

SAPROLEGNIASIS EN POBLACIONES NATURALES DE PECES

SAPROLEGNIASIS IN WILD FISH POPULATIONS

M. Luisa González de Canales^{1*}

J. Bosco Ortiz¹

Manuel González del Valle¹

Carmen Sarasquete²

¹ Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología

Facultad de Ciencias del Mar

Universidad de Cádiz

Apartado oficial

11510 Puerto Real, Cádiz, España

* E-mail: marialuisa.gonzalez@uca.es

² Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía

CSIC

Apartado oficial

11510 Puerto Real, Cádiz, España

Recibido en enero de 1999; aceptado en octubre de 2000

RESUMEN

Se describe la sintomatología clínica y las alteraciones histopatológicas producidas por *Saprolegnia* sp. en *Chondrostomus polylepis* y *Rutilus albugineus* sometidos a estrés ambiental. Como principales alteraciones histopatológicas se observaron la pérdida de epitelio (ulceración en estado avanzado de la enfermedad) y desórdenes del sistema circulatorio, consistentes en congestión sanguínea con hemorragias ocasionales. Los peces infectados desarrollan lesiones focales en las que el hongo invade el *stratum spongiosum* de la dermis y se extiende lateralmente hacia la epidermis, produciendo alteraciones a este nivel. El comienzo de la enfermedad fue producido por un descenso brusco en la temperatura del agua, que probablemente induce un efecto de inmunosupresión y favorece la proliferación del hongo.

Palabras clave: *Saprolegnia*, pez, hongo, alteraciones histopatológicas.

ABSTRACT

The clinical signs and histopathological disturbances produced by *Saprolegnia* sp. are described in *Chondrostomus polylepis* and *Rutilus albugineus*, under environmental stress. The main alterations observed were loss of epithelium leading to ulceration and blood disorders, consisting of blood congestion and occasional hemorrhages. Infected fish developed focal lesions with the fungus invading the *stratum spongiosum* of the dermis before extending laterally over the epidermis. The onset of disease

was brought about by a combination of a rapid fall in water temperature, which probably induced an effect of immunosuppression, and the maintenance of low water temperature, which favored the proliferation of the fungus.

Key words: *Saprolegnia*, fish, fungus, histopathological disorders.

INTRODUCCIÓN

Los hongos acuáticos constituyen una de las micosis más frecuentes en peces de agua dulce, estando también asociada su presencia a los sistemas estuarinos. Tres órdenes (Saprolegniales, Leptomitales y Feronosporales) de la clase Oomycetes incluyen especies que pueden infectar a los peces, siendo los más patógenos los pertenecientes a la familia Saprolegniaceae (Noga, 1996). Las especies del género *Saprolegnia* poseen un micelio aseptado, muy ramificado, de aspecto algodonoso bajo el agua. Sus estructuras reproductivas están separadas de las hifas somáticas por septos y la reproducción asexual se realiza por medio de zoosporas biflageladas producidas por hifas vegetativas, siendo éstas móviles, lo cual facilita su dispersión (Roberts, 1981).

Los hongos son oportunistas típicos que se alimentan, normalmente, de la materia orgánica en descomposición. Son saprofitos ubicuos y aparecen como patógenos de peces cuando hay un cambio brusco en las condiciones ambientales del medio (Bly *et al.*, 1993). Las infecciones comienzan, a menudo, cuando se produce una inmunosupresión debido a una variación brusca de temperatura, posiblemente en combinación con niveles de amonio críticamente elevados o debido a factores relacionados con el estrés ambiental, como cambios bruscos en las condiciones fisicoquímicas del agua, etc. (Bruno y Stamps, 1987).

Típicamente, la infección fúngica se presenta como un crecimiento superficial algodonoso del micelio en la piel o branquias de los peces. Estas lesiones comienzan, generalmente,

INTRODUCTION

Aquatic fungi constitute one of the most frequent mycosis in fresh-water fish, and their presence is associated with estuarine systems. Three orders (Saprolegniales, Leptomitales and Feronosporales) of the class Oomycetes include species that may infect fish, the most pathogenic being those pertaining to the family Saprolegniaceae (Noga, 1996). The species of the genus *Saprolegnia* have a non-septate and highly ramified mycelium and their underwater appearance is cottony. The reproductive structures are separated from the somatic hyphae by septa, and asexual reproduction occurs by means of biflagellate zoospores produced by vegetative hyphae, which facilitate their dispersion as they are mobile (Roberts, 1981).

Fungi are typical opportunists that normally feed on decomposing organic matter. They are ubiquitous saprophytes and appear as fish pathogens when sudden changes in environmental conditions occur (Bly *et al.*, 1993). Infections often start when an immunosuppression is produced by a sudden variation in temperature, possibly in combination with highly critical ammonium levels, or due to factors related to environmental stress, such as drastic changes in the physicochemical conditions of the water, etc. (Bruno and Stamps, 1987).

Typically, the fungal infection appears as a cottony superficial growth of the mycelium on the skin or gills of the fish. These lesions generally begin as small focal infections that quickly spread throughout the whole body surface (Roberts, 1981).

como infecciones focales pequeñas que se extienden rápidamente por toda la superficie del cuerpo (Roberts, 1981).

