

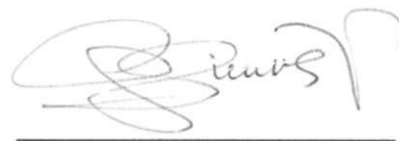
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE ADULTOS DE
***Caligus rogercresseyi* EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*)**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO

JOAQUIN FELIPE NEUMANN HEISE
VALDIVIA - CHILE
2017

PROFESOR PATROCINANTE



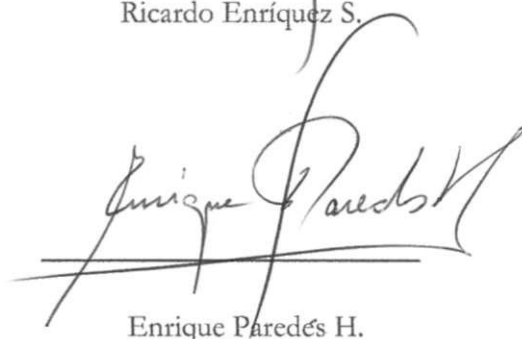
Gerold Sievers P.

PROFESOR COPATROCINANTE



Ricardo Enríquez S.

PROFESORES INFORMANTES



Enrique Paredés H.



Alex Romero Z.

FECHA DE APROBACIÓN: 21 de julio de 2017

A la ciencia.

ÍNDICE

Capítulo

RESUMEN	1
SUMMARY..	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	15
REFERENCIAS	18
ANEXOS.....	20
AGRADECIMIENTOS	23

1. RESUMEN

El ectoparásito *Caligus rogercresseyi* es considerado como uno de los agentes etiológicos de mayor impacto económico que enfrenta la industria del salmón en Chile. El objetivo de este trabajo fue aportar conocimiento adicional en cuanto al ciclo biológico de este parásito. En marzo y abril de 2017, en Puerto Montt, Chile, se realizaron 2 ensayos con salmones del Atlántico (*Salmo salar*) expuestos a poblaciones adultas de hembras y machos de *C. rogercresseyi*, con el fin de evaluar su capacidad infectiva y posterior desarrollo reproductivo.

Se utilizó un acuario que contenía 200 litros de agua de mar (33‰ de salinidad y 12-15°C de temperatura), dividido en 2 compartimentos de distinto tamaño (A y B) mediante una mampara con aberturas en su porción central, calculadas para permitir un flujo de agua de 1 centímetro/segundo (cm/s) (ensayo 1) y 2 cm/s (ensayo 2). En el compartimento A se introdujeron *Caligus* adultos, que debían nadar en contra del flujo de agua para alcanzar los peces mantenidos en el compartimento B. A los 30, 90 y 150 minutos de introducir los parásitos se contaron los especímenes de *Caligus* nadando libremente en ambos compartimentos, lo que permitió calcular el número de parásitos que se habían adherido a los salmones. Al completarse los 150 minutos se removió la mampara divisora del acuario, dando origen a un solo compartimento y destinando 14 días (ensayo 1) y 5 días (ensayo 2) adicionales al desarrollo reproductivo de los parásitos sobre los salmones. Luego de ese periodo los peces fueron sacrificados utilizando sobredosis de anestésicos para contar los estadios adultos y juveniles de *C. rogercresseyi* adheridos a ellos.

En el ensayo 1, a los 30 minutos el 14,8% de los 27 *Caligus* adultos vivos nadaba libremente en el compartimento A y a los 150 minutos no se observaron parásitos nadando en ninguno de los dos compartimentos, estando todos adheridos a los salmones (100% infección). En el ensayo 2, a los 30 minutos el 20,3% de las 64 hembras adultas de *Caligus* vivas nadaba libremente en el compartimento A y a los 150 minutos no se observaron hembras adultas de *Caligus* nadando en ninguno de los compartimentos (100% infección), habiendo varias de ellas adheridas a la región dorsal anterior de los salmones. En el ensayo 1 se encontró una hembra ovígera a 14 días de infección, y en el ensayo 2, después de 5 días, se encontró el 46,9% de las hembras adultas (17 con sacos ovígeros y 13 sin sacos ovígeros), dando un promedio de 4,28 parásitos por salmón.

Los resultados sugieren que los individuos adultos de *C. rogercresseyi* corresponden a una fase infectante del parásito y que las hembras continúan madurando reproductivamente una vez asentadas sobre su hospedero.

Palabras clave: *Caligus rogercresseyi*, capacidad infectiva adultos, *Salmo salar*.

2. SUMMARY

INFECTIVE CAPACITY OF ADULTS *Caligus rogercresseyi* ON ATLANTIC SALMON (*Salmo salar*)

The ectoparasite *Caligus rogercresseyi* is considered one of the etiological agents of greater economic impact that faces the industry of the salmon in Chile. The aim of this study was to provide additional knowledge regarding the biological cycle of this parasite. In March and April of 2017, in Puerto Montt, Chile, two essays were carried out with Atlantic salmon smolts (*Salmo salar*) exposed to adult populations of females and males of *C. rogercresseyi* in order to evaluate their infective capacity and subsequent reproductive development.

It was used an aquarium containing 200 liters of seawater (salinity of 33‰ and a temperature of 12-15°C), divided into 2 compartments of different size (A and B) by a bulkhead with openings in its central portion, which was calculated to allow a water flow of 1 centimeter per second (cm/s) (essay 1) and 2 cm/s (essay 2). Adult *Caligus* were introduced in the compartment A, which should swim against the water flow to reach the fish, kept in compartment B. At 30, 90 and 150 minutes of introducing the parasites, *Caligus* freely swimming specimens were counted in both compartments, allowing to calculate the number of parasites that had adhered to the salmons. After the 150 minutes the divisor bulkhead was removed from the aquarium, creating a single compartment. 14 additional days (essay 1) and 5 days (essay 2) was considered to allow the reproductive development of the parasites on the salmon. After this period the fish were sacrificed using overdose of anesthetic, proceeding to count the adult and juvenile stages of *C. rogercresseyi* attached to them.

In essay 1, at 30 minutes 14.8% of the 27 live *Caligus* adults were swimming freely in compartment A and at 150 minutes no parasites were observed swimming in either compartment, all of which were attached to the salmons (100% infection). In essay 2, at 30 minutes 20.3% of 64 live *Caligus* adult females were swimming freely in compartment A and at 150 minutes no adult females of *Caligus* were observed swimming in any of the compartments (100% infection), many of them adhered to the anterior dorsal region of the salmon. In essay 1 a gravid female was found 14 days post infection, and in essay 2, after 5 days, 46.9% of the adult females (17 with egg sacs and 13 without egg sacs) were found, giving an average of 4.28 parasites per salmon.

The results suggest that adult *C. rogercresseyi* individuals are an infective stage of the parasite and that the reproductive maturation of the females continues once settled on their host.

