

## Répercussion de l'acidification de l'eau sur l'insurgence de la saprolégniose chez le poisson

R. PEDUZZI, F. KÄPPELI & G. TURIAN

Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université de Genève et Institut Cantonal de Bactériologie, 6904 Lugano (Suisse)

PEDUZZI, R., F. KÄPPELI & G. TURIAN (1991). Répercussions de l'acidification de l'eau sur l'insurgence de la saprolégniose chez le poisson. – *Sydowia* 43: 135–147.

Among aquatic organisms white mildews are generally the only ones benefiting of low pH in their environment. We have studied the influence of pH on the growth of three strains of *Saprolegnia parasitica*, *S. ferax*, and *Saprolegnia* sp., three agents of frequent mycoses of fresh water fishes. The acidification of the medium (pH 5.0 – 5.5) enhances both growth of the mycelium (maximum dry weight at pH 5.2) and the production of zoospores (maximum at pH 6.2).

Keywords: saprolegniosis, mycosis, substrate acidification, *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia ferax*.

L'acidification du milieu aquatique provoquée par les pluies acides apporte une modification des équilibres au niveau de la flore microbienne.

Au niveau du saprophytisme aquatique dans le rapport champignons-bactéries, nous avons déjà pu constater au lac d'Orta, Italie, une évolution favorable à la première catégorie de microorganismes comme conséquence de l'acidification causée par des pollutions industrielles d'un corps d'eau (BIANCHI, 1990). En effet, en tant que notion classique, il est reconnu que les champignons possèdent une meilleure adaptation aux milieux acides et dans certains cas même aux fortes acidités (SCHOPFER, 1928).

Parmi les champignons aquatiques qui provoquent à l'état parasitaire des dégâts sur les organismes aquatiques, le genre *Saprolegnia* occupe une place importante. En effet, *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. delicata* et *S. declina* ont été décrites comme agents de la saprolégniose chez le poisson (NOLARD-TINTIGNER, 1973; 1981). Depuis plusieurs années ces microorganismes ont retenu notre intérêt surtout pour ce qui concerne les facteurs qui influencent le passage de la phase saprophytique à l'état parasitaire chez les poissons (PEDUZZI, 1973).

En particulier, il nous a été possible de mettre en évidence une importante production d'enzymes protéolytiques (chymotrypsine et trypsine) qui favorise l'état parasitaire du champignon en lui conférant un pouvoir de pénétration chez l'hôte (PEDUZZI & al., 1976; PEDUZZI & BIZZOZERO, 1977).

Dans ce travail, en considérant l'importance fondamentale jouée par la zoospore de *Saprolegnia* dans le passage du saprophytisme au parasitisme, il nous a semblé intéressant d'examiner les effets de l'acidité sur la sporulation. TORRENS (1984), dans un tableau devenu classique, compare "la sensibilité des différents organismes aquatiques à un abaissement de pH dans les eaux douces" Il est intéressant de remarquer que d'après les mêmes sources bibliographiques utilisées dans ce travail de synthèse, les seuls organismes aquatiques favorisés par l'acidité sont les "mousses blanches" A cette catégorie générique de "mousses blanches" appartiennent les champignons du genre *Saprolegnia*.

Relativement peu de travaux ont examiné l'influence de la baisse de la valeur pH sur une corrélation entre organismes aquatiques, surtout si ce rapport est régi par une relation hôte-parasite. Stimulés ainsi par cette constatation, nous avons voulu vérifier si dans des conditions aquatiques devenues acides ce genre fongique se trouve en condition de mieux agresser des organismes en "stress acide": en particulier les poissons pour lesquels les valeurs acides de l'eau sont défavorables, voir biologiquement intolérables à des valeurs de pH entre 5.5 et 6.

## Matériel et méthodes

### Souches fongiques utilisées

Nous avons utilisé *Saprolegnia ferax* (GRUITHUISEN) THURET (CBS 534.67), *Saprolegnia parasitica* COKER (CBS 540.67), ainsi qu'une souche isolée à partir d'une mycose sur une truite arc-en-ciel de l'espèce *Salmo gairdneri* (Fig. 1). Cette souche sera appelée par la suite *Saprolegnia* sp. sauvage. Elle a été décontaminée des bactéries en la faisant pousser d'abord sur Potato Dextrose Agar et ensuite sur Corn Meal Agar contenant chloramphénicol (0,05 g/l) et pénicilline (0,03 g/l).

