está del todo clara y requiere ser estudiada.

Indudablemente, la importancia que las enfermedades bacterianas presentan en los bivalvos, tanto en estado adulto como larvario principalmente, sugiere la necesidad de prestar mayor atención a los diferentes problemas que se generan, así como a la etiología, identificación y tratamientos, pues los perjuicios económicos que representan merecen ser tomados en consideración.

Pocos virus han sido relacionados con mortalidades significativas en moluscos, (Johnson, 1984). Las familias de virus que infectan moluscos pertenecen a los *Birnavirus*, *Iridovirus* y *Retrovirus*. De ellas, las más peligrosas pertenecen a los Iridovirus. En la revisión hecha por Johnson en 1984, se menciona un primer reporte de partículas como *Iridovirus* ("Iridolike virus") en la ostra portuguesa *C. angulata*.

En 1979 Elston registra una pequeña partícula como Iridovirus en las células velares de las larvas *C. gigas* asociados con mortalidades. El virus, clasificado como Iridovirus, causa la enfermedad actualmente conocida como "enfermedad viral velar de la ostra" o OVVD, esta es la única enfermedad viral mencionada para moluscos por Thoesen (1994) en el Blue Book.

Dentro del grupo de los Birnavirus, citados por Johnson en 1984, todos los hallazgos detectados en moluscos parecen ser cepas de IPN. Estudios posteriores indicarían que los birnavirus posiblemente no infectan ostras pero están comúnmente presentes como contaminantes. De esta manera, los moluscos contaminados podrían ser reservorios del virus IPN, patógeno de peces.

Otros agentes capaces de producir daños en los bivalvos son: Hongos, *Rickettsias*, *Chlamidios* y *Micoplasmas*. Es así como se ha registrado la aparición de *Nocardia matruchoti* causando aplasia epitelial en ostras, o la "enfermedad micelial" causada por un actinomiceto, *Laberintomyxa marina* detectado en la ostra americana,

Siroplidium zoophthorum, que produce una rápida mortandad de larvas. En 1977 se descubrió *Rickettsias* en bivalvos marinos afectando a ostras del género *Crassostrea*. Su importancia y acción patógena en los cultivos de bivalvos no está clara. Respecto a las *Rickettsias* y *Chlamydias* reportados en observaciones histopatológicas de bivalvos, se menciona en la literatura que existen algunos casos asociados con mortalidades del huésped, sin embargo, esto no ha sido aún demostrado y existen casos de infecciones aparentemente benignas. La presencia de organismos tipo *Chlamydia* ha sido reportada para el ostión *Argopecten irradians*, la ostra portuguesa *Crassostrea angulata* y la almeja *Mercenaria mercenaria*. Organismos tipo *Rickettsia* se han encontrado en varias especies de ostiones, ostras y almejas de todo el mundo (Thoesen, 1994).

En Chile el conocimiento de las enfermedades de moluscos cuenta con pocos antecedentes los que hasta hace pocos años se restringían a la descripción de la presencia de algunos parásitos (Oliva et al., 1986; Carvajal 1988) y el reporte de desorden proliferativo celular en ostras de Chiloé (Mix y Breese, 1980). En relación a enfermedades de origen bacteriano se destaca la presencia de *Vibrio anguillarum* (VAR), *V. alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*, en cultivos larvales de ostión (*Argopecten purpuratus*), siendo *A. hydrophila* altamente resistente a la mayoría de los antibióticos de uso común en acuicultura, (Riquelme et al., 1995).

DESARROLLO METODOLOGICO Y RESULTADOS

En un intento de disponer de información actualizada de los Centros de Cultivo de Moluscos de las regiones IV y X, que permita orientar el estudio y georreferenciación de las enfermedades que afectan o han afectado a las especies bajo estudio, y que, además, sirva de base para la creación del sistema computacional asociado a este proyecto, se diseñaron diversos instrumentos de recolección de datos. Básicamente, se elaboraron 3 instrumentos: uno dirigido a empresas que tienen Centros de Cultivos de Moluscos en la X

Región y los otros dos orientados a conseguir información en dichos centros. Como es sabido, en la IV Región este proyecto sólo considera el estudio del *Ostión del Norte*, por lo tanto, dos de los tres formularios construidos para la X Región debieron adaptarse a esta situación. Es así que, finalmente, se utilizaron 5 instrumentos distintos (ver Anexo):

1. *Encuesta a Empresas Cultivadoras de Moluscos, IV Región;*
2. *Encuesta a Empresas Cultivadoras de Moluscos, X Región;*
3. *Encuesta a Centros de Cultivo de Moluscos, IV Región;*
4. *Encuesta a Centros de Cultivo de Moluscos, X Región; y*
5. *Encuesta a Centros que poseen Hatchery, IV y X Región.*

Encuestas a Empresas cultivadoras de Moluscos

Estos instrumentos fueron creados para obtener información general de las empresas del rubro, a fin de dimensionar, por especie, la población de interés en este estudio. Además, constituyeron el punto de partida en la construcción del prototipo computacional.

Los formularios, que se estructuraron principalmente en base a preguntas abiertas, se diseñaron para ser respondidos por el sistema de autoadministración, lo cual permitió que fueran enviados por correo a los encuestados. Para su aplicación se consideró un censo, por lo cual se requería de una base de datos apropiada, actualizada.

Esta base de datos, se construyó haciendo uso de un listado proporcionado por el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPES). Como este listado no contenía la dirección de las empresas, se recurrió a la Subsecretaría de Pesca, entidad que entregó un listado con direcciones comerciales. Aún cuando esta información no consideraba a todas las empresas del listado del SERNAPES, sí contenía a empresas que no estaban incluidas en este último listado. Para complementar la información se recurrió también al Compendio Acuícola de

Chile (1996). Pese a todos los esfuerzos realizados, esta base de datos, que contempla 39 empresas en la IV Región y 327 en la X Región, aún requiere de un proceso de revisión, puesto que en las etapas posteriores de toma de información en los centros dependientes de ellas, se pudo constatar que existían empresas de la X Región que estando consideradas en el listado, no cumplían con los requisitos para estar incluidas en él (sin resolución vigente, sin producción desde hace varios años, etc.)

A fin de dar comienzo al muestreo biológico que requería información acerca de la ubicación de los Centros dependientes de las empresas, como también de las especies cultivadas en dichos Centros, el envío de los formularios correspondiente a las empresas, se realizó a medida que se fueron obteniendo las direcciones de ellas. Es así que se comenzó con el envío de formularios a 140 empresas y se continuó hasta cubrir 292 en la X Región. Como resultado de este proceso, se tiene algún tipo de información con respecto a 91 empresas: 50 devolvieron el formulario contestado, 7 enviaron cartas informando que no tenían concesión vigente o que ya no existía la empresa, y 34 no fueron ubicables en la dirección de la base de datos, razón por la cual los formularios fueron devueltos al remitente. De lo anterior se desprende que se tiene respuesta del 13.67% del total de empresas de la base de datos, lo cual corresponde al 17.12% de los formularios enviados.

Las 50 empresas que respondieron el formulario *Encuestas a Empresas Cultivadoras de Moluscos*, y sus correspondientes Centros de Cultivo, se distribuyen por región como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 1.- Número de Empresas que respondieron la encuesta y total de Centros asociados a ellas, por región.

REGION		
IV	7	8
X	43	60
Total	50	68

De acuerdo a los objetivos, todas las empresas de la IV Región que respondieron la encuesta cultivan el Ostión del Norte. El número de centros y porcentaje con respecto al total de centros asociados a empresas de la X Región que respondieron la encuesta, según la especie que cultiva, se muestra en la Tabla 2. Cabe mencionar que muchos de estos centros cultivan más de una especie.

Tabla 2.- Centros de la X región, asociados a las Empresas que respondieron la encuesta, por especie que cultiva.

ESPECIE		
Choro	43	71.7
Chorito	22	36.7
Cholga	14	23.3
Ostra Chilena	9	15.0
Ostra del Pacífico	11	18.3
Ostión del Norte	9	15.0
Abalón	1	1.7

Encuestas a Centros de Cultivos de Moluscos

Estos formularios se diseñaron para ser aplicados a través de entrevista personal al Administrador o persona responsable del centro. Para este proyecto, se encuestó a 7 centros de la IV Región y a 31 de la X Región. Las respuestas obtenidas se resumen a continuación, para cada región.

IV Región

El formulario utilizado en esta región, consta de 4 ítems. La información correspondiente se resume en las tablas siguientes:

Tabla 3.- Distribución de los Centros según Sector Geográfico.

SECTOR GEOGRÁFICO		
Bahía de Tongoy	4	57.14
Bahía de Guanaqueros	3	42.86
Total	7	100.00

Tabla 4.- Distribución de los Centros según su número de Profesionales

NÚMERO DE PROFESIONALES		
3 - 4	3	42.86
5 - 9	2	28.57
10 ó más	2	28.57
TOTAL	7	100.00

Tabla 5.- Distribución de los Centros según su número de No Profesionales

NÚMERO DE NO PROFESIONALES		
11 - 50	2	28.57
51 - 90	3	42.86
91 ó más	2	28.57
TOTAL	7	100.00

Dos centros indican a Bahía Tongoy, otros dos a Bahía Inglesa y uno a Coquimbo, como origen geográfico de las semillas de Ostión del Norte que utiliza en el hatchery. Por otra parte, Bahía Tongoy es el lugar donde captan las semillas seis de los centros encuestados, el otro centro no proporciona información al respecto. En cuanto al Sistema de Captación, todos dicen que utilizan colectores en Balsa. Los sistemas de cultivo usados por

los centros encuestados son Pearlnet, Linterna en línea, Suspendido, Corral, Fondo y Japonés Modificado. En general, estos centros no mantienen registros de otras variables ambientales, fuera de la visibilidad, la cual es observada diariamente por cuatro de ellos, semanalmente por otro y esporádicamente por otro.

En lo que se refiere a mortalidad, sólo dos centros declaran mortalidades superiores al 45% durante el periodo 1993 - 1996 y la atribuyen, al igual que los otros centros, a problemas de manejo, causas naturales y Polydora.

En cuanto a patologías, dos de los centros encuestados declara haber tenido problemas debido a la Polydora, lo que se manifestó en destrucción de las valvas en un caso y quistes en músculo aductor, malformación de borde ventral y atrofia gonadal en el otro. Un centro señaló tener esporádicamente problemas de fouling, manifestándose destrucción de concha y deformidades. Dos centros declaran que no tienen problemas.

X Región

El formulario utilizado en esta región, consta de 5 ítemes y la información recibida a través de él, se resume a continuación, para cada uno de los ítemes.

1. Antecedentes Generales

Los 31 centros encuestados se distribuyen geográficamente como se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 6.- Distribución de los Centros según Sector Geográfico.

SECTOR GEOGRAFICO		
Calbuco	4	12.9
Ancud	5	16.13
Castro	11	35.48
Quellón	10	32.26
Total	31	100.00

Tabla 7.- Distribución de los Centros según Profesionales que laboran en él

NÚMERO DE PROFESIONALES		
0	4	12.9
1	14	45.16
2	6	19.35
3	1	3.23
No responde	6	19.35
TOTAL	31	100.00

Tabla 8.- Distribución de los Centros según su número de No Profesionales

NÚMERO DE NO PROFESIONALES		
0	1	3.23
1 - 2	8	25.81
3 - 4	12	38.71
5 - 9	7	22.58
10 ó más	3	9.68
TOTAL	31	100.00

Con respecto al personal no profesional que labora en el Centro, es preciso mencionar que casi la totalidad de los centros encuestados, contrata personal adicional, en forma temporal, en periodos de cosecha, siembra o desdoble.

2. Antecedentes de los Centros de Cultivos Marinos

Específicamente, aquí se solicita datos relativos a cada una de las especies de interés para el proyecto y, debido a que ningún centro encuestado declaró tener cultivos de Ostión del Sur, esta especie no se incluye en la descripción de la información correspondiente a este ítem. La tabla siguiente muestra, para las demás especies, el número de centros que las cultivan.

Tabla 9.- Número de Centros por Especie que cultiva

ESPECIE		
Choro	9	29.03
Chorito	25	80.65
Cholga	9	29.03
Ostra Chilena	6	19.35
Abalón	1	3.23
Ostra del Pacifico	5	16.13
Ostión del Norte	7	22.58

- Origen Geográfico de las Semillas

El origen geográfico de las semillas de Choro, Chorito y Cholga que captan los centros para el cultivo de esas especies, se describen en la tabla 10.

Tabla 10.- Centros que cultivan Choro, Chorito o Cholga, según lugar donde captan las semillas

SECTOR GEOGRÁFICO			
Curanué	1	10	2
Huelme	—	2	2
Huidad	—	2	1
Ilque	1	1	—
Isla Cailin	—	1	—
Isla Puluqui	1	2	—
Putemún	8	10	—
Quetalco	—	—	1
San Agustín	—	1	—
San Juan	—	—	2
Vilupulli	—	1	—
Yaldad	2	10	3

Para el cultivo de la Ostra Chilena, 3 centros captan las semillas en Hueihue, uno en Pullinque, uno en Quempillén y otro en Quihua. Las semillas que utilizan los centros que cultivan Ostra del Pacífico, provienen de hatcheries de Tongoy (4 centros) o Chiquihue (1 centro). Los centros que cultivan Ostión del Norte, utilizan semillas provenientes de hatcheries ubicadas en Curaco de Vélez (1 centro), Chiquihue (2 centros), Hueihue (4 centros) y Bahía Yal (2 centros). El centro de cultivo de Abalón usa semillas provenientes de Las Cruces (V Región).

- Sistemas de Captación de Semillas

De los 25 centros que cultivan Choro, Chorito o Cholga, hay uno que declara comprar las semillas que utiliza; los 24 centros restantes captan semillas mediante un sistema en base a redes en desuso. Los centros que cultivan Ostra Chilena, por lo general captan sus semillas mediante Collares de Concha de Cholga (5 centros) o Placas de Plástico (2 centros); sin embargo, hay un centro que utiliza cemento y otro que usa tablitas de PVC.

- Sistemas de Cultivo

La diversidad de sistemas que utilizan los centros encuestados, para el cultivo de las diferentes especies, se resume en la siguiente tabla. En ella se puede observar que los centros que cultivan Chorito o Cholga, utilizan tanto el sistema de Cuelga en Línea como el de Cuelga en Balsa; para las demás especies los sistemas son más variados, distinguiéndose el uso de la Linterna en Línea. En el caso de Abalón, el sistema de cultivo utilizado es el de Barriles suspendidos en bolsas.

Tabla 11.- Centros según Sistema de Cultivo que utilizan, por especie que cultivan

SISTEMA DE CULTIVO						
Cuelga en línea	4	24	9	--	2	--
Cuelga en línea doble	--	--	--	3	--	--
Cuelga en balsa	1	9	3	--	--	--
Linterna en línea	5	--	--	3	2	6
Linterna en balsa	1	--	--	--	--	1
Canastillo en línea	1	--	--	--	--	--
Bandeja en línea	1	--	--	--	--	--
Bandeja Intermareal	--	--	--	1	2	--
Bandeja submareal	--	--	--	--	1	--
Fondo	--	--	--	1	--	--
Pearlnet en línea	--	--	--	1	--	1
Aro en línea	1	--	--	--	--	--

- Manejos

La tabla siguiente muestra, para cada especie, la distribución de los centros, según el tipo de manejo que realizan al cultivo de dicha especie. En ella se puede observar que las actividades que más se realizan son: *desdoble* y *raleo*, en el caso de Mitílicos, y *desdoble* y *limpieza*, en el caso de Ostras y Ostiones. En lo que se refiere al manejo, el centro que cultiva Abalón realiza *desdoble*, *selección por talla*, *muestreo* y *alimentación*.

Tabla 12.- Centros según Manejos que realizan, por especie que cultivan

MANEJOS						
Desdoble	--	9	--	4	2	6
Raleo	4	18	6	1	1	--
Limpieza	--	2	2	3	4	2
Selección por talla	1	--	--	1	1	--
Afineamiento	--	--	--	--	1	--
Mantenimiento de	--	1	1	--	--	--
No realiza	3	2	--	1	1	--

- Mortalidad y posibles causas

En general, los centros de cultivo de Mitílidos no acusan problemas serios de mortalidad, ya que sólo declaran mortalidades menores del 5%, reconocidas como normales para ese tipo de cultivos. Sólo un centro manifestó que en una oportunidad su cultivo de Chorito, por causas desconocidas, tuvo una mortalidad de alrededor de un 15%. En lo que respecta a la Ostra Chilena, un centro declaró una mortalidad del 25% debido a problemas de manejo, otro registró una mortalidad del 35% por problemas de predación y otro dijo haber tenido una alta mortalidad por problemas de alimentación y reproducción. En cuanto a los centros cultivadores de Ostra del Pacífico, sólo uno dijo haber tenido una mortalidad alta (60%) por problemas desconocidos. En el cultivo de Ostión del Norte, dos centros manifestaron una mortalidad casi total de su cultivo debido a problemas ambientales; otro centro le adjudicó a manejo y fallas administrativas el hecho de haber registrado una mortalidad del 40%; además, un centro que registra una mortalidad del 15%, asume que la causa es la salinidad del agua. En el caso del Abalón, la mortalidad registrada es del 15% al 25%.

3. Antecedentes sobre Patologías

Para determinar si es posible contar con información previa acerca de algunas variables ambientales que podrían estar relacionadas con la aparición de determinadas patologías, en este ítem se consultó acerca de la periodicidad con que el centro registra esas variables. Las respuestas obtenidas se resumen en la tabla 13.

Tabla 13.- Número de Centros por Variable Ambiental que registran y periodicidad del registro.

VARIABLE AMBIENTAL	PERIODICIDAD DEL REGISTRO					
	Diaria	Semanal	Anual	Otro	No se registra	No responde
Salinidad	3	0	1	4	7	14
Visibilidad	3	1	1	3	7	15
Temperatura del agua	7	0	1	5	5	14

Con respecto a las patologías que afectan a los cultivos de moluscos, en general, los centros encuestados no proporcionaron información. Esto no resulta muy sorprendente, si se tiene en cuenta que ninguno de esos centros, excepto uno, mantiene registro de las enfermedades que han afectado a sus cultivos. Por lo tanto, tampoco fue posible caracterizar los problemas patológicos desde el punto de vista de los signos, la periodicidad de aparición, las posibles causas o las relaciones con alguna variable ambiental. La excepción la constituye un centro que afirma no tener problemas patológicos, y otro que declara como patología relevante para su cultivo de Ostión del Norte, al *Recogimiento de Manto*, que se presentó al año y dos meses de inicio del cultivo, cuando los individuos tenían un tamaño promedio de aproximadamente 60 mm. Este centro reconoce que no tiene método de prevención para este problema patológico, puesto que desconocen sus causas.

4. Antecedentes sobre Micro-organismos del medio

Las tablas siguientes muestran la distribución de los centros encuestados, según la frecuencia con que realizan monitoreos de algunos micro-organismos del medio.

Tabla 14.- Distribución de los Centros según la frecuencia con que realizan monitoreos de Bacterias Patógenas Humanas.

FRECUENCIA DE MONITOREO DE BACTERIAS PATÓGENAS HUMANAS	N° de Centros
Annual	2
Bimensual	1
Ocasionalmente	2
No responde	1
No se realiza	25

Tabla 15.- Distribución de los Centros según la frecuencia con que realizan monitoreos de Microalgas nocivas (Marea Roja)

FRECUENCIA DE MONITOREO	N° de Centros
DE MICROALGAS NOCIVAS	
Mensual	1
Semestral	1
Annual	1
No se realiza	28

Encuestas a Centros de Cultivos en Hatcheries

Se han encuestado 3 centros en la X Región, los cuales están ubicados en los sectores de Ancud, Puerto Montt y Castro, respectivamente, y un centro en la IV Región, el cual se encuentra en el sector de Tongoy. Estos centros cuentan con 2 a 4 profesionales y entre 2 a 9 no profesionales, que laboran en ellos en forma permanente.

Con respecto a las aguas de suministro del hatchery, en todos los centros las filtran con una calidad de filtrado que varía entre 0.45µm y 1µm. Además, la esterilizan con luz ultravioleta, para las tres etapas del proceso (Larvas, Post-larvas y Microalgas), y las airean con sopladores.

Para el cultivo de Microalgas, todos los centros encuestados realizan recuento de bacterias, ninguno aplica antibióticos al medio de cultivo y sólo los de la X Región realizan recuentos de Protozoos y utilizan estanques que tienen tapa. Además, todos utilizan aireadores con filtro.

En el medio de cultivo larval y post-larval, sólo los centros de la X Región aplican antibióticos pero ninguno especifica el producto usado. Tres de los centros hacen recuento de bacterias en el medio y sólo uno hace recuento de Protozoos. Los estanques que utilizan

para el cultivo, de capacidad muy variable, sin tapa, se limpian diariamente o día por medio, utilizando ácido muriático o algún otro desinfectante.

Aunque sólo uno de los centros dice no mantener un registro de las patologías que se le han presentado, éste es el único que cuantifica en un 40%, la mortalidad de sus larvas y post-larvas. Por otra parte dos de los centros atribuyen la mortalidad de sus larvas a la calidad de las larvas (reproductores) y un tercero a problemas bacterianos.

En lo que se refiere a las Actividades Generales del Hatchery, tres de ellos realizan sanitización completa del hatchery, con distinta periodicidad. Todos los centros encuestados dicen realizar limpieza de las cañerías de la red, tres de ellos aplican cloro, mientras que el otro aplica diariamente un producto especial. Finalmente, todos afirman tratar las aguas efluentes del hatchery, dos de los centros realizan decantación, uno dice utilizar filtros y el otro las trata con luz UV.

IDENTIFICACION DE PATOLOGIAS

El presente proyecto contempla un catastro de las patologías de siete especies de moluscos cultivados en la X región, la ostra chilena, *Tiostrea chilensis* (Fig. 1), la cholga, *Aulacomya ater* (Fig. 2), el chorito, *Mytilus chilensis*, (Fig. 3) el choro, *Choromytilus chorus*, (Fig. 4), el ostión del Norte, (*Argopecten purpuratus*) (Fig.5), la ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*. y el abalon, *Haliotis rufescens*. En la IV región, el estudio se ha centralizado en el Ostión del Norte, realizado este último por el equipo de la Universidad de Antofagasta. El tratamiento metodológico así como los resultados de la IV región serán expuestos separadamente.

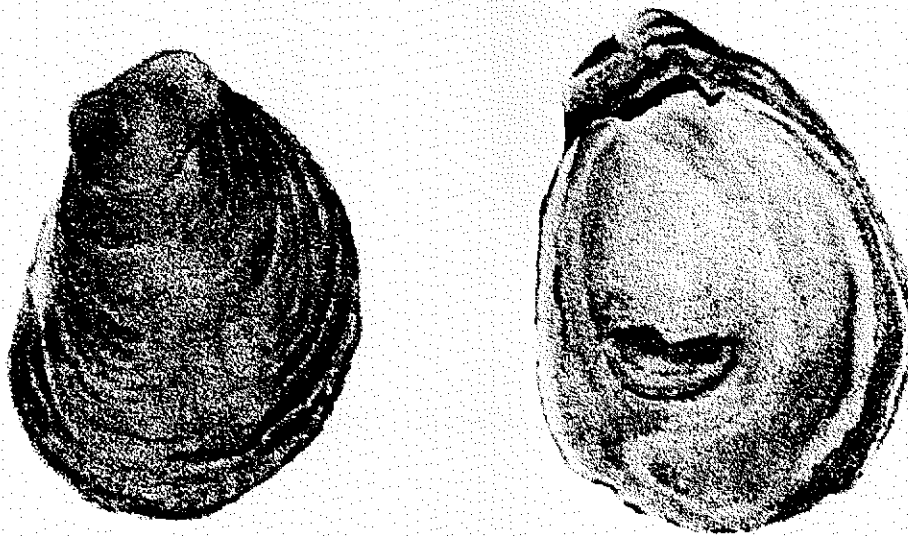


Figura 1.- Ostra chilena (*Tiostra chilensis*)

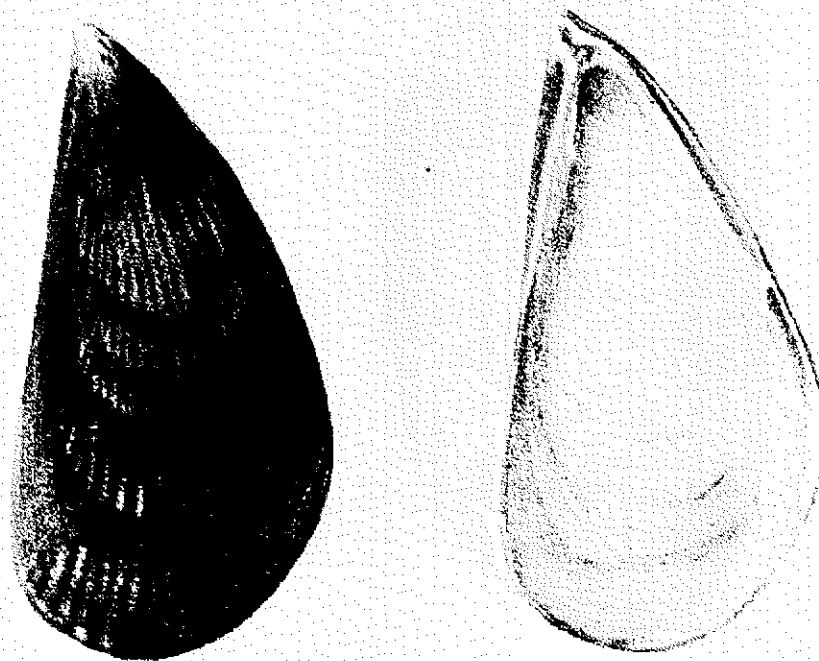


Figura 2.- Cholga (*Aulacomya ater*)

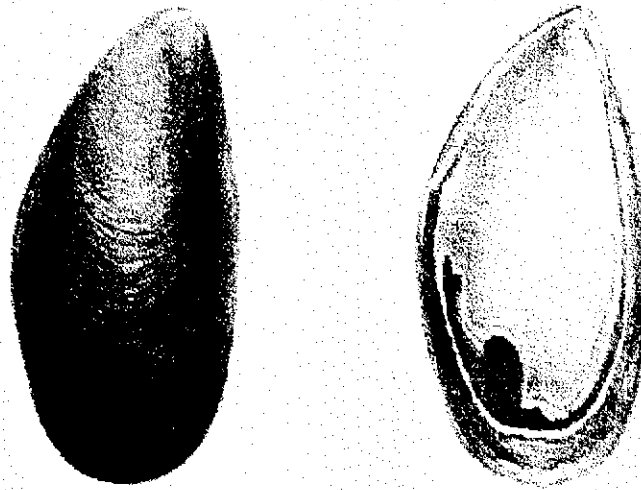


Figura 4.- Chorito (*Mytilus chilensis*)