Keywords: *Caligus rogercresseyi*, adult's infective capacity, *Salmo salar*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. GENERALIDADES

La caligidosis es una enfermedad propia de los peces, producida en Chile por el ectoparásito copépodo *Caligus rogercresseyi*, comúnmente llamado piojo de mar, que habita las aguas marinas y salobres de Chile (Capo 2015). Se considera como uno de los problemas sanitarios más importantes durante la fase de engorda en agua de mar de los salmones cultivados en Chile (Feest 2015) y representa una seria amenaza a la rentabilidad de la industria del salmón, debido principalmente a los costos relacionados a su vigilancia y control (Sánchez y col 2015).

C. rogercresseyi es un parásito poco específico y posee un amplio rango de hospederos, desde salmónidos de cultivo hasta especies nativas del sur de Chile (Marín y col 2015). Bravo (2003) sugiere que los hospederos naturales de este parásito son los peces silvestres marinos que se encuentran en el sector de los centros de cultivos atraídos por el alimento de los salmones, destacándose el robalo (*Eleginops maclovinus*), el pejerrey (*Odontesthes regia*) y el lenguado (*Paralichthys microps*) con cargas parasitarias relativamente bajas, a diferencia de los salmones de cultivo, en donde el parásito ha encontrado un hospedero ideal (Bravo 2011). No existe claridad con respecto al origen del parásito, pero es posible que *C. rogercresseyi* haya sido diseminado desde la costa del Océano Atlántico hacia el Pacífico a través de su hospedero natural *E. maclovinus* vía Estrecho de Magallanes (Bravo 2011).

Las especies más susceptibles de ser infectadas por *C. rogercresseyi* son la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). A pesar de que hace algunos años se han encontrado estadios juveniles de este parásito infectando *smolts* de salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) después de que estos han sido transferidos desde agua dulce (González y col 2011), esta especie ha mostrado ser altamente resistente bajo las mismas condiciones de cultivo que las especies nombradas anteriormente (Bravo 2003, Pino-Marambio y col 2007) al no permitir el desarrollo de adultos, considerándose un hospedero temporal.

En condiciones naturales estos parásitos se encuentran en equilibrio con su hospedero. Sin embargo, la situación se torna diferente en los salmones de cultivo, donde la densidad de carga de los peces es bastante mayor a la observada en la naturaleza. Esto propicia el encuentro parásito-hospedero y probablemente incide en una mayor tasa de multiplicación (Bravo 2011), contribuyendo a elevar la carga parasitaria de los peces. Se postula que esto, sumado a la proximidad entre centros de cultivo, ha facilitado el desarrollo y expansión de la caligidosis en las áreas geográficas en donde se desarrolla esta actividad (Bravo y col 2008).

Esta expansión o aumento de prevalencia de la caligidosis conlleva a que se eleven los costos de tratamiento, a que se alargue el ciclo productivo, y a que se afecte la calidad del producto final y se deba incurrir en gastos por limpieza de carcasas durante su procesamiento, entre otros inconvenientes (Capo 2015).

Además de esto, la acuicultura moderna proporciona condiciones muy favorables para que éste y otros parásitos que afectan a la industria desarrollen resistencia rápidamente contra todos los fármacos disponibles en el mercado. Como se mencionó anteriormente, las altas densidades de peces en los sistemas de cultivo incrementan las oportunidades del parásito de transmitirse entre hospederos y, por lo tanto, de sobrevivir. Es más, se postula que estos parásitos ya casi no necesitan invertir su energía en sobrevivir, como harían en vida silvestre, sino más bien, deben invertirla en reproducirse (Samsing 2015). Al respecto, estudios en Noruega han demostrado que hembras de *Lepeophtheirus salmonis* (piojo de mar que afecta a las salmoniculturas del hemisferio norte) provenientes de centros de cultivo presentan un ciclo reproductivo más corto y son capaces de producir sus huevos a una edad más temprana que hembras provenientes de poblaciones silvestres (Mennerat y col 2012). Un ciclo reproductivo más corto significa una mayor cantidad de generaciones de parásitos al año y, en consecuencia, mayores oportunidades para que la mutación que confiere resistencia a las drogas antiparasitarias ocurra en la población (Samsing 2015).

El desarrollo de un paradigma preventivo es clave, y la única forma de lograrlo es mediante un profundo entendimiento del comportamiento del salmón y del parásito, en este caso, el piojo de mar, en nuestros sistemas de cultivo (Samsing 2015).

3.2. MORFOLOGÍA

3.2.1. Caracterización morfológica

Kabata (2003) divide el cuerpo de ejemplares adultos del género *Caligus* en dos zonas:

- Una anterior ancha con forma de hoja denominada cefalotórax, la que porta nueve pares de apéndices pareados (anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y 4 pares de toracópodos), y posee una membrana marginal que le permite permanecer adherido a su hospedero, simulando una ventosa.
- Una posterior delgada, denominada abdomen, que no presenta apéndices y se divide en tres segmentos: el proximal, denominado genital por portar en su interior parte de las gónadas; uno intermedio, sin ornamentaciones; y el distal, denominado furca, que está dividido en su parte central y porta la apertura anal en el dorso, además de exhibir varias setas caudales con funciones sensoriales.

3.2.2. Dimorfismo sexual

Los caligidos presentan dimorfismo sexual, diferenciándose machos y hembras por algunas características morfológicas observables a simple vista (Salmonexpert 2015^a), aunque las formas restantes de diferenciarlos requieren de las observaciones con lupas o microscopios.

En su etapa adulta, las hembras de *C. rogerresseyi* miden alrededor de 4 a 6 mm de largo. En su extremo posterior poseen un segmento genital abultado que, en el caso de las hembras grávidas, presenta dos largos sacos ovígeros.

Los machos son más pequeños (4,1 a 4,8 mm) y su segmento genital termina en forma más aguzada, el cual no aumenta de tamaño como ocurre en la hembra.

3.3. CICLO BIOLÓGICO

C. rogerresseyi es un parásito de ciclo de vida directo en los peces: presenta estadios parasíticos y estadios de vida libre, careciendo de hospedero intermediario.

Las hembras fertilizadas tienen en cada uno de sus dos sacos ovígeros en promedio 29 ± 3 huevos (Jaramillo y col 2015). Según González y Carvajal (2003), de los huevos emergen larvas llamadas *nauplius* (de aprox. 0,45 mm) que mudan a *nauplius II* (0,48 mm) y luego a *copepoditos* (0,65 mm); esos tres estadios de desarrollo se describen como de vida libre en el plancton, considerándose los *copepoditos* como las formas infectantes del parásito. Estos se fijan al pez mediante unas antenas modificadas y mudan a *chalimus I* (0,83 mm), que se fijan a las escamas mediante el filamento frontal; allí inician su crecimiento mudando sin desprenderse de su hospedero a *chalimus II* (1,27 mm), a *chalimus III* (2,14 mm) y a *chalimus IV* (3,2 mm), mudando finalmente a individuos adultos que se desprenden de su lugar de asentamiento para buscar pareja y copular. Una vez fertilizadas, en las hembras se vuelven a formar los sacos ovígeros, repitiéndose el ciclo biológico, el cual es dependiente de la temperatura. Según González y Carvajal (2003) el tiempo generacional desde la eclosión del huevo hasta el adulto maduro de *C. rogerresseyi* en el salmón del Atlántico (*S. salar*) es de 45 días en invierno, 30 días en otoño, 26 días en primavera y 18 días en verano.