El objetivo de este trabajo es la descripción, tanto macroscópica como microscópica, de un brote de saprolegniasis de tipo crónico que afectó a dos especies de peces, bogas (*Chondostromos polylepis*) y rutilus (*Rutilus albugineus*), en un río de la zona sur de la Península Ibérica, describiéndose las alteraciones histopatológicas observadas en todos los órganos/tejidos de los peces afectados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras analizadas correspondientes a siete ejemplares de bogas (*C. polylepis*) y tres ejemplares de rutilus (*R. albugineus*) procedían de la Ribera del Chanza (Rosal de la Frontera, Huelva, España). Los peces fueron transportados al laboratorio, examinados macroscópicamente y fijados en formol al 10%, tamponado con fosfatos 0.1 M (pH 7.2). Se efectuó un examen externo mediante una lupa de disección, realizándose posteriormente frotis por raspados de la superficie de la piel y branquias para la observación del área afectada. Se extrajeron muestras de distintas zonas corporales (branquias, piel, músculo, hígado, riñón, corazón, bazo, tracto digestivo) y se procesaron para la inclusión en parafina. Se realizaron cortes de un grosor de 6 μm mediante un micrótopo de rotación y se montaron en portaobjetos gelatinizados. Se desparafinaron las secciones y se rehidrataron en agua para la realización de técnicas histológicas convencionales como hematoxilina/eosina, ácido periódico/Schiff (PAS) y hematoxilina/VOF de Gutiérrez (1967). Los frotis de los ejemplares fijados también fueron teñidos con la técnica del Gram.

Las características fisicoquímicas del agua de la zona de procedencia de los peces afectados fueron: pH, 9.1; conductividad,

The objective of this work is to describe, macroscopically as well as microscopically, a chronic-type outbreak of saprolegniasis that affected two fish species, breams (*Chondostromos polylepis*) and rutilus (*Rutilus albugineus*), from a river in the southern part of the Iberian Peninsula. The histopathological disorders observed in all the organs/tissues of the fishes affected are described.

MATERIAL AND METHODS

Seven specimens of breams (*C. polylepis*) and three specimens of rutilus (*R. albugineus*), from Ribera del Chanza (Rosal de la Frontera, Huelva, Spain) were analyzed. They were transported to the laboratory, examined macroscopically and fixed in 10% formaldehyde, buffered with phosphates 0.1 M (pH 7.2). An external examination was done with a dissection lens, and smears were then made by rubbing the surface of the skin and gills in order to observe the affected area. Samples were taken from different parts of the body (gills, skin, muscle, liver, kidney, heart, spleen, digestive tract) and treated for inclusion in paraffin. A rotation microtome was used to obtain 6- μm -thick cuts, which were mounted on slides with gelatin. The paraffin was removed from the sections and they were rehydrated in water in order to carry out conventional histological techniques, such as hematoxylin/eosin, periodic acid/Schiff (PAS) and hematoxylin/VOF (Gutiérrez, 1967). The smears of the fixed specimens were also stained using the Gram technique.

The physicochemical characteristics of the water from where the fish were collected are: pH, 9.1; conductivity, 0.32 mS/cm; salinity, 10.11‰; temperature, 17.4°C; and dissolved oxygen, 12.22 mg O₂/L.

0.32 mS/cm; salinidad, 10.11‰; temperatura, 17.40°C; y oxígeno disuelto, 12.22 mg O₂/L.

RESULTADOS

En el examen macroscópico de la superficie externa de los ejemplares de boga (*C. polylepis*) y rutilus (*R. albugineus*), se apreciaron lesiones en la piel, en forma de manchas blanco-grisáceas de tipo focal, preferentemente en la región dorsal y cerca de la aleta caudal, las cuales adoptan bajo el agua un aspecto algodonoso. En los frotis de piel y branquias se observó la presencia de hifas de hongos del género *Saprolegnia*, que presentan micelios aseptados con numerosos esporangios visibles (fig. 1A–E). La forma de propagación es mediante esporas móviles, que una vez que han colonizado un substrato apropiado, germinan (fig. 1F); las esporas son producidas por hifas vegetativas (fig. 1E), pudiendo también presentar ciclos reproductivos alternativos (e.g., gémula).

En los peces infectados no se detectaron lesiones hemorrágicas o petequias en la superficie externa o en los órganos internos, excepto en las branquias, donde se observaron zonas blanquecinas de carácter isquémico. No se apreciaron adherencias de la vejiga natatoria con ninguna de las vísceras u órganos adyacentes.

En el examen microscópico, los ejemplares muestreados presentaban, en distintas zonas, alteraciones histopatológicas relacionadas con la infección causada por *Saprolegnia* sp.

La invasión de hifas y esporas del hongo vía torrente sanguíneo produce un fallo circulatorio periférico en los distintos órganos, debido a la imposibilidad de mantener el volumen de sangre circulante. Así, en las branquias se observa hiperemia de los capilares con extravasación sanguínea y zonas hemorrágicas asociadas a la formación de posibles trombos (fig. 2A, B). En el espacio interlamelar se

RESULTS

In the macroscopic examination of the external surface of the bream (*C. polylepis*) and rutilus (*R. albugineus*) specimens, lesions were observed on the skin in the form of focal-type white-grayish spots, mainly in the dorsal region and near the caudal fin, which displayed, under the water, a cottony appearance. In the skin and gill smears, hyphae of fungi of the genus *Saprolegnia* were present, showing non-septate mycelia with numerous visible sporangia (fig. 1A–E). Propagation occurs by means of mobile spores, which germinate once they have colonized an appropriate substrate (fig. 1F); spores are produced by vegetative hyphae (fig. 1E), although they can present alternative reproductive cycles (e.g., gemmule).

In the infected fish, no hemorrhagic lesions or eruptions were detected on the outer surface or in the internal organs, except in the gills, where ischemic-type whitish parts were observed. No attachments of the air bladder to any viscera or adjacent organs were observed.

In the microscope examination, histopathological disorders related to the infection caused by *Saprolegnia* sp. were noticed in different parts of the specimens sampled.

