



Aplicación del Tomillo *Thymus vulgaris*
en el manejo de Enfermedades de la Salmonicultura

Autores

María Isabel Toledo Donoso
Alex Manríquez Lagos
German Olivares Cantillano
Andrea Soto Azocar
Luis González Carvajal
Jorge Abel Ringuelet
Williams Díaz

Índice de Contenidos

1. *Introducción.*

2. *Capítulo 1*

¿Qué es el Tomillo?

6. *Capítulo 2*

Usos, características químicas y proveedores de aceite de tomillo.

13. *Capítulo 3*

La enfermedad de la saprolegniosis en la salmonicultura.

18. *Capítulo 4*

El Tomillo (Thymus vulgaris) en el manejo de saprolegniosis.

Introducción

Debido a la importancia económica que representa para Chile la producción de salmónidos y las pérdidas que origina la “saprolegniosis”, es fundamental buscar alternativas al verde malaquita para favorecer la producción limpia y el desarrollo de la acuicultura orgánica. En la actualidad, se ofrecen en el mercado diversos productos de efectividad relativa con respecto del verde malaquita y con baja conformidad por parte del sector salmicultor. La utilización de plantas medicinales como el tomillo, en el control de la saprolegniosis, potencia de manera importante la actividad agrícola frente a un escalamiento y elaboración de un producto comercial, en base a extractos oleicos de esta planta, si este es adoptado por la industria salmonera.

Análisis de perfil de ácidos grasos esenciales realizados a aceites de tomillo de distintos orígenes, revelan que este producto contiene altos niveles de timol, carvacrol y p-cimeno, cercanos al 50%, compuestos de probada acción antifúngica. La utilización de aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*), en el control de la saprolegniosis, se presentaría como una opción, tanto para la acuicultura orgánica como para la tradicional. El presente documento se compone de cuatro capítulos, en el primero se señalan brevemente aspectos relacionados con el cultivo del tomillo. En la segunda sección, se indican las características químicas que posee el aceite de tomillo y los proveedores que actualmente comercializan este producto en el país. En el tercer capítulo, se presentan las características de la saprolegniosis su ciclo de vida y como afecta a ovas y peces de cultivo. Y en el cuarto y último capítulo se resumen los resultados más relevantes del Proyecto “Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la salmicultura” FIA-PI-C-2004-1-D-089, desarrollado por el Laboratorio de Cultivo y Alimentación de Peces (LABCPAC) de la Escuela de Ciencias del Mar de la PUCV, investigación que contó con el apoyo financiero de FIA y los aportes de las empresas participantes Luxcamp, Nutriservice y SETECSAL.

Capítulo 1*

¿Qué es el Tomillo?

El tomillo es una planta aromática, vivaz, leñosa, muy poliforme. La planta puede alcanzar una altura de 10 a 45 cm. con numerosas ramas, leñosas, erectas, compactas, parduscas o blanco aterciopeladas. Las hojas de 3 a 8 mm. son lineares o brevemente pedí celadas, opuestas, sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su envés, resiste bien temperaturas extremas, crece mejor en suelos ricos en materia orgánica (Fernando, M. 1993).



Figura 1. Plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Multiplicación

Por lo general, como en la mayoría de las plantas perennes existen varias formas de propagación. Las más conocidas son: por semillas y vegetativamente.

* Este capítulo fue preparado por la Empresa participante Agrícola Luxcamp. Productora Deshidratadora y Comercializadora de plantas aromáticas y especias.



Figura 2. Almácigos de tomillo (*Thymus vulgaris*).

Establecimiento de Almácigos

La siembra se hace sobre un suelo ligero o bandejas “speedlings” cuidadosamente preparado y alisado, desde agosto a octubre e incluso más tarde. Dado el tamaño pequeño de las semillas es recomendable mezclarlas con arena, para facilitar su siembra. La siembra directa no se hace nunca.

La semilla se deposita en el suelo o recipiente y se cubre con una ligera capa de tierra o turba, con riegos diarios, con aspersores o regadera fina. Se logra una germinación buena en las tres semanas siguientes. Cuando las plantas tienen una altura de 6 a 8 cm se efectúa el trasplante en el lugar definitivo donde se realizara el cultivo.

Esquejado

Según la literatura se practica en toda época siempre y cuando el tomillo esté con actividad vegetativa. Cada pie permite obtener algunos centenares de esquejes. El enraizamiento tiene lugar a los 2 meses y los esquejes pueden ponerse bien en otoño o mejor a principios de primavera. El porcentaje de prendimiento es alrededor de un 85%. Este porcentaje se reduce al 30 o 40%, cuando el esquejado es practicado durante el reposo vegetativo, es decir, en invierno.

Preparación de Suelo y Plantación

Una buena preparación de suelo es un factor de mucha incidencia en el éxito de un cultivo, sobre todo al tratarse de una especie perenne que se mantiene económicamente productiva por varias temporadas. Al momento de realizar esta labor idealmente es recomendable utilizar implementos tradicionales ya sea arado de disco o cincel y rastras de disco.

Previo al trasplante se recomienda melgar a la distancia definitiva del cultivo, según experiencias de Luxcamp la distancia óptima de plantación es de 0,7 m entre hileras y 0,25 m sobre la hilera. Se deben regar las melgas previo al trasplante para asegurar un buen prendimiento de plantas. La densidad de plantación varía de 55.000 a 60.000 plantas /ha.

Labores Culturales y Fertilización

Aparte de los riegos, los cuales deben ser en forma oportuna y con poco agua, se sugiere la aplicación de un herbicida de pre-plantación. Se deben cultivar mecánicamente para el control de malezas entre hileras y desmalezar manualmente sobre la hilera.

Por ser un cultivo intensivo, el suelo debe estar bien provisto de materia orgánica, la cual debe ser aportada a lo menos en el momento de la preparación del suelo, pudiendo ser este, guano bien descompuesto o haber incluido abono verde en la temporada anterior. Los fertilizantes de fondo, se aportan en el momento de la preparación superficial para el trasplante. El nitrógeno se aportará mas tarde, en cobertura después del arraigue de las plantas de manera parcializada en bajas dosis. Según literatura se recomienda las proporciones que se citan en Tabla 1.

Tabla 1. Proporciones para preparado de fertilizantes de fondo.

Fertilizantes	Unidades
Nitrógeno	75 a 80
Fósforo	50 a 60
Potasio	100 a 120

Control de Malezas

Como se menciona anteriormente, se sugiere la aplicación de un producto de pre plantación y en el mercado se puede encontrar productos a base de Simazina. Para el control de malezas anuales y perennes de semilla, se recomienda el uso de herbicidas de post-emergencia, como ejemplo producto a base de Terbacilos.

Enfermedades

Sobre la parte aérea de la planta, se destaca a veces un amarillamiento de hojas de algunas ramas de la parte superior, debido a un ataque de nematodos, a nivel de las raíces, el responsable principal es el *Meloidogyne hapla*. El único control posible es la desinfección del suelo de los viveros mediante la multiplicación vegetativa. No se debe implantar el cultivo del tomillo en parcelas donde se ha detectado la presencia de nematodos. Esta enfermedad también puede ser provocada por exceso de humedad o riegos excesivos.