Los *nauplius* y *copepoditos* de *C. rogerresseyi* presentan sus reservas lipídicas originadas por las madres al interior de su cuerpo, almacenadas en burbujas de vitelo dispuestas en la zona media. A medida que ocurre el desarrollo larval se observa disminución de dicho alimento, agotándose en los *copepoditos* al no encontrar un pez para parasitar (Salmonexpert 2015^b).

Boxaspen y Naess (2000) indican que el piojo de mar *L. salmonis* puede vivir más y ser más grande a temperaturas frías como las de invierno, pudiendo las hembras más grandes producir más huevos y de mayor tamaño que en otras épocas del año. Consecuentemente, estas hembras liberan en la primavera más huevos que las hembras de verano. La larva que emerge de estos huevos puede tener mayor cantidad de reservas y podría permanecer más tiempo en el plancton buscando un hospedero apropiado. Aunque las generaciones de hembras de verano son más pequeñas y producen un menor número de huevos por postura, las poblaciones de verano pueden aumentar exponencialmente debido a los tiempos generacionales más cortos.

La salinidad es otro factor importante para la sobrevivencia de las larvas *nauplius* y *copepoditos* de *C. rogerresseyi*, que mueren a niveles de salinidad inferiores a 20 Unidades Prácticas de Salinidad o UPS (González y Carvajal 2003).

3.4. PROCESO DE INFECCIÓN

Para la supervivencia de todas las especies de parásitos es crucial el proceso de infección. Cada especie parasitaria debe asegurar en el tiempo y el espacio la coincidencia de sus estadios infectantes con la presencia de hospederos adecuados (Sievers 2017). En el caso de la caligidosis, entonces, la dinámica de la infección de los peces por *Caligus* es determinada por la capacidad de los *copepoditos* para encontrar a su hospedero, así como el comportamiento de estos últimos en el agua (Salmonexpert 2015^a). Respecto a la atracción de las larvas de caligidos hacia sus hospederos, Pino-Marambio y col (2007) describen el rol de los semioquímicos en la fijación de adultos y *copepoditos* de *C. rogerresseyi* a los peces, indicando que estas señales químicas presentes en el mucus de los peces son reconocidas por estos en el agua, guiándolos hacia su fuente de alimento. En el mismo estudio se describe que las tres especies de salmónidos que se cultivan en Chile exhiben estas señales químicas, y que *C. rogerresseyi* presenta un sistema quimiosensor complejo para identificarlas, pudiendo incluso diferenciar entre especies hospederas susceptibles y especies no hospederas.

Farías (2005) describe la formación del filamento rostral (o de fijación) de *C. rogerresseyi*, señalando que se inicia desde el interior del cefalón frente a la presencia de mucus del pez hospedero, siendo secretado por la glándula del cemento. Posteriormente, el filamento rompe el borde frontal de la cabeza y sale al exterior como un tubo cristalino, con interior hueco en *L. salmonis* y sólido en *C. rogerresseyi*, diferencia que le permite al *copepodito* de *L. salmonis* secretar quitina a través del filamento y cambiar de sitios de fijación, no así en *Caligus*, que está obligado a fijarse en un sitio que le permita completar su ciclo de vida.

Asencio y col (2011) postulan que las variables ambientales que determinan el proceso de fijación de los *copepoditos* de *C. rogerresseyi* son la salinidad, la intensidad de la luz y la velocidad del hospedero. En su estudio se concluye que a medida que se incrementa la intensidad de la luz y la salinidad, se producen mayores tasas de infecciones exitosas, en tanto que a mayor velocidad de movimiento del pez estas se reducen.

3.5. REPRODUCCIÓN

En relación a los aspectos reproductivos de *C. rogerresseyi*, Osorio (2008) describe que el proceso de la cópula ocurre solamente una vez en su ciclo de vida, ya que el espermátforo del macho produce una sustancia cementante que bloquea los ductos copulatorios de la hembra. Esto impide que sea inseminada nuevamente y las obliga a mantenerse monógamas. Posterior a la cópula ocurre la fecundación de los huevos en la espermateca de la hembra, con lo cual se inicia el desarrollo intracapsular del parásito (al interior de los sacos ovígeros), el que finaliza con la liberación de los estadios planctónicos. Es importante mencionar que las hembras, a pesar de su condición de monógamas, producen hasta once generaciones de sacos ovígeros con una sola cópula (Bravo 2010). Los machos son polígamos, evidencia entregada por Osorio (2008) después de realizar desafíos con varias hembras vírgenes frente a un macho, registrando hasta siete hembras fecundadas en catorce horas.

*Sievers G. (2017). Comunicación personal.

La formación de los huevos, al igual que la fecundación, ocurre al interior del segmento genital de las hembras, para posteriormente emerger al exterior incluidos en dos sacos ovígeros, cada uno fijo a cada poro genital de la hembra (Salmonexpert 2015^a). Respecto a la fecundidad de las hembras de *C. rogerresseyi* en condiciones de laboratorio se ha cuantificado un rango de 100 huevos por hembra (Bravo 2010), en tanto que González y col (2011), al comparar posturas de este parásito en robalos (15-35 huevos/saco) y peces salmónidos (40-60 huevos/saco), plantean que los peces de cultivo estarían proporcionando un mejor nicho alimentario, lo que se reflejaría en posturas más numerosas. Esta característica, sumada a la poligamia en machos, entrega una alta capacidad de variabilidad genética en la descendencia, y por ende, una mayor adaptación a los cambios ambientales.

En la actualidad se postula que los *copepoditos* de vida libre son los únicos responsables de localizar e infectar a un hospedero para completar su ciclo, incluso a pesar de que cuentan con menor visión y capacidad de desplazamiento que los adultos y de que ya han consumido gran parte de sus reservas lipídicas desde que salieron de sus huevos en la fase de *nauplius* (Sievers 2017).

Si bien se ha observado que el estadio adulto de *C. rogerresseyi* es capaz de desprenderse de un pez y nadar activamente hasta encontrar un hospedero adecuado (Bravo y col 2010), no hay estudios que relacionen este hecho con el ciclo reproductivo del parásito. En el presente estudio se determinará la capacidad infectiva de los individuos adultos de *C. rogerresseyi* sobre ejemplares de salmón del Atlántico (*S. salar*), y su implicancia en el ciclo reproductivo del parásito.

3.6. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el estadio adulto de *C. rogerresseyi* corresponden a una fase infectante del parásito.

3.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si machos adultos de *C. rogerresseyi* son capaces de infectar salmones del Atlántico (*S. salar*), mantenidos con un flujo de agua de 1 cm/s.

Determinar si hembras adultas de *C. rogerresseyi* son capaces de infectar salmones del Atlántico (*S. salar*), mantenidos con flujos de agua de 1 y 2 cm/s.