The invasion of hyphae and spores of the fungus through the bloodstream causes peripheral circulatory failure in the different organs, because it is impossible to maintain the volume of circulating blood. Hence, capillary hyperemia is observed in the gills, with blood extravasation and hemorrhagic areas associated with the formation of possible thrombus (fig. 2A, B). In the interlamelar space, fungal hyphae are observed and, associated with them, bacterial colonies formed by cocci (Gram +), bacilli and diplobacilli (Gram –) (fig. 2B). In the distal area of the branchial lamina, epithelial scaling is noticed, caused by the

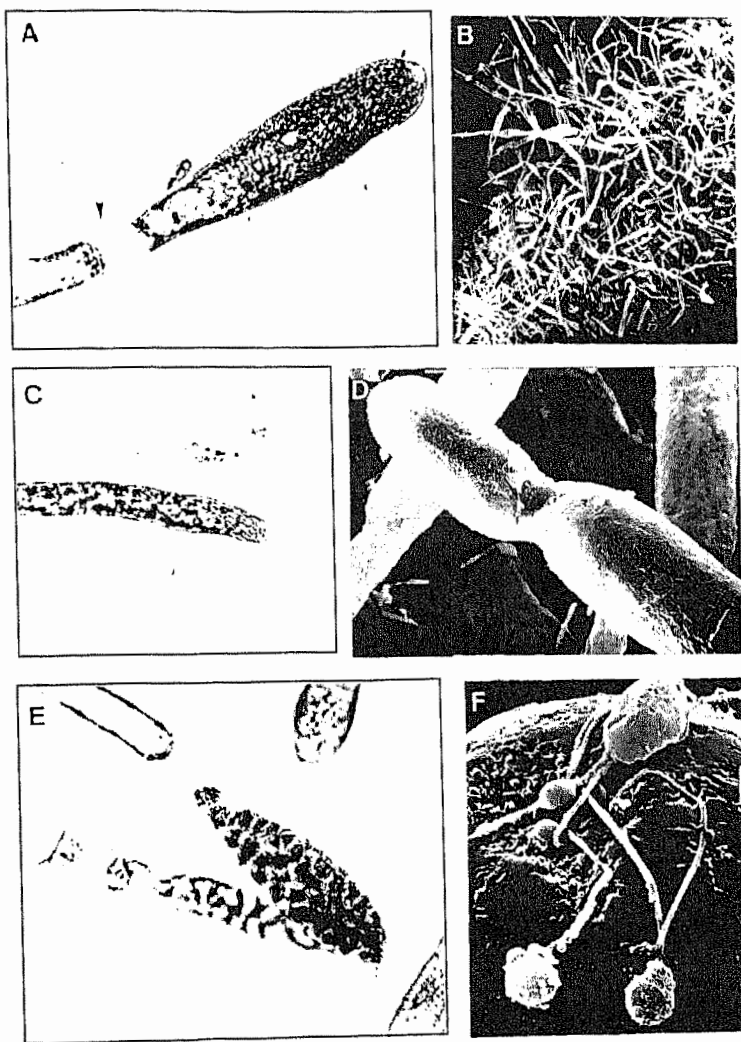


Figura 1. (A) Estructura reproductiva (esporangio inmaduro) de hongo del género *Saprolegnia*, separada de la hifa por medio de un septo (▼), PAS × 40. (B) Zona de superficie externa del pez dañada por el hongo al MEB; se observa la disposición y el aspecto algodonoso del micelio × 250. (C) Porción final de una hifa somática, que en el caso de esta especie es no septada, PAS × 20. (D) Superficie de un esporangio (estructura reproductiva) al MEB × 400. (E) Esporangio maduro, con gran cantidad de zoosporas en su interior, H/VOF × 40. (F) Zoospora germinando en la superficie de una lámina branquial × 7500.

Figure 1. (A) Reproductive structure (immature sporangium) of fungus of the genus *Saprolegnia*, separated from the hypha by means of a septum (▼), PAS × 40. (B) External surface area of the fish damaged by the fungus observed with SEM; the disposition and cottony appearance of the mycelium is observed × 250. (C) Final portion of the somatic hypha, which in this species is non-septate, PAS × 20. (D) Surface of a sporangium (reproductive structure) with SEM × 400. (E) Mature sporangium, containing a large amount of zoospores, H/VOF × 40. (F) Zoospore germinating on the surface of a branchial lamina × 7500.

observan hifas fúngicas y, asociadas a ellas, colonias bacterianas formadas por cocos (Gram +), bacilos y diplobacilos (Gram -) (fig. 2B). En la zona distal de la lámina branquial se observa descamación epitelial, provocada por la inserción, en la misma, de hifas y esporas del hongo (fig. 2C). El epitelio branquial muestra en su superficie gran secreción mucosa con presencia de detritus y restos celulares (fig. 2D). Sin embargo, a nivel branquial, no se observan signos de respuesta proliferativa-inflamatoria que conduzca a la formación de proliferaciones epiteliales o fusión de laminillas branquiales.

En la piel, el hongo invade la dermis y se extiende lateralmente sobre la epidermis, erosionándola a medida que progresa la lesión; de esta forma se rompe la barrera defensiva proporcionada por la cutícula frente a agentes infecciosos, observándose, de hecho, una infección bacteriana secundaria (cocos y diplobacilos) en la zona erosionada (fig. 3B, D, E). También se observan hifas en la musculatura troncal, entre los planos fasciales intermiotomales.

Se observan también alteraciones en el hígado, consistentes en una hiperemia de los capilares con estancamiento sanguíneo y, a veces, discreta picnosis del núcleo de algún hepatocito (fig. 3A, C).