### Milieux de culture et inoculations des milieux

Pour les manipulations d'isolement, de maintien des cultures, de repiquage, de pré-culture avant la mise en sporulation, nous avons utilisé Sabouraud Maltose, Corn Meal (Oxoid), Potato Dextrose (Oxoid) YpG (Yeast-glucose), ainsi que le milieu liquide PYG (Peptone-Yeast-Glucose) de CANTINO (1957).

Milieu synthétique liquide. – Pour l'évaluation de la croissance et de la sporulation asexuée en fonction du pH nous avons

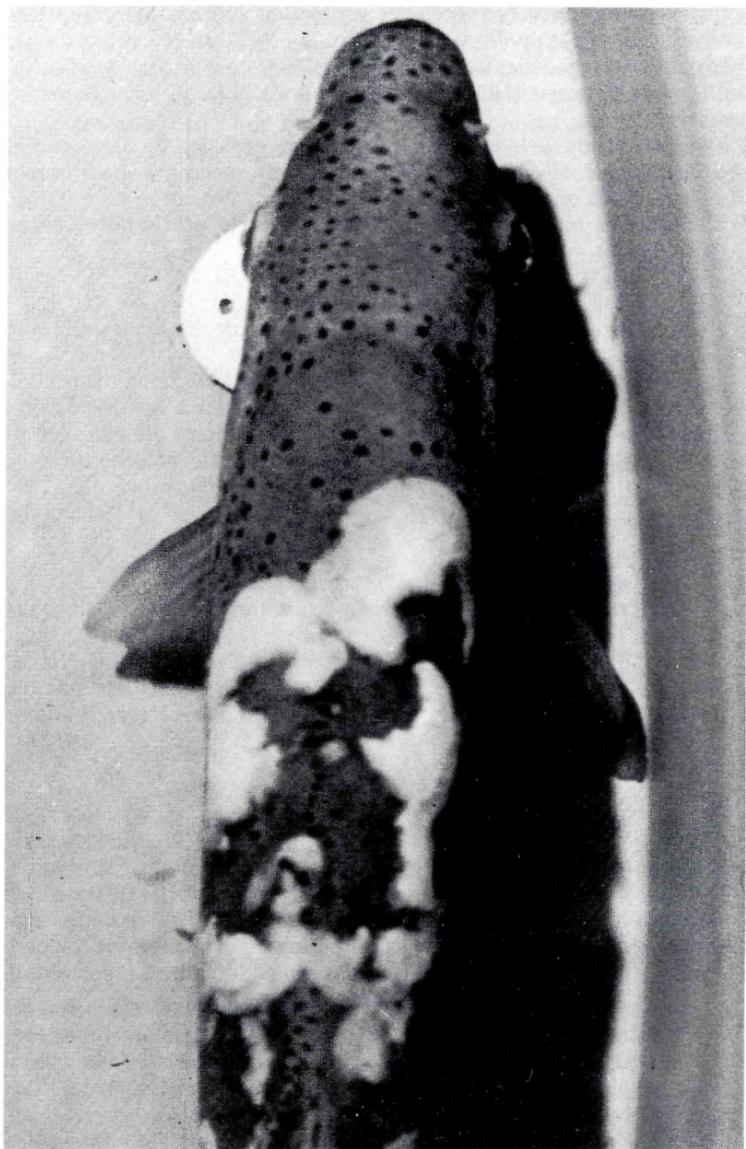


Fig. 1. - Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) atteinte de saprolégnirose (source: PEDUZZI & al., 1976).

utilisé comme base le milieu chimiquement défini, préconisé par POWELL & al. (1972) pour le genre *Saprolegnia* (Tab. 1). Cette formule constitue une modification du milieu SPS (SCOTT & al., 1962) et du milieu que REISCHER (1951) a développé pour la famille des Saprolegniaceae.

Pour l'étude de la croissance et de la sporulation de *Saprolegnia* à différents pH, on emploie comme tampon du succinate de sodium et du TRIS que l'on ajoute au milieu à une concentration de 0,01 M.

Quelques modifications ont été nécessaires afin d'obtenir une excursion des valeurs de pH de 4 à 9:

- 1) Utilisation de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  au lieu de  $\text{K}_2\text{EDTA}$ .
- 2) Parfois emploi selon le pH de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  au lieu de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- 3) Utilisation comme tampon, en plus de succinate de sodium et TRIS, d'acide succinique.