Determinar la capacidad de los individuos adultos de *C. rogerresseyi* de movilizarse entre distintos hospederos.

Determinar la capacidad reproductiva de adultos de *C. rogerresseyi* una vez asentados sobre un hospedero.

*Sievers G. (2017). Comunicación personal.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Entre los meses de marzo y abril de 2017 se realizaron 2 ensayos consecutivos de tipo transversal y descriptivo, siendo ambos desarrollados en Chiquihue Nro. 8300, Puerto Montt, Región de Los Lagos, Chile (lat. 41°, 37', 37" / long. 73°, 00', 16").

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Primer ensayo: 12 salmones (*S. salar*) con un peso promedio de 80 g, proporcionados por la empresa Hendrix Genetics Aquaculture S.A. Grupo de peces libres de *C. rogersesseyi* y sin tratamientos previo a la realización del ensayo.
- Primer ensayo: 28 ejemplares adultos de *C. rogersesseyi* recolectados desde el mar.
- Segundo ensayo: 7 salmones (*S. salar*) con un peso promedio de 100 g, proporcionados por la misma empresa y en iguales condiciones.
- Segundo ensayo: 67 ejemplares adultos de *C. rogersesseyi* donados por Fundación Chile.

4.2. MATERIAL FÍSICO

- 2 acuarios de vidrio de 235 litros de capacidad, con medidas de 126 cm de largo, 36 cm de ancho y 52 cm de alto.
- Una mampara de acrílico con medidas de 51 cm de largo, 35 cm de ancho y 3 mm de grosor, exhibiendo una abertura central circular de 15,8 cm de diámetro cubierta por un enrejado de 1 cm de abertura. Dos bandas plásticas de 0,5 cm de ancho fueron pegadas a ambos bordes del eje largo de la mampara (una a cada lado), otorgándole un ancho final de 36 cm para ser ajustada entre los vidrios anterior y posterior del acuario.
- Una mampara de acrílico de iguales medidas que el anterior, cuya abertura central circular fue reemplazada por 3 aberturas rectangulares verticales paralelas de 16,5 cm de largo por 2 cm de ancho.
- Un tubo LED de 100 cm de largo, adaptado para iluminar el compartimento B.
- Un embudo de plástico (14 cm de diámetro) con una malla metálica de 300 μ de abertura.
- Una bomba succionadora de agua con filtro incorporado marca "Eheim experience 250", capaz de bombear hasta 11,8 L/min, suficiente para un acuario de 120-250 litros de capacidad.
- 4 bombas de aire marca "Elite 801" y múltiples mangueras de distribución.

- Una lupa estereoscópica binocular marca “Ernst Leitz”.
- Otros: agua de mar filtrada, “quechas”, placas Petri, pipetas, frascos, fuentes, bidones, sifón, termómetro, densímetro, alimento para salmones.

4.3. MÉTODOS

Se vertieron 200 litros de agua de mar filtrada en el acuario, quedando un espacio libre de 8 cm entre la superficie del agua y el punto más alto de éste. Luego se introdujo una mampara (M) en forma perpendicular al eje más largo del acuario, siendo ubicada a 20 cm de su extremo izquierdo y dando origen a 2 compartimentos (A y B) de distinto tamaño. Dadas sus dimensiones, la mampara se extendió por todo el ancho y alto del acuario, sobrepasando en 7 cm la superficie del agua. De esta manera, la única forma de que pudiera fluir agua entre un compartimento y otro era a través de su abertura central enrejada (R) (Figura 1).

El compartimento B, al ser más grande que el compartimento A, tuvo la función de albergar a los peces, mientras que el compartimento A se destinó a los parásitos. Estos últimos tendrían la oportunidad de nadar libremente en contra del flujo del agua y atravesar la abertura central enrejada de la mampara, llegando así al compartimento B. No así los peces, que, debido a su mayor tamaño, no tendrían posibilidades de atravesar por el enrejado y alcanzar el compartimento A. El agua siempre mantuvo un flujo unidireccional a medida que atravesaba por el acuario, pasando desde el compartimento B al compartimento A a través de la abertura enrejada de la mampara (R), manteniendo un flujo de 1 cm/s en el primer ensayo y 2 cm/s en el segundo ensayo (ver cálculos en Anexo 1). Una vez en el compartimento A, el agua fue succionada por un tubo provisto de un embudo con una malla de 300 micras de abertura (E) hasta ingresar a la bomba-filtro (BF). Una vez ahí, el agua era filtrada y volvía a ingresar al compartimento B del acuario mediante otro tubo, completándose así el ciclo (Figura 1).

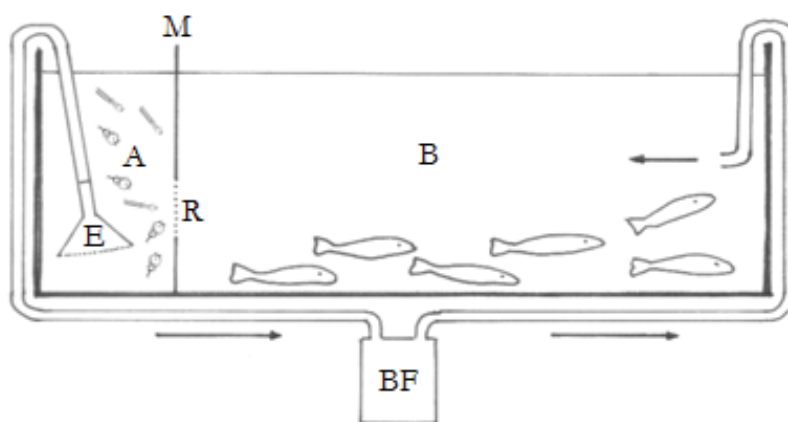


Figura 1: Representación de las estructuras del acuario y sus compartimentos. Se indica la dirección del agua dentro y fuera del acuario. M=mampara; A=compartimento A; B=compartimento B; R=abertura enrejada; E=embudo; BF=bomba filtro.

4.4. PRIMER ENSAYO – PREPARACIÓN

Una vez montado el acuario y sus distintos componentes (excepto la mampara divisora), se adicionaron los 12 peces (*S. salar* de aprox. 80 g), que fueron adaptados al agua de mar durante 25 días (ver Anexo 2) antes de iniciar el ensayo, ya que *C. rogerresseyi* necesita agua de mar para sobrevivir. Una vez concluida la adaptación de los salmones, se realizó la captura de los parásitos adultos (*C. rogerresseyi*) directamente desde mar en el centro de cultivo de la Isla Francisco, reuniéndose alrededor de 200 ejemplares. Estos fueron transportados al laboratorio en 2 bidones con 20 litros de agua de mar cada uno (ver Anexo 3).

En el laboratorio y con ayuda de una pipeta, se seleccionaron los individuos más activos y se dispusieron en una placa Petri. El total de la población seleccionada fue de 28 individuos, siendo constituida por 7 hembras sin sacos, 7 hembras con sacos y 14 machos. Luego se instaló la mampara divisora en el acuario y se dejaron 6 salmones en el compartimento B. Al tubo que succiona el agua desde el compartimento A se acopló un embudo de plástico con una malla metálica (300 μ de abertura) para impedir la succión de cualquier estadio de desarrollo de *C. rogerresseyi*. Los otros 6 salmones se dispusieron en un segundo acuario con abundante agua de mar, la que se mantuvo constantemente oxigenada.