No se observan reacciones inflamatorias de tipo granulomatoso en ninguno de los órganos internos estudiados (hígado, corazón, riñón, bazo, tracto digestivo) que nos hagan pensar en la posible invasión de hifas o esporas en los mismos, ni roces o traumatismos superficiales que nos sugieran una vía de infección y/o penetración secundaria.

DISCUSIÓN

En peces teleosteos, las infecciones fúngicas conocidas como saprolegniasis frecuentemente son consideradas como secundarias a

insertion of the hyphae and spores of the fungus (fig. 2C). The branchial epithelium presents considerable mucous secretion on the surface, with the presence of detritus and cellular remains (fig. 2D). However, at the gill level, there are no signs of a proliferating-inflammatory response that may lead to the development of epithelial proliferations or to the fusion of branchial lamellae.

In the skin, the fungus invades the dermis and extends laterally over the epidermis, eroding it as the lesion progresses so that the defensive barrier provided by the cuticle against infectious agents is fractured, showing, in fact, a secondary bacterial infection (cocci and diplobacilli) in the eroded zone (fig. 3B, D, E). Hyphae are also observed in the musculature of the trunk, between the intermyotomic fascial planes.

Disorders are also observed in the liver, consisting of capillary hyperemia with the stemming of blood and, at times, discrete pyknosis of the nucleus of some hepatocyte (fig. 3A, C).

There were no inflammatory reactions of a granulomatous-type in any of the internal organs studied (liver, heart, kidney, spleen, digestive tract) that would indicate a possible invasion of hyphae or spores, or surface traumatismos or marks that would suggest an infection and/or secondary penetration path.

DISCUSSION

In teleost fish, fungal infections known as saprolegniasis are frequently considered to derive from bacterial or viral diseases (Wolke, 1975; Richard, 1977), or to be the result of traumatismos and subsequent formation of wounds and ulcers (Roberts and Shepherd, 1974). The occurrence of primary saprolegniasis has been recorded in cultured eels (Hoshina and Ookubo, 1956; Hoshina *et al.*, 1960) and in wild eels (Copland and Willoughby, 1982).

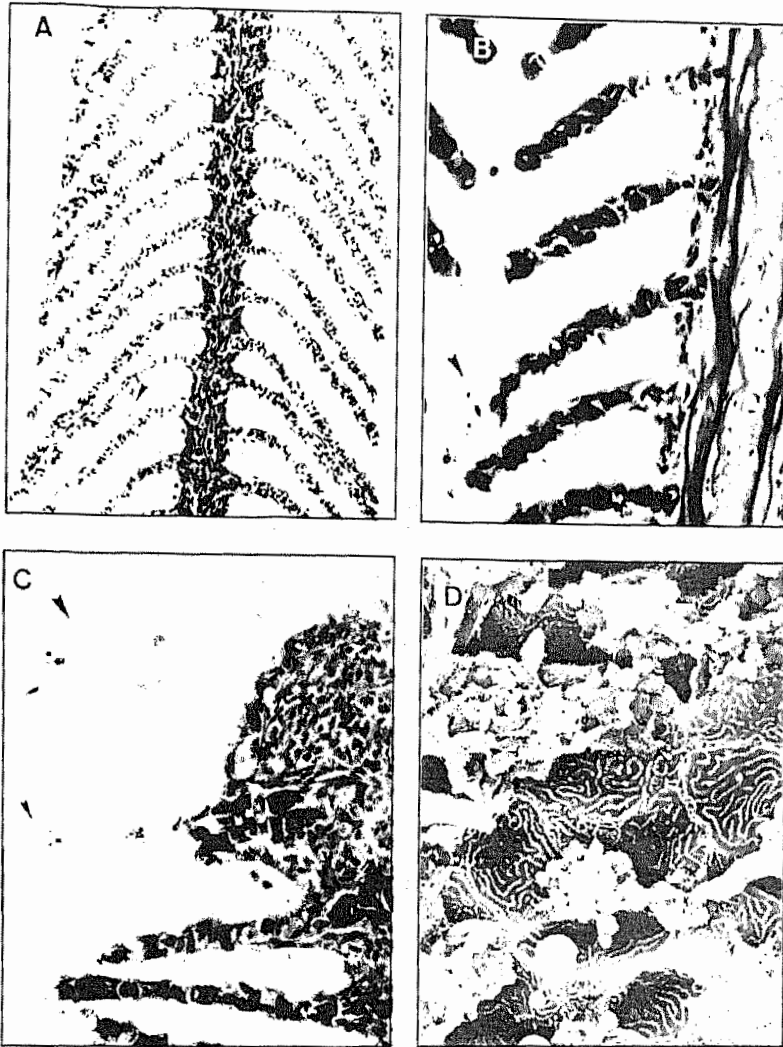


Figura 2. (A) Branquia de *Chondostromos polylepis* mostrando extravasación sanguínea y capilares hiperémicos (▼), H/VOF $\times 20$. (B) Espacio interlamelar de *C. polylepis* donde se aprecia extravasación sanguínea y zoosporas (▼) del hongo, H/E $\times 40$. (C) Zona distal de lámina branquial, apreciándose descamación epitelial y restos de hifas (▼) y zoosporas (▼) asociadas con la lesión, H/VOF $\times 40$. (D) Superficie de epitelio branquial donde se observa hipersecreción mucosa y detritus formado por restos de hongo y material particulado $\times 2700$.