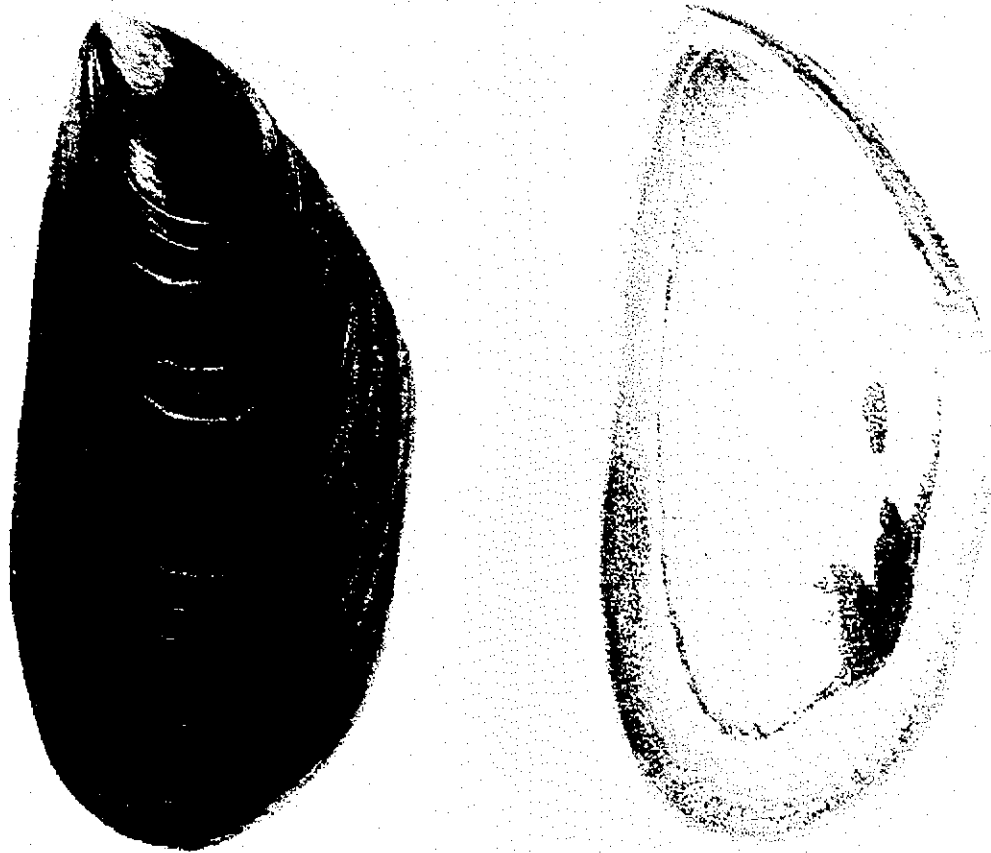


Figura 4.- Choro (*Choromytilus chorus*)

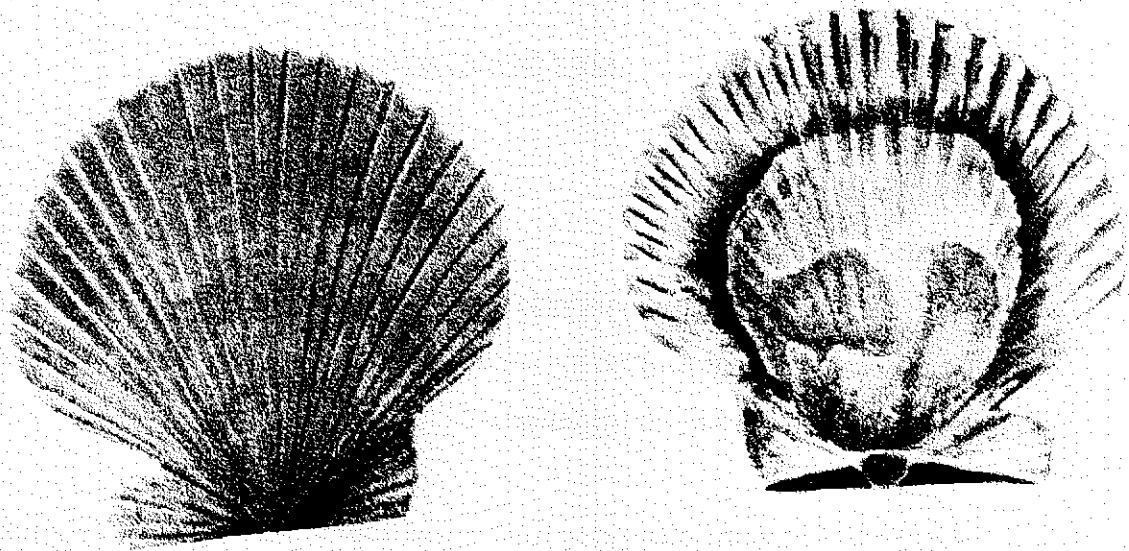


Figura 5.- Ostion del Norte (*Argopecten purpuratus*)

X REGION

METODOLOGIA:

CENTROS MARINOS:

Los ejemplares de cada especie que constituyeron la muestra biológica del estudio fueron elegidos al azar en los centros seleccionados para este fin, se rotularon adecuadamente y luego fueron trasladadas al laboratorio para su análisis.

Los individuos así obtenidos fueron medidos y pesados. En el siguiente paso fueron observados bajo microscopio estereoscópico para detección de parásitos y registro de signos. Al mismo tiempo se realizaron frotis húmedos de manto, branquia y gónadas que fueron observados en microscopio óptico para detección de anomalías, protozoos y estado de madurez. Se llevó un registro individual para todas las observaciones realizadas y a cada individuo se le asignó un código que fue repetido en todas las muestras obtenidas de ellos.

Previo a la toma de la muestra para bacteriología e histología, los ejemplares fueron sumergidos por un minuto en una solución desinfectante de Cloruro de Benzalconio al 10%. Posteriormente se disectaron en forma aséptica para proceder a la obtención de los inóculos desde glándula digestiva y cualquier otro órgano con signos visibles, para ser sembrados en medios de cultivos para bacterias: Agar de Soya Trípica (TSA) suplementado con NaCl al 2% y Agar de Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sucrosa (TCBS), las siembras obtenidas se incubaron a 20°C. El procedimiento para la identificación de las colonias contempló su caracterización morfológica y pruebas bioquímicas. Además desde todas las muestras se obtuvo frotis desde glándula

digestiva para observación con la Técnica del Anticuerpo Fluorescente (IFAT) para detección de *Piscirickettsia salmonis*.

A partir del tercer muestreo se obtuvo trozos de tejido de manto, glándula digestiva y branquia para ser sembrados en Medio Fluido de Tioglicolato (FTG) con 2% de NaCl, los tejidos sembrados en este medio fueron incubados siguiendo los procedimientos señalados en Thoesen (1994). Este medio permite el crecimiento del esporangio de algunos protozoos y fue realizado para estudiar la presencia de ellos en las especies que presentaron anomalías detectadas por histología.

HATCHERY:

Se obtuvieron muestras a partir de tres orígenes: Sistema Agua de Mar (Agua pre-filtrada y post-filtrada), Agua de mantención de microalgas, y desde agua de mantención de las larvas. El agua obtenida se mantuvo en envases estériles. La muestra fue diluída y sembrada en medios nutrientes TSA suplementado con sal y TCBS, para el recuento e identificación de colonias.

Para obtener colonias cuantificables desde los tres orígenes establecidos todas las muestras de agua fueron diluídas 10 y 100 veces desde las cuales se tomó un inóculo de 0,1 ml para depositarlo en placas conteniendo TSA salino, la placa con las siembras fue incubada a 20°C y el recuento de bacterias formadoras de colonias se realizó a las 48 horas, posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas para su identificación.

Para el caso de realizar el diagnóstico de bacterias a partir de larvas, se procedió de la siguiente manera; una vez colectadas las larvas éstas fueron tamizadas y lavadas con agua de mar microfiltrada y estéril luego se suspendieron en 10 ml de agua de mar microfiltrada (0,22 μ m) y se trituraron en un homogenizador de vidrio

estéril, de la mezcla obtenida se tomó 0,1 ml para depositarla en placas Petri conteniendo TSA salino, las placas fueron incubadas y se contaron las bacterias formadoras de colonias después de 48 horas a 20°C, los procedimientos para la identificación de las colonias se realizó de la misma forma descrita anteriormente.

ANALISIS HISTOLOGICO POR MICROSCOPIA DE LUZ (ML):

Para el análisis histológico de individuos provenientes de sistemas marinos, se obtuvo trozos de tejido de la glándula digestiva, manto, gónada y zonas afectadas las que fueron fijadas en Formalina al 10% tamponada en buffer fosfato, se deshidrataron en alcoholes de gradación creciente, se aclararon en Xilol y se embebieron en parafina. Los cortes de 5 μ m se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y en casos específicos se empleó tinción Gram o Giemsa. Los cortes histológicos fueron observados en microscopio óptico Leitz. Los casos de alteración de tejidos fueron fotografiados para posterior análisis e identificación.

ANALISIS HISTOLOGICO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET):

Juveniles y adultos:

Para este caso los cortes de los tejidos que se obtuvo fueron fijadas en Glutaraldehido al 2,5% en 0,1 M de buffer Cacodilato de Sodio (pH 7,4) por tres horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron postfijadas en Tetróxido de Osmio al 1,0% en buffer Cacodilato 0,1 M, se tiñeron en bloque con Acetato de Uranilo, se deshidrataron en grados crecientes de alcohol y se incluyeron en Resina Epóxica. Se obtuvo cortes de 1 μ m en un ultramicrotomo Reichert y se tiñeron con Azul de Toluidina al 1% como control. Los cortes ultrafinos se montaron en grillas de cobre y se tiñeron con Citrato de Plomo. Los cortes seleccionados se observaron en microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 (Universidad de Valparaíso).

Larvas:

Las larvas de *Crassostrea gigas* fueron colectadas desde el fondo del estanque y desde las columnas de agua. Estas últimas fueron usadas como control. Las larvas fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% en agua de mar microfiltrada (0,22µm) por 1 a 2 horas, se extrajo el fijador con dos lavados con agua de mar microfiltrada y posteriormente se dejaron en buffer cacodilato 0.1M por una hora. Se post-fijaron durante una hora en tetróxido de osmio al 1% y se tiñeron en bloque con acetato de uranilo por una hora. Posteriormente se descalcificaron en una solución de EDTA al 5% en buffer cacodilato 0.1 M por 45 min. Se deshidrataron en alcohol y se incluyeron en resina epóxica. Se obtuvo cortes de 1 µm en un ultramicrotomo Reichert y se tiñeron con azul de toluidina al 1% como control. Los cortes ultrafinos se montaron en grillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo. Los cortes seleccionados se observaron en un microscopio Zeiss EM 900.

ANALISIS BACTERIANO:

Las colonias fueron resembradas para su aislación, y los aislados obtenidos fueron sometidos a pruebas bioquímicas estándares para la identificación de bacterias marinas. En general contemplaron las pruebas que se muestran en la tabla 17.

Tabla 17.- Vibriónáceos marinos y Pasteurellas.

CARACTER	ESPECIES						
	<i>Vibrio</i> alginolyticus plecoglossacida	<i>Vibrio</i> parahaemolyticus	<i>Vibrio</i> vulnificus	<i>Vibrio</i> anguillarum	<i>Vibrio</i> ordalii	<i>Pasteurella</i> piscicola	<i>Pasteurella</i>
Crecimiento a 37°C	+	+	+	+(ex)	-	-	+
Motilidad	+	+	+	+	+	-	-
Reducción de NO ₃	+	+	+	+	-(ex)	-(ex)	-
Gas en glucosa	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	+	+	-	-	-
ADH	-	-	-	+	-	+(ex)	-
LDC	+	+	+	-	-	-	-
Citrato de Simmons	+	+	variable	+(ex)	-	-(ex)	-
Ureasa	-	-(ex)	-	-	-	-	-
Indol	+	-	+	+	+	-	-
VP	+	-(ex)	-	+	-	-(ex)	-
Gelatina	+	+	+	+	+(ex)	-(ex)	-
Manitol	+	+	variable	+	+	-(ex)	-
Sorbirtol	-(ex)	-	-	+	-	-(ex)	-
Ramnosa	-	-(ex)	-	-	-	variable	-
Sacarosa	+	-	-	+	+	-(ex)	+
Arabinosa	-	+(ex)	-	variable	-	-	-

(ex)=posibles excepciones

ANALISIS PARA DETECCION DE *Piscirickettsia salmonis*

PROCEDIMIENTO

Para llevar a cabo este análisis se realizaron preparados secos desde la glándula digestiva de todos los moluscos que fueron colectados durante los muestreos. Se realizó un frotis en un portaobjeto, una vez rotulado, éste fue secado al aire y posteriormente se fijó en metanol 100% durante 5 minutos, los portaobjetos obtenidos fueron almacenados a menos 20 °C hasta el momento de su análisis.

Se realizó la prueba indirecta del anticuerpo fluorescente IFAT utilizando un antisuero conjugado anti-rabbit IgC (FITC) (SIGMA) y el antisuero primario rabbit anti-*Piscirickettsia salmonis* obtenido en la Universidad Estatal de Oregon USA.

La técnica que se utilizó para preparar los portaobjetos que contenían las muestras es la señalada por Lannan et al, 1991 para detección de *P. salmonis* en peces de cultivo. Dicho procedimiento fue el siguiente:

Una vez aplicado el anticuerpo primario a los portaobjetos con las muestras, éstos fueron incubados en una cámara húmeda durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se lavaron con solución salina en buffer fosfato (PBS), previo a la aplicación del segundo anticuerpo los portaobjetos fueron secados, una vez aplicado el conjugado FITC, SIGMA que fue diluido en PBS se incubó por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y luego lavados y secados de la misma manera señalada en el paso anterior. Finalmente se colocó el fluido de montaje preparado con glicerol tamponado (pH 8,5) y se taparon con cubreobjetos. Se observaron en un microscopio Zeiss equipado con fluorescencia y en cada frotis se observaron 50 campos en promedio.

RESULTADOS y DISCUSION

Durante el estudio se realizaron cuatro muestreos distribuidos en diferentes estaciones (Julio, Septiembre, Noviembre y Enero). Se examinaron 1386 moluscos. El detalle del número de individuos de cada especie analizada por muestreo se entrega en la tabla 18.

TABLA 18: Número de individuos muestreados por especie

Muestreo	Chorito	Choro	Cholga	Ostión	Ostra chilena	Ostra del Pacífico	Abalon
JUL	131	35	42	22	32	17	*
SEP	113	32	52	21	32	22	6
NOV	143	12	45	24	65	39	12
ENE	275	29	75	20	60	20	10
TOTALES	662	108	214	87	189	98	28

* Durante el desarrollo del primer muestreo no fue posible obtener Abalones

ANALISIS HISTOLOGICO

Mediante la técnica histológica se detectaron diversas anomalías en las especies de moluscos estudiadas , algunas de ellas asociadas a condiciones patológicas, describiéndose las que a continuación se mencionan:

1. Neoplasia hemocítica en *Mytilus chilensis* y *Tiostrea chilensis*.
2. Parasitosis Hemocítica en *Mytilus chilensis* y *Tiostrea chilensis*.
3. Retracción del Manto en el Ostión (*Argopecten purpuratus*) (Protozoo X1).
4. Anomalías asociadas a larvas de *Crassostrea gigas*.
5. Protozoo parasítico en *Mytilus chilensis* (Protozoo X4).
6. Protozoo parasítico de la *Crassostrea gigas* (Protozoo X2).
7. Protozoos parasíticos de la *Tiostrea chilensis* (Protozoo X3 y X5)

1. Neoplasia Hemocítica en *Mytilus chilensis* y *Tiostrea chilensis*.

Esta enfermedad fue detectada en dos especies de bivalvos, *Mytilus chilensis* y *Tiostrea chilensis*.

En todos los casos analizados los individuos afectados no presentaron signos externos de la enfermedad. En el análisis histológico de la glándula digestiva se detectó un tejido proliferativo caracterizado por contener células atípicas de gran tamaño (entre 8 a 11 μm) de diámetro (Foto 1), en comparación con los hemocitos normales que miden entre 6 a 9 μm . Estas células presentan un núcleo muy basófilo con un rango de 8 a 10 μm de diámetro, que escapa al tamaño normal del núcleo de los hemocitos que es de aproximadamente 4 μm . Las células contienen escaso citoplasma y son mitóticamente activas (Foto 2). Esta condición neoplásica está acompañada por la destrucción del tejido normal de los túbulos digestivos.

En todos los casos la neoplasia se presentó en la glándula digestiva y sólo en un caso un ejemplar de *Mytilus* presentó, además, neoplasia en el manto. La Neoplasia identificada para estas especies sería de origen hemocítico, ya que es posible encontrar estas células al interior de algunos vasos hemolinfáticos junto a hemocitos normales (Foto 3).

En *Tiostrea chilensis* los individuos afectados tampoco mostraron signos externos de la enfermedad. Se observa, en el tejido digestivo de esta especie, una gran cantidad de hemocitos transformados que se distribuyen ampliamente por todo el tejido conjuntivo que circunda a los túbulos digestivos (Foto 4). Como en el caso de *Mytilus* los hemocitos transformados se caracterizan por poseer un gran núcleo, con varios nucleólos y escaso citoplasma.

La neoplasia ha sido definida como un crecimiento descontrolado de células que reemplazan al tejido normal.

La distribución geográfica de esta patología en mitílidos ha sido establecida principalmente en poblaciones naturales y cultivos de Europa y América del Norte (Farley, 1969; Lowe y Moore, 1978; Green y Alderman, 1983). La condición detectada en este estudio es similar a la encontrada para *Mytilus edulis* (Farley, 1969) y *Mytilus galloprovincialis* (Figueras *et al.*, 1991a).

La neoplasia hemocítica para *T. chilensis* ha sido descrita anteriormente por Mix & Breese (1980) para la zona de Chiloé. Otras especies de ostras también son afectadas por este desorden proliferativo como por ejemplo: *Crassostrea gigas* (Elston, 1994) y *Crassostrea virginica* (Frieman & Andrews, 1976).

Hasta el momento el origen de esta enfermedad permanece incierto a pesar de que algunos trabajos la relacionan a la presencia de un retrovirus y otros a contaminantes químicos derivados del petróleo (Cheng, 1993).

2. Parasitosis Hemocítica en *Mytilus chilensis* y *Tiostrea chilensis*.

Esta enfermedad fue detectada en chorito y ostra chilena. En el caso de *Mytilus chilensis* sólo un individuo presentó una respuesta hiperplásica hemocitaria que se caracterizó por el aumento en el número de hemocitos, que en su mayoría presentaban. Cuerpos esféricos de unos 2 a 3 μm en su interior. Algunos de estos cuerpos también se encuentran fuera de los hemocitos afectados, al parecer por rompimiento o lisis. Los hemocitos infectados se ubican preferentemente en el tejido conjuntivo de la glándula digestiva, branquias y manto. Una situación similar se encontró en dos ejemplares de *Tiostrea chilensis* (Fotos 5 y 6).

La parasitosis hemocítica está asociada a la presencia de protozoos de tipo *Ascetosporas* también llamados "microcelulas".

En *Mytilus edulis* se ha reportado la presencia de seis tipos de ascetosporidios semejantes a *Bonamia* (Microcelula) para la costa Este de Estados Unidos (Figueras *et al.*, 1991b). Al igual que en *Mytilus edulis*, la parasitosis en *M. chilensis* está asociada a una intensa respuesta hemocítica. En consecuencia, la parasitosis hemocítica en los Mytilidos afectados estaría asociada a la presencia de un protozoo *Ascetosporidio*.

Se ha establecido que algunos parásitos protozoarios de hemocitos producen elevadas mortalidades en cultivos de ostras. Balouet *et al.* (1983) en un estudio con *Ostrea edulis* encontraron un cuadro similar al descrito para *Tiostrea chilensis*, caracterizándose principalmente por la respuesta hiperplásica y el desarrollo intracelular del protozoo. Otra enfermedad asociada a ostras es la Bonamiasis que también se caracteriza por la presencia de los protozoos *Bonamia ostrea* y *Bonamia* sp. dentro de los hemocitos. Se ha probado que *Tiostrea chilensis* es susceptible a la infección experimental con *Bonamia ostrea* (Hine, 1991).

3. Retracción del Manto en el Ostión del Norte (*Argopecten purpuratus*)

(Protozoo X1).

La primera indicación de la infección es la retracción del manto y su oscurecimiento. La infección se localiza preferentemente en el epitelio y tejido conjuntivo del manto, menos común es su presencia en los túbulos de la glándula digestiva.

En los cortes de manto se observan nódulos de diferentes tamaños rodeados por células de tejido conjuntivo (Foto 7), éstos se ubican en las células epiteliales y en el tejido conjuntivo que está por debajo del epitelio. Cada nódulo está formado por 1 o 10 esporocistos más pequeños que tienen un rango de entre 6-10 μm de diámetro. Los nódulos más grandes pueden llegar a medir hasta 30 μm aproximadamente (Foto 8). Los nódulos que se encuentran en los túbulos digestivos al parecer causan un daño importante en los acinos.

Mediante la observación de preparaciones de tejido afectado por microscopía electrónica de transmisión (MET) los nódulos descritos por microscopía óptica en el caso del Ostión del Norte (*Argopecten purpuratus*) están constituidos por varios cuerpos muy electrodensos semejantes a esporoplastos que poseen núcleo (Foto 9) y que se caracterizan por contener en su interior vacuolas de diferentes tamaños que contienen a su vez material electrodenso. También se reconocen estructuras lamelares o membranosas que posiblemente formen parte del polaroplasto (Foto 10 y 11). No ha sido posible identificar, hasta el momento, la presencia de estructuras denominadas como exosporas y endospora, como tampoco alguna estructura especial que aclare su afiliación taxonómica. El análisis en MET de los tejidos cultivados en FTG no arrojó resultados satisfactorios debido a la incapacidad del protozoo de crecer y multiplicarse en el medio de cultivo.

4. Anomalías asociadas a larvas de *Crassostrea gigas*.

De las larvas analizadas un ejemplar presentó dos anomalías que se describen a continuación:

Esferas gastrointestinales:

Al análisis ultraestructural se observó en el tracto gastro-intestinal de la larva la presencia de un cuerpo esférico, constituido por una pared externa, en la cual pueden reconocerse dos zonas de diferente electrodensidad. La zona externa es menos electrodensa que la interna. Las esferas presentan un citoplasma que se caracteriza por ser densamente granulado conteniendo varias vacuolas pequeñas (V 1) y otras con material granulado (V 2). Es posible reconocer un núcleo. Hasta el momento no es posible identificar otros organelos como aparato de Golgi o mitocondrias (Foto 12).

Estos cuerpos esféricos han sido también descritos por Elston (1980) para larvas de *Crassostrea gigas*, y por sus semejanzas ultraestructurales han sido asociadas con el hongo marino *Hyalochlorella marina*. La presencia de este posible hongo en el tracto gastro-intestinal tendría un impacto sobre las funciones normales de la glándula digestiva de la larva.

Acumulación de cuerpos electrodensos en células ciliadas del velo:

Se observó en células ciliadas del velo acumulaciones electrodensas de gran tamaño ubicadas preferentemente cercanas a la superficie celular. Algunas de estas células presentan un cierto grado de degeneración citoplasmática, separación y rompimiento de la membrana plasmática (Figura 13 y 14).

Las acumulaciones de material electrodenso en el citoplasma de células no ciliadas del velo han sido descritas por Elston (1980) para larvas de ostra del pacífico. Por el contrario las acumulaciones aquí descritas se asocian únicamente a células ciliadas del velo. El rompimiento de la membrana plasmática permitiría la entrada de agentes patógenos como virus y bacterias. Estas acumulaciones podrían representar productos anormales del metabolismo celular y no parecen estar relacionadas a partículas semejantes a virus.

5. Protozoo parasítico en *Mytilus chilensis* (Protozoo X4).

Dentro de las células epiteliales de los túbulos digestivos de *Mytilus chilensis* fue posible observar diversos cuerpos esféricos de unos 5 a 8 μm de diámetro, que en su interior se caracterizan por contener material basófilo que aparentemente correspondería al núcleo (Foto 15). En algunos casos se observó una condensación grande (macronúcleo) y una condensación más pequeña (micronúcleo). No fue posible observar cilios o flagelos en su superficie. La localización intracelular del protozoo, aparentemente no causaría daño, puesto que no se observó reacción inflamatoria ya que no hubo un aumento de la infiltración de hemocitos en el tejido adyacente a los túbulos digestivos como parte de una respuesta de defensa celular.

La presencia de un micro y macronúcleo corresponde a una característica de los protozoos ciliados, en este caso no fue posible observar cilios, posiblemente debido a que algunos estados infecciosos no los presentan en su estado parasítico. Un protozoo ciliado de taxonomía aun no definida reportado para *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* (Figueras *et al.*, 1991a y b) no provocaría una respuesta celular del huésped, aun cuando tendría una alta prevalencia (60 a 100 %) en diversas localidades de la Columbia Británica.

6. Protozoo parasítico de *Crassostrea gigas* (Protozoo X2).

Los individuos afectados no presentaron claros signos externos de la enfermedad. La infección se localizó principalmente en el epitelio de los túbulos digestivos. En microscopio óptico se observó la presencia de plasmodios eosinófilos semejantes a los que presentan los protozoos haplosporidios (Foto 16). No se aprecia una clara respuesta de defensa celular de los individuos que presentan estos plasmodios. También se identificaron en gónadas, branquias y manto, pero con menor intensidad. La aparición de células del tejido conjuntivo que miden entre 8 a 13 μm de diámetro aproximadamente y

que contienen en su interior inclusiones de color café que miden aproximadamente 1 μm están asociadas a la presencia de los plasmodios.

Los tejidos cultivados en Tioglicolato (FTG) no presentaron crecimiento del protozoo por lo que no se realizó el análisis ultraestructural.

Los plasmodios que se observaron en *Crassostrea gigas* son de estructura muy semejante a los plasmodios de protozoos haplosporidios descritos para *Crassostrea virginica* (Elston, 1994). En un primer momento se describieron como parte de este cuadro, células del tejido conjuntivo que contenían gránulos de color café y que podrían corresponder a estados más avanzados del protozoo, sin embargo estos cuerpos corresponderían a las denominadas células café (Brown cells) que se presentan en el tejido conjuntivo de *Crassostrea virginica* y que tendrían un rol en la remoción de productos de degradación debido a la muerte del parásito (Cheng y Rifkin, 1970). Estas células también han sido observadas en infecciones causadas por el haplosporidio *Minchinia nelsoni*.

7. Protozoos parasíticos de *Tiostrea chilensis* (Protozoo X3 y X5)

Protozoo X-3

Los especímenes conteniendo el protozoo X3 no presentaron signos externos de la enfermedad. Los protozoos se presentan como plasmodios ubicados principalmente en el manto, túbulo digestivos y branquias. Estos plasmodios son muy semejantes a los encontrados en el epitelio digestivo de *Crassostrea gigas*. No se observaron células del tipo café o infiltración hemocítica en el tejido afectado.