4.5. PRIMER ENSAYO – PRIMERA PARTE

Para determinar si los adultos de *C. rogerresseyi* son una fase infectante del parásito:

- a) En el compartimento B del acuario se dejaron los 6 salmones.
- b) Al compartimento A se vertieron 28 *Caligus* adultos.
- c) A los 30, 90 y 150 minutos se contaron los especímenes de *Caligus* nadando libremente en ambos compartimentos.

Al no haber ningún parásito adherido a alguno de los peces al cabo de 8 horas se daría por finalizado el ensayo. Si se encontraba al menos un parásito adherido a alguno de los peces durante el transcurso del ensayo, quedaría comprobado que el estadio adulto es capaz de nadar en contra de un flujo de 1 cm/s (Anexo 1, a) e infectar a un pez, dando paso a la segunda parte del primer ensayo.

4.6. PRIMER ENSAYO - SEGUNDA PARTE

Para evaluar la capacidad de los adultos de *C. rogerresseyi* de nadar de un pez al otro y/o reproducirse una vez asentados sobre un hospedero:

- a) Se removió la mampara divisora del acuario, dando origen a un solo compartimento.
- b) Al grupo de 6 salmones infectados con *Caligus* adultos se agregaron los 6 salmones libres del parásito y se mantuvieron juntos durante 14 días.
- c) Concluido ese tiempo, se sacrificaron los 12 salmones en un baño con sobredosis de benzocaína 20% (4 ml en 10 litros) y se revisaron por ambos lados bajo la lupa estereoscópica en busca de adultos y estadios intermedios de desarrollo.

Durante los 14 días el agua fue recambiada en un 20% - 30% (40-60 litros) cada 4 días. Para reducir la acumulación de heces, restos de alimento, escamas y otros desechos se utilizó un sifón y un colador, cuya abertura no permitía el paso de *Caligus* adultos.

4.7. SEGUNDO ENSAYO - PREPARACIÓN

Este ensayo consistió en una repetición del primer ensayo, con un aumento de la velocidad del flujo de agua e incluyendo sólo hembras ovígeras. En general, los materiales utilizados en este ensayo fueron los mismos del primer ensayo, con las siguientes diferencias:

- Se redujo la cantidad de salmones (*S. salar*) a 7, siendo igualmente adaptados a agua de mar.
- Se aumentó el número de parásitos a 67.
- Se reemplazó la mampara de abertura circular por el de aberturas rectangulares, pudiéndose obtener una velocidad del flujo de agua de 2 cm/s (Anexo 1, b).

4.8. SEGUNDO ENSAYO – PRIMERA PARTE

Para determinar si los adultos de *C. rogerresseyi* son una fase infectante del parásito:

- a) En el compartimento B del acuario se mantuvieron 7 salmones (*S. salar*) de un peso promedio de 100 g.
- b) En el compartimento A del acuario se agregaron 67 hembras adultas con sacos ovígeros de *C. rogerresseyi*.
- c) A los 30, 90 y 150 minutos se contaron los especímenes de *Caligus* nadando libremente en ambos compartimentos del acuario, observando si se encontraban adosados a los salmones.

4.9. SEGUNDO ENSAYO – SEGUNDA PARTE

Para evaluar la capacidad de las hembras adultas de *C. rogerresseyi* de madurar reproductivamente una vez asentadas sobre un hospedero:

- a) Una vez concluidos los 150 minutos se retiró la mampara divisora del acuario, dando origen a un sólo compartimento para mantener los 7 salmones infectados durante 5 días y permitir la maduración de los sacos ovígeros.
- b) Transcurridos los 5 días se sacrificaron los 7 salmones en un baño con sobredosis de benzocaína 20% (4 ml en 10 litros) y se revisaron por ambos lados bajo la lupa estereoscópica en busca de adultos y estadíos intermedios de desarrollo.

5. RESULTADOS

5.1. PRIMER ENSAYO

5.1.1. Capacidad infectiva de ejemplares adultos de *C. rogercresseyi*

A los 90 minutos del ensayo se encontró una hembra adulta sin movimiento en el fondo del compartimento A (3,6% de mortalidad).

La totalidad de los adultos vivos de *C. rogercresseyi* (n = 27) nadaron contra un flujo de 1 cm/s pasando del compartimento A al compartimento B del acuario; allí los parásitos se adhirieron a los 6 salmones. En el cuadro 1 se muestra la cantidad de parásitos observados nadando libremente.

Cuadro 1: Cantidad de *C. rogercresseyi* adultos nadando libremente después de 30, 90 y 150 minutos en ambos compartimentos del acuario separados por una mampara con un flujo de 1 cm/s.

Minutos	Compartimento A			Compartimento B		
	Hembras sin sacos	Hembras con sacos	Machos	Hembras sin sacos	Hembras con sacos	Machos
0	7	7	14	-	-	-
30	2	2	0	0	0	1
90	(1)	0	0	0	0	2
150	0	0	0	0	0	0

(n) = *Caligus* adultos muertos.

En el compartimento A se encontró una hembra sin movimiento a los 90 minutos del ensayo (3,6% mortalidad). De los 27 ejemplares adultos vivos, a los 30 minutos el 14,8% (4) nadaba libremente en el compartimento A y en el compartimento B nadaba libre el 3,7% (1), estando el 81,5% restante (22) adherido a los salmones. A los 90 minutos se observó un 7,4% (2) de los parásitos nadando libremente en el compartimento B y a los 150 minutos no se observaron parásitos nadando en ninguno de los compartimentos, estando todos los individuos vivos adheridos a los salmones en el compartimento B (100% infección).

5.1.2. Capacidad de adultos de *C. rogercresseyi* de movilizarse entre distintos hospederos

A los 14 días de iniciado el primer ensayo se sacrificaron los 12 salmones (promedio $97,3 \pm 22$ g), encontrándose una hembra adulta con sacos ovígeros en un salmón. No se observaron otros estadíos del parásito.

5.2. SEGUNDO ENSAYO

5.2.1. Capacidad infectiva de hembras de *C. rogercresseyi*

Las hembras adultas vivas ($n = 64$) nadaron contra un flujo de 2 cm/s pasando del compartimento A al compartimento B del acuario y allí se adhirieron a 7 salmones. En el cuadro 2 se muestra la cantidad de parásitos observados nadando libremente en ambos compartimentos.

Cuadro 2: Cantidad de hembras adultas de *C. rogercresseyi* nadando libremente después de 30, 90 y 150 minutos en ambos compartimentos del acuario.

Minutos	Hembras adultas de <i>Caligus rogercresseyi</i>	
	Compartimento A	Compartimento B
0	67	-
30	13 (3)	ND
90	3	1
150	0	0

(n) = *Caligus* adultos muertos.