La defoliación de las sumidades y el amarilleo, constatado después de la floración, son fenómenos naturales que no deben confundirse con enfermedades.

Recolección y Rendimiento

En cultivos nuevos o establecidos en la misma temporada solo se puede realizar una cosecha. Al segundo año es posible realizar dos y hasta tres cosechas dependiendo de la temperatura y las lluvias, siempre que estas no se presenten en abundancia en los meses de marzo y abril pudiendo realizar esta a mediados de mayo. En el primer año el rendimiento fresco varía de 800 a 1000 Kg/ha y en los años siguientes el rendimiento fresco puede llegar a los 5000 Kg./ha.

Bibliografía

Fernando, M. L. 1993, Plantas Medicinales y Aromáticas Estudio, cultivo y proceso. Dr. Ingeniero de Montes del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. 2ª Edición, 365 p

Viuda-Martos, M, Ruiz-Navajas, J. F. López. & J. A. Pérez-Álvarez. 2007 Antifungal Activities of thyme, clove and oregano essential oils Journal of Food Safety, Blackwell Publishing, 27 (1), pp. 91-101.

Capítulo 2*

Usos, características químicas y proveedores del aceite de tomillo.

Desde épocas remotas el aceite esencial de tomillo ha sido usado como agente en el control de infecciones, compuestos como el timol, el p-cimeno, carvacrol y otros, le dan las propiedades antifúngicas y antimicrobianas conocidas. De estos componentes mencionados, el timol es el elemento activo de mayor presencia el cual, se puede extraer de una variedad de plantas, tales como orégano, romero, albahaca etc. Por su olor agradable y sus propiedades antisépticas naturales, el timol se utiliza en una gran diversidad de productos. (Tabla 2).

Tanto la planta de tomillo como el extracto de aceite esencial de tomillo poseen una serie de bondades, lo cual permite una amplia gama de usos y aplicaciones, algunas de las cuales se describen a continuación.

Comidas y conservación de alimentos:

- ✓ En la elaboración y preparación de sopas, ensaladas, salsas, etc.
- ✓ En la preparación de pastas y productos afines.
- ✓ Como complemento en la conservación de carnes y otros, debido a su uso como repelente a mosquitos y otros insectos.

Aromaterapia:

- ✓ Tratamiento de dolores de garganta y Laringitis
- ✓ Combatir crisis asmáticas, cuadros de tos y bronquitis, debido a su capacidad expectorante.
- ✓ Control de stress, fatiga y depresión.

Controlador de plagas eficaz:

- ✓ El timol componente del aceite esencial de tomillo es usado en la apicultura para controlar y atacar el ácaro varroa, araña microscópica que infecta los apiarios provocando grandes pérdidas en la producción de miel.
- ✓ Control de plagas de pulgones en plantas de interior y viveros.

* Este capítulo fue preparado por el Profesor Jorge Ringuet de la Universidad de Mar del Plata Argentina, invitado gracias al apoyo de FIA. Proyecto FIC-CO-C-2007-3-M-001.

Paralelamente tiene un amplio espectro de aplicación en farmacología,

- ✓ Es conocido en el tratamiento o prevención de infecciones urinarias
- ✓ Inhibidor de bacterias (incluyendo *E. coli*)
- ✓ Antihelmíntico
- ✓ Antiséptico y antiviral.
- ✓ Antiputrefacción, cicatrizante, vermicida, antioxidante y otros

Como se menciona anteriormente, uno de los principales componentes del aceite esencial de tomillo es el timol y gracias a la asociación con otros compuestos y aceites esenciales, es utilizado en medicamentos y productos farmacológicos Tabla 2.

Tabla 2. Productos farmacológicos a base de timol en asociación con otros compuestos.

Asociación	Producto	Laboratorio
Aceite de Eucalipto	Hansaplast® Balsamo Descongestionante	Beiersdorf
Aceite de Ricino	Hansaplast® Balsamo Descongestionante	Beiersdorf
Aceite de Terpentina	Hansaplast® Balsamo Descongestionante	Beiersdorf
Alcanfor	Hansaplast® Balsamo Descongestionante	Beiersdorf
Alcanfor	Salonpas	Andromaco
Alcohol	Listerine	Pfizer
Alcohol	Listerine Control Sarro	Pfizer
Alcohol Etílico	Listermint Con Fluor	Pfizer
Anfocerina	Hansaplast® Balsamo Descongestionante	Beiersdorf
Benzoico, ácido	Listerine	Pfizer
Benzoico, ácido	Listerine Control Sarro	Pfizer
Eucaliptol	Listerine	Pfizer
Eucaliptol	Listerine Control Sarro	Pfizer
Eugenol	Listermint Con Fluor	Pfizer
Mentol	Hansaplast® Balsamo Descongestionante	Beiersdorf
Mentol	Listerine	Pfizer
Mentol	Listerine Control Sarro	Pfizer
Mentol	Polisep	Drag Pharma
Mentol	Salonpas	Andromaco

Metilsalicilato	Listerine	Pfizer
Salicilato de Glicol	Salonpas	Andromaco
con Salicilato de Metilo	Listerine Control Sarro	Pfizer
con Salicilato de Metilo	Listermint Con Fluor	Pfizer
con Salicilato de Metilo	Salonpas	Andromaco
Salol	Polisep	Drag Pharma
Sodio, citrato	Listermint Con Fluor	Pfizer
Sodio, fluoruro	Listermint Con Fluor	Pfizer
con Vaselina	Hansaplast® Balsamo Descongestionante	Beiersdorf
Zinc, cloruro	Listerine Control Sarro	Pfizer

Composición química de diferentes aceites de tomillo.

Tanto la composición química del aceite esencial de tomillo como el rendimiento es muy variable y depende directamente de la época del año, estado de la floración, desarrollo de la planta, humedad ambiental, metodología de extracción del aceite, entre otros. Si bien es cierto, se busca una estabilización y se instituyen estándares para los aceites esenciales de tomillo, en análisis realizados a diversos productos comerciales se observa una gran diferencia. (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil de aceites esenciales de tomillo según distintos orígenes.

Principales compuestos identificado	A. de tomillo blanco de la India (g/100g de muestra)	A. de Tomillo Marca Flavex Extrac. CO2 (g/100g de muestra)	A. de Tomillo blanco de la CEE (g/100g de muestra)	A. de Tomillo blanco de Luxcamp (g/100g de muestra)
α - pineno	1,3	0,4	1,4	1,0
β - pineno	0,3	0	0,2	0,2
Eucaliptol	2,3	0,5	0,5	1,0
p-Cimeno	15,2	27,3	21,4	27,4
Linalol	2,3	1,9	7,1	3,2
Borneol	1,5	0,7	0,8	1,5
Timol	19,0	33,2	49,5	48,6
Carvacrol	0,7	1,8	6,1	2,1

Comercialización del aceite de Tomillo.