Figure 2. (A) Gill of *Chondostromos polylepis* showing blood extravasation and hyperemic capillars (▼) H/VOF $\times 20$. (B) Interlamellar space of *C. polylepis* where blood extravasation and fungus zoospores (▼) are observed, H/E $\times 40$. (C) Distal zone of the branchial lamina, where epithelial scaling and remains of hyphae (▼) and zoospores (▼) are observed, associated with the lesion, H/VOF $\times 40$. (D) Surface of the branchial epithelium where mucous hypersecretion and detritus formed by fungus remains and particulate material are observed $\times 2700$.

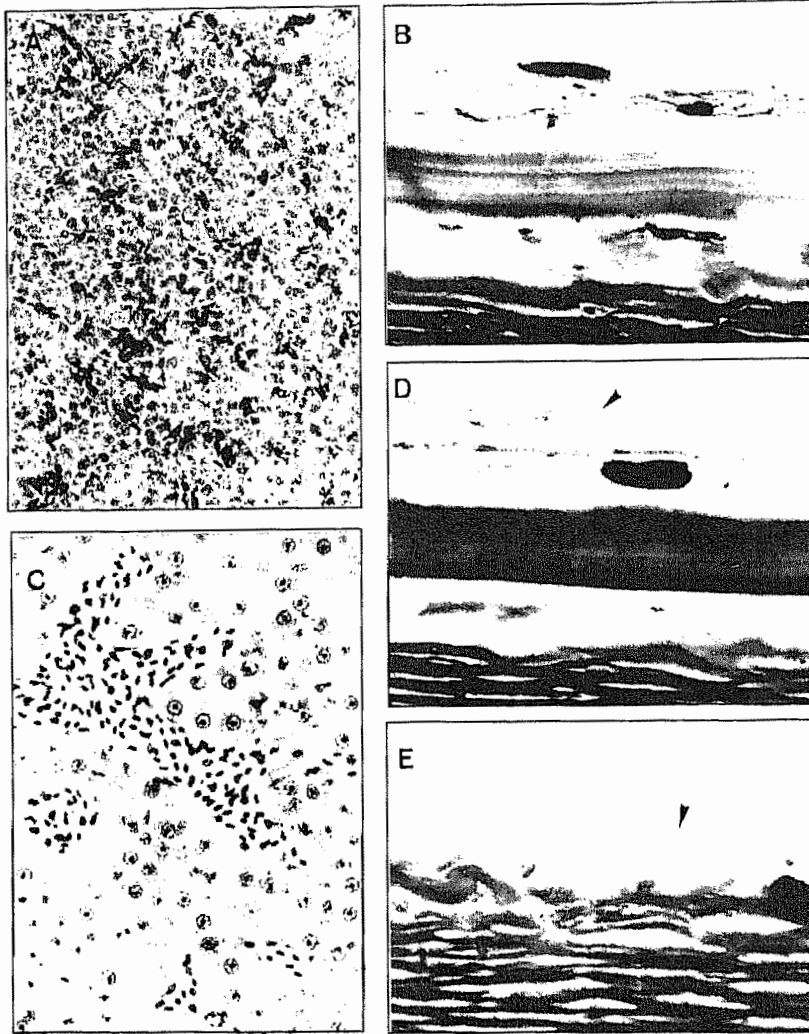


Figura 3. (A) Hígado de *Rutilus albugineus* mostrando éstasis sanguínea; no se aprecia alteración en los hepatocitos ni en la disposición parenquimatosa de los mismos, H/VOF $\times 20$. (B) Piel de *Chondostromos polylepis* mostrando las capas epidérmica y dérmica, H/VOF $\times 40$. (C) Hiperemia de capilares en hígado de *C. polylepis*, no observándose alteración en los hepatocitos, H/E $\times 40$. (D) Ligera descamación epitelial (\blacktriangledown) en la zona afectada por infección micótica, H/VOF $\times 40$. (E) Pérdida de epidermis con presencia de zoosporas (\blacktriangledown) en la zona erosionada por la acción de *Saprolegnia* sp., H/VOF $\times 40$.

Figure 3. (A) Liver of *Rutilus albugineus* showing blood stasis; no alteration is observed in the hepatocytes or in their parenchymatous arrangement, H/VOF $\times 20$. (B) Skin of *Chondostromos polylepis* showing the epidermal and dermal layers, H/VOF $\times 40$. (C) Capillary hyperemia in the liver of *C. polylepis*, in which no hepatocyte alteration is observed, H/E $\times 40$. (D) Slight epithelial scaling (\blacktriangledown) in the area affected by the mycotic infection, H/VOF $\times 40$. (E) Loss of epidermis and presence of zoospores (\blacktriangledown) in the area eroded by *Saprolegnia* sp., H/VOF $\times 40$.

enfermedades bacterianas o virales (Wolke, 1975; Richard, 1977) o como consecuencia de traumatismos y posterior formación de heridas y úlceras (Roberts y Shepherd, 1974). Saprolegniasis primarias han sido citadas en anguilas cultivadas (Hoshina y Ookubo, 1956; Hoshina *et al.*, 1960) y silvestres (Copland y Willoughby, 1982). Diferentes autores (Tiffney, 1939; Neish, 1977; Richard y Pickering, 1978; Durán *et al.*, 1987) sugieren que en ciertas situaciones estresantes se produce una inmunosupresión debido a cambios bruscos de pH, temperatura, etc., pudiendo los hongos del género *Saprolegnia* actuar como patógenos primarios.

La saprolegniasis tegumentaria descrita en este trabajo podría ser de tipo primario, ya que no se observan heridas cutáneas que sugieran que la infección sea provocada por traumatismos y, por tanto, se trate de una infección de tipo secundario, aunque se han observado poblaciones bacterianas (cocos, bacilos y diplobacilos) de tipo secundario. Estas bacterias podrían corresponder a bacilos oportunistas, que algunos autores han señalado como pertenecientes al género *Pseudomonas* (Ellis y Waddell, 1983).