ND = No determinado.

A los 30 minutos de iniciado el ensayo, se encontraron tres (3) hembras sin movimiento en el compartimento A del acuario (4,5% de mortalidad). A los 30 minutos de iniciado el ensayo el 20,3% (13) de las 64 hembras de *C. rogercresseyi* vivas nadaba libremente en el compartimento A, mientras que el resto de las hembras permanecía en el compartimento B, estando algunas adheridas a los salmones. A los 90 minutos se constató un 4,7% (3) de las hembras vivas nadando libremente en el compartimento A, estando el 94% (60) de las hembras vivas adheridas a los salmones del compartimento B y una (1,6%) nadando libremente. A los 150 minutos no se observaron hembras de *Caligus* adultas nadando libres en ninguno de los compartimentos, estando todas las hembras vivas adheridas a los salmones en el compartimento B (100% infección). Se visualizaron varias hembras adheridas a la parte dorsal anterior de los salmones (Figura 2).



Figura 2: Hembras ovígeras de *C. rogerresseyi* (flechas) adheridas a la parte dorsal anterior de un salmón.

5.2.2. Carga parasitaria de los salmones al final del segundo ensayo

A los 5 días de iniciado el segundo ensayo se sacrificaron los 7 salmones (promedio $128,4 \pm 29$ g), encontrándose 30 hembras (46,9%), 17 con sacos y 13 sin sacos, dando un promedio de 4,3 parásitos por salmón. No se observaron otros estadios del parásito.

6. DISCUSIÓN

González y Carvajal (2003) describen que la forma infectante de *C. rogerresseyi* es el *copepodito*, el cual se encuentra suspendido libremente en el plancton hasta que logra adherirse a un hospedero. Esta aseveración ha sido comprobada en diversos estudios, sin embargo, no significa que el *copepodito* sea el único estadio infectante del parásito. Al respecto, Cruz-Reyes y Camargo-Camargo (2001) definen el término “estadio infectante” como “la fase de ciclo de vida de un parásito, con capacidad para producir infección y que puede entrar al hospedador por transmisión activa o transmisión pasiva (...)”.

En el presente trabajo se observó que casi la totalidad de los adultos de *Caligus* fueron capaces de nadar contra un flujo de agua, localizar un salmón y luego adherirse a él dentro de un tiempo relativamente corto (30 a 150 minutos). Ello demuestra que, bajo estas condiciones experimentales, el estadio adulto de *C. rogerresseyi* también es una forma infectante activa del parásito. Esta observación adquiere sentido si se consideran las infecciones naturales de los peces nativos (Bravo 2003), en que el parásito nada activamente de un pez al otro y asegura su supervivencia en un enorme volumen de agua y, por otro lado, explica el éxito que éste tiene en sistemas en que los hospederos están concentrados en un volumen de agua comparablemente muy pequeño. Sin embargo, en el presente trabajo quedaron abiertas las preguntas respecto a si los individuos adultos de *C. rogerresseyi* son o no capaces de nadar de un pez al otro y si, una vez asentados sobre un salmón, se reproducen exitosamente.

De acuerdo a lo descrito por González y Carvajal (2003), el tiempo que tarda en completarse el ciclo biológico de *C. rogerresseyi* durante el verano es de 18 días, por ello se consideró en el primer ensayo que 14 días serían suficientes para presenciar una nueva generación de *chalmus* y, quizás, de *Caligus* adultos; más aún al saber que el 50% de las hembras ya había desarrollado sacos ovígeros. Al examinar los salmones exhaustivamente después de ese tiempo con una lupa estereoscópica, se constató que los parásitos no fueron capaces de sobrevivir eficientemente en el acuario, no encontrándose adheridos a un hospedero ni tampoco nadando de forma libre en el agua. Es probable que el sistema de filtrado del agua del acuario no haya sido suficiente para mantenerla limpia del detritus provocado por los 12 salmones, aumentando su turbidez y causando la muerte y desaparición de la mayor parte de los individuos adultos (Bravo 2003). También es factible que los peces no hayan tenido el tamaño suficiente para actuar como hospederos adecuados (Costello 2006). Otra posibilidad radica en que algunos individuos hayan sido succionados accidentalmente a través del sifón durante los 3 recambios de agua. Sin embargo, el hallazgo de una hembra ovígera muy activa en un salmón indicó que la sobrevida de *Caligus* adultos fue posible aun bajo las condiciones desfavorables indicadas.

Debido a la baja sobrevivencia de parásitos del primer ensayo, se decidió hacer algunas modificaciones antes de iniciar el segundo: lo primero fue solicitar salmones de mayor tamaño, reduciendo a la vez su número para evitar una alta densidad poblacional. Luego se aumentó la cantidad de parásitos en un 140%, utilizándose sólo hembras con sacos. Esto tenía el objetivo de aumentar la probabilidad de hallar ejemplares vivos y/o estadios de desarrollo intermedio al

término del ensayo. La razón de no haber incluido machos en el segundo ensayo fue que en el primer ensayo estos ya habían demostrado ser capaces de nadar contra la corriente y adherirse a un hospedero. Si bien es cierto que las hembras del primer ensayo habían logrado lo mismo, estas aún debían demostrar ser capaces de madurar una vez asentadas sobre su hospedero y producir sacos con *nauplius*.

Se podría inducir que al aumentar la cantidad de parásitos disminuiría el alimento disponible para cada uno, repitiéndose las condiciones del primer ensayo. Sin embargo, a diferencia del primero ensayo, en el segundo ensayo se redujo el tiempo de espera de 14 a 5 días, evitando exponer a los parásitos a una posible falta de alimento. Si bien los 5 días no bastarían para presenciar una nueva generación de adultos, sí serían suficientes para que las hembras ovígeras pudieran madurar y formar *nauplius* en sus sacos ovígeros. Esto permitió además reducir los recambios de agua, evitando con ello la succión accidental de parásitos a través del sifón.

De entre todos los estudios publicados sobre este parásito no se encontró ninguno que indicara la velocidad aproximada a la que pueden llegar a desplazarse los individuos adultos de *C. rogerresseyi*. En este estudio los parásitos demostraron ser muy hábiles nadando en contra de un flujo de 2 cm/s, en que, con seguridad, fueron atraídos por la luz que iluminaba el compartimento B del acuario (Asencio y col. 2011) y por algún semioquímico attractante producido por los peces y liberado al agua (Pino-Marambio y col. 2007). Al respecto, llama la atención que en la descripción morfológica de los adultos no se le dé importancia al gran desarrollo del segundo y tercer par de toracópodos, las que actúan como poderosas aletas natatorias y le permiten nadar a velocidades muy superiores a la comprobada, sobre todo si no se les expone a una corriente en contra.