Pour ajuster les milieux à des valeurs de pH bas, on a utilisé une solution tampon plus acide que celle contenue dans la composition originale de POWELL & al. (1972); l'acide succinique a été employé au lieu de HCl.

Tab. 1. – Milieu synthétique employé

1. <i>Elément minéraux:</i>	<i>concentration (g/l)</i>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.3610
EDTA	0.5000
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5000
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1435
$\text{ZnCl}_2$	0.0835
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0366
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0048
2. <i>Substances organiques:</i>	
L-méthionine	0.0500
L-glutamate de Na	2.0000
Glucose	5.0000

Inoculation de mycelium. –Prélèvement de disques de mycélium d'une culture âgée de 48–96 heures sur milieu de Sabouraud en boîte de Pétri. L'utilisation d'une emporte-pièce de 0.75 cm de diamètre nous a permis de standardiser l'inoculum mycélien.

Production et inoculation de zoospores. – Pour obtenir la formation de zoospores on a mis les inoculums de mycélium végétatif (0.75 cm diam.) âgés de 72 h dans 20 ml d'eau courante stérile pendant 24 h. L'absence de substances nutritives dans l'eau cause en effet la formation de zoosporanges et la libération consécutive de zoospores. Ce procédé de „starvation“ permet de maîtriser la „mise en sporulation“ (POLLI, 1976).

Détermination du nombre de zoospores. – Pour chaque expérience le nombre de spores inoculées a été déterminé en étalant un volume de la solution de zoospores sur les plaques de Pétri avec le milieu de Sabouraud. Une série de flacons est ensuite ensemencée avec des suspensions de zoospores d'égale concentration. Au moyen des comptages sur plaque des zoospores qui germent nous arrivons à inoculer une quantité d'environ 1,000 zoospores dans 100 ml de milieu.

Filtration des zoospores. – La solution de spores avant d'être inoculée est filtrée sur „Buchner“ avec un filtre en nylon de porosité de 50  $\mu\text{m}$ . (Ny 50 HD ZBF, Rüsclikon, Suisse).

Les zoospores peuvent en effet passer à travers le filtre; par exemple les zoospores primaires enkystées de *S. parasitica* ont un diamètre de 9–11  $\mu\text{m}$  et celles de *S. ferax* un diamètre de 9–12  $\mu\text{m}$  (SEYMOUR, 1970).

On obtient ainsi une solution de zoospores dépourvue d'hyphe, ce qui nous a permis une étude spécifique de la germination des spores.

Conditions de culture. – Pour étudier les effets du pH sur *Saprolegnia* nous avons standardisé les cultures aux conditions suivantes: agitation 100 rpm, obscurité, durée de la culture 4 jours à une température comprise selon les expériences entre 20 C et 23 C, conditions qui permettent d'obtenir une croissance optimale en 4 jours (POWELL & al., 1972) et une bonne zoosporulation (COTNER, 1930).

Détermination de croissance et mesure du pH. – Nous avons utilisé la mesure du poids sec comme critère pour définir l'augmentation pondérale de *Saprolegnia* aux différents pH. Après 4 jours de croissance, au moyen d'une filtration sur „Buchner“, la masse mycélienne est séparée du milieu liquide. Les filtres sont ensuite mis dans un four à 105 C pendant 24 h. Le poids sec est déterminé.

Le pH des milieux synthétiques a été déterminé en utilisant les pH-mètres Beckman 3560 et Orion Research 601 I et a été mesuré après l'autoclavage.

Dans le but de vérifier la variation du pH induite par l'activité métabolique de *Saprolegnia* nous avons mesuré le pH après les 4 jours de croissance avant la filtration en le comparant aux pH des milieux témoins.