La saprolegniasis puede ser causada por una amplia variedad de hongos acuáticos (Scott y O'Bier, 1962) y en ocasiones varias especies fúngicas pueden aparecer simultáneamente en el mismo hospedador (Willoughby, 1970; Pickering y Willoughby, 1977), no pudiendo identificarse en muchos casos el agente etiopatogénico primario.

Las hifas encontradas sobre la superficie corporal y las branquias de los ejemplares infectados son huecas, en forma de tubos no septados, de aproximadamente 20 μm de ancho, con una gruesa pared externa. Los asentamientos de las hifas en la dermis y su posterior crecimiento invasivo, lateralmente sobre la epidermis, provoca la pérdida de células epidérmicas, conduciendo a una

Different authors (Tiffney, 1939; Neish, 1977; Richard and Pickering, 1978; Durán *et al.*, 1987) suggest that, under certain stress conditions, an immunosuppression is produced by sudden variations in pH, temperature, etc., allowing fungi of the genus *Saprolegnia* to act as primary pathogens.

The tegumentary saprolegniasis described in this work might be of primary-type, as no cutaneous wounds were observed which may suggest that the infection was caused by traumatismos and, thus, a secondary-type infection, although secondary-type bacterial populations (cocci, bacilli and diplobacilli) have been observed. These bacteria may correspond to opportunistic bacilli, which have been reported to belong to the genus *Pseudomonas* by some authors (Ellis and Waddell, 1983).

The saprolegniasis may be caused by a wide variety of aquatic fungi (Scott and O'Bier, 1962) and, occasionally, several fungal species may appear simultaneously in the same host (Willoughby, 1970; Pickering and Willoughby, 1977), making it impossible to identify, in many cases, the primary etiopathogenic agent.

The hyphae found on the body surface and gills of the infected specimens are hollow and have the shape of non-septate tubes, around 20 μm wide, with a thick external wall. The settlements of the hyphae on the dermis and their subsequent invasive growth, laterally over the epidermis, generates a loss of epidermal cells, leading to extensive ulceration in the settlement area of the infection. Similar observations were recorded by Copland and Willoughby (1982) for specimens of eel (*Anguilla anguilla*) infected by *Saprolegnia*.

Hoshina *et al.* (1960) pointed out that *Anguilla japonica* is less susceptible to infections by *Saprolegnia* at temperatures around 20°C; therefore, a possible cause of the disease might be a sudden fall in water temperature,

ulceración extensiva en el lugar de asentamiento de la infección. Observaciones similares fueron descritos por Copland y Willoughby (1982) en ejemplares de anguila (*Anguilla anguilla*) infectadas por *Saprolegnia*.

Hoshina *et al.* (1960) señalaron que *Anguilla japonica* se mostraba menos susceptible a infecciones por *Saprolegnia* a temperaturas alrededor de los 20°C, de modo que una posible causa de la enfermedad podría ser una bajada brusca de la temperatura del agua, lo que produciría un fenómeno de inmunosupresión, haciendo más vulnerables a los ejemplares, como señalaron Quiniou *et al.* (1998) en ejemplares de *Ictalurus punctatus*.

La aparición temprana de brotes de *Saprolegnia* se ha asociado, a menudo, con la introducción de especies en cultivos intensivos, lo que se puede relacionar con fenómenos de estrés y con el hecho de que este hongo es uno de los principales patógenos potenciales que pueden encontrarse en la migración de peces en aguas a distintas salinidades, siendo documentada por algunos autores la tolerancia del hongo a bajas salinidades (TeStrake, 1959; Liu y Volz, 1976). Los peces objeto de nuestro estudio se recolectaron en una zona estuárica, lo que hace pensar que las variaciones de salinidad junto con alteraciones de condiciones fisicoquímicas del agua (pH y temperatura, fundamentalmente), podrían ser una de las causas principales de la saprolegniasis descrita.

Richard y Pickering (1979) señalaron que el daño superficial de la piel o branquias, en peces infectados por *Saprolegnia*, podía tener drásticas consecuencias, ya que la pérdida de proteínas y electrolitos del suero era proporcional al porcentaje de piel afectada, incrementándose paralelamente la mortalidad y/o morbilidad de los peces. Durán *et al.* (1987), en un estudio de ejemplares de trucha arcoiris infectados por *Saprolegnia*, observaron una

which would produce a phenomenon of immunosuppression, making the specimens more vulnerable, as reported by Quiniou *et al.* (1998) for specimens of *Ictalurus punctatus*.

The early appearance of *Saprolegnia* outbreaks has frequently been associated with the introduction of species to intensive cultures, which can be related to stress phenomena and to the fact that this fungus is one of the main potential pathogens that can be found in the migration of fishes in waters with different salinities. The tolerance of the fungus to low salinity has been documented (Te Strake, 1959; Liu and Volz, 1976). The fishes studied herein were collected in an estuarine zone; thus, the variations in salinity, together with the modifications of the physicochemical characteristics of the water (pH and temperature, basically), may be one of the main causes of the saprolegniasis described.

Richard and Pickering (1979) pointed out that the superficial damage of the skin and gills, in fish infected by *Saprolegnia*, could have drastic consequences, since the loss of serum proteins and electrolytes was proportional to the percentage of skin affected, the mortality and/or morbidity of the fish increasing similarly. Durán *et al.* (1987), in a study of rainbow trout infected by *Saprolegnia*, noticed a decrease in the concentration of serum proteins, due to a loss of proteins from the extra-vascular fluid in the areas affected by the fungal infection (Hargens *et al.*, 1974). This would explain the relatively rapid death of the specimens infected with this disease. Neish and Hughes (1980) suggested an osmoregulatory failure as the possible cause of death of the mugiloid populations affected by *Saprolegnia*.