El objetivo de haber reemplazado la abertura circular enrejada de la mampara por 3 aberturas rectangulares fue evitar el enrejado, ya que produce múltiples turbulencias. Con las aberturas rectangulares se pretendió reducir ese problema y asegurar flujos más constantes; además, el haberlas situado en forma vertical y paralela le otorgaría a los ejemplares adultos de *Caligus* la posibilidad de elegir la altura por la cual atravesar la mampara. Sin embargo, posteriormente se tuvo conocimiento de que las aberturas rectangulares igualmente producen turbulencias, y que las formas circulares aseguran un flujo más constante en casi toda la superficie de una abertura. Es posible entonces que sea más apropiado utilizar varias aberturas circulares de igual diámetro, cuya área total esté calculada en función del flujo de agua que se quiera obtener.

Al examinar los salmones del segundo ensayo bajo la lupa estereoscópica no se encontraron estadíos intermedios de desarrollo, indicando que no hubo una infección larvaria exitosa. Sin embargo, considerando que sólo se utilizaron hembras con sacos en este ensayo, el hecho de haber hallado 13 hembras sin sacos indica que sí hubo maduración de estos durante los 5 días de ensayo. Esto tiene una fuerte implicancia en el ciclo reproductivo del parásito, ya que revela que no sólo el *copepodito* es el encargado de nadar hacia un pez para desarrollarse sobre él y continuar con el ciclo biológico, sino que también el adulto.

6.1. CONCLUSIONES

1. Los adultos de *C. rogerresseyi* corresponden a una fase infectante del parásito.
2. Los machos adultos de *C. rogerresseyi* son capaces de nadar en contra de un flujo de agua de 1 cm/s e infectar salmones del Atlántico (*S. salar*).
3. Las hembras adultas de *C. rogerresseyi* son capaces de nadar en contra de un flujo de agua de 1 y 2 cm/s e infectar salmones del Atlántico (*S. salar*).
4. No se pudo comprobar la capacidad de los adultos de *C. rogerresseyi* de movilizarse entre distintos hospederos ni de reproducirse exitosamente una vez asentados sobre un hospedero. Adicionalmente es interesante destacar que los sacos ovígeros de las hembras adultas de *C. rogerresseyi* continúan madurando una vez que estas se han adherido a un hospedero.

7. REFERENCIAS

- Asencio G, Marin S, Miranda P. 2011. La caligidosis en salmónidos de cultivo; resultados del programa de monitoreo, vigilancia y control de *Caligus rogercresseyi*. Periodo octubre 2007 - diciembre 2009. *Compendio Intesal*.
- Boxaspen K, Naess T. 2000. Development of eggs and the planktonic stages of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) at low temperatures. *Contrib Zool* 69, 51-55.
- Bravo S. 2003. Sea lice in Chilean salmon farms. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 23, 197-200.
- Bravo S, Marín S, Monti G, Silva M. 2008. Estrategias de manejo integrado para el control de *Caligus* en la industria del salmón en Chile. *Instituto de Acuicultura, Austral de Chile*, Valdivia, Chile.
- Bravo S. 2010. The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Exp Parasitol* 125, 51-54.
- Bravo S, Treasurer J, Sepúlveda M, Lagos C. 2010. Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of *Caligus rogercresseyi* in Chile and implications for sea louse management. *Aquaculture* 303, 22-27.
- Bravo S. 2011. Caligidosis 181-227. En: *Enfermedades infecciosas del cultivo de salmónidos en Chile y el mundo* (Avendaño-Herrera 2011).
- Capo R. 2015. Barrera física contra *Caligus rogercresseyi*. *Salmonexpert* 33, 42-44.
- Costello M.J. 2006. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends Parasitol* 22, 475-483.
- Cruz-Reyes A, Camargo-Camargo A. 2001. *Glosario de términos en parasitología y ciencias afines*. S.A. de C.V., DF México.
- Farías D. 2005. Aspectos biológicos y conductuales del estadio infectante de *Caligus rogercresseyi* (Boxshall y Bravo 2000) (Copepoda:Caligidae), en peces nativos y en cultivo de Chile. *Memoria de Título*, Escuela de Biología Marina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Feest P. 2015. Selección genómica de candidatos resistentes a *Caligus rogercresseyi*. *Salmonexpert* 33, 34-38.
- González L, Carvajal J. 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi* (Copepoda:Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* 220, 101-117.

- González MT, Arenas B, Asencio G, Molinet C, Carvajal J. 2011. Fecundity of sea louse *Caligus rogercresseyi* on native host *Eleginops maclovinus*, and farmed salmon in Southern Chile. *Aquacult Res* 43, 853-860.
- Jaramillo R, Garrido O, Asencio G, Barriá G, Mancilla J. 2015. Morphological characterization of the egg capsule of the sea louse *C. rogercresseyi*. *Arch Med Vet* 47, 193-199.
- Kabata Z. 2003. *Copepods parasitic on fishes. Key and notes for the identification of British species (New series)*. Ray Society, United Kingdom.
- Marin SL, Martin R, Lewis R. 2015. Effects of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000) chalimus stage condition (dead, moribund, live) on the estimates of Cypermethrin BETAMAX® efficacy. *Aquacult Res* 46, 30-36.
- Mennerat A, Hamre L, Ebert D, Nilsen F, Dávidová M, Skorping A. 2012. Life history and virulence are linked in the ectoparasitic salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*. *J Evol Biol* 25, 856-861.
- Osorio V. 2008. Conducta de apareamiento y reproducción del ectoparásito *Caligus rogercresseyi* (Boxshall y Bravo 2000) (Copepoda:Caligidae) en el hospedador *Eleginops maclovinus*. (Valenciennes 1840) (Pisces:Nototheniidae). *Memoria de Título*, Escuela de Biología Marina, Universidad de los Lagos, Osorno, Chile.
- Pino-Marambio J, Mordue AJ, Birkett M, Carvajal J, Asencio G, Mellado A, Quiroz A. 2007. Behavioural studies of host, non-host and mate location by the sea louse, *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture* 271, 70-76.
- Salmonexpert. 2015 ^a. ¿Qué es la caligidosis? Análisis de la biología y ecología de la enfermedad. Caligidosis en Chile. Parte 1: estadios del parásito. *Aprendiendo Acuicultura* 2, 7-16.
- Salmonexpert. 2015 ^b. ¿Qué es la caligidosis? Análisis de la biología y ecología de la enfermedad. Caligidosis en Chile. Parte 2: estadios planctónicos. *Aprendiendo Acuicultura* 2, 19-26.
- Samsing F. 2015. Estrategias preventivas para el control del piojo de mar en salmones. *Salmonexpert* 33, 70-74.
- Sánchez JC, Mancilla J, Barriá P, Alcaíno LJ, Sáez PJ. 2015. Potencial del robalo (*Eleginops maclovinus*) como biocontrolador del piojo de mar (*Caligus rogercresseyi*) en condiciones de cohabitación con salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Salmonexpert* 33, 46-50.