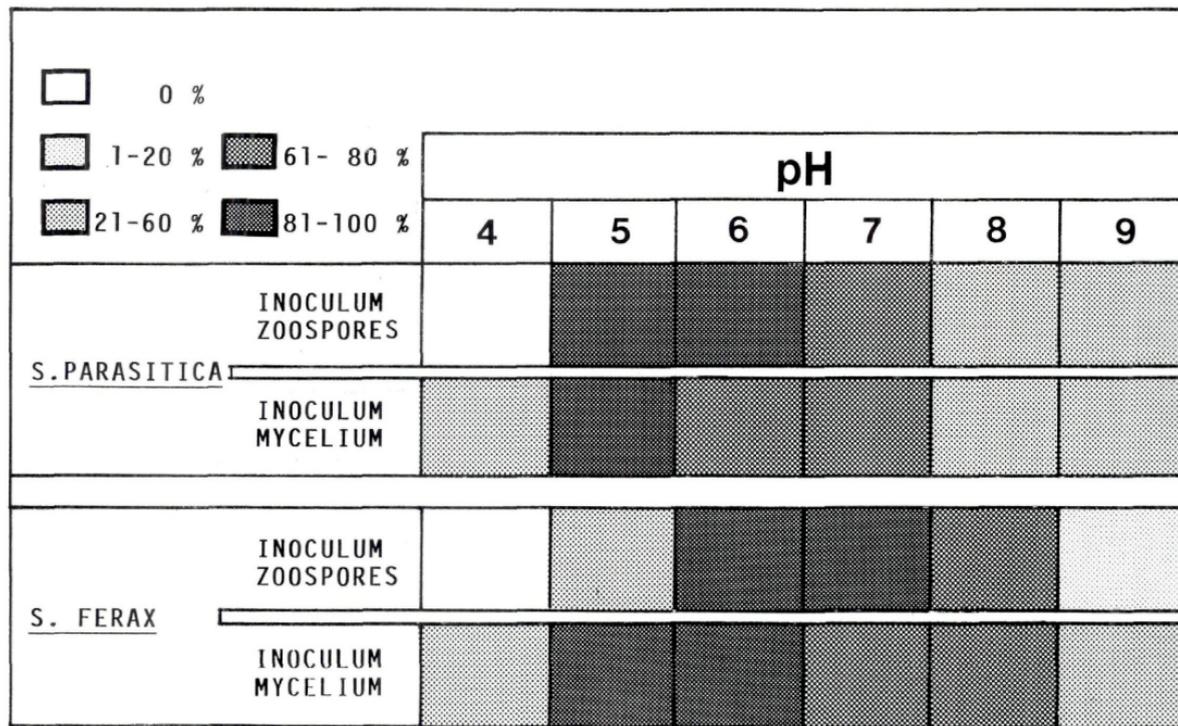


Fig. 2. – Résumé des résultats de la croissance mycélienne en milieu synthétique liquide, en fonction du pH. Mesures se rapportant à *S. parasitica* et *S. ferax*.