Recently, Quiniou *et al.* (1998) described winter saprolegniasis as a disease characterized by the presence of lesions on the skin covered by fungal hyphae, due to a decrease in the number of mucous cells, caused by the sudden

reducción en la concentración de proteínas séricas, debido a una pérdida de proteínas del fluido extravascular en las zonas afectadas por la infección fúngica (Hargens *et al.*, 1974), lo que explicaría la relativa rapidez con que se produce la muerte de los ejemplares afectados por dicha enfermedad. Neish y Hughes (1980) sugirieron que la posible causa de la muerte de poblaciones de mugilidos afectados por *Saprolegnia* se debía a un fallo osmoregulatorio.

Recientemente, Quiniou *et al.* (1998) describió la saprolegniasis de invierno como una afección caracterizada por la presencia de lesiones en la piel cubiertas por hifas de hongos, debido a una reducción del número de células mucosas, provocada por la bajada brusca de temperatura del agua. Las células mucosas no sólo actúan como barrera física sino que también contienen muchas sustancias como inmunoglobulinas, lisozimas y enzimas proteolíticas que previenen las infecciones microbiana, de modo que una disminución de esta barrera defensiva podría facilitar el asentamiento y crecimiento posterior de los hongos. En los ejemplares que hemos estudiado aparece también una infección bacteriana secundaria (cocos distinguibles fácilmente de las zoosporas, bacilos y diplobacilos), provocada, posiblemente, por la ruptura de la barrera defensiva proporcionada por la cutícula frente a los bioagresores, agravando el estado de salud de los peces y contribuyendo a la muerte de los ejemplares más debilitados.

El crecimiento del micelio en el medio externo, comparado con el existente en la zona de la lesión, sugiere que el ambiente externo proporciona un medio más óptimo de crecimiento para el hongo, que el que se presenta en los tejidos dañados. Una posible explicación a este hecho pueden ser los altos niveles de oxígeno y de nutrientes presentes en el agua, en relación con los existentes en las zonas necróticas. Liu y Volz (1976) consideran que los bajos

fall in water temperature. The mucous cells do not just act as a physical barrier; they also contain a lot of substances, such as immunoglobulins, lysozymes and proteolytic enzymes, that prevent microbial infections. Therefore, a diminution of this defensive barrier might facilitate the settlement and subsequent growth of fungi. In the specimens studied, a secondary bacterial infection (cocci easily distinguishable from zoospores, bacilli and diplobacilli) also appears, possibly because of the fracture of the defensive barrier provided by the cuticle against bioaggressors, leading to a deterioration in the health of the fish and to the death of the weakest specimens.

The growth of the mycelium on the outside, compared to that existing in the injured area, suggests that the external environment provides a better medium for the fungus to grow than that in the damaged tissues. A possible explanation for this may be the high oxygen and nutrient levels present in the water, relative to those found in necrotic zones. Liu and Volz (1976) consider that low oxygen levels may be one of the most limiting factors for the growth of *Saprolegnia*; this has been observed in intensive cultures in summer where the levels of dissolved oxygen are low.

Oomycetes typically produce superficial infections that mainly affect the skin, although they occasionally invade the musculature (Pickering and Willoughby, 1982). In the specimens analyzed, no granulomatous alterations are observed related to other fungal infections, such as *Icthiophonus*. The lesions seem to originate in the muscle or the subcutaneous tissue and extend to the organs adjacent to the perforation spot. However, Noga and Dykstra (1987) described a fungal infection related to Oomycetes of the genus *Aphanomyces* with the presence of granulomatous cores composed of macrophagous and epithelial cells, occasionally surrounded by a thin layer of fibroblasts.

niveles de oxígeno pueden ser uno de los factores más limitantes para el crecimiento de *Saprolegnia*, siendo esto observado en cultivos intensivos en verano, donde los niveles de oxígeno disuelto son bajos.

Los oomicetos típicamente producen infecciones superficiales que afectan principalmente a la piel, aunque ocasionalmente invaden la musculatura (Pickering y Willoughby, 1982). En los ejemplares analizados no se observan alteraciones granulomatosas relacionadas con otras infecciones fúngicas como *Ichthyophonus*. Las lesiones parecen originarse en el músculo o tejido subcutáneo, extendiéndose a los órganos adyacentes al lugar de la perforación. Sin embargo, Noga y Dykstra (1987) describieron una infección fúngica relacionada con oomicetos del género *Aphanomyces*, con la presencia de focos granulomatosos constituidos por macrófagos y células epiteloides, rodeados ocasionalmente por una delgada capa de fibroblastos.

En conclusión, podríamos sugerir que se trata de una infección fúngica de tipo primario, generalizada a toda la población piscícola del hábitat de estudio. Esto nos hace pensar que se ha producido un cambio de condiciones ambientales (baja salinidad y temperatura) que, por una parte, pueden debilitar el estado de salud de los organismos, debido a fenómenos de inmunosupresión y, por otro, puede favorecer la proliferación de estos microorganismos oportunistas. *Saprolegnia* sp. prolifera rápidamente a bajas temperaturas, produciendo altas cantidades de zoosporas móviles (Bly *et al.*, 1993), las cuales pueden anclarse en la capa mucosa/piel del pez donde se enquistan y, bajo condiciones favorables, germinan y penetran en la piel y músculo. Posteriormente, infecciones secundarias de tipo bacteriano, así como pérdida de electrolitos, iones y proteínas en episodios de tipo crónico, podrían producir la muerte de los peces.