El aceite esencial de tomillo tiene una comercialización característica que corresponde a productos líquidos de valor elevado con orientación al área de aromaterapia (Tablas 4 y 5). En el mercado se pueden encontrar presentaciones desde los 10 o menos ml hasta botellas de litro. Es en este punto donde se producen las principales diferencias de comercialización ya que ciertos productores lo comercializan por volumen (ml) y otro gran grupo lo comercializa según se peso (gr)

Los agentes comercializadores y/o productores a nivel mundial son variados y corresponden a un variado numero de países que ofrecen este producto (Tabla 4).

La comercializaron a nivel nacional no esta muy definida, sin embargo se orienta principalmente a la aromaterapia. Mayoritariamente las principales entidades comercializadoras ofrecen un producto importado (Tabla 5).

Tabla 4. Catastro internacional de productores y/o comercializadores de aceite esencial de tomillo.

Producto	Productor o vendedor	Uso o caract.	País
A.E.Tomillo	Health Leads	Órgánico/aromateria	España
A.E.T.	Botica Francesa	Aromaterapia	Perú
A.E.T.	Cedrosa	35/40%, 22%	México
A.E.T.	Ecobotiga	Aromaterapia	España
A.E.T.	Health Leads	Aromaterapia	UK
A.E.T. Rojo	Red Safari	Aromaterapia	Canadá
A.E.T. Blanco	Red Safari	Aromaterapia	Canadá
A.E.T.	Bulgarian Pharmaceutical Group Ltd.	Alimento, medicina	Bulgaria
A.E.T.	Esoteric Oils (Pty) Ltd	Aromaterapia/Uso tópico	SudAfrica
A.E.T.	Productores y vendedores	Aromaterapia	India
A.E.T.	Global Herbal Supplies	Terapéutico	Australia
A.E.T.	FLAVEX Naturextrakte GmbH	Extractos naturales	Alemania
A.E.T.	Geobell AG	Aromaterapia	Suiza
A.E.T.	VOGELE	s/i	Dinamarca
A.E.T.	Green Tech S.A.	s/i	Francia

A.E.T.	Mehul Chemicals Industries	Aromaterapia/Otros	India
A.E.T. (Rojo y blanco)	Frutarom (UK) Ltda.		UK
A.E.T.	Essencia, Aetherische Oele AG	Químicos	Suiza
A.E.T.	Florame	Aromática	Francia
A.E.T.	Science Lab.	Químicos	USA
A.E.T.	Jade Oils	Aromaterapia	UK
A.E.T.	Sigma Aldrich Co.	Químicos	USA
A.E.T.	Loaves and Fishing	s/i	
A.E.T.	Marlin Chemical Products	s/i	México
A.E.T.	Manuel Riesgo S.A.	s/i	España
A.E.T.	Biomedica, spol. s r.o.	s/i	Republica Checa
A.E.T.	Vitamin Usa	s/i	USA
A.E.T.	The Crystal Garden	Terapéuticos	USA

s/i: sin información.

Tabla 5. Catastro nacional de productores y/o comercializadores de aceite esencial de tomillo en el país.

Producto	Productor o vendedor	Uso o caract.
A.E.T.	Aromas Naturales Chile	Aromaterapia
A.E.T.	Osmanthus	Aromaterapia
A.E.T.	AMBAR	Aromaterapia
A.E.T.	Hualapulli Ltda.	Aromaterapia

Bibliografía.

Albo, G., C. Henning, J. Ringuelet, F. Reynaldi, M. De Giusti, y A. Alippi. 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 34: 417-427.

Alippi, A., J. Ringuelet, C. Henning, y A. Bandoni. 2001. Actividad antimicrobiana in vitro de algunos aceites esenciales y mezclas de esencias sobre *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Vida Apícola*. Barcelona, España. 106: 41-44.

Cerimele, E., J. Ringuelet, M.S. Henning, C. Ricci, A. Kahan, S. Padín, y P. Sceglio. 2005 Aceites esenciales para el control de áfidos. *Bienal de Ciencia y Tecnología*. CIC. La Plata.

Kahan A, S. Padín, M. Ricci, J. Ringuelet, E. Cerimele, M. Henning, C. Basso, 2007. Biocontrol de *Brevicoryne brassicae* L. con aleloquímicos en repollo. XXX Congreso Argentino de Horticultura. La Plata, 24-29 de septiembre de 2007. Libro de Resúmenes: 32.

Kahan, A., M. Ricci, S. Padín, J. Ringuelet, P. Catalano, y P. Sceglio. 2003. Actividad biológica del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (STAPF.) sobre *Sipha maydis* (PASS.) (Hemiptera: Aphididae). XXV Congreso Nacional de Entomología. Talca, Chile. 26/28 de noviembre 2003. Resúmenes: 46.

Larrán, S., J. Ringuelet, M. Carranza, C. Henning, E. Cerimele, y M. I. Urrutia. 2001. In vitro fungistatic effect of essential oils against *Ascosphaera apis*. *Journal of Essential Oil Research*, 13: 122-124.

Padin, S. J. Ringuelet, G. Dal Bello, E. Cerimele, y C. Henning, 2000. Effect of essential oils on mortality and repellence of stored-grain insects. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, Vol 7 (4): 67-73.

Padín, S. B., E. Ricci, J. Ringuelet, y A. Kahan, 2002. Actividad repelente de *Cymbopogon citratus* STAPF. "Lemongrass" sobre *Schizaphis graminum* Rond. y *Diuraphis noxia* Mordv. (Homoptera: Aphididae) en trigo. XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, junio de 2002, Río Cuarto, Córdoba. Resúmenes: 141.

Padín, S., A. Kahan, M. Ricci, J. Ringuelet, C. Henning, P. Catalano, y P. Sceglio. 2006a. Actividad biológica del aceite esencial de *Laurus nobilis* L. sobre *Myzus persicae* Sulz. (Hemiptera: Aphididae) en repollo. XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Catamarca, 28-30 de junio 2006. Resúmenes: 413.

Padín, S., M. Ricci, C. Henning, E. Cerimele, J. Ringuelet, M. Catalano, y M. Basso. 2006b *Myzus persicae* (Sulz.): bioactividad de productos naturales. ExpoUniversidad 2006. UNLP. La Plata, 28 agosto a 8 septiembre de 2006.

Ringuelet, J., C. Henning, A. Kahan, M. Ricci, S. Padín, y P. Catalano. 2005a. Actividad tóxica del aceite esencial de "lemongrass" *Cymbopogon citratus* Stapf. Sobre *Brevicoryne brassicae* L. y *Myzus persicae* Sulz. en plantas de repollo. V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. 28 nov.-2 dic. 2005. Montevideo, Uruguay. Libro de Resúmenes: 51.

Capítulo 3

La enfermedad de la saprolegniosis en la salmonicultura.

Las micosis o proliferación de hongo en los peces constituyen uno de los aspectos más confusos y menos explorado de la ictiopatología, las cuales producen grandes pérdidas económicas en acuicultura. (Meyer, 1991).