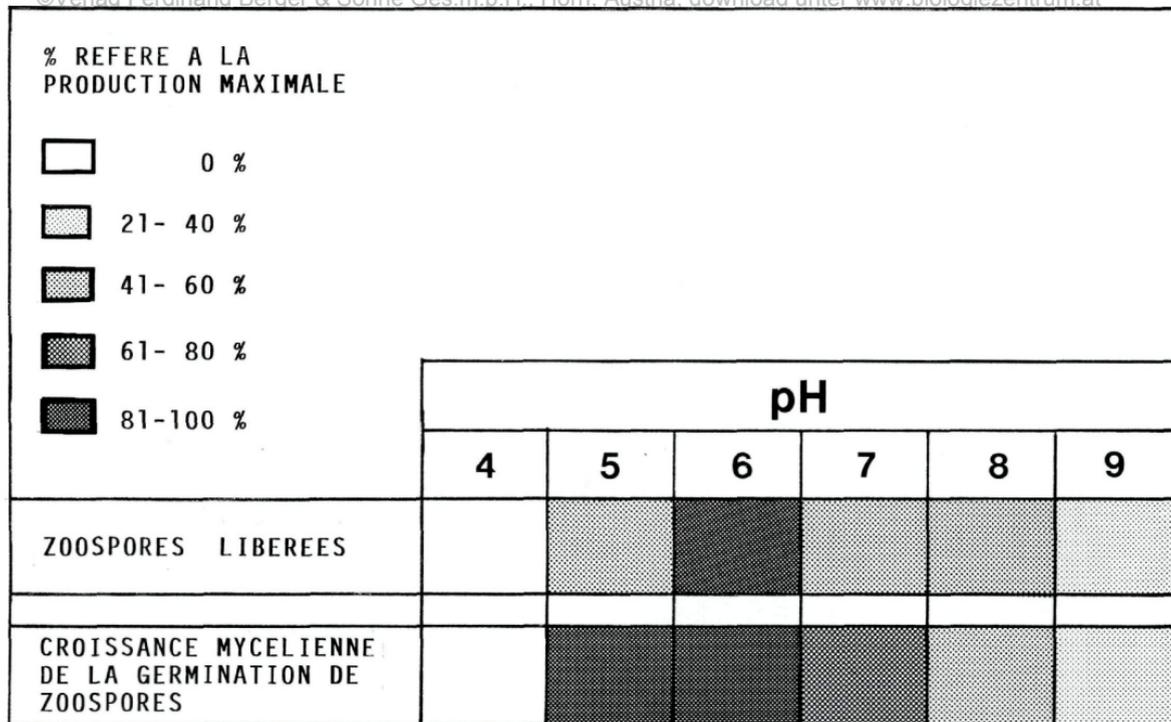


Fig. 3. – Production de zoospores libérées et croissance fongique dérivant de la germination de zoospores, en fonction du pH pour *S. parasitica* (en % par rapport à la quantité maximale relevée à chaque stade du développement asexué).

## Détermination de la production de zoospores

Avec la souche *S. parasitica* nous avons déterminé la quantité de zoospores produites en fonction du pH.

Un inoculum mycélien de 0.65 cm diam. est mis dans une série de flacons Erlenmeyer, contenant 25 ml de milieu synthétique liquide ajustés aux différents pH. Les cultures sont placées dans les conditions habituelles de travail et après 2 jours filtrées avec un filtre en nylon selon les modalités décrites sous „filtrations des zoospores“. Après centrifugation le culot est resuspendu et homogénéisé dans 0.5 ml de surnageant en procédant ainsi à une concentration de cellules sporale de 20 fois. Afin de déterminer la densité zoosporale la suspension est ensuite ensemencée sur Sabouraud. Il faut aussi remarquer que l'acide glutamique présent dans le milieu synthétique liquide stimule la production de zoospores (SMITH & al., 1984).

Dans la présentation des résultats les valeurs du poids sec sont exprimés et arrondis au mg. Les valeurs du pH sont exprimées avec une fraction décimale, sauf dans les Figures 2 et 3 où les valeurs pH sont indiquées uniquement en unités entières pour mieux résumer la tendance fondamentale du phénomène.

## Résultats et discussion

### Croissance en fonction du pH

Pour les trois souches nous avons testé la croissance mycélienne en fonction du pH. Les mesures ont été effectuées sur des cultures dérivant du mycélium et des zoospores. La Fig. 4 nous donne l'augmentation pondérale en mg de poids sec de la culture de *S. parasitica* en fonction de la valeur pH. Chaque culture a été inoculée avec une suspension de 1,000 zoospores. Les meilleures croissances avec ce type d'ensemencement sont enregistrées dans les milieux aux pH acides (pH 5). A la Fig. 5 nous rapportons la croissance fongique exprimée en pourcentage de poids sec; dans l'échelle adoptée le 100% correspond à la valeur maximale en mg mesurée dans la série d'expériences. En nous référant aux Figures 4 et 5 nous pouvons constater un spectre de croissance assez vaste car il est possible de relever une croissance à un pH de 4 jusqu' à un pH de 9. Aucune croissance n'a pu être observée à un pH de 3 soit avec l'inoculum constitué par le mycélium soit avec la solution de zoospores. A pH 4 il y a une absence totale de croissance dans les milieux ensemencés avec des zoospores, tandis que pour les cultures ensemencées avec un inoculum mycélien un accroissement du poids bien que limité peut être relevé. La représentation graphique rapporté à la Fig. 4 nous permet de constater

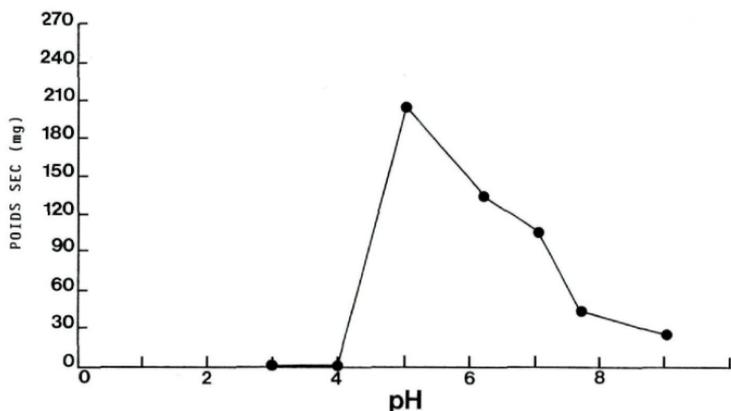


Fig. 4. – Mesure de la croissance de *S. parasitica* en fonction du pH, inoculum de la culture: zoospores. Mesure pondérale en mg de poids sec.