In conclusion, it seems we are dealing with a primary-type fungal infection that has spread to all the fish population of the habitat studied. We believe that a change in the environmental conditions (low salinity and temperature) has occurred, which, on the one hand, may weaken the health condition of the organisms, because of immunosuppression phenomena, and on the other, may favor the proliferation of opportunistic microorganisms. *Saprolegnia* sp. proliferates rapidly at low temperatures, producing great quantities of mobile zoospores (Bly *et al.*, 1993), which attach themselves to the mucous-membrane/skin of the fish, where they encyst and, under favorable conditions, germinate and penetrate the skin and muscle. Subsequently, secondary bacterial-type infections, as well as the loss of electrolytes, ions and proteins in chronic-type episodes, may produce the death of the fish.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely thank Isabel Viaña and Agustín Santos for their technical support in the development of this work.

English translation by Manuel Gardea.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su más sincero agradecimiento a Isabel Viaña y Agustín Santos por su ayuda técnica en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Bly, J.E., Lawson, L.A., Szalai, A.J. and Clem, L.W. (1993). Environmental factors affecting outbreaks of winter saprolegniosis in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Fish Dis., 5: 15-19.

- Bruno, D.W. and Stamps, D.J. (1987). Saprolegniasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fry. *J. Fish Dis.*, 10: 513-517.
- Copland, J.W. and Willoughby, L.G. (1982). The pathology of *Saprolegnia* infections, of *Anguilla anguilla* L. elvers. *J. Fish Dis.*, 5: 421-428.
- Durán, A., Rodríguez-Aparicio, L.B., Reglero, A. and Pérez-Díaz, J. (1987). Changes in serum enzymes of *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Dis.*, 10: 505-507.
- Ellis, A.E. and Waddell, I.F. (1983). A systemic fungal disease in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., caused by a species of *Phialophora*. *J. Fish Dis.*, 6: 511-523.
- Gutiérrez, M. (1967). Coloración histológica para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. *Invest. Pesqueras*, 31(2): 265-271.
- Hargens, A.R., Millard, R.W. and Johansen, K. (1974). High capillary permeability in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 48(A): 675-680.
- Hoshina, T. and Ookubo, M. (1956). On a fungal disease of eels. *J. Tokyo Univ. of Fisheries*, 42: 2-13.
- Hoshina, T., Sano, T. and Sunayama, H. (1960). Studies on the saprolegniasis of eel. *J. Tokyo Univ. of Fisheries*, 47: 59-79.
- Liu, C. and Volz, P.A. (1976). On the ecology of Saprolegniaceae. *Phytologica*, 34: 209-230.
- Neish, G.A. (1977). Observations on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). *J. Fish Biol.*, 10: 513-522.
- Neish, G.A. and Hughes, G.C. (1980). *Fungal Diseases of Fish*. Book 6. T.F.H. Publications, Neptune, New Jersey, pp. 9-49.
- Noga, E.J. (1996). *Fish Diseases, Diagnosis and Treatment*. Mosby-Year Book, 565 pp.
- Noga, E.J. and Dykstra, M.J. (1987). Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *J. Fish Dis.*, 1: 47-53.
- Pickering, A.D. and Willoughby, L.G. (1977). Epidermal lesions and fungal infection on the perch, *Perca fluviatilis* L., in Windermere. *J. Fish Biol.*, 11: 349-354.
- Pickering, A.D. and Willoughby, L.G. (1982). *Saprolegnia* infections in salmonid fish. In: Roberts (ed.), *Microbial Diseases of Fish*. Academic Press, New York, pp. 271-297.
- Quiniou, S.M.A., Bigler, S., Clem, L.W. and Bly, E.J. (1998). Effects of water temperature on mucous cell distribution in channel catfish epidermis: A factor in winter saprolegniasis. *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 1-11.
- Richard, R.H. (1977). Mycology of fishes. In: R.J. Roberts (ed.), *Fish Pathology*. Baillière Tindall, London, pp. 456-498.
- Richard, R.H. and Pickering, A.D. (1978). Frequency and distribution patterns of *Saprolegnia* infection in wild and hatchery-reared brown trout *Salmo trutta* L. and char *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Dis.*, 1: 69-82.
- Richard, R.H. and Pickering, A.D. (1979). Changes in serum parameters of *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Dis.*, 2: 197-206.
- Roberts, R.J. (1981). *Patología de los Peces*. Baillière Tindall, London, 366 pp.
- Roberts, R.J. and Sheperd, C.J. (1974). *Handbook of Trout and Salmon Diseases*. London. Fishing News, pp. 315-324.
- Rucker, R.R. and Gustafson, P.V. (1953). An epizootic among rainbow trout. *Progressive Fish Culturist*, 15: 179-181.
- Scott, W.W. and O'Bier, A.H. (1962). Aquatic fungi associated with diseased fish and fish eggs. *Progressive Fish Culturist*, 24: 3-15.
- TeStrake, D. (1959). Estuarine distribution and saline tolerance of some Saprolegniaceae. *Int. J. Exp. Bot.*, 12: 143-152.
- Tiffney, W.N. (1939). The host range of *Saprolegnia parasitica*. *Mycologia*, 31: 310-321.
- Willoughby, L.G. (1970). Mycological aspects of a disease of young perch in Windermere. *J. Fish Biol.*, 2: 113-116.
- Wolke, R.E. (1975). Pathology of bacterial and fungal diseases affecting fish. Univ. Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, pp. 33-116.