La saprolegniosis o saprolegnia, corresponde a una enfermedad fungal causada por *Saprolegnia parasítica* un hongo externo que ataca a peces y ovas. Tiene como característica un micelio cenocítico muy ramificado, una pared celular principalmente de glucanos, también de celulosa en la cual aparecen septos para separar los órganos reproductores.

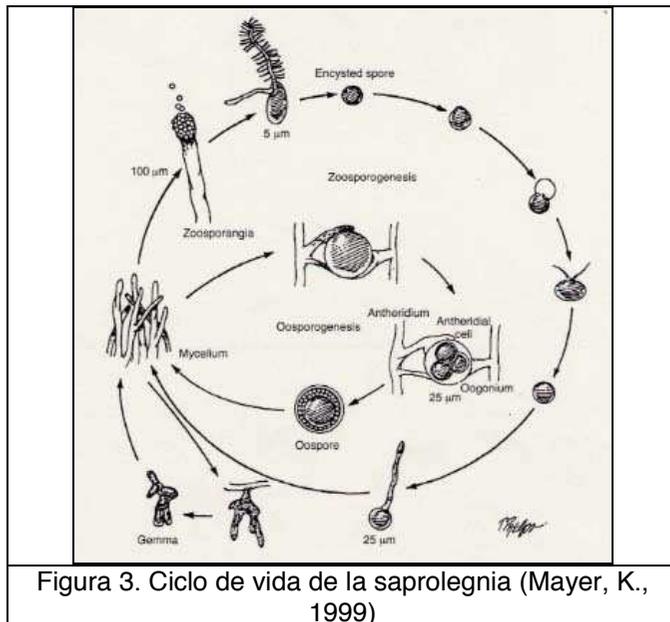


Figura 3. Ciclo de vida de la saprolegnia (Mayer, K., 1999)

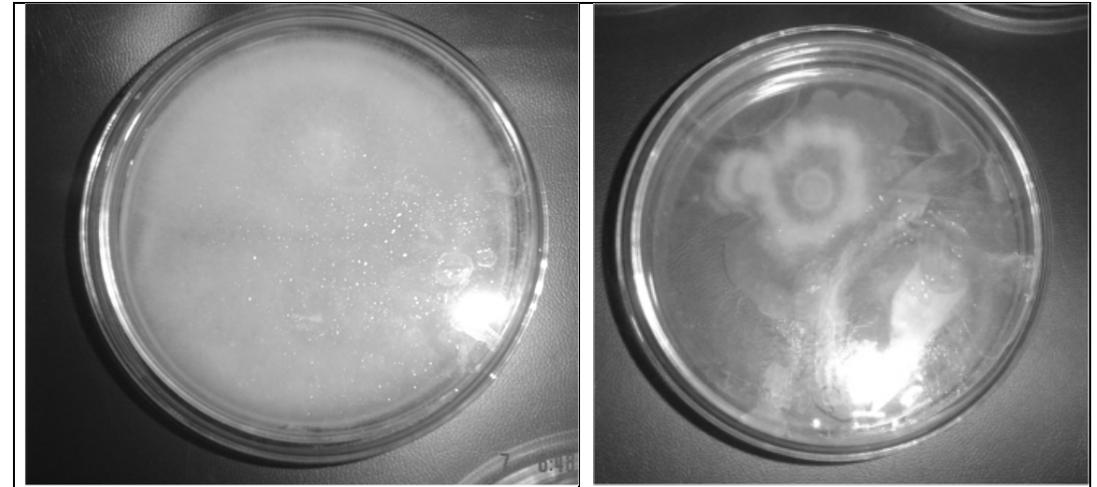


Figura 4. Colonia *S. parasítica* complex con crecimiento abundante.

Figura 5. Colonia obtenida desde la Piscicultura Entre Ríos.

La saprolegnia, es un habitante de agua dulce, se encuentra en cualquier fuente de agua aunque también puede alojarse en sustratos húmedos, tolera temperaturas entre los 3 a 33 °C con un rango de temperatura óptima de desarrollo de 14 a 16°C en el cual se acelera el proceso de multiplicación del hongo. Su nivel de tolerancia a la salinidad es de 1,75% de NaCl, sin embargo no soporta concentraciones superiores a 3,5% de NaCl

La saprolegnia es muy versátil, puede actuar tanto saprófito como parasitoide, alimentándose de células muertas o parasitando a peces como la trucha y el salmón (Roberts, 1981). Las partes afectadas se ven cubiertas por una forma algodonosa de color blanco llamado micelio, compuesto de numerosas ramificaciones llamadas hifas.

Los hongos del género *Saprolegnia* cuentan con una estructura algodonosa, y un micelio poco organizado, en el ápice de las hifas se desarrolla un zoosporangio y en su interior se desarrolla una multitud de zoosporas biflageladas, las cuales una vez liberadas al medio buscan prontamente otro huésped.

La saprolegnia cuenta con una reproducción asexual por esporas móviles biflageladas, las cuales son producidas en estructuras denominadas zoosporangios y cuenta con una reproducción sexual mediante la producción de anteridios y ogonios.

Su dispositivo de infección consiste en esparcir zoosporas, fase asexual, que encontrarán un hospedero o un sustrato propicio para su desarrollo, algunas especies más invasivas cuentan con una especie de garfio que les permite adherirse al sustrato. Una vez encontrado el hospedero comienza el ciclo sexual mediante el cual se va infectando la ova u el pez. La saprolegnia afecta a la acuicultura durante toda la producción de agua dulce, siendo en las etapas de ovas, esmoltificación y reproductores aquellas de mayor susceptibilidad e impacto económico (Srivastava, 1987; Tampieri, 1998)

En el caso de las ovas, la saprolegnia es encontrada principalmente en huevos muertos y estériles siendo colonizados rápidamente, posteriormente se produce la propagación o infección en huevos vivos debido al contacto que se produce en la incubación. Huevos muertos son considerados como el principal foco de desarrollo y propagación de la saprolegnia. (Basulto y Flores, 1963; Vivar y Bernal, 1998).



Los peces cuentan con barreras físicas de defensa ante el ataque de saprolegnia como son escamas, mucosa (que recubre la piel del en situaciones) y epidermis (Wood y Willoughby, 1986). En el caso de salmónidos, el más susceptible al ataque de los hongos es el salmón del Atlántico, ya que al presentar gran pérdida y fragilidad de escamas lo predispone a la invasión de Saprolegnia.

La infección por hongo en los peces es atribuido principalmente a una disminución en las defensas del pez, lo cual produce una reducción en la secreción de mucus, que se

traduce en una baja en la formación de anticuerpos, heridas en la epidermis, pérdida de escamas. El estrés es un factor que tiene como consecuencia un exceso de producción de cortisol en la sangre, ocasionando una deficiencia proteica, la que no permite la producción de anticuerpos y de mucus.