que la croissance dérivant des zoospores semble être favorisée par les pH acides (le maximum de croissance est constaté à pH 5.2) de façon plus importante que les cultures ensemencées avec l'inoculum mycélien. Il est possible de résumer cette série d'expériences sur la croissance fongique en fonction de la valeur pH au moyen de la Fig. 2.

Selon ces résultats, obtenus en milieu synthétique liquide, *S. parasitica* montre que la croissance mycélienne dérivée des deux

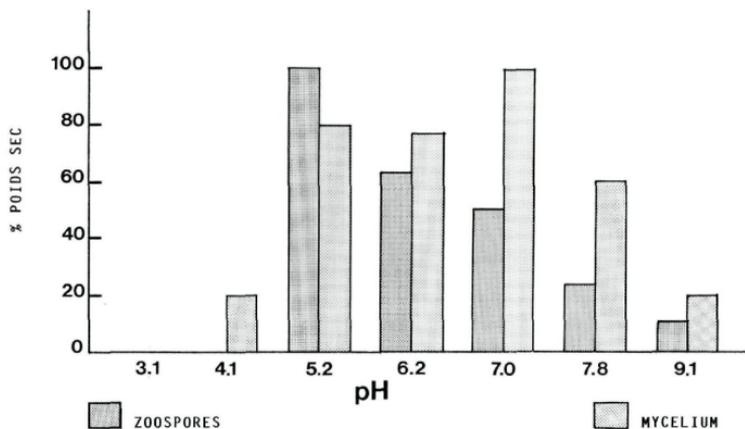


Fig. 5. – Croissance de *S. parasitica* en fonction du pH, Culture dérivant de l'inoculum de zoospores et de mycélium. Mesure exprimée en % de poids sec.

types d'inoculum est favorisée dans des conditions de culture légèrement acides et neutres comprises entre pH 5 et pH 7.

Avec *S. ferax* les expériences effectuées dans le même milieu ont montré que la croissance est possible dans un spectre de pH relativement plus vaste. En effet, les meilleures croissances se relèvent entre pH 5 et pH 8. On remarque une bonne adaptation à pH neutre et aux pH légèrement acides. Le fait que cette souche semble bien s'adapter aussi à des pH légèrement alcalins permet de déduire qu'elle possède une amplitude d'accomodation aux valeurs pH assez considérable. Les résultats obtenus avec la souche „sauvage“ *Saprolegnia* sp. que nous avons isolée à l'état parasitaire donnent le même comportement de croissance constaté chez la souche de *S. parasitica* de référence.

Les résultats sur la croissance mycélienne obtenus en milieux synthétiques liquides ont été confirmés en milieux synthétiques solidifiés.

#### Production de zoospores en fonction du pH

À la Fig. 6 nous rapportons graphiquement les résultats obtenus avec nos essais sur des cultures de 48 h.

Il s'agit du dénombrement des zoospores libérées exprimé en unités de cellules par ml de milieu. Le comptage est fait après germination des zoospores sur Sabouraud. Notre étude montre qu'il y a production et libération de zoospores capables de germer dans les cultures de valeur pH initiale comprise entre 5.2 et 9.1.

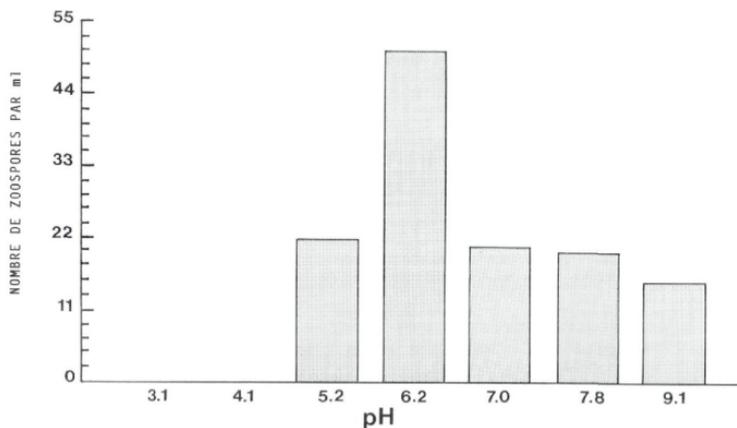


Fig. 6. – *S. parasitica* après 48 heures de culture. Nombre de zoospores libérées par ml en fonction du pH.