Los protozoos X2 y X3 podrían corresponder a un mismo protozoo en dos especies. Las características morfológicas registradas para estos dos protozoos en ambas ostras resultan ser similares a haplosporidio. Se hace necesario realizar un análisis ultraestructural para poder aclarar la taxonomía de estos protozoos. En las observaciones de los tejidos afectados de *T. chilensis* no se observó una respuesta celular clara o característica en contra del protozoo X3.

Protozoo X5

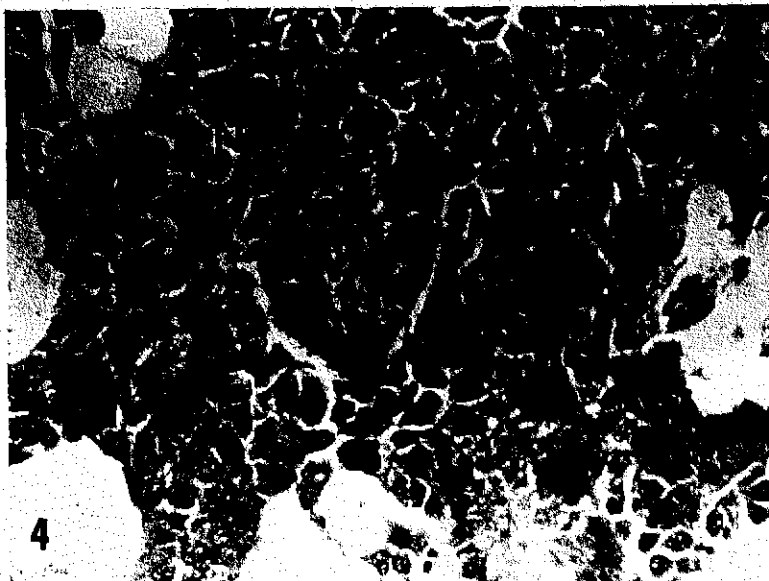
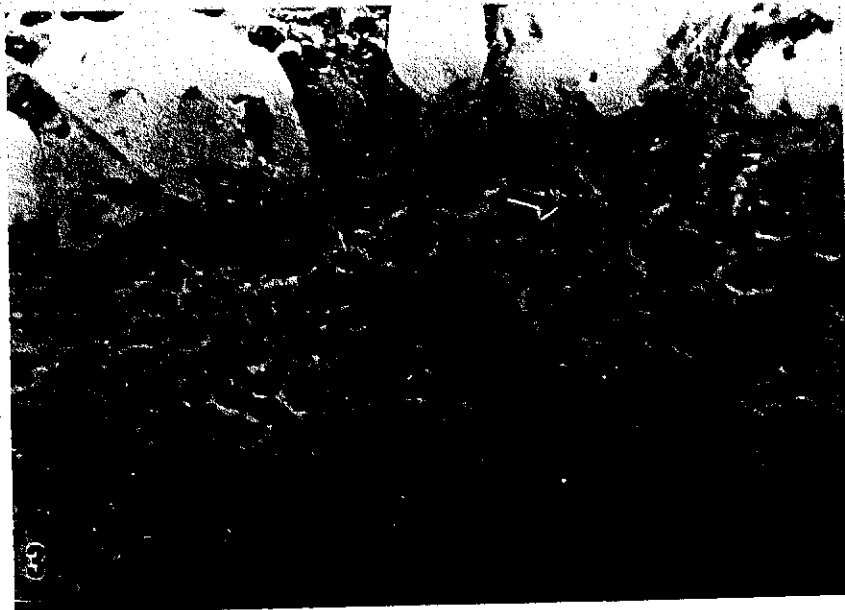
En los túbulos digestivos de la glándula digestiva se observaron cuerpos esféricos que corresponderían a un protozoo X5 que mide aproximadamente 10 a 13 μm de diámetro. Estos se caracterizaron por poseer uno o dos núcleos que se pueden ubicar central o excéntricamente. Estos cuerpos se ubican en el lumen y por lo general están adosados a las células epiteliales de los túbulos (Foto 17). No se observó infiltración hemocítica como parte de la respuesta celular del huésped. Estos cuerpos esféricos podrían corresponder a un primer estadio de un protozoo asociado al Subphylum Ciliophora.

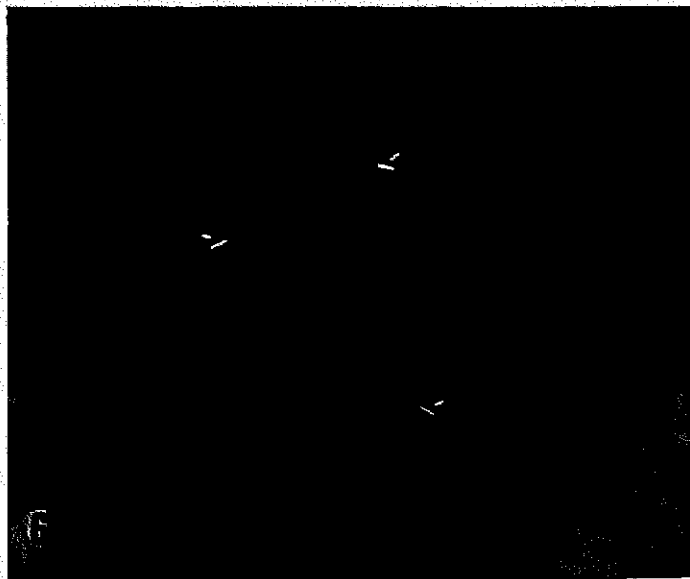
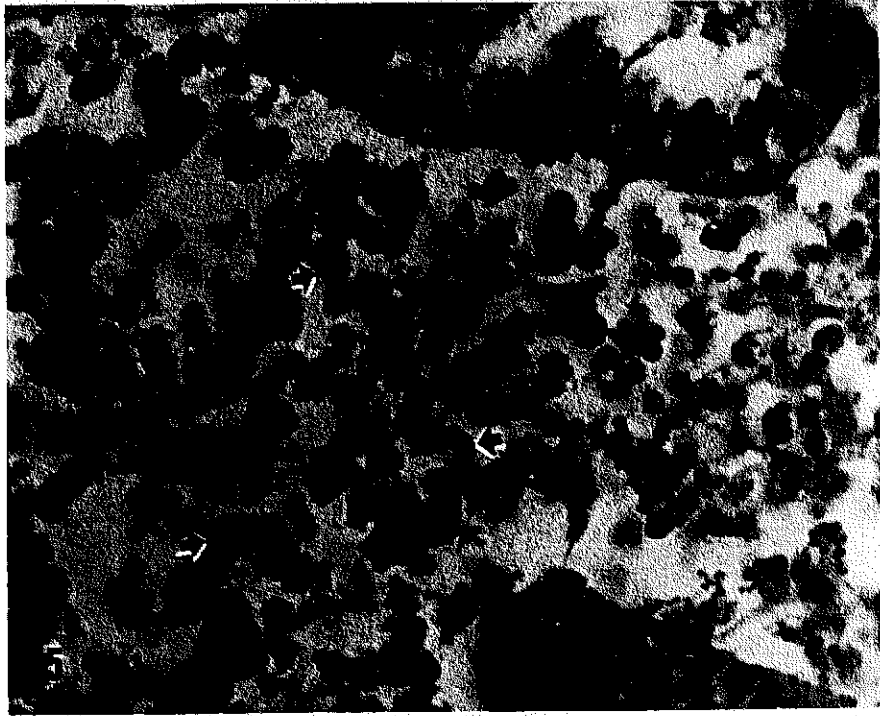
LEYENDAS DE FOTOS.

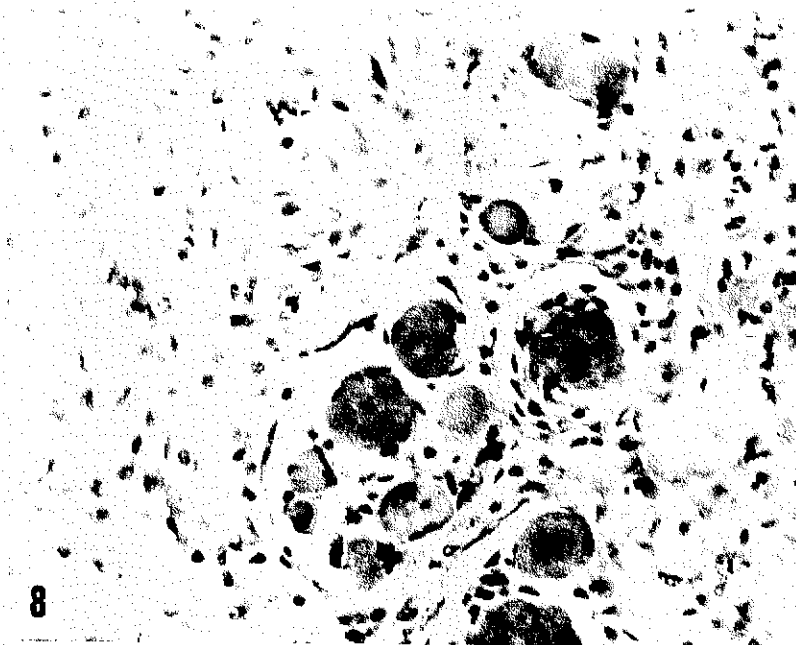
- Foto 1. Infiltración del tejido conjuntivo de la glándula digestiva en *Mytilus chilensis* por células neoplásicas. N = células neoplásicas. (x 220)
- Foto 2. Neoplasia hemocítica en la glándula digestiva. ep = epitelio, N = células neoplásicas. (x 1,100)
- Foto 3. Vaso hemolinfático con células transformadas. Flecha = hemocito normal. (x 1,200).
- Foto 4. Células neoplásicas en *Tiostrea chilensis*. N = células neoplásicas. (x 220).
- Foto 5. Parasitosis hemocítica de *Tiostrea chilensis*. Flechas = hemocitos infectados. (x 220)
- Foto 6. Hemocitos de *Tiostrea chilensis* con cuerpos intracitoplasmáticos. Flechas = inclusiones intracitoplasmáticas. (x 4000)
- Foto 7. Epitelio y manto de *Argopecten purpuratus* con presencia de nódulos del protozoo X1. Flechas = cistos. (x 1,330).
- Foto 8. Nódulos en el tejido conjuntivo del manto que contienen un variado número de esporocistos. (x 1,440).
- Foto 9. MET de un nódulo del Protozoo X1. (x 18,100).
- Foto 10. MET que muestra un Protozoo X1. N = núcleo, L = complejo de lamelas, Flechas = vacuolas. (x 24,000).

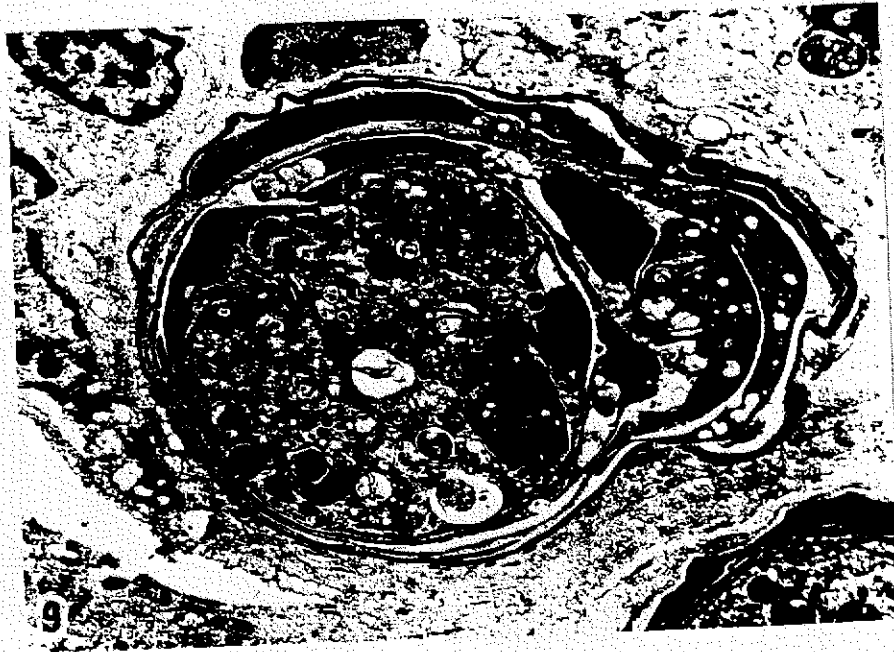
- Foto 11. MET que muestra un detalle de los sistemas de membranas lamelares y vesículas con material electrodensó. L= complejo de lamelas, Flechas = vesículas con material electrodensó. (x 24,500).
- Foto 12. MET de un Cuerpo Esférico en una larva de *Crassostrea gigas*. p = pared externa, N = núcleo, Flechas= vacuolas V1 y V2. (x 3.500).
- Foto 13. MET de células ciliadas del velo de una larva de *Crassostrea gigas*. N= núcleo, Cabezas de flechas = acumulaciones electrodensas, C = cilios. (x4,400).
- Foto 14. MET de células con acumulaciones electrodensas que presentan degeneración citoplasmática. N= núcleo. (x 4,000).
- Foto 15. Protozoo X4 en los túbulos digestivos de **Mytilus chilensis**. Flechas = protozoo X4. (x 1,500).
- Foto 16. Plasmodios del Protozoo X 2 en *Crassostrea gigas*. Flechas = plasmodios. (x1,100).
- Foto 17. Protozoo X5 en *Tiostrea chilensis*. Flechas = protozoo X5. (x 1,200).



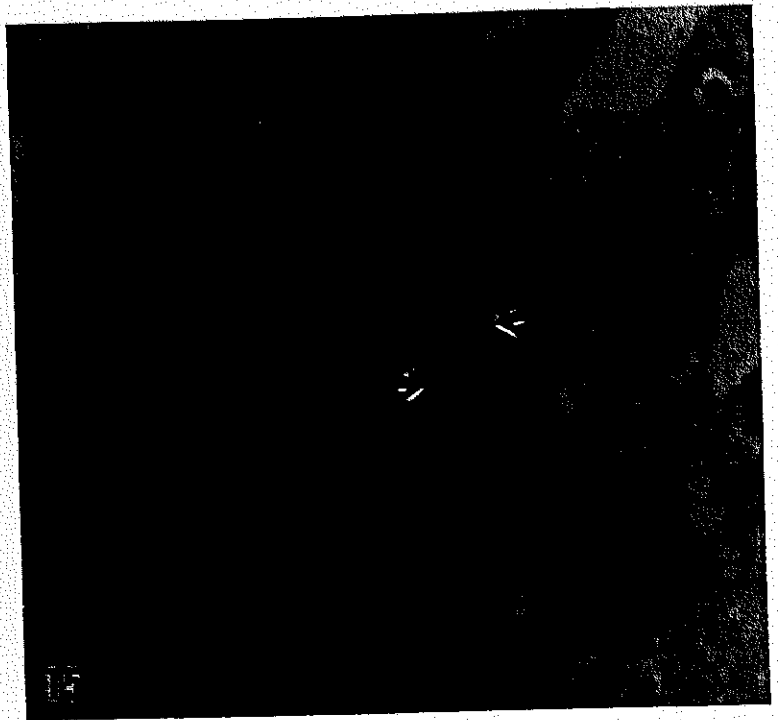


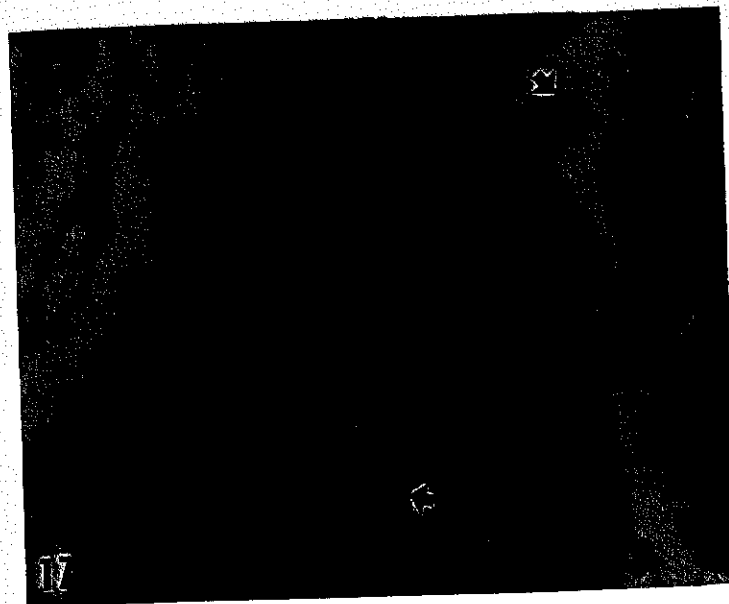












ANÁLISIS BACTERIANO:

PROCEDIMIENTOS

Sistemas Marinos:

Los inóculos que se sembraron desde las distintas especies obtenidas durante los muestreos, provinieron principalmente de la glándula digestiva, ya que pocos individuos presentaron alteraciones en otro órgano que justificaran tomar una muestra bacteriológica desde ellos. En la Tabla 19 se observa el número de muestras para análisis bacteriano obtenidas desde la glándula digestiva para las distintas especies analizadas.

TABLA 19 : Número de muestras bacteriológicas obtenidas por especie.

Especie	Julio	Muestreo		
		Septiembre	Noviembre	Enero
Chorito	65	59	57	79
Choro	21	17	8	7
Cholga	20	19	18	23
Ostión	14	6	7	8
Ostra chilena	23	22	32	18
Ostra del Pacífico	15	15	24	11
Abalon	0	6	3	4

Cabe hacer notar que el primer muestreo se emplearon dos medios de crecimiento para sembrar desde cada órgano, lo que duplicó las muestras para el análisis. Motivo por el cual se estimó que en los siguientes muestreos se emplearía uno de ellos eligiendo el medio TSA por ser menos selectivo como medio base para la toma de muestras y se dejó el TCBS para la búsqueda de *Vibrios* a partir de los crecimientos en el medio base.

Debido a que no es posible relacionar las bacterias aisladas con bacterias patógenas cuando los individuos no están evidentemente enfermos, sin realizar un bioensayo, los crecimientos de colonias en los medios empleados pueden corresponder a la flora natural de los individuos o del lugar.

RESULTADOS y DISCUSION

Caracterización de colonias:

En los crecimientos en TCBS en los cuales se intentó aislar bacterias del género *Vibrio*, en cuyo caso las colonias adoptan un color amarillo, se presentaron siempre varios morfotipos entre ellas algunas de color amarillo, sin embargo las pruebas bioquímicas realizadas a ellas no condujeron a los *Vibrios*, tampoco se lograron resultados positivos con la prueba de los sensidiscos 0/129 y Novobiocina. Por este motivo las colonias caracterizadas por el color amarillo en TCBS fueron probadas con anticuerpos específicos disponibles para *V. anguillarum*, *V. ordalii* y *V. anguifforme*, por medio de pruebas de inmunodifusión. No obstante, los resultados de estas pruebas fueron negativos.

Bacterias Identificadas:

Sistemas Marinos:

Todas las bacterias fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas estándares. Cabe destacar que no se aprecia una diferencia clara en la asociación de bacterias a las distintas especies, llegándose a aislar una diversidad de ellas desde los distintos moluscos muestreados. La Tabla 20 muestra los géneros bacterianos identificados durante los cuatro muestreos.

Otro aspecto que cabe mencionar, es que las bacterias aisladas en los medios de cultivos empleados no fueron consideradas como patógenos, sino más bien, se les consideró como bacterias presentes en el medio ambiente y que habrían ingresado al organismo vía filtración. La mayoría de los géneros bacterianos identificados han sido descritos por Bautista (1989), como pertenecientes a la flora bacteriana del agua circulante y que tendrían una variación de abundancia de una u otra, dependiendo de las condiciones ambientales imperantes en el lugar.

Sakata, 1992, citando el trabajo de Garland et. al. 1982 realizado en ostras, indica que la glándula digestiva de esa especie está provista de sistemas de defensa, tales como movimientos de los cilios, producción de mucus y sustancias antimicrobianas, que impedirían que organismos patógenos se fijen en la superficie ciliada de la glándula digestiva. Por lo tanto la microflora del tracto intestinal estaría constituida por la población de bacterias, unidas a la materia particulada del contenido intestinal. Solamente en ostras debilitadas los factores antimicrobianos llegarían a inactivarse y las bacterias del contenido intestinal pueden atacar y desarrollarse en la superficie del intestino. De acuerdo a estas investigaciones se puede esperar que las colonias bacterianas identificadas en el presente estudio hayan sido parte de la microflora natural del lugar .

Es posible agregar que ninguno de los crecimientos que se obtuvo se encontraba en forma pura, lo que podría indicar que las bacterias aisladas no estarían actuando como patógenos principales, sin embargo, para llegar a establecer su rol de patógeno en los moluscos analizados se debe realizar un bioensayo, el que ha sido propuesto para otro estudio, dado el plazo que tiene el presente proyecto.

TABLA 20. Géneros bacterianos aislados en los 4 muestreos a partir de Glándula Digestiva de las siete especies de moluscos en estudio.

Géneros aislados	I	II	III	IV
Acinetobacter	x	x		
Actinobacillus	x			x
Alcaligenes		x		
Aeromona		x		
Bacillus	x			
Corynebacterium	x			
Enterobacterias	x	x		x
Micrococcus			x	x
Moraxella	x	x	x	x
Neisseria	x	x		
Pseudomonas	x	x	x	x
Staphylococcus	x			

Hatchery:

Las empresas dedicadas a la producción comercial de larvas de moluscos en la X Región son tres, ubicadas en el area de Puerto Montt, Ancud y Castro. La producción está dirigida a la obtención de semillas del Ostión del Norte y Ostra Japonesa.

Durante los 4 muestreos, fue posible obtener muestras para los análisis bacterianos de agua de mar pre y post filtradas así como de los cultivos de microalgas empleadas en la alimentación de las larvas. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con el estudio sobre las larvas debido a que en algunas ocasiones no se encontraban disponibles.

La cuantificación de colonias bacterianas se entrega en la Tabla 21, para la dilución de 10 y un inóculo de 0.1 ml.

TABLA 21: Cuantificación de colonias en los 4 muestreos.

N° Muestreo	Hatchery 1				Hatchery 2				Hatchery 3			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Larvas	*	*	99	47	*	*	7		s/c	17	s/c	150
Microalgas	474	3	11	155	>500	*	130	145	>500	*	103	>400
Agua de.Mar												
Pre-filtrada	79	2		*		*	*80	2	29	1	50	138
Agua de.Mar												
Post-iltrada	5	s/c	2	50	*	*	30	s/c	14	s/c	2	s/c

* El Hatchery no entrega muestras para este análisis.

La TABLA 22 muestra los géneros de bacterias aislados desde Hatchery durante los 4 muestreos. Si bien se sembraron muestras tomadas desde agua pre y post filtradas, desde cultivo de microalgas y también desde larvas, no se observa diferencia entre los géneros bacterianos identificados desde los aislados de uno u otro origen, aunque sí una mayor o menor diversidad de géneros entre muestreos.

TABLA 22: Géneros de bacterias aisladas en Hatchery obtenida desde agua de mantención de microalgas y larvas, desde larvas, y desde agua de mar pre y postfiltro.

Géneros aislados	Muestreo			
	I	II	III	IV
Acinetobacter	x		x	
Actinobacillus	x	x	x	x
Alcaligenes	x		x	
Aeromonas	x			
Bacillus	x			
Corynebacterium	x			
Enterobacterias	x		x	
Micrococcus		x	x	x
Moraxella	x	x	x	x
Neisseria	x			
Pseudomonas	x	x	x	x
Staphylococcus			x	

Detección de *Piscirickettsia salmonis*

El número de frotis por área y por muestreo se presentan en la Tabla 23, y corresponden a las especies en estudio:

Tabla 23.- Distribución de frotis por muestreo.

ZONA	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
Calbuco	35	54	55	80
Ancud	41	48	61	90
Castro	95	87	131	155
Quellón	104	81	87	150
Totales	275	270	334	475

Los resultados de estos análisis indican la presencia de *P. salmonis* en las cuatro zonas de estudio sólo en el chorito, con una incidencia media en las muestras de 16.21%. Ello indicaría que los mitílidos están actuando como reservorio del patógeno para los salmónidos de cultivo, aún cuando su rol ecológico no está claro (Tabla 24).

Tabla 24. Número de muestras positivas a *P. salmonis* (Técnica IFAT)

	CALBUCO	ANCUD	CASTRO	QUELLÓN
CHORITO	4	2	11	19
CHOLGA	0	1	8	2
CHORO	0	1	3	3
O. CHILENA	0	5	0	0
O. del PACÍFICO	0	0	1	0
ABALON	0	0	0	0
OSTION	0	0	0	0

IV REGION

Los centros estudiados correspondieron a las Bahías de Guanaqueros y Tongoy, dos de ellos en Guanaqueros (C1, C2) y dos en Tongoy (C4, C5). Se incluyó, además, una empresa marina (C3) y dos hatcheries (C6 y C7).

ANALISIS PARASITOLOGICO

PROCEDIMIENTO

Alrededor de 10 ostiones por centro se utilizaron para el análisis histológico; los especímenes fueron pesados y medidos, procediéndose a la disección y observación en fresco (frotis húmedo) de manto, branquias, palpos, nefridio, gónadas, intestino (pared y contenido) y glándula digestiva. Se observó bajo microscopio óptico, para la detección de posibles parásitos, protozoos o metazoos.

Los protistas presentes (ciliados) fueron contabilizados por campo (10x), tomándose el promedio de a lo menos 5 campos, para determinar la intensidad media según Margulis et. al (1981).

Con una jeringa estéril de 1 ml, se les extrajo hemolinfa para realizar frotis que luego fueron teñidos con la metodología clásica para frotis sanguíneos. Posteriormente, se les extirpó tejido (aproximadamente 1 cm²) de la glándula digestiva, del manto, corazón, nefridios, branquia y gónada. Los tejidos fueron fijados en formalina buffer al 10% en agua de mar, lavados y preservados en alcohol de 70°, deshidratados en una batería ascendente de alcohol y finalmente incluidos en parafina. Con la ayuda de un micrótopo Biocut® se obtuvo cortes seriados de 5 µm de grosor y teñidos con hematoxilina-eosina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la revisión de los frotis sanguíneos no se observó células anormales. Tampoco se observó figuras neoplásicas en los otros tejidos. En los tejidos se encontró encapsulaciones focales hemocíticas con formación de abscesos que contenían al parásito y hemocitos necróticos, además de la formación de cuerpos ceroides en un amplio rango de tejidos como el manto, la glándula digestiva y la gónada.

De los análisis se comprobó que los ostiones en general presentaban sólo un tipo de ciliado (*Euplotes*), localizado en torno a los palpos o las branquias con mayor preferencia e intensidades muy bajas. Sólo en los dos primeros muestreos se detectó la presencia de *Trichodina*, *Euplotes*, otro ciliado no identificado y un ciliado de la familia *Ancistrocomidae*.