Históricamente los tratamientos y técnicas para combatir a la saprolegnia han sido variados destacando la Sal común (NaCl): 1,5% (7,3 ppt) y 2,0% (10 ppt) (Padgett, 1984), la Formalina: Formaldehído 40% p/p (37% p/v), destacando el Verde de malaquita por su gran eficacia y eficiencia en el combate de la saprolegnia, sin embargo este producto hoy día es cuestionado por los países consumidores por su actividad cancerígena siendo prohibida la comercialización de salmónidos y derivados que hayan recibido algún tipo de tratamiento con este producto (Alderman, 1994). De aquí que la industria ha estado constantemente buscando nuevas alternativas para combatir la saprolegnia y existen en el mercado productos de eficacia relativa como el Bronopol, Pyceze (Pottinger y Day 1999), el Parasite-S: Formaldehído+Metanol, el Plasmicel: Cloruro de Benzalconio + Formaldehído y el Saprofin: Mezcla de aceites esenciales (Drymis winteri, Schinus molle, Cryptocarya alba y Eucaliptos dive),

Bibliografía

Alderman, D. J. 1994. Control de oomycete pathogens in aquaculture, In: G. J. Mueller, ed, Salmon Saprolegniasis. Bonneville Power Administration, Div. Fish and Wildlife, Portland,OR. pp 111-130.

Basulto, S., C. Flores. 1963. Saprolegnia en Peces, Rev. Soc. Med. Vet Ch. 11: 7-8.

Mayer, K. 1999. Saprolegnia: There's a Fungus Among Us. OSU Department of Fisheries and Wildlife.

Padgett, D. E. 1984. Evidence for extreme salinity tolerance in saprolegniaceous fungi (oömycetes). *Mycologia* 76: 372-375.

Pottinger, T.G., J.G. Day, 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. Diseases of Aquatic organisms Vol. 36: 129-141, 1999.

Roberts, R. J. 1981. Micología de los Teleósteos. En: Patología de los Peces. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp 235-247.

Srivastava, R. C. 1987. Fish Mycopathology current trends in life sciences-XIV. Today & Tomorrow's printers and publishers, New Delhi. p 107.

Tampieri, M. P. 1998. Mycoses of fish. *Med. Mycol.* 36: 216-219.

Vivar, V. M. 1997. Saprolegniosis en Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) en la piscicultura de Río Blanco (V Región-Chile). *Bol. Micol.* 12: 1-12.

Vivar, V. M., F. L. Bernal. 1998. Control de saprolegniosis por ácido acético, cloruro de sodio y verde malaquita en huevos de trucha arcoiris. *Bol. Micol.* 13: 29-34.

Wood, S., Willoughby, L, Beakes GW. 1986. Preliminary evidence for inhibition of Saprolegnia fungus in the mucus of brown trout, *Salmo trutta* L. following experimental challenge. *J Fish Dis* 9:557-560.

Capítulo 4.

El Tomillo (Thymus vulgaris) en el manejo de la saprolegniosis.

En este capítulo se presentan los resultados más relevantes del proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089 en relación al efecto preventivo y curativo de la incorporación del aceite de tomillo en baños como tratamiento de la saprolegniosis en ovas de trucha y salmón.

Efecto curativo y preventivo de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo para distintas cepas de saprolegnia.

Para el desarrollo del proyecto se obtuvieron seis muestras de agua provenientes de:

- ✓ Piscicultura Río Blanco (Saladillo, V Región).
- ✓ Piscicultura Entre Ríos (Talagante, Región Metropolitana).
- ✓ Lago Natri (Chiloé, X Región).
- ✓ Lago Tarahuin (Chiloé, X Región).
- ✓ Lago Llanquihue (Puerto Varas, X Región).
- ✓ Piscicultura CETECSAL (Chiloé, X Región).

De las cuales, se cultivaron 4 cepas, que se mantuvieron en un medio GYA, de agar, glucosa y extracto de levadura.

En estas cepas, se evaluaron concentraciones entre 50 a 500 ppm de aceite de tomillo mas una control (0 ppm de aceite de tomillo) en tratamiento preventivo, obteniendo los siguientes resultados.

- No todas las cepas reaccionan de la misma manera (Tabla 6).
- Se observó que hubo inhibición del crecimiento a partir de los 150 ppm de aceite de tomillo en la mayoría de las cepas. (Figura 8 y 9).
- Que el efecto inhibitorio es directamente proporcional al tiempo de exposición. Tabla 6 (Perrucci, Cecchini, 2006)

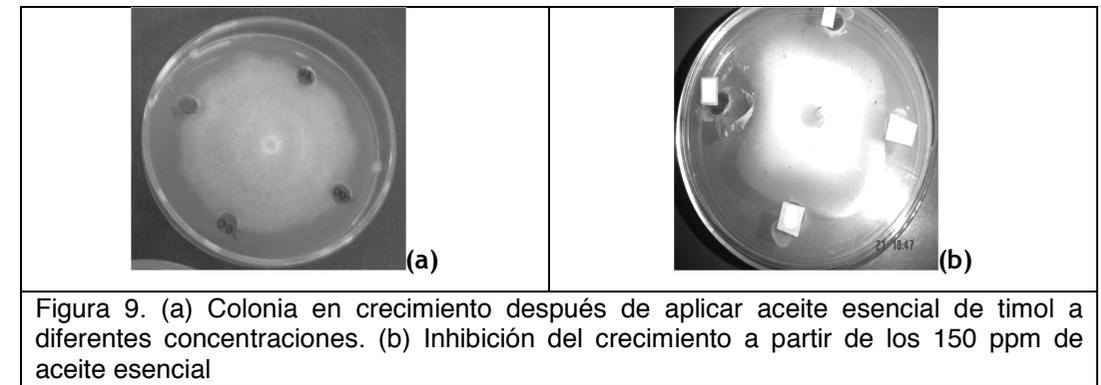
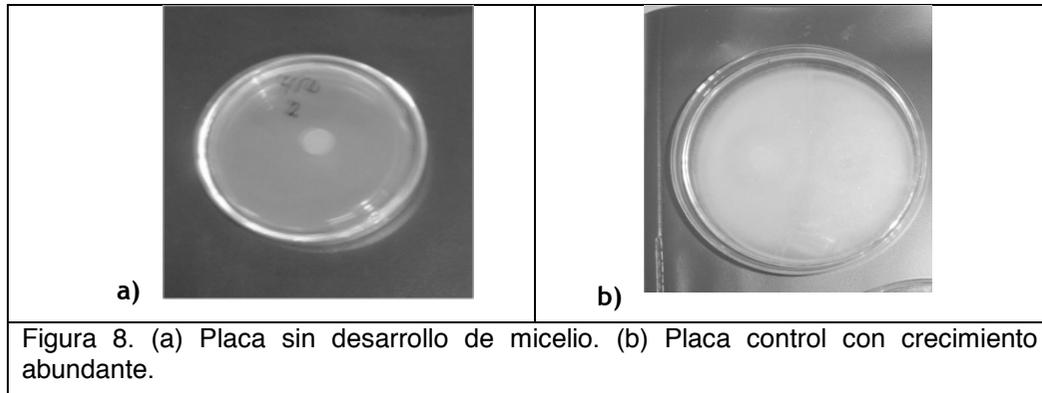


Figura 8. (a) Placa sin desarrollo de micelio. (b) Placa control con crecimiento abundante.