On a observé une zoosporulation maximale à pH 6.2, plus faible aux pH 5.2, 7 et 7.8, et plus faible encore à pH 9.1. Le fait de n'avoir pas obtenu une croissance mycélienne à partir d'ensemencements de zoospores provenant des cultures de pH 3.4 et 4.1 a empêché le comptage. Cette constatation permet de postuler qu'il n'y a pas eu production de zoospores capables de germer à ces basses valeurs de pH.

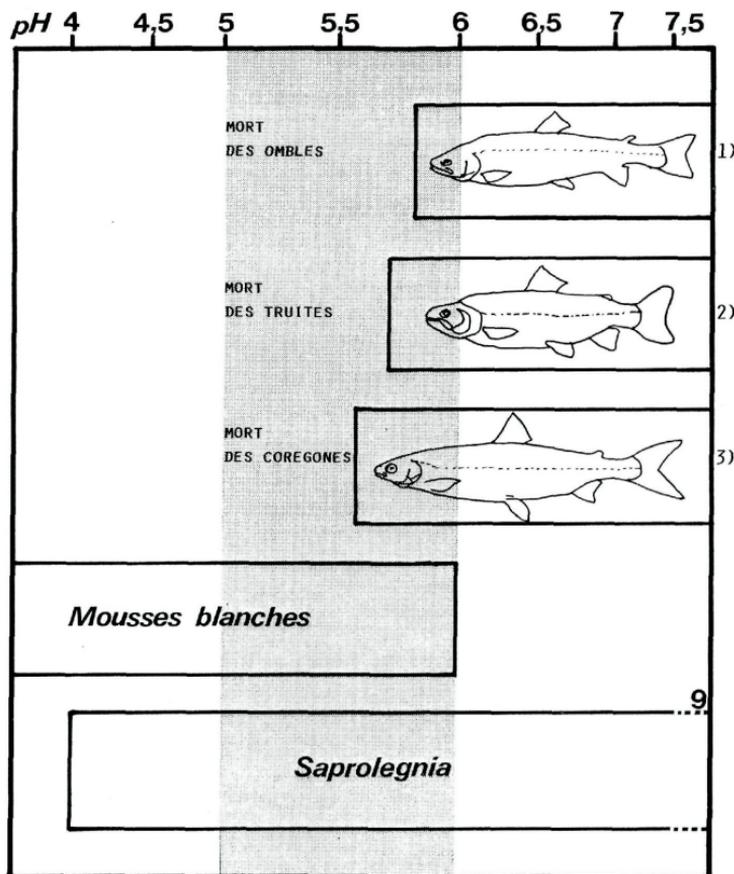


Fig. 7. – Sensibilité biologique à un abaissement du pH des poissons (genres: *Salvelinus*, *Salmo* et *Coregonus*) de *Saprolegnia* et des „mousses blanches“.

À la Fig. 3 nous avons regroupé les résultats des expériences effectuées avec la souche de *S. parasitica*. Avec les résultats rapportés aux Figures 3 et 6 nous pouvons montrer l'influence positive de l'acidité sur la production de zoospores. En effet, il résulte clairement que la production de zoospores est favorisée par une légère acidité. En outre, nous avons pu constater que la souche *Saprolegnia sp.* sauvage isolée à partir d'une mycose d'une truite suit le comportement de croissance et de sporulation observé chez *S. parasitica*.

En conclusion, dans l'insurgence de la saprolégniose la corrélation hôte-parasite est influencée de façon positive par une baisse de la valeur pH de l'eau. En effet, à des valeurs de pH entre 5 et 6 chez les souches de *Saprolegnia* examinées (deux espèces de référence avec potentialités parasitaires reconnues et une souche sauvage que nous avons isolée à l'état de parasite sur un poisson) il a été possible de constater une production abondante de zoospores (maximum à pH 6 – 6.2) et une croissance mycélienne considérable (maximum d'accroissement à pH 5.2). Parallèlement, au niveau de l'organisme hôte, dans une eau avec les mêmes valeurs de pH (entre 5 et 6) nous retrouvons le poisson dans une situation de "stress-acide", donc plus vulnérable et plus réceptif à l'agression des zoospores.