La presencia de estos ciliados, según las observaciones en fresco y posteriormente en las placas histológicas no constituye ningún daño a los ostiones, en la baja cantidad (intensidad) en que se encuentran en cada campo (promedio) observado (Ver fotos 18, 19 y 20). No obstante es necesario señalar que este tipo de ciliados asociados con el molusco pueden llegar a constituir algún tipo de peligro toda vez que la intensidad se haga mayor, lo cual ha sido reportado para otras áreas geográficas, así van Banning (1979) en Figueras y Villalba(1988) lo mencionan como parásito de las branquias de ostra y que su presencia se torna dañina cuando supera un determinado nivel ocasionando efectos nocivos para el funcionamiento de éstas.

Bower et al (1994), refiriéndose a Ostras menciona que la mayoría de las infecciones son inocuas con baja intensidad, pero que fuertes infecciones estaban asociadas con la erosión de las branquias, debilitamiento y pérdidas en ostras en Francia.

PATOLOGIA CAUSADA POR UN PROTISTA DESCONOCIDO.

En el análisis macroscópico de los individuos examinados se detectó manchas café en el manto, esto junto con la retracción del manto y a veces con el desprendimiento de conquiolina y carie de las valvas son indicios de una patología por un agente desconocido, siendo sometidos al análisis histopatológico posterior (ver foto 23, 24 y 26) palpos(ver foto 21 y 22), glándula digestiva e intestino (ver foto 25) .

La presencia de este tipo de protozoos, ya detectado en el primer y segundo muestreo, se comprueba especialmente en algunos individuos examinados en el tercer y cuarto muestreo desde la Localidad 2, 4 y 5, pero con prevalencias bajas de 10% y 23,6% (revisión macroscópica para la comprobación de manchas café en el manto).

En las restantes localidades muestradas no se detectó la presencia de estas manchas café macroscópicas, ni retracción del manto o las lesiones en el tejido que indiquen la presencia de tal parásito.

Lo anterior señala que el parásito no está totalmente extendido en el área, o está con una prevalencia baja, lo que no significa que no esté presente en otras áreas, o en el medio natural y que se debe tener el suficiente cuidado para evitar su posible expansión o daños en los cultivos, en los centros afectados, a otros centros del área o tal vez a otras especies de moluscos.

la producida por *Perkinsus marinus* en *Macoma balthica* (Goggin et al, 1996). Sin embargo, en las secciones histológicas del Ostión del Norte, no se encontró el meronte típico de esta especie caracterizado por tener una gran vacuola excéntrica donde en su interior es posible observar un vacuoloplasto, por otra parte, los cultivos de tejido del ostión en medio Fluido de Tioglicolato (FTG), resultaron negativos. Cabe destacar, que este tipo de lesiones son comunes en los molusco al defenderse de algún agente extraño.

Las lesiones ceroides son el resultado de una defensa del ostión hacia un agente patógeno (protista) que ha sido neutralizado (muerto). Se estima que las lesiones ceroides sean causadas por un protozoos sarcodino (ameba) (S.Bower, comunicación personal).

Otra de las anomalías encontradas fue la presencia de inclusiones basofílicas en el citoplasma de las células epiteliales del intestino, se presume que estas inclusiones puedan ser bacterias. El porcentaje de positivos en la muestra fue de 6.7% y sólo se detectó en el segundo muestreo.

La presencia de los protozoos ectocomensales encontrados en la cavidad del manto de los ostiones no produjeron daños patológicos en los órganos afectados (branquias, palpos, manto) (ver fotos 18, 19 y 20).

LEYENDA DE FOTOGRAFÍAS

FOTO 18.- Branquias y presencia de *Trichodina*. (Flecha) (x 1,840)

FOTO 19.- Palpo con presencia de un ANCISTROCOMIDAE (Flecha) (x 500)

FOTO 20.- Palpo y ANCISTROCOMIDAE magnificado (Flecha) (x 1,700)

Las siguientes fotos corresponden a la presencia de lesiones por protistas desconocidos:

FOTO 21.- Palpo: presencia de lesiones ceroides (Flechas) (x 420).

FOTO 22.- Palpo: vista magnificada de las lesiones ceroides (x 1,600)

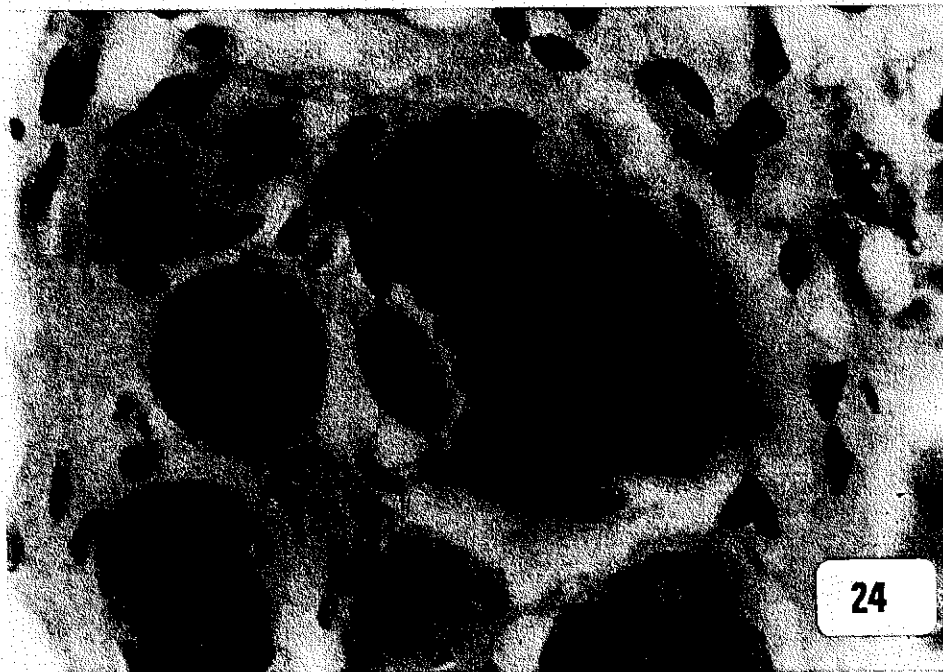
FOTO 23.- Manto: lesiones ceroides (x 3,200).

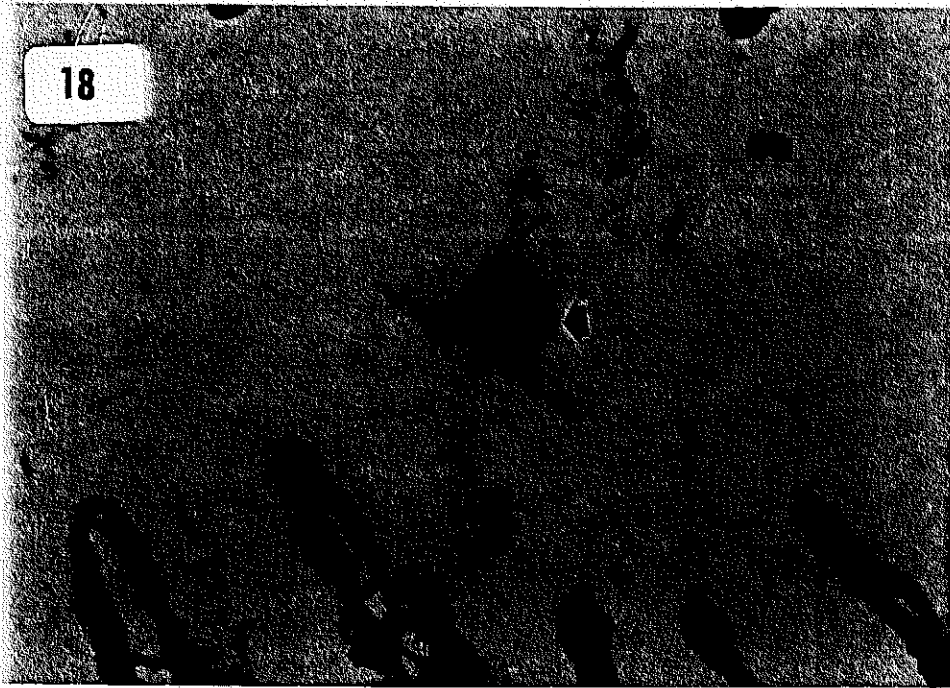
FOTO 24.- Manto: lesiones ceroides (x 3,400).

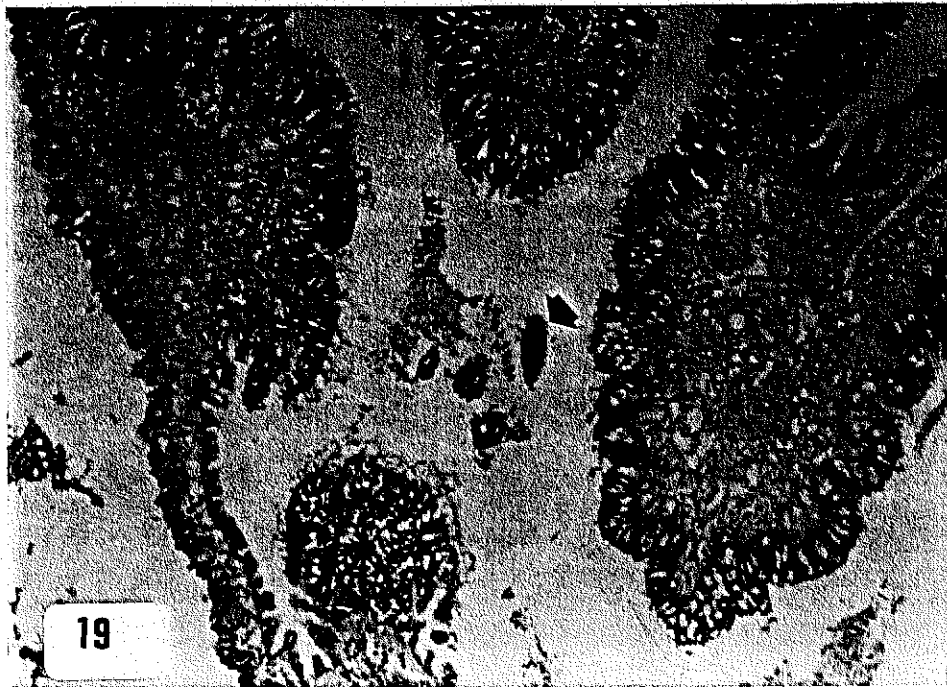
FOTO 25.- Intestino: epitelio con inicio de la infección (x 3,100)

FOTO 26.- Manto: borde del manto con infección (x 3,140)





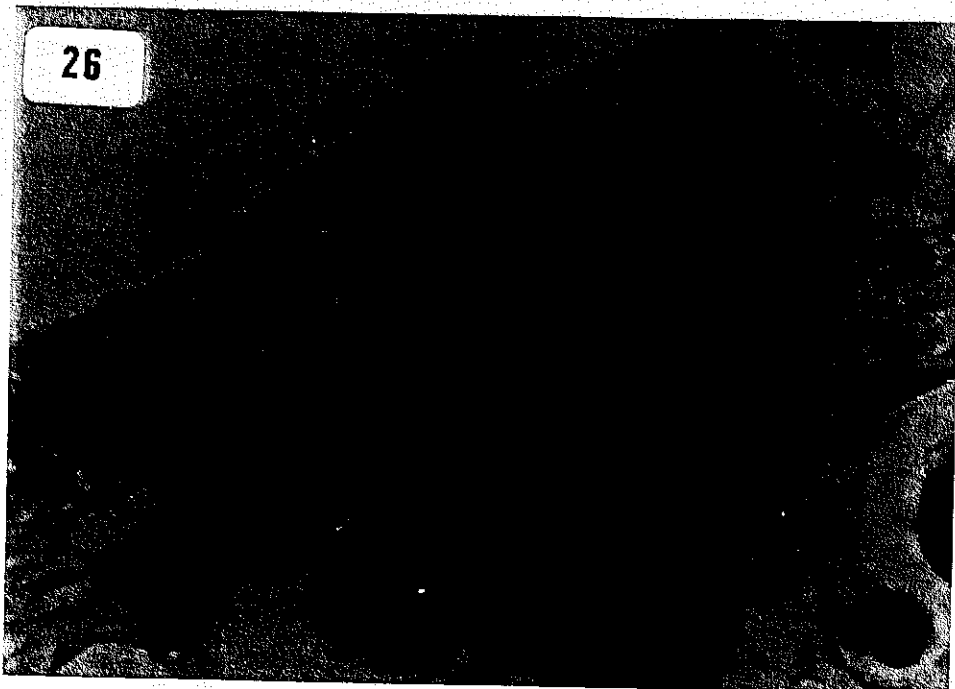




25



26



ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

PROCEDIMIENTO:

Primeramente se lavó los individuos con agua de mar estéril. Posteriormente se disectaron en forma aséptica gónada y nefridio a grupos de cinco organismos (obteniendo 1 gramo para cada órgano), luego las muestras fueron homogeneizadas con un "Tissue Tearor" y sembradas en medio Triptosa Soya Agar (TSA), suplementado con NaCl 2% w/v y Thiosulfato-citrato-bilisucrosa Agar (TCBS). Posteriormente las placas se incubaron a 20°C por 48 h para TCBS y siete días para TSA.

Análisis de hatchery fueron realizados solamente en uno de los dos centros de cultivo, debido a ser el único que se encontraba operando en la región. Se analizaron muestras de agua de entrada, estanques de cultivo, alimento (microalgas) y larvas. Las muestras fueron sembradas de acuerdo a la metodología descrita por Riquelme et al., (1995), en los medios de cultivo y condiciones de incubación descritos previamente.

Posteriormente se procedió a aislar posibles patógenos, seleccionando todas las cepas sucrosa (+), debido a antecedentes previos que señalan que en este grupo se encontrarían los potenciales patógenos de bivalvos. A las cepas seleccionadas se les midió la capacidad de producir exotoxinas hemolíticas y proteasas mediante técnicas estándares (Smibert y Krieg, 1981).

RESULTADOS

Un total de cien ostiones, de un rango de talla de 7,44 a 109,4 mm, se analizaron bacteriológicamente en el primer muestreo, correspondiendo a 50 especímenes de la bahía de Tongoy y 50 especímenes de la bahía de Guanaqueros, no se observaron diferencias en cuanto a la carga bacteriana de los organismos tanto en gónada como en nefridio, la cual fluctuó entre

1×10^3 - 1×10^5 cfu/g de órgano. Un patrón similar al primer muestreo de invierno (Julio) se observó en el segundo muestreo del mes de Septiembre, en el cual se analizó un total de 175 ostiones, 50 en Guanaqueros y ciento veinticinco en Tongoy. Por su parte, la carga bacteriana de los organismos provenientes de hatchery, es decir, producidos en laboratorio (HSA y HSB), de la bahía de Tongoy, no difirieron de lo encontrado en los organismos provenientes de captación natural de semillas, tanto en la concentración de bacterias heterotróficas totales como en los vibrios.

La carga de vibrios totales en los dos muestreos (n=225 ostiones) no muestra grandes diferencias, oscilando en el valor de 1×10^3 cfu/g de órgano. La presencia de vibrios sucrosa (+) fue menor en el segundo muestreo, no detectándose éstos en algunos centros de cultivo.

La ocurrencia de bacterias con actividad hemolítica también fue menor en el segundo muestreo. En el primer muestreo se detectaron nueve cepas con actividad hemolítica, de las cuales una mostró una fuerte actividad patogénica (Cepa 118). Esta cepa corresponde a un *Vibrio* sp. aislado de la gónada de organismos del centro de cultivo Guayacan (Foto 27). Además se detectaron dos cepas de *Vibrio* sp., con actividad patogénica (No 126 y 129) aisladas de gónada y nefridio respectivamente (hemolíticas y proteolíticas), éstas causaron cerca del 50% de mortalidad larval. El proceso de identificación de estas cepas está siendo desarrollado actualmente.

En el segundo muestreo se encontraron sólo tres cepas hemolíticas, cuya actividad patogénica sobre larvas está aún por determinarse.

En los muestreos realizados en el hatchery no se encontró vibrios con características patogénicas. A su vez, el hatchery se encontraba en condiciones normales de funcionamiento, sin mortalidades larvales masivas.

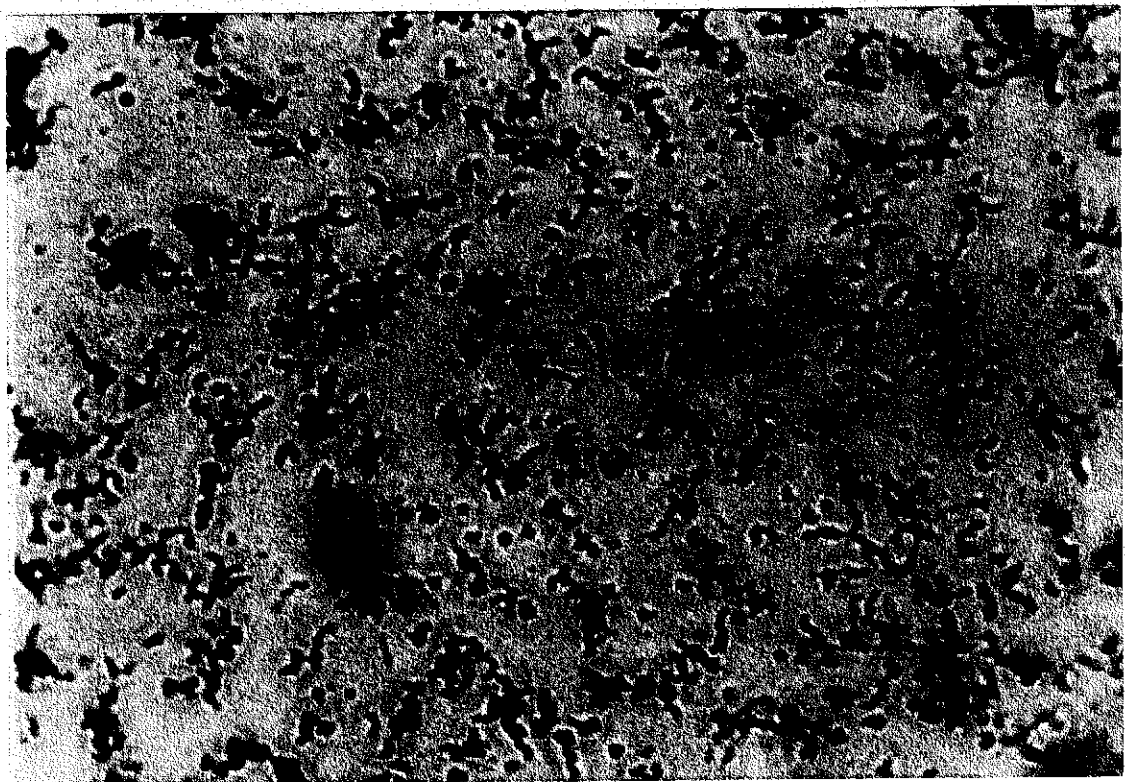


Foto. 27.- Microfotografía de la cepa de *Vibrio sp.* patogénica (118).

2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS PATOLOGÍAS

ANTECEDENTES

La escasa información disponible acerca de las patologías que afectan a los moluscos cultivados en Chile, se reduce principalmente a estudios bacterianos realizados en Hatcherías y reproductores del Ostión del norte (*Argopecten purpuratus*).

En relación a los hallazgos de cepas de *Vibrio*, en las ovas de ostiones, Riquelme et al., (1994), realizan un estudio en el que se encuentra evidencia de una transmisión vertical de bacterias en esta misma especie. Posteriormente el mismo autor prueba la patogenicidad de *Vibrio*, a raíz de una mortalidad masiva de larvas de ostión (Riquelme et al., 1995).

En el aspecto parasitario, no hay reportes relacionados con enfermedades sino más bien estudios taxonómicos de algunos parásitos encontrados en especies de moluscos silvestres (Carvajal, 1988). Lo más relacionado al tema de parásitos que infectan a moluscos es un estudio realizado por Oliva et al., (1986) sobre parasitismo en el Ostión del norte.

DESARROLLO METODOLÓGICO Y RESULTADOS

De acuerdo a la información sobre el número de centros en la X región, éstos fueron agrupados dependiendo de su distribución geográfica. Los centros seleccionados, al momento de iniciar los muestreos biológicos, pudieron ser asociados a cuatro zonas geográficas en función de la concentración geográfica de los centros, (Mapa 1):

Zona I: Calbuco Zona II: Ancud Zona III: Castro Zona IV: Quellón

Las localidades de muestreo en la IV Región se señalan en el Mapa 1B. La distribución de los hallazgos considerados patológicos en función de su grado de incidencia en los diferentes lugares de muestreo, se ha graficado en los mapas siguientes, por tipo de molusco, para la X Región.

Mapa 2: Neoplasia Hemocítica: En el mapa 2 se señalan los centros muestreados para chorito y ostra chilena. Se señala la presencia de Neoplasia en estas dos especies, la que para el caso de *Mytilus chilensis* se presenta en las zonas de Quellón, Castro:

Muestreos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	6.4	4.0	1.4	1.4
Nº ind. positivos	5	3	2	4
Nº Total	78	74	148	280

Para *Ostrea chilensis* la distribución de esta patología se presenta en las Zonas de Calbuco y Ancud:

Muestreos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	0	0	3.1	10
Nº ind. positivos	0	0	2	6
Nº Total	20	19	64	60

Mapa 3: Parasitosis Hemocítica: En el Mapa 3, se señalan las zonas muestreadas para chorito y ostra chilena. Esta patología solamente fue detectada para estas dos especies en la zona de Ancud:

Mytilus chilensis

Muestreos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	0.0	0.0	0.0	0.4
Nº ind. positivos	0	0	0	1
Nº Total	78	74	148	280

Tiostrea chilensis

Muestreos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	0.0	0.0	0.0	3.3
Nº ind. positivos	0	0	0	2
Nº Total	20	19	64	60

Mapa 4: Retracción del manto. (Ostión del Norte): Todos los centros de cultivo de Ostión que se muestrearon en este estudio, presentaron la patología asociada al protozoo X1:

Muestreos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	89.4	13.3	0.0	10.0
Nº ind. positivos	17	2	0	2
Nº Total	19	15	23	20

Mapa 5: Protozoo parasítico de *Mytilus chilensis* (X4): Este protozoo se presentó en todas las Zonas muestreadas:

Muestréos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	0.0	0.0	15.5	17.9
Nº ind. positivos	0	0	23	50
Nº Total	78	74	148	280

Mapa 6: Protozoo parasítico de *Crassostrea gigas* (X2): Esta patología se presentó en las zonas de Ancud, Castro y Quellón:

Muestréos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	53.3	57.1	23.2	17.2
Nº ind. positivos	8	8	10	5
Nº Total	15	14	43	29

Mapa 7A y B: Protozoos parasíticos de *Tiostrea chilensis* (X3 y X5).

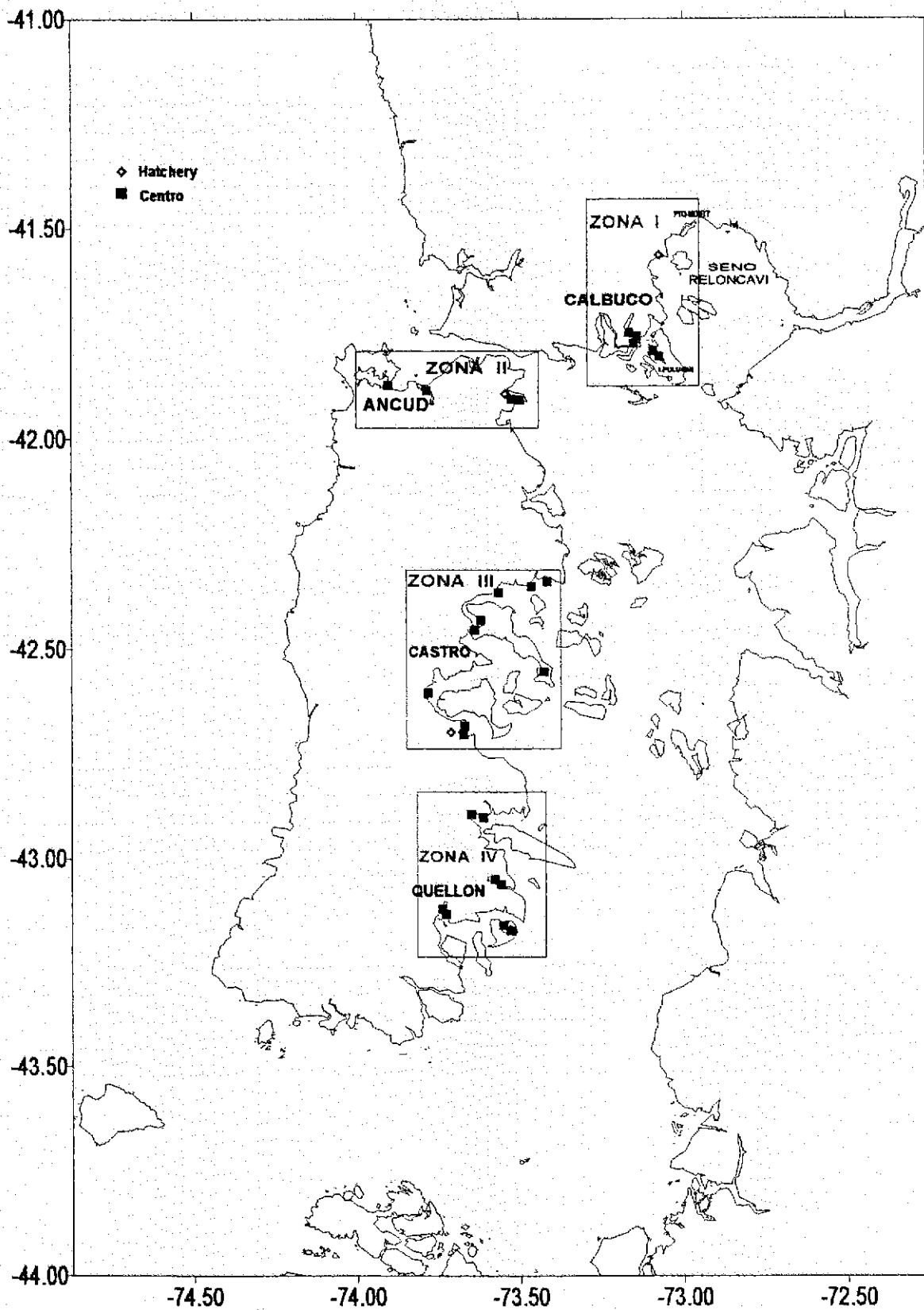
Los protozoos X3 y X5 se presentan principalmente en la zona de Ancud y en menor medida en la Zona de Calbuco y Castro:

Protozoo X3

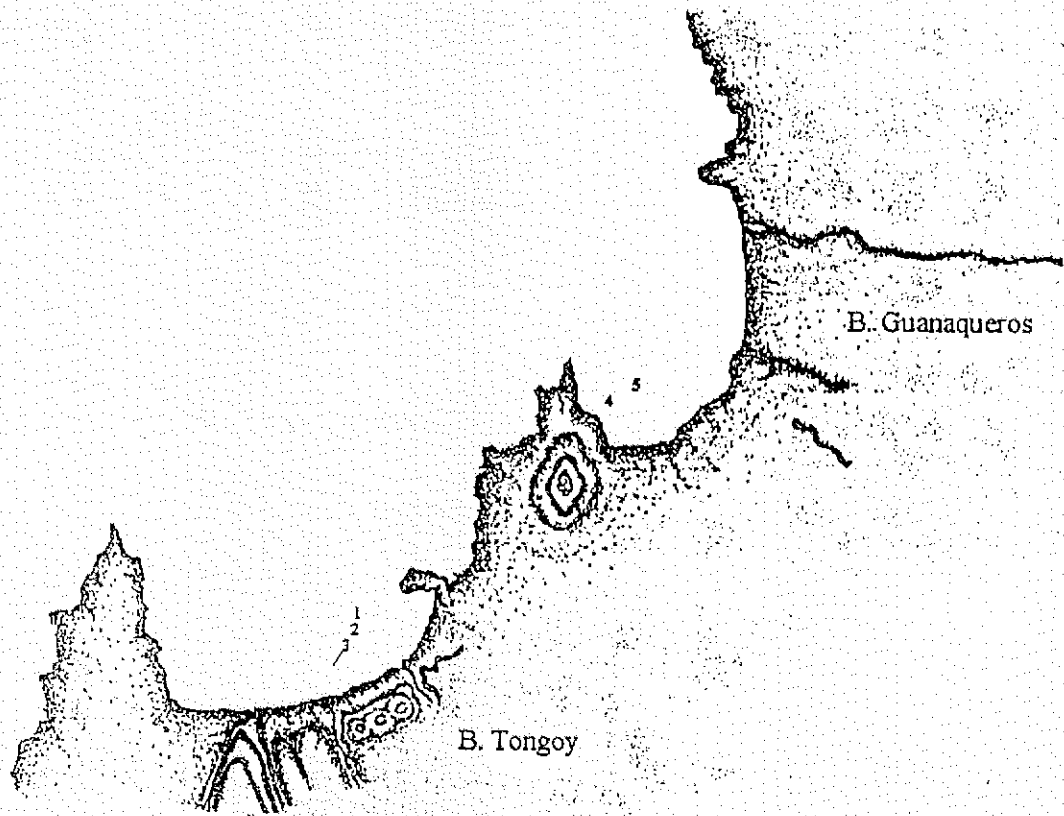
Muestréos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	25.0	31.5	12.5	3.3
Nº ind. positivos	5	6	8	2
Nº Total	20	19	64	60

Protozoo X5

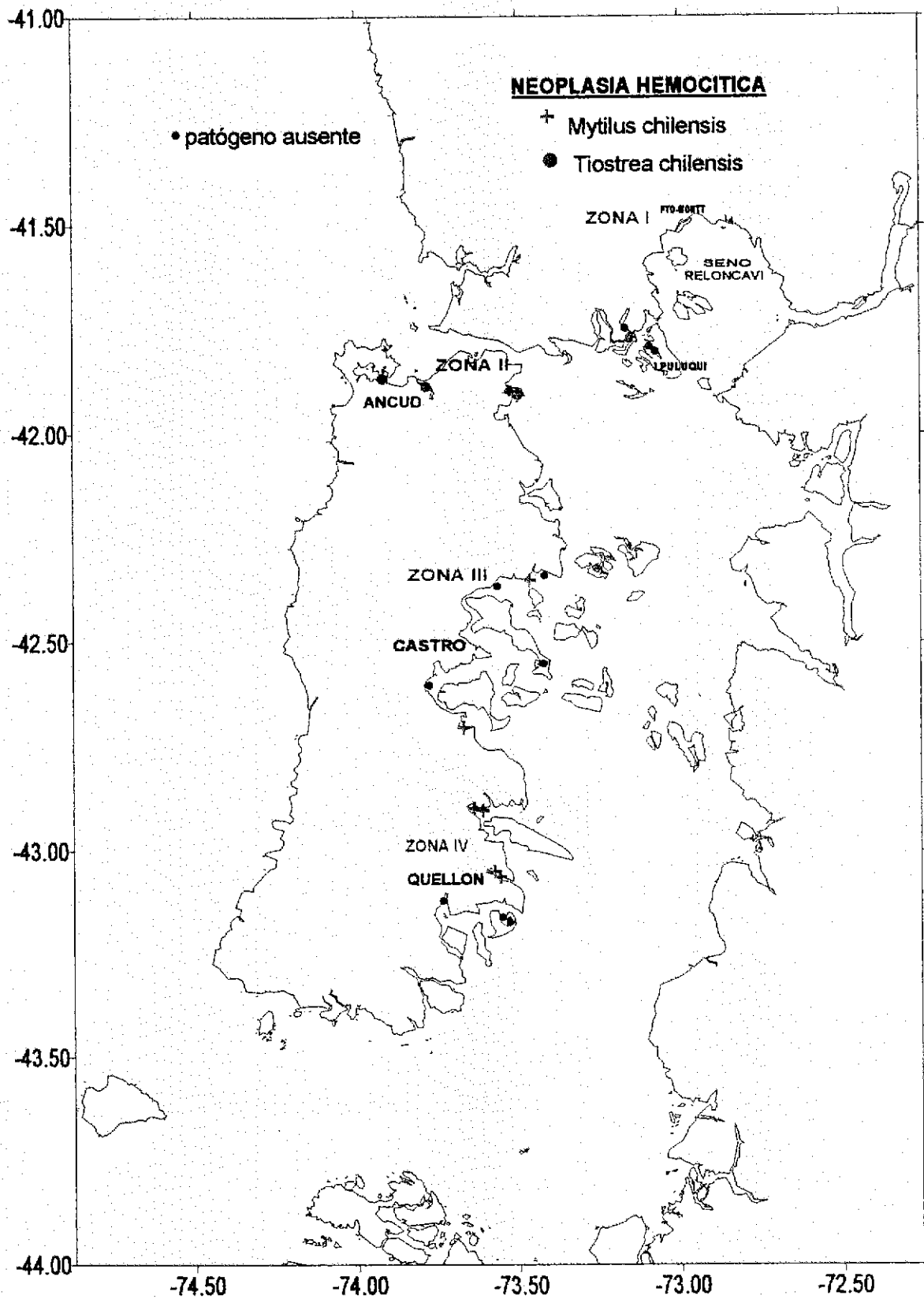
Muestréos	Julio	Septiembre	Noviembre	Enero
% prevalencia	20.0	42.1	21.9	31.6
Nº ind. positivos	4	8	14	19
Nº Total	20	19	64	60



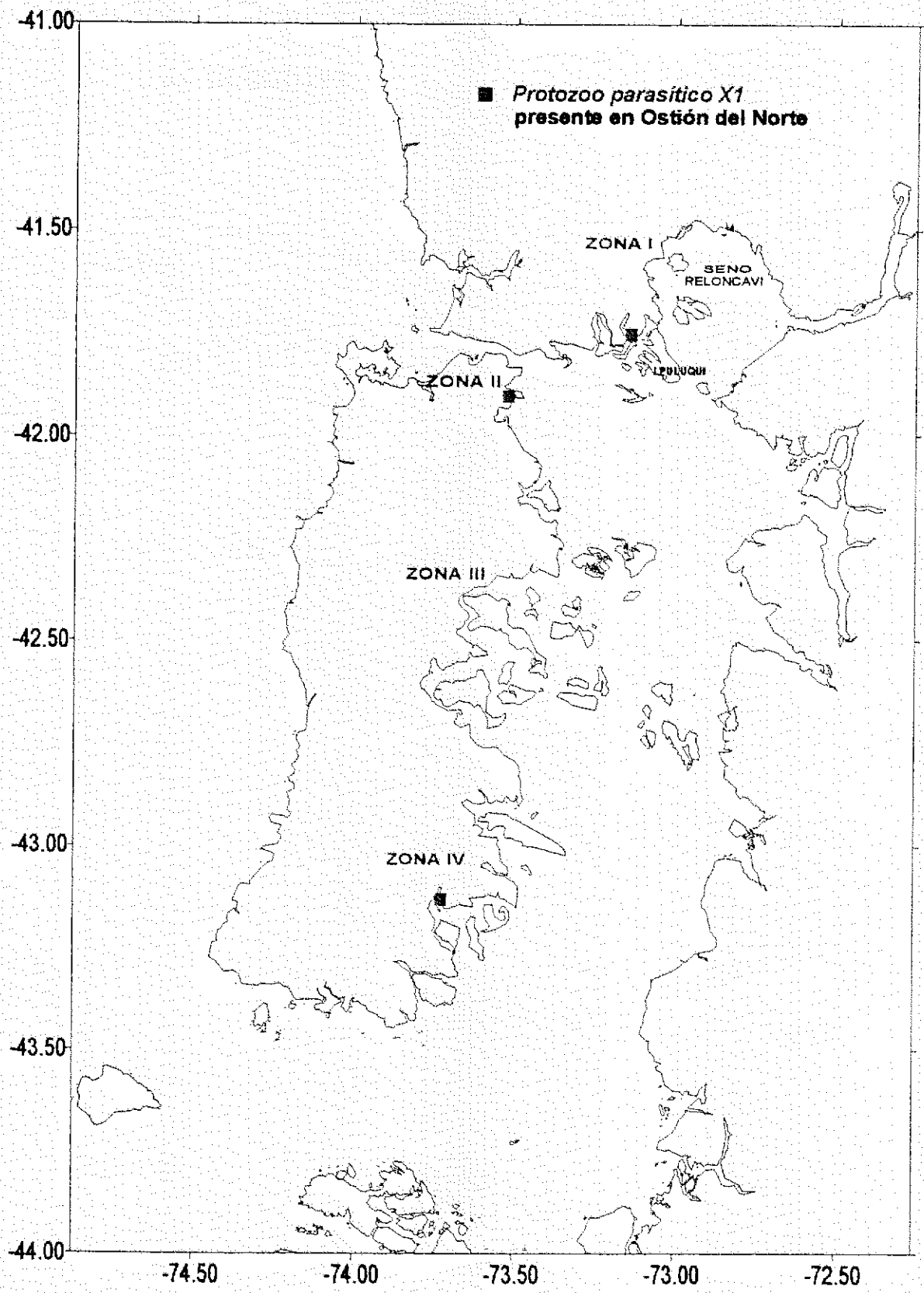
MAPA 1A.-DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS PUNTOS DE MUESTREO



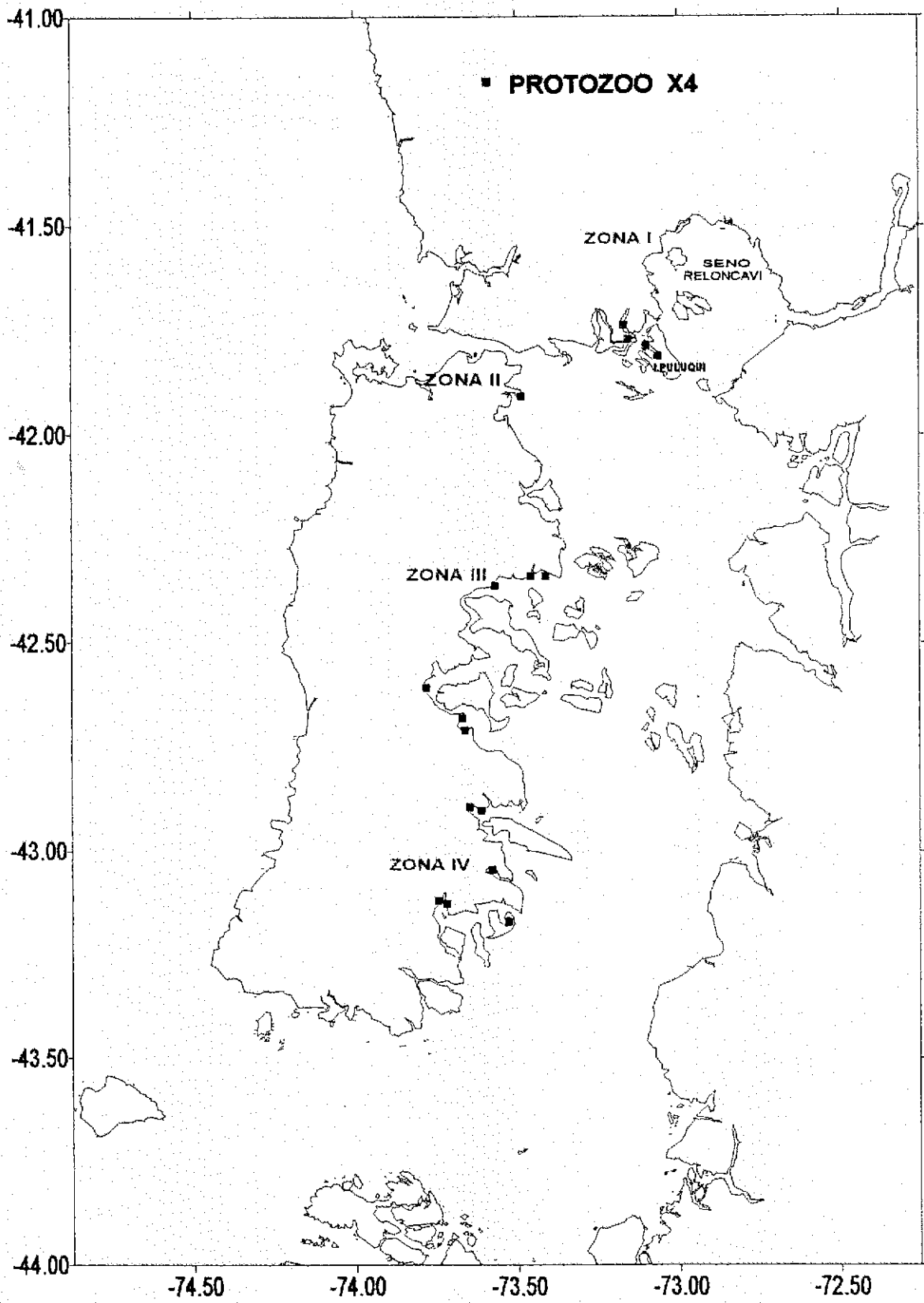
Mapa 1B. Localidades de muestro en la IV Región.



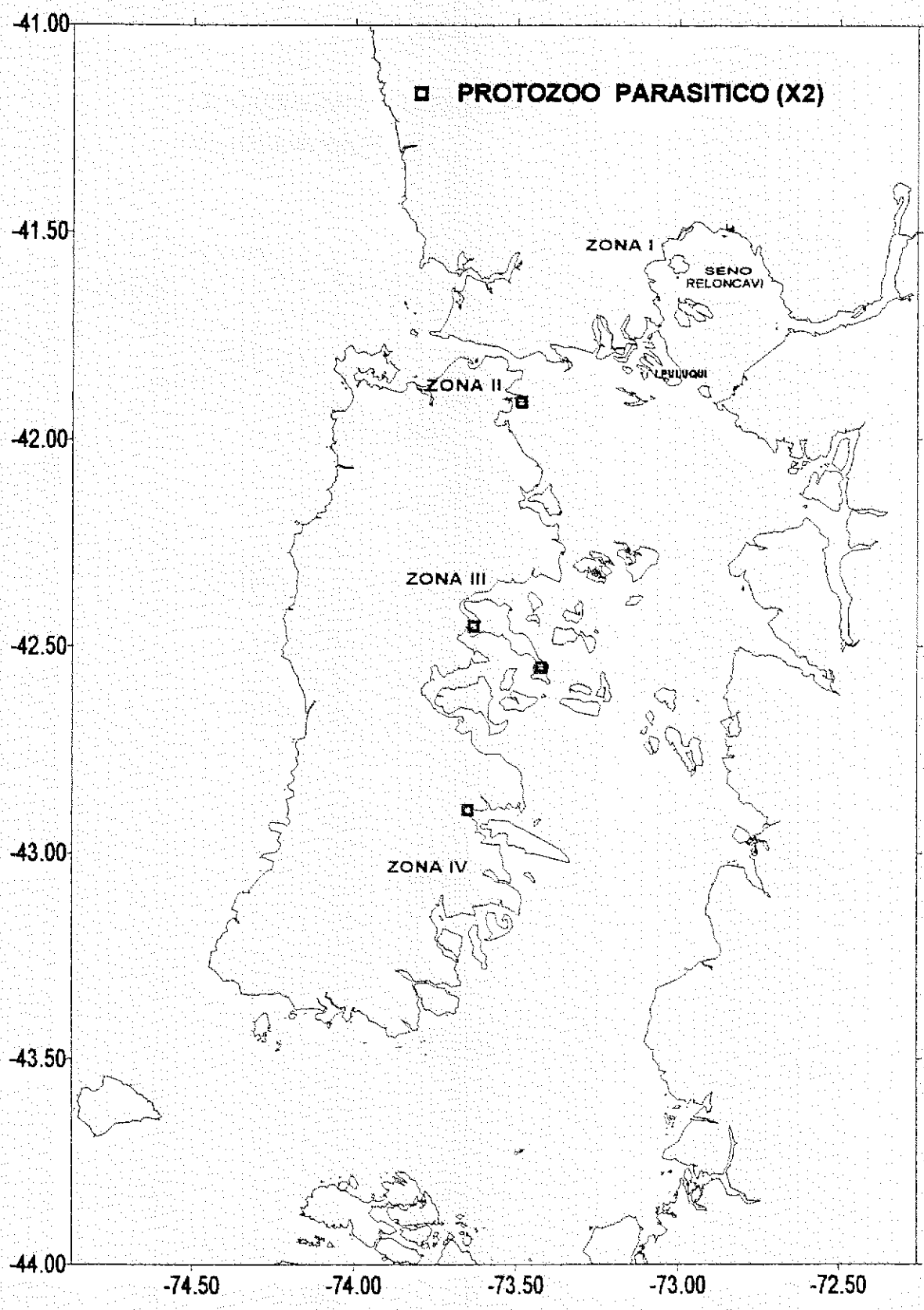
Mapa 2.- Presencia de Neoplasia en *Mytilus chilensis* y *Tiostraea chilensis*



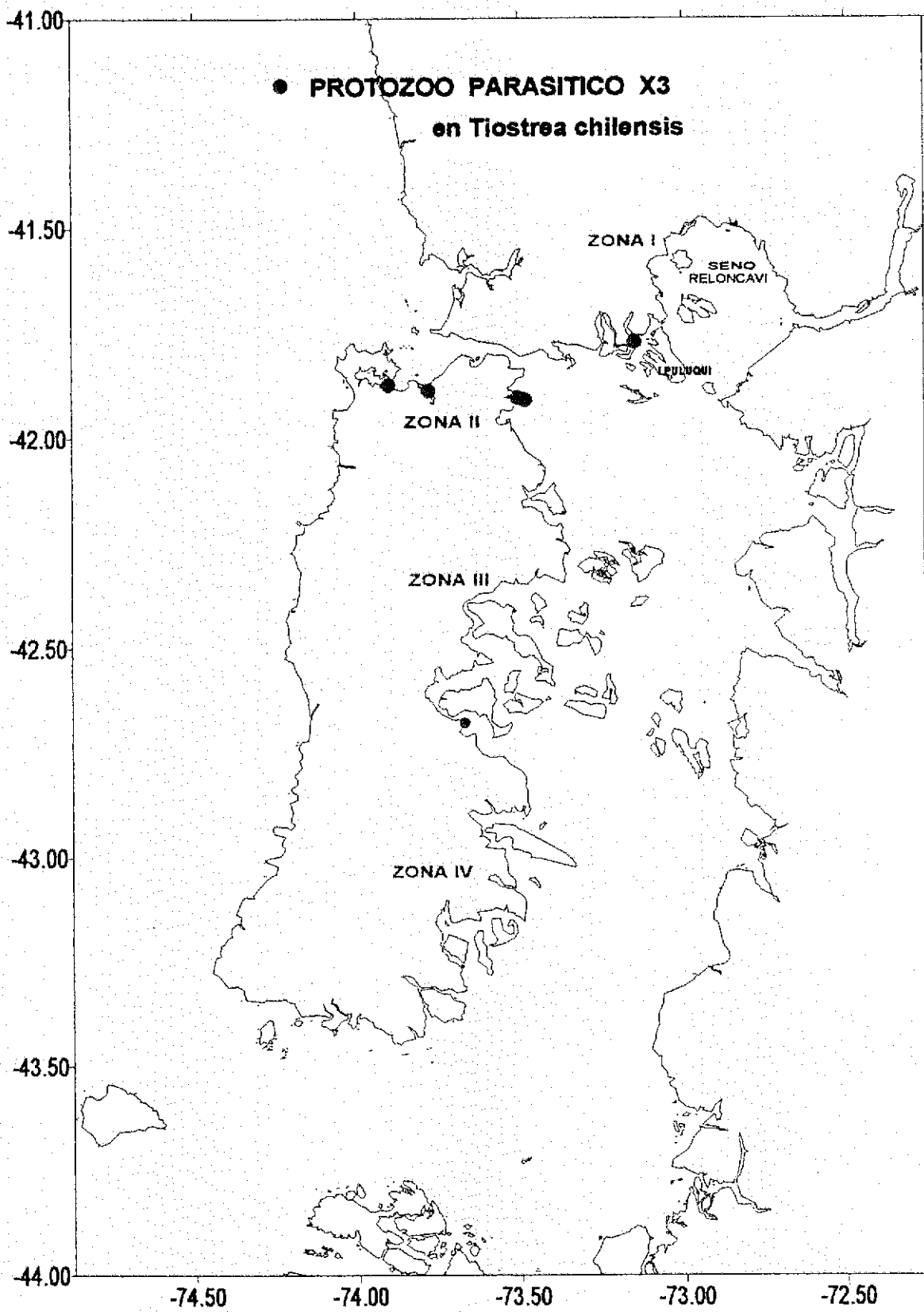
Mapa 4. Retracción del manto en cultivo de Ostión del Norte.



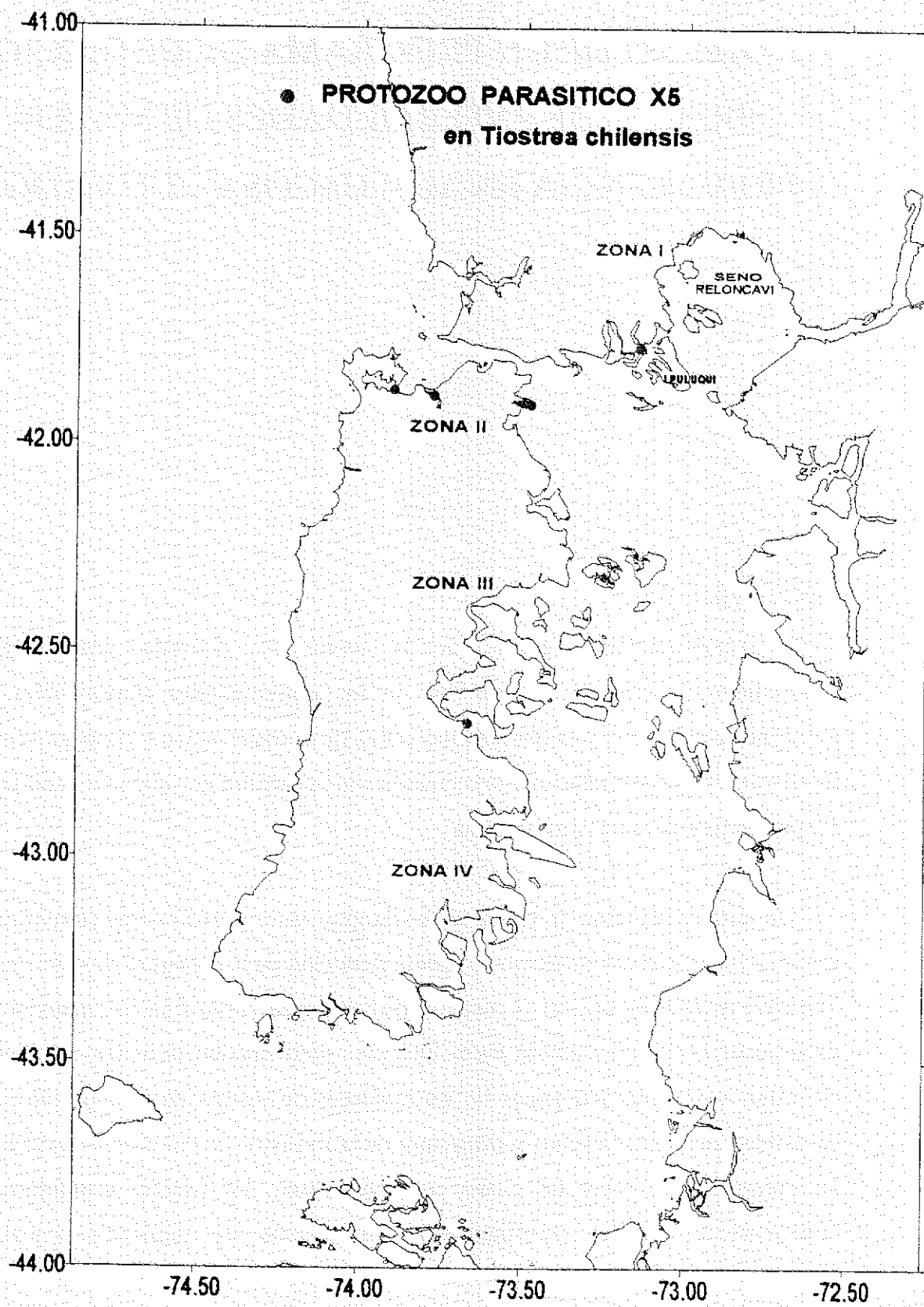
Mapa 5. Protozoo X4 en *Mytilus chilensis*.



Mapa 6. Presencia del Protozoo Parasítico X2 en Ostra japonesa.



Mapa 7A. Protozoo Parasitico X3 en Tlostrea chilensis



Mapa 7B. Protozoo Parasitico X5 en Tiostraea chilensis

3. DISEÑO DE UN PROGRAMA DE DETECCIÓN PRECOZ DE ENFERMEDADES DE MAYOR PREVALENCIA EN MOLUSCOS CULTIVADOS.

ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud ha definido que: "Vigilancia Epidemiológica nacional y mundial de las enfermedades transmisibles, es el escrutinio permanente y la observación activa de la distribución y propagación de las infecciones y factores relacionados con suficiente exactitud en calidad y cantidad para ser pertinentes para un control eficaz".

Un sistema eficiente de vigilancia es de gran valor debido a que proporciona un mecanismo de defensa mediante la rápida detección de la presencia de enfermedades. También es factible utilizar el sistema de vigilancia como una herramienta en los programas de control y erradicación. En vista a implementar un sistema de detección en orden a controlar patologías de los moluscos de cultivo, se necesita información confiable y actualizada sobre la estructura de la industria en cuestión, la incidencia de las enfermedades sobre las cuales se desea actuar, los factores económicos y la epidemiología de las enfermedades. Un sistema de vigilancia tendría que

implementar una infraestructura que permita realizar las actividades correspondientes y que tiene los siguientes objetivos fundamentales:

- A) Evitar la entrada de enfermedades.
- B) Detectar la enfermedad en caso de introducción.
- C) Apoyar las medidas de control y erradicación.