Figura 9. (a) Colonia en crecimiento después de aplicar aceite esencial de timol a diferentes concentraciones. (b) Inhibición del crecimiento a partir de los 150 ppm de aceite esencial

También se realizaron pruebas para determinar la actividad antifúngica curativa del aceite de tomillo en las cepas cultivadas obteniendo los siguientes resultados.

A las 72 horas de cultivo, todas las muestras estudiadas presentaron crecimiento abundante, no observándose inhibición del crecimiento fúngico. Al no observarse inhibición del crecimiento se procedió a realizar las siguientes pruebas:

a) Trozos de 4 mm de diámetro de agar GY, con hifas en crecimiento activo, se inocularon al centro de placas, de 10 cm de diámetro, con 20 ml de agar GY y se mantuvieron por 24 horas a 20°C. Posteriormente, se insertaron en forma equidistante 3 cilindros de vidrio en los cuales se adicionó 0,1 ml de solución de aceite esencial a concentraciones de: 50, 100 y 150 ppm; 200, 250 y 300 ppm; 350, 400 y 450 ppm.

b) Trozos de agar con hifas de *Saprolegnia* sp. en crecimiento activo, se dejaron por distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos), en concentraciones crecientes de aceite esencial (0-500 ppm) y posteriormente se lavaron en agua destilada estéril, se inocularon en placas con agar GY y se incubaron a 20°C por 72 horas. Para cada cepa y concentración las pruebas se realizan en triplicado.

Es posible observar que con el procedimiento (a) se obtuvo inhibición del crecimiento a partir de los 200 ppm y con el procedimiento (b) se observó inhibición del crecimiento en algunas de las colonias (Tabla 6) a partir de 100 ppm por 90 minutos. En concentraciones superiores no se observó crecimiento miceliar.

Tabla 6. Crecimiento de las cepas a diferentes tiempos y concentraciones de aceite de tomillo.

	Cepa 1			Cepa 2			Cepa 3			Cepa 4		
	100 ppm	150 ppm	200 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
30 min	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
60 min	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
90 min	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
120 min	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = crecimiento (-) = inhibición

Concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas de trucha arcoíris a nivel de laboratorio.

En diversos ensayos realizados por el Laboratorio de Cultivo y Alimentación de Peces de la Escuela de Ciencias del Mar LABCPAC, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, se determinaron concentraciones tolerables de aceite de tomillo en ovas. Se probaron concentraciones entre 10 y 1000 ppm de aceite esencial, las cuales se aplicaron en baños a distintos periodos de tiempos (Tabla 7 y 8).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere aplicar una concentración de 400 ppm de aceite de tomillo por un máximo de 2 horas. Los resultados indicaron que a medida que aumentó la concentración y el tiempo de aplicación de los baños, la mortalidad de las ovas aumenta. La máxima concentración y tiempo de aplicación resultaron ser 600 ppm y una hora de exposición. (Tabla 8)

Tabla 7. Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad de ovas de trucha sometidas a baños con aceite de tomillo a concentraciones entre 10 y 200 ppm a distintos tiempos.

[] aceite de tomillo (ppm)	15-30 min.		45-60 min.		3 horas	
	% ovas vivas	% ovas Muertas	% ovas vivas	% ovas muertas	% ovas vivas	% ovas muertas
10	100	0	100	0	100	0
20	100	0	100	0	100	0
30	100	0	100	0	100	0
40	100	0	100	0	100	0
50	100	0	100	0	100	0
100	100	0	100	0	90	10
150	100	0	100	0	100	0
200	80	20	100	0	90	10
Control	100	0	100	0	100	0

Tabla 8. Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad de ovas de trucha sometidas a baños con aceite de tomillo a concentraciones entre 400 y 1000 ppm, a distintos tiempos.

[] Aceite de tomillo (ppm)	60 min.		120 min.		180 min.	
	% ovas vivas	% ovas muertas	% ovas vivas	% ovas muertas	% ovas vivas	% ovas muertas
400	100	0	90	10	10	90
600	100	0	40	60	0	100
800	80	20	0	10	0	100
1000	40	60	0	10	0	100
Control	100	0	100	0	100	0

Concentraciones de aceite de tomillo para tratamientos preventivo de saprolegniosis en ovas de trucha arcoíris a nivel de laboratorio.

Una vez definidas las concentraciones tolerables para ovas, se evaluaron distintas concentraciones para el control de la saprolegnia mediante tratamientos preventivos a nivel de laboratorio. Se probaron en ova verde de trucha arco iris, baños de aceite a concentraciones de 50 ppm de Bronopol y de 0 a 400 ppm de aceite de tomillo. (Tabla 9). Resultando mas efectivo el baño con 100 ppm de aceite de tomillo, en términos de sobrevivencia y porcentaje de ovas con y sin hongos.

Un porcentaje mayor de ovas muertas con hongos significa que en el medio existen mejores condiciones de propagación para la saprolegnia, efecto que con el tratamiento con 100 ppm de tomillo se anularía. Por lo tanto, con estos resultados es posible indicar que baños con 100 ppm de aceite de tomillo, resultarían más efectivos que los otros tratamientos aplicados para la prevención crecimiento del hongo.

Tabla 9. Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad en ovas verde de trucha arcoiris expuestas a baños a distintas concentraciones de aceite de tomillo y Bronopol

[] de aceite de tomillo	Bronopol 50 ppm	0 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm
% Sobrevivencia	96	90	95	48	8	0
% Mortalidad	4	10	5	52	92	100
% C/Hongos	64	68	55	35	57	12
% S/Hongos	36	32	45	65	43	88

Validación del aceite esencial de tomillo para su uso en ovas de salmón del Atlántico a nivel de laboratorio.

Para validar el usos de aceite esencial de tomillo en ovas de Salmón Atlántico, se trabajo con concentraciones de 0, 200, 400 y 500 ppm por 30 minutos al día. Los resultados obtenidos indican que en los tratamientos de 400 y 500 ppm la mortalidad producida alcanza niveles sobre un 80% luego del primer baño, efecto similar obtenido en ovas de trucha.

La mortalidad registrada en la ovas de los tratamientos control y con 200 ppm de aceite, se debió específicamente a la infección por saprolegnia (Tabla 10 y Figura 10).

Tabla 10. Mortalidad producida en ovas verdes de S. Atlántico.