Nos résultats ayant permis de prouver l'influence positive des pH légèrement acides sur la production de la forme infectante (les zoospores) et sur la croissance mycélienne des *Saprolegnia* à potentialité parasitaire, il nous est possible de proposer un complément au tableau de TORRENS (1984). Nous avons ainsi élaboré la Fig. 7 en tenant compte de l'influence de la baisse de la valeur pH sur la corrélation hôte-parasite qui donne la saprolégniose.

### Bibliographie

- BIANCHI, M. (1990). Popolamento microbico del Lago d'Orta. – Thèse de Doctorat 267375, Université de Milan, pp. 94.
- CANTINO, E.C. (1957). Chitin synthesis and nitrogen metabolism during differentiation in *Blastocladiella emersonii*. – Amer. J. Bot. 44: 498–505.
- COTNER, R.B. (1930). The development of zoospores in the Oomycetes at optimum temperatures and the cytology of their active stages. – Amer. J. Bot. 17: 511–546.
- NOLARD-TINTIGNER, N. (1973). Etude expérimentale sur l'épidémiologie et la pathogénie de la Saprolégniose chez *Lebistes reticulatus* PETERS et *Xiphophorus helleri* HECKEL. – Acta Zool. Pathol. Antverp. 57: 1–127.
- (1981). Ability of zoospores versus oospores to cause saprolegniosis in fish. In: VANBREUSEGHEM, R. & DE VROEY, C. (eds). Sexuality and pathogenicity of fungi. – Masson, Paris: 97–106.
- PEDUZZI, R. (1973). Application de la sérologie à l'étude des *Saprolegnia*. Thèse d'habilitation au titre de privat-docent. – Faculté des Sciences, Univ. Genève (Habilitationsschrift, EAWAG-ETH Dübendorf), 82 pp.

- , N. NOLARD-TINTINGNER & S. BIZZOZERO (1976). Recherches sur la saprolégniose. II Étude du processus de pénétration, mise en évidence d'une enzyme protéolytique et aspect histopathologique. — Riv. It. Piscic. Ittiop. 11: 109–117.
- & S. BIZZOZERO (1977). Immunochemical investigation of four *Saprolegnia* species with parasitic activity in fish: Serological and kinetic characterization of a chymotrypsin-like activity. — Microbial Ecology 3: 107–118.
- & B. POLLI (1977). Immune Response of Trout against Mycosis. — EAWAG-News, Swiss Federal Institutes of Technology 7/8: 8–9.
- POLLI, B. (1976). Paragone elettroforetico e immunologico fra estratti di micelio di *Saprolegnia* (Oomycetes) allo stadio vegetativo e sporulante (patogeno). — Travail de diplôme, EAWAG-ETH Zürich, pp. 94.
- POWELL, J.R., W.W. SCOTT & N.R. KRIEG (1972). Physiological parameters of growth in *Saprolegnia parasitica* COKER. — Mycopath. Mycol. appl. 47: 1–40.
- REISCHER, H.S. (1951). Growth of Saprolegniaceae in synthetic media. I. Inorganic nutrition. — Mycologia 43: 142–155.
- SCHOPFER, W.S. (1928). Recherche sur la sexualité des champignons. — Bull. Soc. Bot. Genève (2e série) 20: 149–323.
- SCOTT, W.W., J.R. POWELL & R.L. SEYMOUR (1962). Pure culture techniques applied to the growth of *Saprolegnia* spp. on a chemically defined medium. — Va. J. Sci. 14: 42–46.
- SEYMOUR, R.L. (1970). The genus *Saprolegnia*. — Nova Hedwigia 19: 1–125.
- SMITH, S.N., R.A. ARMSTRONG & J.J. RIMMER (1984). Influence of environmental factors on zoospores of *Saprolegnia diclina*. — Trans. Br. mycol. soc. 82: 413–421.
- TORRENS, I.M. (1984). Les pluies acides. — L'observateur de l'OCDE 129: 9–15.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sydowia](#)

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: [43](#)

Autor(en)/Author(s): Peduzzi R., Käppeli F., Turian Turian G.

Artikel/Article: [Répercussion de l'acidification de l'eau sur l'insurgence de la saprolégniose chez le poisson. 135-147](#)