La implementación de un sistema de vigilancia requiere de una serie de actividades que pueden agruparse de la siguiente forma:

1. Recolección sistemática de datos pertinentes.
2. Consolidación, evaluación e interpretación de los datos.
3. Pronta distribución de la información y de las recomendaciones a los involucrados, en especial a los que deben decidir y actuar.

A través de un sistema de detección se puede recolectar la información básica que permita los estudios tendientes a preparar un programa de control o erradicación. Un programa en este sentido se realizó anteriormente para Salmónidos en la zona Sur Austral de Chile (Informes Técnicos FIP, FIP II/93-29)

DESARROLLO METODOLOGICO

El soporte informático de un programa de detección precoz de enfermedades en moluscos, está dado por un sistema computacional que controla todos los aspectos relevantes asociados a la operación de una Base de Datos definida a partir de los requerimientos del problema.

Creación del Prototipo Computacional

En la construcción de una Base de Datos que sustente en forma eficaz la información a recopilar, con la consecuente emisión de informes, se usa el método de Modelamiento de Datos. Este método permite obtener, mediante una serie de pasos sistemáticos, la Base de Datos conceptual que luego será soportada por algún administrador de bases de datos. Los pasos del método son:

1.- Formulación de requerimientos, cuyo propósito es identificar y describir los datos requeridos. Estos últimos, son identificados mediante entrevistas con el cliente, o información del entorno.

2.- Diseño conceptual, cuyo objetivo es definir las vistas de los usuarios, y los requerimientos de información de un diseño global de la Base de Datos. Se definen las entidades, los atributos y las relaciones.

3.- Implementación del diseño, donde se aplica el modelo conceptual a un modelo interno o esquema que pueda ser procesado por un Sistema Administrador de bases de datos.

4.- Diseño físico, que especifica, entre otras cosas, los formatos de los registros y la selección de los métodos de acceso.

1 Formulación de Requerimientos.

Dada la necesidad de construir un sistema de vigilancia para la rápida detección de la presencia de enfermedades en moluscos de cultivo, es necesaria la participación de expertos en el tema, así como personas que realicen la labor de capturadores de requerimientos. En el caso de este sistema, se enfrenta una situación que no ha sido modelada anteriormente, lo que es una dificultad más para la aplicación del método.

En la recolección de los datos, se concurre a documentos oficiales y entrevistas a especialistas de las diversas áreas del conocimiento involucradas en el proyecto (vistas de usuario), de los cuales se puede obtener posteriormente las entidades (archivos). En forma básica, se puede decir que, el sistema se compone de cuatro grandes procesos de trabajo:

- a) Ingreso de datos provenientes de los registros de información
- b) Selección de los centros
- c) Emisión de reportes a monitorear
- d) Mantención archivos principales.

Proceso a) El sistema opera ingresando la información emanada del monitoreo de los centros seleccionados.

Proceso b) Esta parte, se apoya en un plan de muestreo diseñado especialmente para cada tipo de especie y cuyo esquema sólo se podrá proponer una vez que se obtenga la información adecuada tanto de las variables que influyen en la aparición de las patologías como de la clasificación de los centros en áreas geográficas según la prevalencia de las enfermedades.

Proceso c) Mediante este requerimiento, los responsables de operar el sistema pueden emitir distintos reportes relacionados con aspectos de interés para los usuarios.

Proceso d) Permitirá ingresar, alterar, eliminar e imprimir los datos principales de las empresas, sus centros de cultivos, las especies de moluscos y los agentes que influyen en la determinación de las alertas.

2 Diseño conceptual.

2.1.- Recolección de Información

En cada centro seleccionado en la muestra, es necesario tipificar la presencia de una enfermedad que afecta a los moluscos cultivados allí. El formulario, por diseñar, contempla datos relevantes para construir las vistas. En consecuencia, para evitar desajustes en el desarrollo, se plantea el modelo Entidad-Relación con información semántica que rige el modelado de la Base de Datos

2.2.-Modelo Entidad-Relación.

El diseño de una base de datos se puede realizar mediante la aplicación de heurísticas al modelo Entidad-Relación o también mediante la captura de vistas, integración y normalización de éstas. Durante el desarrollo del proyecto, se aplicará ambas técnicas para obtener finalmente las tablas relacionales que conforman la Base de Datos.

3. Implementación del diseño.

El lenguaje seleccionado para la implementación del sistema es Visual Basic Pro 3.00, debido a que soporta en forma natural y eficiente el desarrollo mediante prototipos, además de permitir un acceso a tablas definidas implementativamente como relacionales y basadas en el estándar que define el administrador de bases de datos, Microsoft Access.

I. INTRODUCCIÓN.

A continuación presentamos la definición de requerimientos del Sistema Computacional para el Proyecto FIP 95/32.

Para dar una respuesta a los requerimientos y establecer las bases sobre las que el sistema se sustentará, se mantuvo repetidas sesiones de trabajo con los usuarios y otros especialistas.

1.1. Objetivos.

Los objetivos planteados para la etapa de especificación de requerimientos del Sistema corresponden a los siguientes:

1. Determinar el alcance de requerimientos del proyecto referentes al ingreso de antecedentes necesarios para el desarrollo del Sistema.
2. Identificar los requerimientos de información a satisfacer por el Sistema en cada una de las secciones involucradas y relacionadas.

1.2. Metodología.

La metodología empleada se sustenta fundamentalmente en las siguientes actividades :

1. Entrevista con los usuarios y personal especializado, con el objeto de tener una mayor comprensión de los procesos y capturar sus requerimientos.
2. Análisis sistémico de la información obtenida en las entrevistas con los usuarios, dando origen a esquema de Entrada y Salida lo que permite visualizar en forma directa los requerimientos de información asociados a las actividades pertinentes.
3. Presentación y revisión de esquema de Entrada y Salida con los usuarios.

En general, los temas tratados en las entrevistas realizadas corresponden a los siguientes :

1. Identificación de las funciones realizadas por cada sección del Sistema Computacional.
2. Documentos (listados, informes, formularios, etc.) que llegan a cada función.
3. Documentos (listados, informes, formularios, etc.) que se emiten en cada función.
4. Problemas presentados.
5. Presentación de necesidades y posibles mejoras.

6. Exposición, discusión y modificación de esquema de Entrada y Salida para satisfacer los requerimientos de información de las distintas actividades.

II. FUNCIÓN DEL SISTEMA COMPUTACIONAL.

El Sistema Computacional, permitirá al usuario mantener al día la información generada en distintos Centros de Cultivo y evacuar informes que permitirán aplicar fundamentalmente el "Sistema de Detección y Tratamiento de Enfermedades en Moluscos Cultivados en Chile".

III. REQUERIMIENTOS.

Los requerimientos que se explicitan a continuación, darán el marco de referencia para situar la solución propuesta.

El sistema deberá, como mínimo, satisfacer los siguientes requerimientos:

1. Permitir registrar los datos de las encuestas realizadas a cada uno de los centros de cultivos marinos.:

Para lo cual se debe:

1.1. Permitir el ingreso de antecedentes generales del Centro.

Se debe ingresar los datos que permiten identificar a cada centro. Entre estos datos se debe incluir:

- Ubicación Geográfica,
- Número de personas que laboran
 - Profesionales
 - No Profesionales.

1.2. Permitir el ingreso de Antecedentes de los Cultivos Marinos del Centro

Se debe registrar los datos de cada especie que el centro cultiva. En particular:

1.2.1. Se debe permitir registrar el Origen Geográfico de las semillas que el centro utiliza, tanto si provienen de un Hatchery como de Captación

- Especie.
- Origen Geográfico.
- Hatchery
 - Comuna
 - Sector

- Captación,
 - Comuna,
 - Sector
- 1.2.2. En el caso de Captación, permitir el ingreso del Sistema de Captación utilizado por el Centro del Cultivo.
 - Especies correspondientes
 - Sistema de Captación
 - 1.2.3. En el caso de Cultivo, permitir el ingreso de los Sistemas utilizados por el Centro y los Períodos en que se aplican.
 - Especies correspondientes
 - Sistema de Cultivo
 - 1.2.4. Permitir registrar los Manejos de Cultivo que se efectúan en el Centro (raleos, desdobles, etc.) indicando además su periodicidad.
 - Especie
 - Manejo
 - Periodicidad
 - 1.2.5. Permitir el ingreso de antecedentes sobre el Porcentaje de Mortalidad promedio de los últimos tres años, indicando posibles causas, entre estos datos se debe incluir:
 - Especie correspondiente
 - Porcentaje de mortalidad de cada especie
 - Posibles Causas
- 1.3. Permitir el ingreso de Antecedentes de Patologías.
 - 1.3.1. Para cada Variable Ambiental, permitir el ingreso de los siguientes datos:
 - Identificación de Variable Ambiental
 - Periodicidad de su Registro
 - 1.3.2. Para cada Método de Prevención de Patologías relevantes a los cultivos, permitir el ingreso de los siguientes datos:
 - Patología a la que se aplica
 - Método de Prevención correspondiente
 - 1.3.3. Permitir identificar si el Centro mantiene Registros sobre las Patologías que han afectados a sus cultivos, se deben incluir los siguientes datos:
 - Si hay o No, Registros
 - En caso afirmativo, desde qué año.

1.3.4. Permitir registrar una descripción de Signos de los Principales Problemas Patológicos que se han presentado en cada centro, se deben incluir los siguientes datos:

- Problemas Patológicos (Signos)
- Periodicidad de su Aparición
- Posibles Causas de los Problemas

1.4. Permitir el ingreso de Antecedentes sobre microorganismos del Medio.

1.4.1. Monitoreos de Bacterias Patógenas Humanas

- No / Sí Frecuencia

1.4.2. Monitoreos de MicroAlgas Nocivas (Marea Roja)

- No / Sí Frecuencia

Permitir registrar Observaciones realizadas al estudio por parte de los Centros Encuestados

2. Permitir registrar los datos de las encuestas realizadas a cada uno de los Centros de Cultivos de Hatchery.

2.1. Permitir el ingreso de antecedentes generales del Centro.

Se debe ingresar los datos que permiten identificar a cada centro. Entre estos datos se debe incluir:

- Ubicación Geográfica,
- Número de personas que laboran
 - Profesionales
 - No Profesionales.

2.2. Permitir el ingreso de información respecto de Aguas de Suministro del Hatchery.

2.2.1. Permitir registro de la Calidad Filtrado de Aguas de Suministro.

- Agua cruda
- 10 a 50 μm
- 1 a 2 μm
- 0.5 a 0.1 μm
- Otra

2.2.2. Permitir registro de la Esterilización de las Aguas de Suministro

- Etapas del Proceso en que se aplican
 - Ninguna
 - Larvas
 - Post-Larvas
 - Microalgas
- Tratamientos
 - Luz UV
 - Ozono
 - Cloro
 - Otros

- 2.2.3. Permitir registro de la Aieración de las Aguas de Suministro
 - Equipos Utilizados
 - Compresores
 - Sopladores
 - Otros
 - Tamaño del Filtro
- 2.3. Permitir el ingreso de información respecto de Cultivo de Microalgas.
 - 2.3.1. Recuento de Protozoos
 - 2.3.2. Recuento de Bacterias
 - 2.3.3. Tapa de Estanques
 - 2.3.4. Filtro de Aireadores
 - 2.3.5. Antibióticos aplicados
- 2.4. Permitir el ingreso de información respecto del Cultivo Larval y Post-Larval.
 - 2.4.1. Especie
 - Nombre
 - Abalón
 - Ostra del Pacífico
 - Ostión del Norte
 - Ostión del Sur
 - Producción Promedio Anual
 - Larvas
 - Post-Larvas
 - Porcentaje de Supervivencia
 - Larvas
 - Post-Larvas
 - 2.4.2. Periodicidad de:
 - Limpieza de Estanques
 - Recambio de Aguas
 - 2.4.3. Productos de Limpieza
 - 2.4.4. Capacidad de los estanques
 - Larvas
 - Post-Larvas
 - 2.4.5. Tapa en Estanques
 - 2.4.6. Recuento de Bacterias
 - 2.4.7. Recuento de Protozoos
 - 2.4.8. Uso de Antibióticos
 - Productos de uso frecuente
 - Concentración utilizada
 - Forma de Aplicación
 - Periodicidad
 - Cambio Frecuente de Producto y Causas
 - 2.4.9. Causas de Mortalidad
 - Larvas
 - Post-Larvas
- 2.5. Permitir el registro de las Actividades Generales del Hatchery
 - 2.5.1. Registro de Patologías
 - 2.5.2. Sanitización Completa

- 2.5.3. Limpieza de Cañerías de Agua
- 2.5.4. Tratamientos de las Aguas Fluentes
- 2.6. Permitir el registro de Observaciones

3. Emitir listados en forma rápida y simple.

Los listados que se solicitarán al Sistema, dependen directamente de los objetivos del usuario. El prototipo presentado contiene algunas posibilidades a modo de ejemplo

- Listado de Empresas por Región
- Listado de Cultivos Marinos por Empresa y por Región
- Listado de Origen Geográfico de Semillas
- Listado de Captación por Centro de Cultivo
- Listado de Patologías por Región
- Listado de Antibióticos Usados, etc.

IV. PROPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN.

Definidos el ámbito en estudio, las funciones involucradas en el desarrollo y las funciones relacionadas, estamos en condiciones de plantear el enfoque de solución de acuerdo a los requerimientos establecidos en III.

4.1. Enfoque de Solución.

En este punto, se trata de dar una visión de las opciones con las cuales contará el Sistema, de acuerdo a cada uno de los requerimientos expuestos por los usuarios en las distintas reuniones que se han llevado a cabo. Es así que a continuación se presenta la Estructura General del Sistema a desarrollar y luego, según los requerimientos planteados, se presentan un conjunto de opciones que están orientadas a satisfacerlos indicando cual es el objetivo general de la opción presentada.

4.2. Estructura del Sistema

En el Sistema propuesto, se destacan tres módulos que le dan forma y le permiten cumplir las funciones para las cuales fue diseñado, estos son los módulos de Mantenimiento, de Ingreso y de Listados, según se esquematiza a continuación

1. Módulo de Mantenimiento.

Este módulo permite el insertar información relativamente estable durante el desarrollo del proyecto. Típicamente se completa al comienzo y sufre pocas modificaciones.

- 1.1. Empresas
 - 1.1.1. Centros de Cultivos
 - 1.1.2. Centros de Hatchery
- 1.2. Especies
- 1.3. Tipos de Captación
- 1.4. Sistemas de Cultivos
- 1.5. Sistemas de Manejos
- 1.6. Variables Ambientales
- 1.7. Patologías

2. Módulo de Ingreso.

Este módulo permite el ingreso de la información generada a través del tiempo y que permite caracterizar la actividad propia de los Centros considerados. La base de datos generada permite fundamentar el análisis y las decisiones de interés para los objetivos del proyecto.

- 2.1. Encuesta Centro de Cultivos Marinos
 - 2.1.1. Origen Geográfico
 - 2.1.2. Captación
 - 2.1.3. Sistemas de Cultivos

- 2.1.4. Sistemas de Manejos
- 2.1.5. Porcentajes de Mortalidad
- 2.1.6. Signos Patológicos
- 2.1.7. Antecedentes Medio Ambiente
- 2.2. Encuesta Centro de Cultivos en Hatchery
 - 2.2.1. Aguas de Suministro
 - 2.2.2. Cultivo de Microalgas
 - 2.2.3. Cultivo Larval y Post-Larval
 - 2.2.4. Actividades Generales

3. Módulo de Listados

Este módulo permite recuperar información desde el sistema mediante consultas pre-programadas de acuerdo a los intereses del usuario. Los listados deberán afinarse una vez se pruebe el prototipo computacional.

4.3. Descripción de Módulos.

Los módulos presentados en este capítulo tienen como objetivo mostrar, principalmente, el tipo de pantallas y los datos que se ingresarán al sistema. El diseño definitivo se analizará posteriormente, tomando en cuenta factores tales como: facilidades para la rapidez de digitación, estética, funcionalidad, etc.

A continuación se describen los módulos del Sistema, que dan una solución estructurada a los distintos requerimientos planteados.

1. **Módulo Mantención.**

1.1 Empresas

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar las distintas organizaciones empresariales que tienen Centros de Cultivo.

Antecedentes Generales de la Empresa

Archivo Ventana ?

Botones de navegación: [Iconos]

Rut Empresa:

Nombre Empresa:

Calle:

Número:

Departamento:

Ciudad: Región:

Teléfono:

Datos Persona que Contesta:

Nombre:

Apellido:

1.2 Centros de Cultivos

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar para cada Empresa los distintos Centros con los que cuenta.

- 1.4 **Sistemas de Captación de Semilla**
Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar la forma en que se realizan las Capturas de las semillas que se utilizan para el cultivo.

The screenshot shows a software window titled "Ficha de Mantenimiento de Captura". The window has a menu bar with "Archivo", "Edición", "Opciones", and "Ventana". Below the menu bar is a toolbar with various icons for file operations and editing. The main area contains a table with two columns: "Código" and "Descripción". The first row of the table contains the text "grdGrilla". Below the table are two input fields: "Código Captura" and "Nombre Captura".

Código	Descripción
grdGrilla	

Código Captura:

Nombre Captura:

1.4.2 Sistemas de Manejo

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos de la forma en que realiza el manejo de las Especies.

The screenshot shows a software window titled "Ficha de Mantenimiento de Manejos". It features a menu bar with "Archivo", "Edición", "Opciones", and "Ventana". Below the menu bar is a toolbar with various icons for file operations and editing. The main area contains a data grid with two columns: "Código" and "Descripción". The first row of the grid contains the text "grdGrilla". Below the grid are two input fields: "Código Manejo" and "Nombre Manejo".

Código	Descripción
grdGrilla	

Código Manejo:

Nombre Manejo:

1.3 Mantenimiento de Especies

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar las distintas Especies que manejan los Centros.

The screenshot shows a software window titled "Ficha de Mantenimiento de Especies". The window has a menu bar with "Archivo", "Edición", "Opciones", and "Ventana ?". Below the menu bar is a toolbar with various icons for file operations and editing. The main area contains a table with three columns: "Codigo", "Nombre Común", and "Nombre Científico". The first row of the table contains the text "gndGallia". Below the table are three input fields labeled "Codigo Especie", "Nombre Común", and "Nombre Científico".

Codigo	Nombre Común	Nombre Científico
gndGallia		

Código Especie:

Nombre Común:

Nombre Científico:

1.4.3 Mantenimiento de Registros de Variables Ambientales

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre las Principales variables ambientales durante el cultivo de Especies en los distintos Centros de Cultivo.

The screenshot shows a software window titled "Ficha de Mantenimiento de Variables Ambientales". The window has a menu bar with "Archivo", "Edición", "Opciones", and "Ventana ?". Below the menu bar is a toolbar with various icons for file operations and editing. The main area contains a table with two columns: "Código" and "Descripción". The first row of the table has the value "gradGalle" in the "Código" column. Below the table are two input fields: "Código Variables Ambiental" and "Nombre Variable Ambiental".

Código	Descripción
gradGalle	

Código Variables Ambiental:

Nombre Variable Ambiental:

1.5 Patologías

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre las Patologías.

The screenshot shows a software window titled "Ficha de Mantenimiento de Patologías". The menu bar contains "Archivo", "Edición", "Opciones", and "Ventana". The toolbar includes icons for file operations (New, Open, Save, Print, Copy, Paste, Find, Undo, Redo) and a search box. The main area contains a table with the following structure:

Código	Descripción
lgdGrilla	

Below the table, there are two input fields:

Código Patología:

Patología:

2 Módulo de Ingreso

Este módulo permite realizar el proceso de ingreso de una Encuesta devuelta por el Centro.

2.1 Identificación.-

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre una determinada Encuesta en sus Aspectos Generales. Este módulo es aplicable a Centros de Cultivos Marinos y Centros de Cultivos en Hatchery.

The screenshot shows a software window titled "Antecedentes Generales de Encuesta". The window has a menu bar with "Archivo" and "Ventana ?". Below the menu bar is a toolbar with several icons. The main area of the window contains a form with the following fields:

- Número de Encuesta:** A text input field.
- Rut Empresa:** A text input field.
- Nombre:** A text input field.
- Ubicación:** A text input field.
- Teléfono:** A text input field.
- Número de Profesionales:** A text input field.
- Número de No profesionales:** A text input field.

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Actividades Generales del Hatchery 1]

Archivo Ventana

Numero de Encuesta: _____

Para cada una de las siguientes preguntas, marque lo que corresponda.

¿Su Centro, mantiene un registro de las Patologías que se han presentado?

¿Desde que Año? _____

¿Se realiza sonización completa del Hatchery?

¿Con qué frecuencia? _____

¿Se realiza limpieza de las cañerías de la red de agua del Hatchery?

¿Con qué frecuencia? _____

¿Producto utilizado? _____

¿Se realizan tratamientos a las aguas efluentes del Hatchery, previo a su envío al Mar?

Indíquelo(s) _____

2.2.-Centros de Cultivos Marinos

2.2.1 Origen Geográfico

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre el Origen Geográfico de las semillas utilizadas por un determinado Centros de Cultivo.

Origen Geográfico de las especies de la Encuesta

Archivo Edición Opciones Ventana ?



Número de Encuesta:

Especie	Hatchery	Captación
grdGrillo		

Especie:

Hatchery:

Sector:

Captación:

Sector:

2.2.2 Sistema de Captación

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre el Origen Geográfico de las semillas utilizadas por un determinado Centros de Cultivo.

Sistema de Captación

Archivo Edición Opciones Ventana

Número de Encuesta

Especies	Número de Encuesta
grdSnlc	

Especie: cboEspecie

Forma de Cultivo: dcbTipoCaptacion

Data1

2.2.3 Sistema de Cultivo

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre el Sistema de Cultivo utilizado por un determinado Centros de Cultivo.

The screenshot shows a software window titled "Ficha de Mantenimiento de Sistemas de Cultivos". The window has a menu bar with "Archivo", "Edición", "Opciones", and "Ventana ?". Below the menu bar is a toolbar with various icons for file operations and editing. The main area contains a table with two columns: "Código" and "Descripción". The first row of the table contains the text "grdGrilla". Below the table, there are two input fields: "Código Sistema de Cultivo" and "Descripción Sistema de Cultivo".

Código	Descripción
grdGrilla	

Código Sistema de Cultivo:

Descripción Sistema de Cultivo:

2.2.4 Sistema de Manejo

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre el Sistema de Manejos utilizado por un Centros de Cultivo.

Sistema de Manejo

Archivo Edición Opciones Ventana ?

Número de Encuesta:

Especies	Sistema de Manejo	Periodicidad
grdGnita		

Especie: Fecha Inicio:

Forma de Manejo: Fecha Termina:

2.2.5 Porcentajes de Mortalidad

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre el Porcentaje de Mortalidad que ocurre en un determinado Centros de Cultivo.

Número de Encuesta:

Especies	Mortalidad (%)	Posibles Causas
grdGrifa		

Especie:

Porcentaje de Mortalidad:

Posibles Causas:

2.2.6 Signos Patológicos

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre los Signos Patológicos detectados en un determinado Centros de Cultivo.

Signos de Problemas Patológicos

Archivo Edición Opciones Ventana ?

Número de Encuesta:

Número	Problema Patológico	Periodicidad	Posibles Causas
ord/Grilla			

Número Correlativo:

Problema Patológico:

Periodicidad de Aparición:

Posibles Causas:

2.2.7 Antecedentes Medioambientales

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre antecedentes medioambientales que ocurren en un determinado Centros de Cultivo.

The screenshot shows a software window titled "Variable Ambiental" with a menu bar containing "Archivo", "Edición", "Opciones", and "Ventana". Below the menu is a toolbar with various icons. The main area contains a form with the following elements:

- A label "Número de Encuesta" followed by a text input field.
- A table with two columns: "Variables Ambientales" and "Periodicidad del Registro". The table has a header row and several empty rows below it.
- A label "Variable Ambiental" followed by a dropdown menu showing "dcbVariableAmbiental" and a "Data1" button.
- A label "Periodicidad" followed by a text input field.

2.3.-Centros de Cultivos en Hatchery.-

2.3.1 Aguas de Suministro.-

- Filtrado de las Aguas de Suministro.-

Este módulo permite ingresar, modificar y eliminar los datos sobre antecedentes del Filtrado de Aguas de Suministro que ocurren en un determinado Centros de Cultivos en Hatchery.

- Esterilización de las Aguas de Suministro.-

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Aguas de Suministro del Hatchery]

Archivo Ventana ?

Número de Encuesta

Filtro de aguas de Suministro

10 a 50µm

1 a 2µm

0.5 a 0.1µm

Otro Individual:

- Aireación de las Aguas de Suministro.

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Aguas de Suministro del Hatchery 1]

Archivo Ventana ?

Número de Encuesta

Esterilización de las Aguas de Suministro

Etapas del Proceso que se aplican

Luz Ultravioleta				

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Aguas de Suministro del Hatchery 1]

Archivo Ventana ?

Número de Encuesta: []

Aireación de las Aguas de Suministro

Equipos Utilizados

Compresores []

Sopladores []

Otra []

Tamaño del filtro []

2.3.2. - Cultivo de Microalgas. -

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Cultivo de Microalgas 1]

Archivo Ventana ?

Número de Encuesta: []

Marque lo que corresponda

¿Se Realiza recuento de Protozoos en el medio?

¿Se realiza recuento de Bacterias en el medio?

Los estanques que utilizan ¿Tienen tapa?

Los aireadores que utilizan ¿Tienen filtro?

¿Que antibióticos aplican al medio de cultivo de las microalgas? []

2.3.3.- Cultivos Larval y Post-Larval.-

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Cultivo Larval y Post-Larval]

Archivo Ventana ?

Número de Encuesta: _____

Para cada especie que se cultive en su Hatchery, anote el promedio de producción anual y porcentaje de sobrevivencia respectivo, por estadio.

Producción Promedio Anual		Porcentaje de Sobrevivencia	

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Cultivo Larval y Post-Larval]

Archivo Ventana ?

Número de Encuesta: _____

Para cada una de las siguientes preguntas, marque lo que corresponda.

Los estanques que utilizan, ¿tienen tapa?

¿Se realiza recuento de Bacterias en el medio?

¿Se realiza recuento de Protozoos en el medio?

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Cultivo Larval y Post-Larval 1]

Archivo Opciones Ventana ?

Número de Encuesta:

¿Se aplica antióticos al cultivo? Sí No

2	otro aspirina	1/1000	en gotas	a cada hora

¿Cambia con frecuencia el producto que utiliza? Sí No

¿Por qué?

Fondo de Investigación Pesquera Proyecto FIP 95/32 - [Cultivo Larval y Post-Larval 1]

Archivo Ventana ?