Ppm Ac. tomillo	Total Ovas	Baño 1		Baño 2		Baño 3		Baño 4	
		% vivas	% muertas						
0	750	99,7	0,3	83,3	16,7	46,7	53,3	0	100
200	750	94,3	5,7	81,7	18,3	28,3	71,7	0	100
400	750	18,3	81,7	21,7	78,3	0	100	0	100
500	750	8,3	91,7	0	100	0	100	0	100

Para observar el efecto del aceite de tomillo sobre la propagación del hongo, se continuó realizando el tratamiento, en aquellos tratamientos con 400 y 500 ppm de aceite de tomillo, el hongo no proliferó pasados 15 días de la muerte de las ovas, al contrario de lo ocurrido en los tratamientos control y con 200 ppm de aceite esencial de tomillo Figura 10 y 11 (Smith et al. 1985).

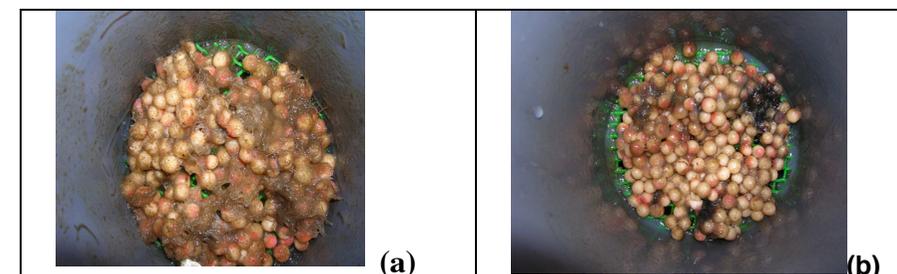


Figura 10. Ovas de S. Atlántico sometidas a baños con (a) 0 ppm y (b) 200 ppm de aceite esencial de tomillo.

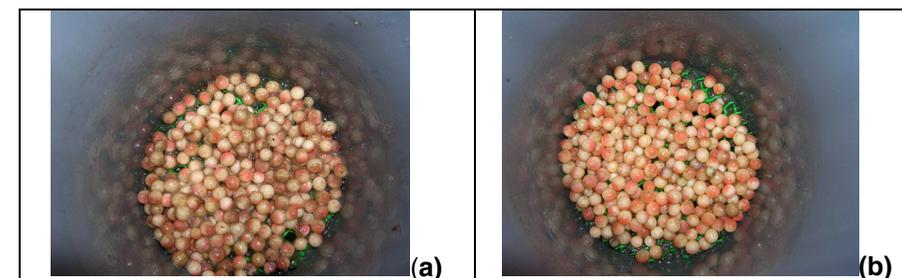


Figura 11. Ovas de S. Atlántico sometidas a baños con (a) 400 ppm y (b) 500 ppm de aceite esencial de tomillo. Se aprecia una menor formación de hongos.

Según estos resultados se recomiendan baños no superiores a las 300 ppm de aceite de tomillo para la prevenir la aparición de hongos, en ovas verdes de salmón del Atlántico.

Tratamiento curativo por baños en ova verde de trucha arco iris a escala piloto.

Las experiencias fueron realizadas en la Piscicultura de Río Blanco, Los Andes. Se probaron baños con aceite de tomillo de 400 a 800 ppm, teniendo como control un tratamiento de baño con 50 ppm de Bronopol. Los resultados de esta experiencia están dados según el porcentaje de ovas vivas, ovas muertas con hongo y sin hongo, así como el área cubierta por el hongo luego de haber efectuado baños cada 48 hrs. durante 35 días, hasta obtener ova con ojo

En el tratamiento con 400 ppm de aceite de tomillo (Tabla 11) se observó que al término de la experiencia había un 33% de ovas vivas en las cunas. Aunque la cantidad de ovas vivas fue baja, el área cubierta por el hongo también fue menor, comparado con las otras dos concentraciones de tomillo utilizadas. Este resultado sugiere que es posible utilizar aceite de tomillo a una concentración de 400 ppm como tratamiento curativo en ovas verdes de trucha arco iris. En los baños a 600 ppm y 800 ppm de tomillo, la totalidad de las ovas, no resistieron estas concentraciones de aceite de tomillo. Por lo cual se puede indicar que no es conveniente el uso de de aceite de tomillo en concentraciones de 600 y 800 ppm en tratamiento de *Saprolegnia sp.*, en ova verde de trucha arcoiris.

Comparativamente los baños con Bronopol mostraron mejores resultados que los baños de aceite de tomillo. Sin embargo, se hace crítico el tiempo de exposición, ya que en las primeras semanas el micelio del hongo en el tratamiento control era significativamente mayor, el hongo crecía a su máxima expresión, no así con cualquiera de los tratamientos con tomillo. Esto fue más evidente en los primeros 15 días de tratamiento (Pottinger y Day 1999).

Por lo tanto es preciso indicar que para los baños con 400 ppm, se deben definir estrategias de aplicación en la periodicidad de los baños y tiempo del tratamiento. Para esto último, es necesario verificar el tiempo en el cual se produce la reaparición de la saprolegnia en el agua de cultivo, una vez efectuado el tratamiento (Branson 2002).

Tabla 11. Porcentajes de sobrevivencia y mortalidad en ova verde de trucha arcoiris, con baños de aceite de tomillo a distintas concentraciones y 50 ppm de Bronopol.

Aceite de Tomillo [] ppm	% Ovas muertas		% Ovas vivas	Área hongo (cm ²)	Nº ovas /área
	% c/ hongo	% s/hongo			
400	30	37	33	282	914
600	55	45	0	405	1441
800	75	25	0	406	1429
50 ppm Bronopol	5	15	80	98	317

Tratamiento curativo por baños en ova con ojo de trucha arco iris a escala piloto.

Al igual que la experiencia anterior, los resultados están dados según el porcentaje de ovas vivas, ovas muertas con hongo y sin hongo, así como el área cubierta por el hongo al final de la experiencia. Como en la experiencia con ova verde se probaron concentraciones de 400, 600 y 800 ppm, siendo las dos últimas nocivas para las ovas, en la experiencia con ovas con ojo, se probaron concentraciones de 200, 400 y 500 ppm de tomillo. (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentajes de sobrevivencia y mortalidad por tratamiento curativo en ova con ojo de trucha arcoiris con baños a distintas concentraciones de aceite de tomillo y Bronopol.

Aceite de Tomillo [] ppm	% Ovas muertas		% Ovas vivas	Área hongo (cm ²)	Nº ovas/Area
	% c/ hongo	% s/hongo			
200	12	8	80	44	150
400	36	0	64	78	329
500	43	48	8	278	1043
50 ppm Bronopol	22	25	53	103	296

En esta prueba se obtuvieron mejores resultados a una concentración de 200 ppm, ya que se registró al final de la experiencia un mayor porcentaje de ovas vivas (80%), una menor área de propagación y un menor número de ovas infectadas que con los otros tratamientos. Estos resultados indican que es posible la utilización de 200 ppm de tomillo en el tratamiento curativo de ovas con ojos infectadas por *Saprolegnia sp.*, ya que la mortalidad es aceptable comparada con el tratamiento control y los demás tratamientos con tomillo. Baños a concentraciones de 400 y 500 ppm de aceite de tomillo no arrojaron buenos resultados, por lo que no se consideran recomendables.