8. ANEXOS

Anexo 1: Cálculo del flujo de agua del primer ensayo (a) y segundo ensayo (b).

a) Cálculo para obtener el flujo de agua de 1 cm/s (abertura circular)

$$Q = \text{caudal} = 11,8 \text{ litros por minuto} = 11800 \text{ cm}^3/60 \text{ s} = 196,66 \text{ cm}^3/\text{s}$$

$$A = \pi \times r^2 = 3,1416 \times r^2$$

$$V = \text{velocidad} = 1 \text{ cm/s}$$

$$A = \frac{Q}{V} = \frac{196,66 \text{ cm}^3/\text{s}}{1 \text{ cm/s}} \quad \left| \quad \begin{aligned} \pi \times r^2 &= 196,66 \text{ cm}^2 \\ r &= 7,9 \text{ cm} \\ \text{Diámetro} &= 15,8 \text{ cm} \end{aligned} \right.$$

b) Cálculo para obtener el flujo de agua de 2 cm/s (aberturas rectangulares)

$$Q = \text{caudal} = 11,8 \text{ litros por minuto} = 11800 \text{ cm}^3/60 \text{ min} = 196,66 \text{ cm}^3/\text{s}$$

$$V = 2 \text{ cm/s}$$

$$A = ?$$

$$A = \frac{Q}{V} = \frac{196,66 \text{ cm}^3/\text{s}}{2 \text{ cm/s}} = A = 98,33 \text{ cm}^2$$

Los 98,33 cm² equivalen a 3 aberturas de 16,5 cm de largo por 2 cm de ancho.

Anexo 2: Adaptación de los salmones al agua de mar en el acuario.

Se utilizó la misma metodología en la preparación de ambos ensayos: de forma sistemática fue quitándose agua dulce del acuario para luego ser reemplazada por agua de mar, obteniéndose así un aumento paulatino en la salinidad. Este procedimiento se repitió 4 veces con la ayuda de un densímetro hasta alcanzar la misma salinidad del agua de mar (3,3% ó 33 gramos/litro), destinándose 5 días de adaptación de los peces luego de cada aumento de salinidad (Cuadro 3).

Cuadro 3: Salinidad del agua entre los días 0 y 24, según periodo de recambio, durante el proceso de adaptación de los peces al agua de mar.

Periodo de recambio	Días	Salinidad (%)
-	0-4	0
1	5-9	1,5
2	10-14	2
3	15-19	2,5
4	20-24	3,3

Los peces recién transportados al laboratorio se mantuvieron 5 días en agua dulce para que pudieran adaptarse al acuario; esto debido a que el agua dulce en que los peces habían vivido anteriormente, y que fue usada durante su transporte, podía poseer características ligeramente distintas al agua dulce disponible en el laboratorio. Entre los días 5-15 se fue aumentando la salinidad de forma paulatina a medida que los peces iban adaptándose al periodo anterior. Finalmente, el día 20 se consiguió alcanzar la misma salinidad del agua de mar, destinando 5 días adicionales (días 20-24) a la adaptación de los peces a este medio.

Durante este proceso, y a lo largo de todo el estudio, el agua fue constantemente oxigenada, la temperatura del agua se mantuvo entre 12-15°C, y los peces fueron alimentados diariamente a base de pellet, recibiendo cada uno el 1,5% de su peso corporal.

Anexo 3: Obtención de *C. rogercresseyi* adultos.

El 8 de Febrero se navegó 16 horas en el Wellboat “Patagón V” al centro en la Isla Francisco, ubicado a la entrada del Canal Moraleda frente a la Isla Magdalena. Una vez iniciada la cosecha, y unida a un palo telescópico, se mantuvo una “quecha” bajo el chorro de agua proveniente del vaciado de la bodega de acopio de salmones, la que es evacuada directamente al mar. La “quecha” estaba premunida con un visillo, cuya abertura de malla era de 1 mm, diseñada para capturar los *Caligus* que eran arrastrados y nadan libremente en dicha agua. La cosecha demoró 4 horas y cada cierto tiempo se revisó el visillo de la “quecha”, separándose los ejemplares adultos de *Caligus* y depositándose cuidadosamente en el “botellón 1” con 20 litros de agua de mar. Con este método se obtuvieron alrededor de 40 parásitos. Llamó la atención la gran cantidad de machos en relación a las hembras.

Concluida la cosecha se inició el viaje de regreso. Durante el transporte se realizó la segunda parte de captura de *Caligus* adultos en el tubo de desagüe del estanque de cloración. Para ello se colocó la misma “quecha” en dicho desagüe, captando varios cientos de *Caligus* adultos vivos. Antes de separar cuidadosamente los parásitos capturados y llevarlos al “botellón 2”, con 20 litros agua de mar limpia, se separaron las algas, escamas, pequeños crustáceos y todo tipo de material biológico visible. El material resultante, que contenía a los parásitos y otros elementos no considerados de importancia, se vació al segundo botellón. Este método resultó ser más eficiente que el anterior, pudiéndose obtener cerca de 200 parásitos. Esto permitiría seleccionar los individuos según sexo, desarrollo y motilidad.

En el laboratorio, en Puerto Montt, se constató que de los cientos de *Caligus* acopiados en el botellón 2 muy pocos estaban activos; la materia orgánica que no había sido extraída se encontraba en un evidente estado de putrefacción, alterando el medio en que estos permanecían. Sólo se rescataron 6 hembras y 53 machos de aquel botellón. En el botellón 1, en cambio, todos los parásitos seguían activos.

9. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo, especialmente:

- A mi familia, particularmente a mi padre Guillermo Neumann y a mi hermano Christian Neumann, por su apoyo constante y excelente voluntad. Sin ellos no habría sido posible realizar este trabajo.
- Al Dr. Gerold Sievers, mi Profesor Patrocinante y amigo. Persona de admirable sencillez y vocación por enseñar; gestor de la idea de realizar este estudio. Agradezco su gran compromiso y dedicación, además de haberme transmitido una nueva y más amplia visión de la parasitología.
- Al Dr. Ricardo Enríquez, por la orientación recibida en cuanto a la mantención de los salmones y por habernos prestado algunos de los materiales. Se le agradece además su compromiso y constante disposición para ayudar.
- A Carlos Lobos de la empresa Hendrix-Genetics S.A., quien además de donar todos los salmones que fueron utilizados, inició el contacto con Fundación Chile y mostró preocupación e interés durante todo el estudio.
- Al Sr. Guillermo Schwarzenberg, por habernos prestado un acuario completo en excelente estado y habernos ayudado con algunos cálculos.
- Al Sr. Nicolás Macaya y las demás personas de Fundación Chile, quienes siempre mostraron gran amabilidad y disposición. Su colaboración fue esencial en este estudio, ya que permitieron el retiro de los salmones desde sus instalaciones y nos donaron una cantidad importante de parásitos adultos.
- A la Sra. Viviana Videla y las demás personas de Fundación Chiquihue, por habernos facilitado enormemente el estudio al donarnos toda el agua de mar filtrada que se requirió para los ensayos.
- Al Sr. Hans Kossmann de la empresa Patagonia Wellboat, quien nos permitió navegar en una de sus embarcaciones para capturar los parásitos utilizados en el primer ensayo.
- Al Dr. Luis Vargas, por haber dejado un acuario adicional a nuestra disposición.
- Al Sr. Tomas Krause, por habernos facilitado los bidones utilizados en el transporte del agua de mar.