Número de Encuesta:

Indique las causas que usted atribuye a la mortalidad de larvas y post-larvas

Causas

Larvas:

PostLarvas:

4. DIAGNOSIS, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE MOLUSCOS

ANTECEDENTES

La más completa información sobre las enfermedades de los moluscos y los métodos de diagnóstico, detección y prevención de la que se dispone en la actualidad, se encuentra en la edición más reciente del "Blue Book". Esta obra, según Elston (1994), marca la partida en un área poco estudiada de la medicina animal, como son estos organismos cuya biología es substancialmente diferente a la de los peces.

Dentro de las técnicas de diagnóstico el área concerniente a los virus es quizás una de las que muestra menor avance, debido al escaso desarrollo en el área del cultivo celular y de tejidos de estos organismos, motivo por el cual la detección de dichos agentes se realiza mediante el uso de microscopía electrónica.

Los invertebrados no producen anticuerpos tal como se conoce en peces por lo que los procedimientos inmunológicos, útiles en detección precoz serían difíciles de llevar a cabo. Es así como en la mayoría de los casos no existen métodos para detectar infecciones subclínicas.

Las herramientas de diagnóstico más modernas no están todavía disponibles para ser aplicadas a la diagnosis práctica de las enfermedades de moluscos, es por esto que la

mayoría de los procedimientos en este sentido se basan en el análisis histológico, el cual es un proceso relativamente lento si es aplicado a un campo de la producción en que muchas veces se requiere de respuestas rápidas para actuar en forma oportuna y acertada. Dentro de las limitaciones que presenta esta técnica es que no permite un estudio de la patogenicidad de los agentes encontrados.

Más escasa aun es la información relativa a las formas de control y tratamiento. Muchas de las enfermedades de los moluscos son difíciles o imposibles de tratar, y no todas son resultado directo de agentes infecciosos. Los factores físicos, químicos y el manejo tienen a menudo fuerte influencia sobre el desarrollo de una condición patológica. Es necesario identificar estos factores a fin de recomendar las medidas apropiadas.

En los hatcheries se privilegiará las medidas preventivas tendientes a la optimización del manejo dada su característica de sistema cerrado.

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNOSIS

1- Procedimientos de Muestreo desde Poblaciones

Cada lote o stock de cultivo debe ser muestreado por separado, entendiendo como lote la definición entregada por Thoesen (1994.). Aunque originalmente ha sido definida para poblaciones de peces puede ser adaptada para poblaciones que estén en confinamiento, como sería el caso de los moluscos en cultivo, ya que se estima que es necesario disponer de un orden para efectos de seleccionar las muestras para análisis

"Lote es un grupo de individuos de una misma especie que se han originado de un mismo stock de desove y que comparten una fuente de agua común"

El número de muestras en poblaciones sintomáticas están basados en obtener un número de especímenes estadísticamente significativo que proporcionen en la muestra un nivel de confianza (generalmente 95%) de obtener un individuo afectado asumiendo una prevalencia específica de la enfermedad.

De acuerdo a esta definición el tamaño mínimo de la muestra requerida para detectar al menos un espécimen infectado asumiendo niveles de incidencia de la enfermedad de 2, 5, y 10% para diferentes tamaños de poblaciones está dada en la Tabla 25.

Tabla 25. Tamaño mínimo de muestra para límites de confianza del 95% para encontrar un espécimen infectado a diferentes incidencias de la enfermedad para tamaños poblacionales variables

Tamaño poblacional	2% de Incidencia de enfermedad	5% de Incidencia de enfermedad	10% de Incidencia de enfermedad
50	50	30	20
100	80	45	25
250	110	50	25
500	130	55	30
1 000	140	55	30
2 500	145	60	30
5 000	145	60	30
≥ 10 000	150	60	30

Fuente: Austin, B. y B. A. Austin (Eds.) 1991. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. John Wiley & Sons. NY 316 pp.

En lotes sintomáticos la muestra debe estar constituida por al menos 10 especímenes de cada stock del cultivo que exhiban signos clínicos, se debe incluir en la muestra, además, individuos sanos. Los especímenes deben estar vivos en el momento de colectarlos. Para su traslado al laboratorio de análisis deben ser embalados en envases limpios, debidamente etiquetados en cajas térmicas con hielo procurando que lleguen vivos.

2.- Diagnósis de Áreas

En el Manual para Diagnósis de Enfermedades de Organismos Acuáticos, la OIE señala en el capítulo 15 sobre "Enfermedades de Bivalvos; Técnicas de Diagnósis", que los procedimientos de muestreo y los puntos a muestre deben ser seleccionados de tal manera de maximizar las posibilidades de detectar patógenos. Deben considerarse además los parámetros que tienen un efecto en el desarrollo del agente infeccioso tales como la densidad del stock, el flujo de agua y el ciclo de desarrollo de los moluscos. En dicho manual se sugiere el muestreo por puntos en una zona dada, en este tipo de muestreo se deben seleccionar tres puntos, número que debe ser aumentado en zonas más amplias que contengan varias áreas discretas de cultivo de la especie susceptible. Se debe considerar también la toma de muestras desde los bancos naturales de moluscos.

3.- Procedimientos para examen.

Larvas:

Las larvas y post-larvas deben ser examinadas vivas en forma visual para registrar la presencia de signos de enfermedad. Los individuos que presenten signos aparentes de enfermedad deben ser seleccionados y colocados en una placa Petri conteniendo agua de mar y examinadas bajo microscopio estereoscópico. Cuando sea necesario las larvas pueden ser tranquilizadas o aletargadas mediante hipotermia.

Se preparan montajes húmedos y se observan en microscopio para la detección de bacterias, hongos o protozoos.

Juveniles y Adultos:

Los procedimientos para el examen externo son generalmente similares para todos los Moluscos.

Los individuos seleccionados deben ser abiertos cuidadosamente, cortando primero el músculo abductor, teniendo la precaución de no dañar los tejidos, en particular el manto, branquias, corazón y glándula digestiva. Se deben registrar las anormalidades y lesiones de los tejidos como también las deformidades de la concha, organismos que la perforan y parásitos que habitan en el manto. Se examinan bajo microscopio estereoscópico para detectar anormalidades o parásitos en los órganos. Se preparan montajes húmedos de los diversos tejidos y se observan en microscopio óptico.

4.- Procedimientos para análisis histológico

Estos procedimientos son esenciales para la detección de patologías mediante el estudio de las estructuras finas de tejido y órganos en moluscos y otros animales.

Las técnicas histológicas están relacionadas con la preparación de un tejido para su observación microscópica. El objetivo de estas técnicas es obtener una sección fina del tejido del animal o corte histológico. Para obtener estos cortes, los tejidos deben ser preservados en soluciones fijadoras y luego embebidos en bloques de parafina.

Las bases técnicas de la histología se encuentran en cualquier texto especializado, motivo por el cual no serán expuestas en el presente informe, no obstante, a continuación se describen los procedimientos primarios de preparación del tejido de moluscos adultos, juveniles y larvas que han sido resumidos desde Bucke (1991).

Los individuos menores de 15 mm pueden ser fijados completos; a los individuos de mayor tamaño se les extraen trozos de tejido de 4 a 5 mm de grosor los que son sumergidos en el fijador de elección. El fijador preferido para moluscos marinos es la solución de Davidson. También pueden ser utilizados fijadores universales como la formalina al 10% tamponada en buffer carbonato, o la solución de Bouin, aunque se debe considerar que en esta última los tejidos no deben permanecer por más de 24 horas en ella, por lo que se deben realizar al menos tres lavados sucesivos en alcohol al 70% (v/v). Para que la fijación sea adecuada el tejido necesita una cantidad de fijador de al menos 10 veces su volumen.

En el caso de larvas y juveniles que deben ser incluidas completas en el fijador, previo a efectuar el corte se necesita de un proceso de descalcificación, mediante quelación ácida o por electrólisis, debido a que es muy difícil realizar cortes a tejidos calcificados utilizando micrótomos convencionales.

No se considera en la presente descripción de métodos los procedimientos para la inclusión en el bloque de parafina, ni la realización misma de los cortes ya que pertenecen al campo de las técnicas histológicas comunes.

5. Procedimiento para análisis bacteriológico.

Juveniles y Adultos:

Los individuos seleccionados para este análisis se lavan y desinfectan sumergiendo las partes blandas en solución desinfectante, o bien en agua de mar estéril. Luego se ponen en una superficie limpia y se toman los inoculos para siembra con un asa o tórula estéril en un medio selectivo para bacterias marinas. Se utiliza el medio Thiosulphato Citrato Bile Salts Sucrosa (TCBS) para identificar *Vibrio*, algunos autores recomiendan que el medio sea suplementado con un 1% de NaCl (w/v), (Elston, 1990). Las placas con las siembras

deben ser incubadas a una temperatura similar a la del agua en la cual los individuos fueron colectados. Además se puede emplear Agar de Soja Triptica (TSA) suplementado con 2% de NaCl.

Las colonias que crecen son individualizadas y aisladas para su identificación mediante pruebas bioquímicas.

Larvas:

En el caso de las larvas se sugiere que se siembre en placas Petri preparadas con medios de crecimiento TCBS o TSA más NaCl para detectar fuentes de contaminación microbiana desde tres orígenes:

- Sistema de agua de mar
- Los reproductores y
- Las fuentes de microalgas.

Las muestras deben ser diluidas para proveer colonias contables en la placa. La dilución dependerá de las condiciones locales pero una dilución inicial va desde la no diluida hasta 0,0001 en agua de mar estéril o solución salina.

Adicionalmente se toman muestras desde las larvas en cultivo separando las larvas de fondo de las de la columna de agua, se utiliza una jeringa de 1,0 ml estéril permitiendo que las larvas sedimenten hacia al extremo de la jeringa y luego colocar los 0,5 ml del extremo donde están las larvas en un tubo conteniendo 2,0 ml de agua de mar estéril o solución salina al 1 o 3% (w/v) luego colocarla en un equipo que permita triturar las larvas como un Tissue Teator u otro similar (Ten-Broeck tissue grinder). Luego de homogeneizar las larvas se siembran cuantitativamente como se indicó anteriormente, (Elston, 1990).

Existen otros medios de crecimiento más específicos que pueden complementar la información de las bacterias contaminantes de las larvas y sistemas, como podría ser el caso del medio para las bacterias deslizantes o *Myxobacterias* marinas las cuales necesitan pocos nutrientes como es el caso del Agar Citofaga de Agua de mar (SWCA), el que puede ser utilizado junto a los otros medios (TCBS o TSA) especialmente cuando se sospeche de la "Enfermedad del Ligamento de los Moluscos".

Las colonias que hayan crecido por estos procedimientos son cuantificadas, caracterizadas e identificadas presuntamente por procedimientos bioquímicos estándares

Los procedimientos para confirmar la identidad de las bacterias caracterizadas mediante pruebas bioquímicas contemplan las pruebas inmunológicas para aquellas bacterias donde existan anticuerpos disponibles, como es el caso de algunas especies de *Vibrio*.

Elston (1991), describe un procedimiento para el diagnóstico rápido de *Vibrio* en larvas, el cual contempla un procedimiento de descalcificación histológica y cuando éste se haya completado sugiere neutralizar la solución utilizada por medio de buffer fosfato y finalmente reemplazar el buffer con solución salina 1,5% (w/v), las larvas son enseguida embebidas en medio "cryostat cutting" y enfriadas rápidamente a -70°C. Se cortan secciones de 4 µm y se tiñen con el conjugado del antisuero para examinar las secciones en microscopio de epifluorescencia y registrar las bacterias positivas.

6.- Procedimientos para detección de virus en larvas:

Debido a que no se dispone comercialmente de líneas celulares de moluscos, el diagnóstico viral en larvas se realiza mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET), siguiendo el procedimiento empleado por Hine (1992).

- - Las larvas son fijadas en Glutaraldehido al 2,5% en agua de mar filtrada (0,22 μ m) por una a 2 horas
- - Se lavan 2 veces en agua de mar filtrada para eliminar el fijador
- - Se centrifugan para formar un pellet y se elimina el agua de mar sobrenadante
- - Se coloca el pellet en un fluido de Agar al 2%
- - El pellet en agar se transfiere a un portaobjeto y se corta en pequeños trozos que se ponen en buffer Cacodilato 0,1 M
- - Se realiza un post-fijado en Tetróxido de Osmio al 1% en buffer Cacodilato 0.1 M por una hora
- - Se descalcifica en EDTA al 5% en Cacodilato 0.1 M por 30 a 45 minutos
- - Se deshidrata en una serie de Etanol (50 a 100%)
- - Se lava 2 veces por 10 minutos en Oxido de Propileno
- - Se infiltra durante una hora en Oxido de Propileno/Resina Epóxica (Araldite) 50/50
- - Se embebe en resina 100% toda la noche y se seca por 48 horas a 60°C
- - Se cortan secciones ultrafinas y se tiñen con Acetato de Uranilo en Etanol 50% por 10 minutos y con Citrato de Plomo en agua destilada hervida por 5 minutos
- - Se examina en microscopio electrónico de transmisión (MET)

7.- Procedimientos inmunológicos

Debido a la carencia de la respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas en los invertebrados, el diagnóstico inmunológico de las infecciones depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos son un componente crítico en cualquier inmunoensayo. La disponibilidad de antígenos para la inmunización depende de la posibilidad de aislar y purificar los patógenos, lo que resulta problemático en los moluscos ya que la mayoría de los patógenos son protozoos intracelulares, *Rickettsias* y virus (Mialhe et al., 1992). A pesar de ello algunos autores han descrito protocolos para la preparación de anticuerpos altamente específicos, es el caso de los *Baculovirus*, *Bonamia ostreae* y organismos tipo *Rickettsiales*.

Las experiencias realizadas para obtener anticuerpos poli y monoclonales han permitido probar los test de la Fluorescencia y ELISA para los patógenos *Bonamia ostreae* de *Ostrea edulis*, *Rickettsia* branquial de *Pecten maximus*, *Lymphocystivirus* asociado con peces y *Vibrio P1*, el agente de los anillos café en la almeja *Tapes philippinarum* pese a ello, aun no existe disponibilidad comercial de los anticuerpos.

8.- Procedimientos moleculares

Mialhe et al, (1992) señala que debido a la falta de información genética de los patógenos de los moluscos y camarones la mayoría de las pruebas de ácidos nucleicos directos que pueden ser preparadas consisten en fragmentos de DNA genómico clonados compuestos de secuencias específicas para ciertas especies o cepas, pero la condición esencial sigue siendo la obtención de patógenos aislados y purificados. Por lo tanto las experiencias que se han realizado se reducen a trabajos de investigación con los patógenos que se han purificado y que son los mencionados en el punto anterior. Aún así se necesita un mayor conocimiento de la biología molecular de los patógenos para lograr un mayor avance en este tipo de técnicas de diagnosis.

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNOSTICO ESPECÍFICOS

Los procedimientos de diagnóstico que se describen a continuación han sido recopilados desde Fisher, 1988 Elston, 1994, y Manual de la OIE, 1995.

NEOPLASIA HEMATOPOYETICA

Esta enfermedad detectada en los Mytilidos durante el desarrollo del presente estudio es conocida en la literatura como *Neoplasia Hemocítica*, *Sarcoma Diseminado*, *Enfermedad Proliferativa Hemica*, *Neoplasia Leucocítica*, *Neoplasia Sarcomatosa*, *Desorden Proliferativo y Condición Hemocítica Atípica*. Aun no está claro el origen de esta condición, aunque ha sido asociada a virus y/o partículas contaminantes.

Procedimientos de Diagnóstico

El diagnóstico se basa en examen microscópico de frotis de sangre o examen histológico de tejidos, la presencia de grandes células sanguíneas por sobre el 10% de su tamaño normal es un signo presunto de la enfermedad. La confirmación está basada en el examen histológico, el sarcoma se caracteriza por la aparición de células inusuales en el tejido conectivo, vasos sanguíneos y senos de la masa visceral, músculo y tejido del manto, las células pueden estar focalizadas o ampliamente diseminadas. Usualmente los hemocitos miden de dos a cuatro veces su tamaño normal y tienen un núcleo hipercromático, el núcleo puede ser pleomórfico o esferoide, dependiendo de la especie de bivalvo (Peters, 1988).

BONAMIASIS:

Infección letal de las células sanguíneas de las ostras comunes, acompañada por lesiones branquiales no específicas . Es causada por los protozoos del Phylum Ascetospora , *Bonamia ostreae* y *Bonamia* sp. La enfermedad puede ocurrir todo el año y puede ser transmitida experimentalmente por cohabitación o por inoculación.

Huéspedes: *Ostrea edulis*, *O. angasi*, *O. conchaphila* y *Triostrea chilensis*.

En el medio natural se puede diagnosticar después que las ostras han pasado 3-4 meses en un área infectada, mediante técnicas histológicas o frotis de órganos infectados. El muestreo para diagnosis sigue las reglas generales establecidas.

Procedimientos de diagnóstico

Examen citológico: frotis de sangre:

Para larvas y ostras: secar al aire las muestras, realizar el frotis desde tejido cardíaco o de macerado de larvas. Secar al aire y fijar en metanol. Teñir con tinciones corrientes para sangre y observar bajo microscopio. Este protozoo mide 2 μ m y puede ser observado dentro y fuera de los hematocitos. Una observación de 5 minutos o 50 campos por frotis es suficiente.

Histología:

El diagnóstico mediante esta técnica resulta ser menos sensible. En los cortes preparados se trata de identificar *Bonamia ostreae* en los hemocitos de secciones de tejido. El protozoo (2-3 µm de talla), se distribuye sistémicamente en infecciones avanzadas, en tanto que en las infecciones tempranas las concentraciones se pueden encontrar en tejido braquial.

Exámenes inmunológicos:

Existen anticuerpos monoclonales que han sido preparados a partir de los protozoos aislados y purificados, que reaccionan con epitopes de *B.ostreae* o *Bonamia* sp. Los anticuerpos pueden ser empleados en pruebas inmunológicas como ELISA o las técnicas de los anticuerpos fluorescentes (FA). La aplicación de estos exámenes se restringe a Francia y algunos países europeos y a Norteamérica en donde están disponibles estos kit.

HAPLOSPORIDIOSIS

Infección a veces letal a las células sanguíneas, tejido conectivo y digestivo, a menudo acompañado de decoloración café rojizo de branquias y manto. Es causada por protozoos del Phylum Ascetospora, tales como: *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale*, *H. armonicum* y *H. spp.*

Especies Afectadas: *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes decussatus* y *Ostrea angasi*. Sólo *H. nelsoni* (parásito de *C. virginica*) causa epizootias.

Procedimientos de Diagnóstico:

Examen Citológico: por frotis de glándula digestiva, branquias y manto, para lo cual se hace un corte sagital a través de estos órganos y se presiona sobre el portaobjetos obteniendo una impresión de los tejidos. Se fija en metanol (2-3 min.) y luego se tiñe con los kit de tinción disponibles y se observa al microscopio

Estados de Plasmodium: 30-40 μm de tamaño, afecta principalmente las branquias, palpos, tejido conectivo y epitelio de glándula digestiva.

Examen histológico: Cortar la masa visceral a través de 1 plano visceral y poner la muestra en algún fijador para este fin y seguir los procedimientos histológicos convencionales.

MARTEILIOSIS O ENFERMEDAD DE ABER O ENFERMEDAD DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA.

Causada por Protozoos parásitos del Phylum Ascetospora, Clase Paramyxia, Género *Marteilia*, que se desarrolla generalmente en células epiteliales de la glándula digestiva y está relacionada con el resblandecimiento de la ostra y el agotamiento de sus reservas de energía (glicógeno) (Figueras y Montes, 1988).

Especies afectadas:

Ostrea edulis con *M. refringens*

Saccostrea commercialis con *M. sydneyi*

Mytilus galloprovincialis con *M. maurini*

Crassostrea cucullata con *M. lengehi*

Cardium edule con *M. spp* (no identificada)

Procedimientos diagnósticos:

Examen citológico: Hacer corte a través de glándula digestiva y branquias, realizar el frotis, secar y fijar en metanol (2-3 min.).

La observación de los frotis teñidos muestra parásitos de 5-8 μm en estados tempranos y pueden alcanzar hasta 40 μm durante la esporulación. Las células secundarias o esporoblastos se ven rodeadas por un halo de brillo. Observar durante 5 minutos o 50 campos por preparación.

Examen histológico:

Cortar una sección a través de la glándula digestiva.

El corte puede ser teñido con varias tinciones no específicas

Los estados jóvenes de *Marteilia* están presentes en el epitelio del estómago, estados de desarrollo posteriores pueden ser encontrados en el epitelio del divertículo digestivo. También se pueden observar esporangios libres en el lumen del intestino.

MIKROCYTOSIS:

Enfermedad letal de dos géneros de ostras: *Crassostrea gigas* y *Saccostrea commercialis*, causada por dos protozoos *Mickrocytos mackini* y *M. roughleyi* respectivamente.

La enfermedad provoca pústulas, abscesos y úlceras, principalmente en el manto con escaras café en la concha.

Los abscesos están compuestos de hemocitos granulares y hialinocitos conteniendo pequeñas células de 1-3 μm . la tasa de mortalidad es de alrededor del 40%. La

enfermedad ocurre más a menudo durante la primavera para *C.gigas* y durante el invierno austral para *S. commercialis*.

Procedimientos para el diagnóstico

Examen citológico:

Cortar una sección a través del absceso o úlcera, remover el exceso de agua con papel secante. luego realizar una impresión en un portaobjeto, secar al aire y fijar en metanol (2 a 3 min.). Los portaobjetos se tiñen utilizando un equivalente a la tinción Wright-Giemsa. Los parásitos de 1 a 3 μm de diámetro se pueden ver incluidos en los hemocitos o libres en la célula huésped y tienen un citoplasma azul y un núcleo pequeño de color rojo. Cada portaobjetos debe ser observado por 5 minutos.

Examen histológico:

Se cortan secciones de la ostra incluyendo, cuando estén presentes, las pústulas, abscesos y úlceras. En el caso de *M. roughle* los estados del parásito están presentes en los hemocitos que se concentran alrededor de los abscesos o las úlceras. Para *M. mackini* éstas se concentran en las células del tejido conectivo, vesículas o en la periferia de las lesiones.

PERKINSOSIS O "DERMO"

Esta enfermedad conocida como "Dermo" debido a su designación taxonómica inicial *Dermocystidium marinum*, es causada por un parásito del Phylum Apicomplexa conocido como *Perkinsus marinus*, infecta casi todos los tejidos de la ostra, se transmite por contacto directo en el agua, pero es incapaz de tolerar bajas temperaturas y bajas salinidades.

El único huésped descrito para esta enfermedad es la ostra americana *Crassostrea virginica*. Se conocen otras especies de *Perkinsus* como es *P. atlanticus* y *P. olsenii* que afectan a *Ruditapes decussatus*, *Haliotis rubra* y *Haliotis laevis*, se conocen además a otras 50 especies de bivalvos que pueden ser portadores de *Perkinsus* sp. sin manifestar enfermedad.

Procedimientos para el Diagnóstico

Las enfermedades en las especies confinadas dependen básicamente del manejo a que son sometidas, en especial a la densidad de carga en espacios reducidos lo que dificulta su control y terapia dada la rapidez con que se propagan los agentes patógenos. Esto es especialmente relevante en los sistemas de hatchery en los cuales los principales agentes son patógenos bacterianos.

De alguna manera los riesgos patológicos de origen natural o inducidos son previsibles y exigen medios permanentes de intervención preventiva.

En los moluscos, como en otros animales, en caso de ocurrir patologías, se trata de:

- Identificar la causa
- Favorecer la fisiología normal del individuo
- Interrumpir la transmisión de los agentes patógenos
- Detener al agente que haya ingresado, usando terapia o interrumpiendo su ciclo de vida

MÉTODOS DE PREVENCIÓN

Los manejos preventivos aplicados a los moluscos juveniles y adultos mantenidos en sistemas marinos son completamente diferentes a la intervención preventiva en un sistema de hatchery el cual puede ser comprendido como un sistema cerrado. Es así como las estrategias preventivas están dirigidas a impedir la aparición principalmente de patógenos bacterianos. Las fuentes posibles de introducción de agentes bacterianos, virales o protozoarios al sistema puede ocurrir desde:

1. * Sistemas de Agua
2. * Alimento de Larvas (microalgas)
3. * Reproductores

Elston (1990), señala que la mayoría de las enfermedades en las larvas son manejables. De todos los problemas causados por agentes patógenos hasta el momento sólo los virus han resultado ser huésped-específicos. De los otros agentes causantes de enfermedades en los hatcheries no se puede hacer una diferencia entre los patógenos oportunistas y los patógenos huésped-específicos, por lo tanto las medidas de manejo preventivo en estos sistemas de crianza deberían ser las siguientes:

1. .- Mantener stock de algas libres de patógenos
2. .- Mantener sistemas de agua libres de *Vibriosis* y otros patógenos por medio de filtros apropiados e higiene del sistema.
3. .- Aislar stocks infectados y el equipo asociado
4. .- Eliminar los stocks infectados y desinfectar el equipo
5. .- Identificar la fuente de contaminación y modificar y limpiar el sistema

Para el caso de las enfermedades de huésped específico se sugiere las siguientes prácticas de manejo que pueden ser consideradas una vez que se haya establecido para nuestro país el huésped y el agente patógeno:

- 1.- Separar y aislar los reproductores antes, durante y después del desove hasta que se haya determinado que los reproductores están libres de enfermedades.
- 2.- Separar los cultivos de larvas y juveniles sospechosos de otros cultivos
- 3.- Usar equipos y herramientas de cultivo separados para cada lote y esterilizar el equipo después del uso.
- 4.- Destruir los equipos infectados y la fuente de reproductores si se confirma la presencia de enfermedad.
- 5.- Esterilizar el agua efluente de cualquier cultivo de reproductores o larvas que pueda portar una enfermedad.

Sistema Marino

El manejo preventivo de las enfermedades puede ser vista desde los siguientes aspectos:

- 1.- Prevención de contacto entre patógeno y huésped
- 2.- Incremento de la resistencia natural o genética (mejoramiento genético)
- 3.- Mejoramiento de la dieta
- 4.- Inmunización

1.- Prevención de contacto entre patógeno y huésped

Este tipo de prevención está sustentado por dos modalidades de intervención:

- 1.- Intervención puntual sobre los moluscos disponibles
- 2.- Intervención coordinada a través de programas de prevención nacionales o internacionales.

Intervención puntual: La mayoría de las prácticas de manejo en un sistema de cultivo de moluscos son conocidas y se encuentran controladas por los cultivadores entre ellas se pueden mencionar:

- mantención de densidades adecuadas
- limpieza y lavado de individuos
- desdobles y raleos

Sin embargo, existen prácticas preventivas para el caso de enfermedades específicas, es el caso de la mayoría de las patologías causadas por protozoos como *Perkinsus*, *Bonamia* y *Haplosporidios*.