Tratamiento preventivo en ova verde de trucha arco iris a escala piloto.

Los resultados de esta experiencia, al igual que la experiencia anterior, están dados por el porcentaje de ovas vivas, ovas muertas con hongo y sin hongo, así como el área cubierta por el hongo. (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentajes de sobrevivencia y mortalidad de tratamiento preventivo en ova verde de trucha arco iris a distintas concentraciones de aceite de tomillo y Bronopol.

Aceite de Tomillo	% Ovas muertas		% Ovas vivas	Área hongo (cm ²)	Nº ovas área
	% c/hongo	% s/hongo			
[] ppm					
400	24	30	46	107	380
600	80	20	0	327	1177
800	40	60	0	288	1066
50 ppm de Bronopol	14	34	52	135	522

En el tratamiento preventivo, con la aplicación de 400 ppm de aceite de tomillo se aprecia un mayor porcentaje de ovas vivas (46%), que en el tratamiento curativo (33%) Tabla 11. Lo que se podría considerar un buen resultado, debido a que en condiciones normales existe un picaje de ovas infectadas con hongo, por lo tanto el número de ovas vivas a esta concentración podría llegar a ser incluso mayor. Además, el número de ovas con hongo al final de la experiencia también fue menor, comparada con la misma concentración del tratamiento curativo. En definitiva se podría decir que es factible utilizar baños con 400 ppm de aceite de tomillo para la prevención del hongo, comparada con las otras dos concentraciones probadas.

Por otro lado con la utilización de concentraciones mayores, es decir 600 y 800 ppm no se encontraron ovas vivas al final de la experiencia, lo que confirmaría que no es factible la utilización de estas concentraciones para el tratamiento de *Saprolegnia sp.* en ovas verdes de trucha arcoiris.

Con el tratamiento con baños de Bronopol se pudo apreciar que arrojaron buenos resultados en cuanto a la cantidad de ovas vivas al final de la experiencia. Sin embargo, al comparar el área abarcada por el hongo obtenida con 400 ppm de aceite de tomillo, es menor utilizando esta concentración, que 50 ppm de Bronopol. La cantidad de ovas muertas sin hongo también resultó ser menor en el tratamiento con tomillo.

Este último resultado nos indica una vez más que es posible utilizar tomillo a una concentración de 400 ppm, ya que se estaría obteniendo una menor cantidad de ovas infectadas por el hongo. Es posible que estos resultados mejoren al afinar estrategias de manejo en la etapa de ova verde.

Tratamiento preventivo en ova con ojo de trucha arco iris a escala piloto.

Al utilizar baños con 200 ppm de aceite de tomillo (Tabla 14), se obtuvieron como resultado un 78% de ovas vivas al final de la experiencia. Este porcentaje es levemente superior que el tratamiento control, con el cual se logró un 77% de ovas vivas.

Utilizando una concentración de 400 ppm se obtuvieron al final de la experiencia un 82% de ovas vivas, cifra mayor a las dos concentraciones de tomillo utilizadas 200 y 500 ppm y al tratamiento control con Bronopol.

Los resultados registrados con la concentración de 500 ppm de aceite esencial de tomillo, confirman que es demasiado alta para ser utilizada en el control de *Saprolegnia sp.*, en ovas con ojo de trucha arcoiris.

En estas pruebas, de las tres concentraciones de tomillo utilizadas, el mejor resultado se obtuvo con una concentración de 400 ppm, en término de porcentaje de ovas vivas, menor área cubierta por hongo y menor número de ovas por área infectada.

Tabla 14. Porcentaje de sobrevivencia y mortalidad en ovas sometidas a distintas concentraciones de aceite de tomillo y Bronopol

Aceite de Tomillo	% Ovas muertas		% Ovas vivas	Área hongo (cm ²)	N° ovas área	Alevines al término de la experiencia		
	% c/hongo	% s/hongo				Muertos	Muertos c/hongo	Vivos
200	12	10	78	62	207	4	3	77
400	10	8	82	26	74	6	11	63
500	20	55.5	24.5	220	840	37	14	62
50 ppm bronopol	20	3	77	61	197	8	11	79

Conclusiones.

No todos los aceites de tomillo poseen el mismo perfil de ácidos grasos esenciales, se aconseja realizar previamente un perfil de ácidos grasos, para determinar con mayor exactitud las concentraciones en ppm de aceite de tomillo a utilizar.

Es posible el uso de aceite de tomillo para el control de la saprolegniosis en salmónidos. Sin embargo, su utilización dependerá del tiempo de aplicación, concentración, etapa de desarrollo y especie.

Se observó que en cultivo en placas, a partir de los 150 ppm de aceite de tomillo, se inhibe el crecimiento del hongo saprolegnia.

En ensayos de tolerancia en ovas de trucha arco iris, cuando estas se someten a baños de 200 ppm por tres horas, sobrevive un 90% de ellas, mientras que en ovas de salmón del Atlántico, se logra este mismo nivel de sobrevivencia, cuando el baño no sobrepasa los 30 minutos.

Se pueden aplicar baños de aceite de tomillo a 400 ppm como tratamiento preventivo y de control de la saprolegnia en ovas verde trucha. Para la etapa de ovas con ojo es posible emplear aceite de tomillo a concentraciones de 200 ppm pues resultan ser más sensibles.

Bibliografía.

Branson E. 2002. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *Vet Rec.* 151:539-441.

Carballo, M., M. J. Muñoz, & J. V. Tarazona. 1990. Inducción de estrés y aumento de susceptibilidad a *Saprolegnia* parasítica por compuestos tóxicos en *Oncorhynchus mykiss*, p. 733-737. *Actas III Congreso Nacional Acuicultura*. Santiago de Compostela, Spain.

Davidson P.M. & M.E. Parish. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43: 148–155.

Inouye S., M. Tsuruoka, M. Watanabe, K. Takeo, M. Akao, Y. Nishiyama & H. Yamaguchi. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses* 43: 17–23.

J. Stroh, 1 M. T. Wan, 1 M. B. Isman, 2 D. J. Moul, 3 1998. Evaluation of the Acute Toxicity to Juvenile Pacific Coho, Salmon and Rainbow Trout of Some Plant Essential Oils, a Formulated Product, and the Carrier Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Volume 60, Number 6 / junio de 1998 923-930.

Mahmound, A.-L.E. 1994. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology* 19: 110–113.

Paster N., B. J. Juven, E. Shaaya, M. Menasherov, R. Nitzan, H. Weisslowicz, & U. Ravid. 1990). Inhibition effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11: 33–37.

Perrucci, S., S. Cecchini. 2006 In Vitro antimycotic of some natural products against *Saprolegnia ferax*. *Phytotherapy Research* Vol. 9 (2): 147-149.

Pottinger, T.G., J.G. Day, 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic organisms* Vol. 36: 129-141, 1999.

Smith, S. N., R. A. Armstrong, J. Springate, G. Barker. 1985. Infection and colonization of Trout eggs by *Saprolegniaceae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85: 719-723.