Entre las medidas de prevención y manejo se puede mencionar las de tipo general como son:

- - Evitar introducir lotes infectados en áreas en donde no se ha reportado la enfermedad
- - Utilizar reproductores libres de patógenos específicos para la obtención de semilla
- - Mantener un programa de chequeos patológicos periódicos a fin de conocer el status sanitario del área de cultivo

- - Utilizar los factores ambientales tales como salinidad y temperatura para favorecer el estado de salud normal
- - Mantener en lo posible densidades bajas para reducir el riesgo de transmisión de agentes patógenos

Existen otras medidas dirigidas a situaciones más específicas de determinadas patologías como serían el manejo del área en el caso de erradicación de *Bonamia*, en el cual Elston (1990), sugiere sacar completamente las ostras del área de cultivo por un período de al menos tres años y emplear dos años más para exámenes en grupos introducidos.

Intervención Coordinada: Este aspecto está relacionado con la intervención a través de programas de prevención nacional y/o internacional. Con este método se trata de interrumpir la transmisión de agentes patógenos en zonas mas o menos amplias. Esto puede llevarse a cabo destruyendo las fuentes de infección (individuos contaminados), y sustituyendo los lotes por individuos libres de enfermedades específicas.

Los programas internacionales han sido entregados por la Oficina Internacional de Epizootias de la Organización Mundial de Sanidad Animal a través de la publicación del Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos (1995), en el que se señalan las pautas necesarias para controlar la diseminación de agentes patógenos que revistan importancia desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional, y que afecten al comercio internacional, las cuales se citan como enfermedades de declaración obligada.

Hasta el momento ninguna de las enfermedades listadas en el citado Código está claramente identificada en los moluscos cultivados en Chile.

Los programas nacionales vigentes para el control de las enfermedades de los moluscos están señalados en el Decreto Exento N° 75 del 12 de Abril de 1996 del Ministerio

de Economía Fomento y Reconstrucción que "Determina Certificados Sanitarios y Otros Exigibles Para la Importación de Especies Hidrobiológicas" este Decreto señala las enfermedades que deben ser certificadas como ausentes en las especies de peces, moluscos y crustáceos que se importen hacia nuestro país.

Respecto a los moluscos, los Artículos N° 10 y 11, especifican las enfermedades que deben ser certificadas como ausentes para la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y los Abalones rojo (*Haliotis rufescens*) y japonés (*H. discus hannai* o *Nordotis discus hannai*) respectivamente. Para el caso de la Ostra del Pacífico las enfermedades serían las mismas de Declaración Obligada a la OIE, a las que se ha agregado la enfermedad bacteriana "Necrosis Bacilar de las Larvas" la enfermedad micótica "Micosis Larval" y la enfermedad parasitaria "Enfermedad del Gusano Rojo".

Para los Abalones se deberá certificar la ausencia de las siguientes enfermedades: **Vibriosis**, (*Vibrio anguillarum*), **Polydoriasis** (*Polydora* sp.) y **Perkinsosis** (*Perkinsus* sp.)

Incremento de la resistencia natural o genética:

Esta forma de prevención está relacionada con la obtención de poblaciones con buena tasa de crecimiento, conversión alimenticia y resistencia a enfermedades. Al respecto existen numerosos trabajos en vertebrados que apuntan al valor de las cepas genéticamente resistentes para reducir el problema de las enfermedades.

El objetivo de la mejora genética desde el punto de vista de la prevención, es oponer a las causas de la enfermedad un terreno genético menos susceptible o más refractario. Para lo cual se pueden emplear métodos de selección, cruzamiento o manipulación genética

De acuerdo a investigaciones realizadas en este campo habría cierta herencia en la resistencia a algunas enfermedades protozoarias. En el trabajo realizado por Elston et al. (1987) sobre la resistencia de *Ostrea edulis* a la infección por *Bonamia ostreae* encontró que existían cepas de la Ostra que demostraron ser mas resistentes a este parásito. En dicha investigación se observaron tasas de mortalidades diferentes al colocar Ostras planas de variados orígenes bajo condiciones idénticas. Estas observaciones estarían indicando que existe una resistencia en las ostras que se desarrollaría después de varias generaciones de sobrevivientes a la enfermedad.

Este descubrimiento demuestra la capacidad biológica de *Ostrea edulis* para desarrollar resistencia a la enfermedad (*B. ostreae*) y es una opción de manejo útil en aquellos lugares donde el patógeno es enzoótico.

Los estudios realizados sobre fecundación cruzada en ostras han sido realizados hasta ahora en forma experimental con resultados promisorios, sin embargo es necesario realizar mayores investigaciones para su aplicación al manejo preventivo de enfermedades.

La manipulación genética mediante la inducción de triploides se ha realizado en ostras de género *Crassostrea* con el fin de obtener individuos con mejores tasas de crecimiento, se espera que con el desarrollo de este tipo de investigación se obtenga en el futuro individuos resistentes a enfermedades específicas mediante herramientas genéticas.

Mejoramiento de la dieta e Inmunización: son herramientas de prevención potenciales de usar en los moluscos, sin embargo es necesario realizar mayor investigación en estos campos. Hasta el momento para invertebrados existe sólo la vacuna comercial contra la bacteria *Gaffkia homari* para la langostas *Homarus americanus*.

TRATAMIENTOS:

Los agentes quimioterapéuticos modernos se definen como productos químicos que cuando se usan en el tratamiento de enfermedades infecciosas, destruyen efectivamente el agente causal y no dañan a los organismos de cultivo. Esta definición ideal incluye a los antibióticos, pero a causa de su naturaleza especial, se les considera separadamente en los trabajos sobre el tema.

Antes de aplicar un tratamiento a los organismos en cultivo, se debe ver que cumplan ciertas condiciones para que éste sea exitoso y eliminar el patógeno o al menos atenuar su acción.

Lo primero que se debe considerar, es que las terapias existentes están dirigidas a los agentes bacterianos y parasitarios; no existen tratamientos antivirales curativos. Para diseñar la terapia adecuada, lo primero será analizar la facilidad de realizar un tratamiento considerando el número de moluscos en cultivo que se debe tratar. También se deben considerar los niveles de mortalidad, la prognosis de la enfermedad y el costo del tratamiento.

Una clasificación general permite diferenciar dos grandes tipos de terapias antibacterianas, de acuerdo al tipo de producto químico empleado:

Tratamiento antiséptico:

Corresponde al tratamiento externo de los individuos mediante productos químicos, para eliminar un amplio espectro de gérmenes. Para esto se cuenta entre otros, con los yodóforos, Hipoclorito de Sodio, formalina, azul de metileno, Isopropanol, Verde Malaquita, Sulfato de Cobre, etc.... También se pueden emplear estos productos para sanitizar las manos de los operarios y de los materiales empleados.

Antibioterapias :

Se agrupan bajo este nombre las terapias con antibióticos.

Los antibióticos inhiben o destruyen en forma selectiva los organismos patógenos, sin producir daño aparente al organismo que está siendo tratado. La acción puede ser bacteriostática o bactericida, dependiendo de la actividad propia o de la dosis aplicada.

Si la acción es bacteriostática, afecta la multiplicación del agente patógeno, retardando el proceso infeccioso , de tal forma que el huésped puede recuperarse y aislar o destruir el microorganismo.

Si la acción es bactericida, actúa químicamente sobre el patógeno para finalmente destruirlo.

El tratamiento con antibiótico debe asegurar la eliminación de la población bacteriana causal de la enfermedad.

Los tratamientos con sustancias antimicrobianas son preferentemente utilizados en los cultivos de larvas en sistemas de Hatchery, para impedir la proliferación de bacterias patógenas.

La mayoría de los antibióticos comúnmente utilizados en el control de bacterias marinas fueron desarrolladas para el tratamiento de enfermedades en mamíferos y su aplicación está gobernada por las mismas reglas que se aplican a estos organismos. En general se deben cumplir los siguientes requisitos:

- a) Indicación adecuada
- b) Dosis correcta
- c) Aplicación precoz.
- d) Esfuerzo terapéutico sostenido.

En los sistemas de cultivo marino, las terapias están dirigidas a controlar parásitos externos ya que no es posible alcanzar los estados de parásito intracelulares, como son la mayoría de las enfermedades más importantes descritas para moluscos de cultivos. Es así como la principal forma de combatir a estos patógenos es mediante el manejo preventivo de los stocks.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Austin, B. y B. A. Austin (Eds.) 1991. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. John Wiley & Sons. NY 316 pp.
- Andrews, J. D. 1988. Epizootiology of the Disease Caused by the Oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. in William S. Fisher (Edit): Disease processes in Marine Mollusks American Fisheries Society Special Publications. 18 pp.: 47-63.
- Andrews, J. D y S. Ray. 1988. Management strategies to control the disease caused by *Perkinsus marinus* in William S. Fisher (Edit) :Disease Processes in Marine Mollusks American Fisheries Society Special Publications. 18 pp.: 47-63.
- Balouet, G., M. Poder, y A. Cahour. 1983. Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. Aquaculture, 34: 1-14
- Bautista, P. C. 1989. Tecnología de Cultivo Ed. Mundi-Prensa. Castelló, 37 Madrid España, 167 pp. Bower, S.; J. Blackbourn, D. J. Nishimura and G. R. Meyer. Diseases of cultured Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) in British Columbia Canada. 4th International Colloq. Pathol. Marine Aquaculture. pp.: 67-68.
- Bower, S., S. E. M. Mcgladdery and I. M. Price. 1994. Synopsis of infectious disease and parasites of commercially exploited shellfish. Ann. Rev. Fish Dis. 4. pp.: 1-199.
- Bucke, D. 1991. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Chapter V: Histology. in: Austin y Austin (Eds.) John Wiley & sons. 317 pp.
- Carvajal, J. 1988. Patología de moluscos y repoblación. Invest. Pesq. 35: 123-128.
- Cheng, T. 1993. Noninfectious diseases of marine mollusks. In: J. A. Couch and J. W. Fournie (Editors), Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms, pp. 289-318.
- Cheng, T. C. y Rifkin, E. 1970. Cellular reactions in marine mollusks in response to helminth parasitism. American Fisheries Society Special Publication 5: 443-496.
- Couch, J. A. 1993. Observations on the State of marine Disease Studies. In Pathobiology of marine and Estuarine Organisms. Edited by John A. Couch, John W. Fournie.

- Elston, R. 1980. Ultrastructural aspects of serious disease of hatchery reared larval oysters, *Crassostrea gigas* Thünberg. *Journal of Fish Diseases*, 3: 1-10.
- Elston, R.A. 1990. Mollusk diseases guide for the shellfish farmer. Washington Sea Grant Program. Seattle. 73 pp.
- Elston, R.A. 1991. Bacteriological methods for diseased shellfish. *In*: Austin, B. y B. A. Austin (Eds.) 1991. *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. John Wiley & Sons. NY 316 pp.
- Elston, R. 1994. Diseases of shellfish. *In*: J. C. Thoesen (Editor), *Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens*. 4th Edition, version 1, Fish Health Section, American Fisheries Society. 1994.
- Elston, R. A., M. L. Kent y M. T. Wilkinson. 1987. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64: 237-242.
- Farley, C. A. 1969. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *J. Natl. Cancer Inst.*, 43: 509-516.
- Figueras, A. J., Jardon, C. F. and Caldas, J. R. 1991a. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture*, 99: 17-33.
- Figueras, A. J., Jardon, C. F. and Caldas, J. R. 1991b. Diseases and parasites of mussels (*Mytilus edulis*, Linneaus, 1758) from two sites on the East Coast of the United States. *J. Shellfish Res.*, 10(1): 89-94.
- Figueras, A. J. y J. Montes. 1988. Aber disease of Edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *Amer. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18: 38-46.
- Figueras, A. J. y A. Villalba 1988 Patología de moluscos. *In*: E. Espinoza de los Monteros y U. Labarta (Eds): *Patología en Acuicultura*. Madrid. pp. 327-389.
- Fisher, 1988. Disease processes in marine bivalve molluscs. *Amer. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 314 pp.
- Goggin, Cl.; Mcgladdery, S. E.; Whyte, S. K. and Cawthorn, R. J. 1996. An Assessment of lesion in bay Scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa: Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organism*: 24(1): 77-80.

- Frieman, E. M. y Andrews, J. D. 1976. Occurrence of hematopoietic neoplasms in virginia oysters (*Crassostrea virginica*). Journal of the National Cancer Institute. 56: 319-324.
- Green, M., y D. J. Alderman, 1983. Neoplasia in *Mytilus edulis* L. from United Kingdom waters. Aquaculture, 30: 1-10.
- Gulka, G y Pai Wen Chang. 1988 Pathogenical and infectivity of a rickettsia-like organism in the scallops *Placopecten*. Journal of Fish Diseases. 8(3): 309-318.
- Hine, P. M. 1991. The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. Aquaculture, 93: 241-251.
- Hine, P. M. 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Diss.aquat.Org., 12: 135-142.
- Johnson, P. T. 1984. Viral diseases of marine invertebrates. Hergoländer Meeresunters 37: 65-98.
- Lannan, C. N., S. A. . y J. L. Fryer. 1991. A fluorescent antibody test for detection of the *Rickettsia* causing diseases in Chilean salmonids. J. Aquat. Anim. Health., 3(4): 229-234.
- Lowe, D. M., and M. N. Moore. 1978. Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical, haemocytic condition in *Mytilus edulis*. J. Nat. Cancer Inst., 60: 1455-1459.
- Margulis, L., J.O. Corliss, M. Melkonian, y D. J. Chapman (Eds.) 1990. Hadbook of Protoctista. pp 769-803. Boston,; Jones and Bartlett. Publ.
- McGladdery, S. E; R. J. Cawthorn, B. C. Bradford. 1991. *Perkinsus karlssoni* n. sp. (Apicomplexa) in bay Scallops *Argopecten irradians*. Diseases of Aquatic Organisms. 10: 127-137.
- McGladdery, S. E.; Brenda C. Bradford y D. J. Scarratt. 1993. Investigations into the transmission of parasites of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819), during quarantine introduction to Canadian waters. Journal of Shellfish Research. 12(1): 49-58.

- McGladdery, S. E., S. K. White and R. J. Cawthorn. 1996. An Assessment of lesions in bay Scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa; Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms*: 24(1): 77-80.
- Mialhe, E., V. Boulo, E. Bachere, D. Hervio, K. Cousin, T. Noel, M. Ohresser, R. M. le Deuff, B. Despres and S. Gendreau. 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusk and shrimp aquaculture. *Aquaculture*. 107: 155-164.
- Mix, M. C. and W. P. Breese. 1980. A cellular proliferative disorder in oyster (*Ostrea chilensis*) from Chiloé, Chile. *J. Invertebr. Pathol.* 36:123-124.
- Office International des Epizooties. 1995. Código Internacional para los Animales Acuáticos de la OIE. 186 pp.
- Oliva, M., Herrera, H.; Matulic, J. y Severino, B. 1986. Parasitismo en el Ostión del Norte *Chlamys (Argopecten) purpuratus* (Lamarck, 1819). *Parasitol al día*. 10: 83-86.
- Perkins, F. O. 1993. Infectious Diseases of Mollusks. In: J.A. Couch and J.W. Fournie. (Eds). *Pathology of marine and Estuarine Organisms*. London. Tokio.
- Peters C., E. 1988. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. *Amer. Fish. Soc., Spec. Publ.*, 18: 74-92.
- Riquelme, C., P. Chavez, Y. Morales and G. Hayashida. 1994. Evidence for parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biol. Res.* 27:129-134.
- Riquelme, C.; G. Hayashida, A. E. Toranzo, J. Vilches and P. Chavez. 1995. Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum* related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22: 135-141.
- Riquelme, C., G. Hayashida, N. Vergara A. Vásquez, Y. Morales y P. Chavez. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture*.
- Sakata, T. 1991. Microflora of Healthy animals. In: B. Austin; D.A. Austin Eds.: *Methods for the microbiological examination of Fish and Shellfish*. 317 pp.

Smibert, R. M. y N. R. Krieg. 1981. General characterization. *In* : Gerhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Krieg y Phillips (Eds.). Manual of methods for general bacteriology. Amer. Soc. Microbiol., Wash., D. C., pp: 409-443.

Thoesen, John C. 1994. Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens. 4th Edition, version 1, Fish Health Section, American Fisheries Society

ANEXO

FORMULARIOS DE ENCUESTAS DIRIGIDAS
A EMPRESAS Y CENTROS CULTIVADORES
DE MOLUSCOS.

ANTECEDENTES GENERALES DE LA EMPRESA IV Región

Nombre de la persona que contesta: _____

Nombre de la Empresa : _____

Dirección Comercial : _____

Rut de la Empresa : _____

Número de Centros que dependen de la Empresa :

Para cada uno de los Centros pertenecientes a la Empresa, por favor, anote los datos que se piden en la tabla siguiente:

Nombre del Centro	Ubicación Geográfica	Nombre del Administrador	Producción app. año 1995	Fase de cultivo	
1.-				Engorda	
				Hatchery	
				Ambas	
2.-				Engorda	
				Hatchery	
				Ambas	
3.-				Engorda	
				Hatchery	
				Ambas	
4.-				Engorda	
				Hatchery	
				Ambas	
5.-				Engorda	
				Hatchery	
				Ambas	
6.-				Engorda	
				Hatchery	
				Ambas	

ANTECEDENTES GENERALES DE LA EMPRESA X Región

Nombre de la persona que contesta: _____

Nombre de la Empresa : _____

Dirección Comercial : _____

Rut de la Empresa : _____

Número de Centros que dependen de la Empresa :

Para cada uno de los Centros pertenecientes a la Empresa, por favor, anote los datos que se piden en la tabla siguiente:

	Nombre del Centro	Ubicación Geográfica	Especie que cultiva	Nombre del Administrador
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Para cada una de las especies que se especifican y que son cultivadas por algún Centro de su Empresa, por favor, anote los datos que se piden en la tabla siguiente:

Especie	Centros que la cultivan	Periodos en que se cultiva	Producción aproximada año 1966
	1.-		
Chorito	2.-		
	3.-		
	1.-		
Choro	2.-		
	3.-		
	1.-		
Cholga	2.-		
	3.-		
	1.-		
Ostión del Norte	2.-		
	3.-		
	1.-		
Ostión del Sur	2.-		
	3.-		
	1.-		
Ostra del Pacífico	2.-		
	3.-		
	1.-		
Ostra Chilena	2.-		
	3.-		
	1.-		
Abalón	2.-		
	3.-		

Rogamos enviar de vuelta este formulario con los datos solicitados a :

MARIEL CAMPALANS B.

Laboratorio Patologías de Recursos Acuáticos

Escuela de Ciencias del Mar

Universidad Católica de Valparaíso

Casilla 832
 PUERTO MONTT

o bien

Casilla 1020 correo 1
 VALPARAISO

CENTROS DE CULTIVOS MARINOS

Ostión del Norte - IV Región

1.- ANTECEDENTES GENERALES DEL CENTRO

☉ Ubicación Geográfica : _____

☉ Número de personas que laboran en el Centro:

<i>Profesionales</i>	
<i>No Profesionales</i>	

2.- ANTECEDENTES DEL CULTIVO MARINO DEL OSTIÓN DEL NORTE

☉ **Origen geográfico** (al menos Comuna y Sector) de las semillas que utiliza ese Centro, tanto si provienen de un Hatchery como de Captación Natural.

<i>Origen Geográfico de las Semillas</i>	
<i>Hatchery</i>	
<i>Captación Natural</i>	

☉ **Sistemas de Captación Natural** que utiliza ese Centro, para el Ostión del Norte

<i>Sistemas de Captación Natural</i>	
--------------------------------------	--

☉ **Sistemas de Cultivo** que utiliza y **periodos** en que su Centro desarrolla dicho cultivo

<i>Periodo de Cultivo</i>	<i>Sistema de Cultivo</i>

- ☉ **Manejos** que se efectúan a los cultivos de Ostión del Norte (raleos, desdobles, limpieza, cambio de mallas, etc). Indique además **periodicidad** con que se realiza cada manejo.

Manejos	Periodicidad

- ☉ **Porcentaje de Mortalidad** promedio de los últimos tres años, indicando las posibles causas.

	Mortalidad (%)	Posibles Causas
1993		
1994		
1995		

3.- ANTECEDENTES SOBRE PATOLOGIAS

- ☉ Para cada variable ambiental que es registrada habitualmente por su Centro, indique la **periodicidad** con que se evalúan.

Variables Ambientales	Periodicidad del Registro
Oxigeno del Agua	
Temperatura del Agua	
Salinidad	
Visibilidad	
Otras (Especifique):	

- ☉ Indique los **métodos** que utiliza el Centro, para prevenir las patologías más relevantes que pueden afectar a sus cultivos de Ostión del Norte.

Patologías	Método de Prevención
•	
•	
•	
•	

- ☉ ¿Mantiene el Centro un registro de las patologías que han afectado a sus cultivos?
Marque con una X lo que corresponda

NO

SI ¿Desde qué año? _____

- ☉ Describa los *signos* de los principales *problemas patológicos* que se han presentado en su Centro, indicando *periodicidad* en la aparición y *posibles causas*.

<i>Problemas Patológicos (signos)</i>	<i>Periodicidad de Aparición</i>	<i>Posibles Causas</i>
•		
•		
•		

4.- OBSERVACIONES AL DESARROLLO DEL PRESENTE ESTUDIO

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

CENTROS DE CULTIVOS MARINOS

1.- ANTECEDENTES GENERALES

☉ Ubicación Geográfica: _____

☉ Número de personas que laboran en el Centro:

Profesionales	
No Profesionales	

2.- ANTECEDENTES DE LOS CULTIVOS MARINOS DEL CENTRO

Para cada especie que cultiva su Centro, especifique lo que se solicita a continuación.

☉ **Origen geográfico** (al menos Comuna y Sector) de las semillas que utiliza, tanto si provienen de un Hatchery como de Captación Natural.

Especies	Origen Geográfico de las Semillas	
	Hatchery	Captación Natural
Choro-Chorito-Cholga		
Ostra Chilena		
Abalón		
Ostra del Pacífico		
Ostión del Norte		
Ostión del Sur		

☉ **Sistemas de Captación Natural** que utiliza.

Especies	Sistemas de Captación Natural
Choro-Chorito-Cholga	
Ostra Chilena	
Ostión del Norte	
Ostión del Sur	

☉ **Sistemas de Cultivo** que utiliza.

Especies	Sistema de Cultivo
Choro-Chorito-Cholga	
Abalón	
Ostra Chilena	
Ostra del Pacífico	
Ostión del Norte	
Ostión del Sur	

☉ **Manejos** que se efectúan a los cultivos (raleos, desdobles, limpieza, cambio de mallas, etc). Indique además **periodicidad** con que se realiza cada manejo.

Especies	Manejos	Periodicidad

☉ **Porcentaje de Mortalidad** promedio de los últimos tres años, indicando las posibles causas.

Especies	Mortalidad (%)	Posibles Causas
Choro		
Chorito		
Cholga		
Abalón		
Ostra Chilena		
Ostra del Pacífico		
Ostión del Norte		
Ostión del Sur		

3.- **ANTECEDENTES SOBRE PATOLOGIAS**

☞ Para cada variable ambiental que es registrada habitualmente por su Centro, indique la **periodicidad** con que se evalúan.

Variables Ambientales	Periodicidad del Registro
Oxígeno del Agua	
Temperatura del Agua	
Salinidad	
Visibilidad	
Otras (Especifique):	

☞ Indique los **métodos** que utiliza el Centro, para prevenir las patologías más relevantes para sus cultivos.

Patologías	Método de Prevención
•	
•	
•	
•	

☞ ¿Mantiene el Centro un registro de las patologías que han afectado a sus cultivos?
 Marque con una X lo que corresponda

NO

SI ¿Desde qué año? _____

☞ Describa los **signos** de los principales **problemas patológicos** que se han presentado en su Centro, indicando **periodicidad** en la aparición y **posibles causas**.

Problemas Patológicos (signos)	Periodicidad de Aparición	Posibles Causas
•		
•		
•		

4.- ANTECEDENTES SOBRE MICRO-ORGANISMOS DEL MEDIO

☉ ¿Realiza el Centro monitoreos de bacterias patógenas humanas?
Marque con una X lo que corresponda

NO

SI

¿Con qué frecuencia? _____

☉ ¿Realiza el Centro monitoreos de microalgas nocivas (Marea Roja)?
Marque con una X lo que corresponda

NO

SI

¿Con qué frecuencia? _____

5.- OBSERVACIONES AL DESARROLLO DEL PRESENTE ESTUDIO

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

CENTROS DE CULTIVOS EN HATCHERY

1.- ANTECEDENTES GENERALES

➤ Ubicación Geográfica : _____

➤ Número de personas que laboran en el Centro:

<i>Profesionales</i>	
<i>No Profesionales</i>	

2.- AGUAS DE SUMINISTRO DEL HATCHERY

Indique si en su Centro se realiza o no alguna de las siguientes actividades con las aguas de suministro del Hatchery. En caso que su respuesta sea positiva, complete el recuadro correspondiente. (Marque con una X lo que corresponda)

➤ Filtrado de aguas de suministro

SI

NO

Calidad del Filtrado		Indíquela:
Agua Cruda	<input type="checkbox"/>	
10 a 50 μm	<input type="checkbox"/>	
1 a 2 μm	<input type="checkbox"/>	
0.1 a 0.5 μm	<input type="checkbox"/>	
Otra	<input type="checkbox"/>	

➤ Esterilización de las aguas de suministro

SI

NO

Tratamientos	Etapas del proceso en que se aplican			
	Ninguna	Larvas	Post-larvas	Microalgas
Luz ultravioleta (UV)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ozono	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cloro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros (Especifique):	<input type="text"/>			

♦ Anote la Cantidad de Energía UV en $\mu\text{watt seg/cm}^2$

➤ Aireación de la aguas de suministro

SI

NO

<p>Equipos utilizados:</p> <p>Compresores <input type="checkbox"/></p> <p>Sopladores <input type="checkbox"/></p> <p>Otros (Indíquelos) <input type="checkbox"/></p>	<p>Tamaño del filtro:</p> <div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>
---	--

☐ ¿Se aplica antibióticos al cultivo?

SI

NO

Si su respuesta es positiva, indique lo siguiente

Productos de uso frecuente	Concentración utilizada	Forma de Aplicación	Periodicidad

¿Cambia con frecuencia el producto que utiliza?

SI

NO

¿Por qué?: _____

☐ Indique las causas que usted le atribuye a la mortalidad de larvas y post-larvas

	Causas
Larvas	
Post-larvas	

5.- ACTIVIDADES GENERALES DEL HATCHERY

En cada una de las preguntas siguientes, marque con una X lo que corresponda.

☐ ¿Su Centro, mantiene un registro de las patologías que se han presentado?

NO

SI

¿Desde qué año?:

☐ ¿Se realiza sanitización completa del Hatchery?

NO

SI

¿Con qué frecuencia?

☐ ¿Se realiza limpieza de las cañerías de la red de agua del Hatchery?

NO

SI

¿Con qué frecuencia?
Producto utilizado :

☐ ¿Se realizan tratamientos a las aguas efluentes del Hatchery, previo a su envío al mar?

NO

SI

Indíquelo(s)

6.- OBSERVACIONES

Anote las observaciones que estime pertinentes al desarrollo del presente estudio.

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACION