

Kültürü Yapılan Çipuralarda (*Sparus aurata* L.) Görülen *Listonella anguillarum* Enfeksiyonu Üzerine Bir Çalışma*

Jale Korun

Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dumlupınar Bulvarı Kampus 07058, Antalya, Türkiye

*E mail: jalekorun@akdeniz.edu.tr

Abstract: A study on *Listonella anguillarum* infection occurred in cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). It was observed an infection with daily 3% mortality in a gilt-head sea bream and European sea bass farm located in around of Bodrum, Aegean Region of Turkey in November 2003. The seawater salinity was 33‰ and the seawater temperature was 18-19 °C during this term. In the diseased fish, loss of appetite, lethargy, loss of scale, haemorrhagy in the skin, especially at the base of fins, paleness of the liver, kidney, and spleen, haemorrhagy on the liver, yellowish-bloody fluid in the gut were observed. For diagnosis, gilt-head sea bream (eight fish) (300-350 g) were taken from cage in the sea and autopsied under sterile conditions. Bacterial inocula were made from visceral organs and blood and cultured on BHIA added with 1.5 % NaCl. After incubation at 22 °C for 48 hours, colonies grown on medium were examined for morphological, physiological, and biochemical properties. API 20E system and Mono-Va agglutination kit were also included in the study. As a result of the bacteriological study, the isolated strain from the diseased gilt-head sea bream was identified as a *Listonella anguillarum* strain. The main histological finding in the diseased fish was noted necrose of haemopoietic elements of spleen and hemosiderin deposits in the melanomacrophage centers of both spleen and kidney. Treatment was done with oxytetracycline added in feed (75 mg/kg/live weight). Fish losses lasted in the seventh day of the treatment.

Key Words: Gilt-head sea bream, *Sparus aurata*, vibriosis, *Listonella anguillarum*, oxytetracycline treatment.

Özet: 2003 yılının Kasım ayında, Türkiye'nin Ege Bölgesi Bodrum civarında bulunan bir çipura ve Avrupa levrek balığı işletmesinde günlük %3 ölüm oranı ile bir enfeksiyon gözlemlendi. Bu dönem esnasında deniz suyu tuzluluğu ‰33 ve deniz suyu sıcaklığı 18-19 °C idi. Hasta balıklarda, iştah kaybı, durgunluk, pul kaybı, deride özellikle yüzgeçlerin tabanında kanama, karaciğer, böbrek ve dalağın solgunluğu, karaciğerde kanama, bağırsakta sarımsı-kanlı sıvı gözlemlendi. Teşhis için, denizdeki kafesten ölmek üzere olan çipura balıkları (sekiz adet) (300-350 g) alındı ve aseptik teknikte otopsi yapıldı. Bakteriyel ekimler iç organlar ile kandan hazırlandı ve %1.5 NaCl eklenen BHIA da kültürü yapıldı. 22 °C de 48 saatlik inkübasyon sonrası, besiyerinde gelişen koloniler morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler için incelendi. API 20E sistemi ile Mono-Va aglütinasyon kiti de çalışmaya dahil edildi. Bakteriyolojik çalışmanın sonucu olarak, hasta çipura balıklarından izole edilen suş *Listonella anguillarum*'un bir suşu olarak tanımlanmıştır. Hasta balıklarda dikkati çeken başlıca histolojik bulgu; dalağın hemopoietik elementlerinde nekroz, hem dalak hem de böbreğin melanomakrofaj merkezlerinde hemosiderin birikimi oldu. Tedavi, yem içine katılan oksitetrasiklin (75 mg/kg/canlı ağırlık) ile yapıldı. Balık kayıpları tedavinin yedinci gününde durdu.

Anahtar Kelimeler: Çipura, *Sparus aurata*, vibriosis, *Listonella anguillarum*, oksitetrasiklin tedavisi.

*Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'nce 2005.05.0111.014 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Giriş

Çipura (*Sparus aurata* L.) balıkları ülkemizde Bodrum civarındaki çiftliklerde ağ kafeslerde kültürü yapılan türler arasında yer almaktadır. Türkiye de kültür çipura balıklarını etkileyen bakteriyel enfeksiyonlardan Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri türlerinin tanımlanması farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Candan, 1993; Çağırğan ve Yürekli, 1996; Kubilay ve Uluköy, 2004). Bu çalışmanın amacı; 2003 yılının Kasım ayında kültür çipura balıklarında görülen ve günlük %3 mortalite ile seyreden enfeksiyonun etkenini ortaya çıkarmaktır.

Materyal ve Yöntem

2003 yılının Kasım ayında Ege Bölgesi Bodrum civarındaki bir çipura-levrek balığı üretim işletmesinde günlük %3 mortalite

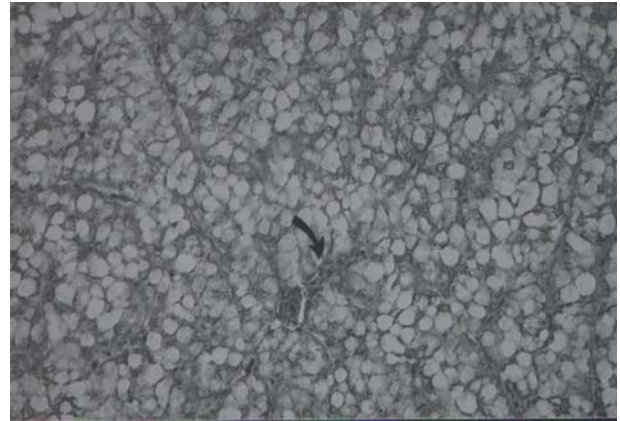
ile seyreden bir enfeksiyon görüldü. Deniz suyu sıcaklığının 18-19°C; tuzluluğunun ‰33 olduğu tespit edildi. Hastalığın teşhisini yapabilmek amacı ile çipura balıklarına (sekiz adet) (300-350 g) ventral ve lateral insizyonlar uygulandıktan sonra aseptik teknikte iç organları ortaya çıkarıldı. Karaciğer, dalak, böbrek ve kandan % 1.5 NaCl içeren Beyin Kalp İnfüzyon Agar (BHIA; Merck; Germany) besiyerlerine ekimler yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 22 °C de 48 saat süre ile inkübe edildi. Bu süre sonunda besiyerlerinde gelişen bakteri kolonilerinin morfolojisi ve rengi tespit edilerek, alt kültürleri yapıldı. İzole edilen bakteri suşunun hareketli olup olmadığının tespiti için asılı damla yöntemi; hücre morfolojisinin tespiti için Gram boyama yöntemi uygulandı. Suşun fenotipik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile sitokrom oksidaz (Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride; Sigma) reaksiyonu, katalaz üretimi (%3 H₂O₂), β-hemoliz (% 0.5 NaCl içeren %5 koyun kanı ilave edilmiş TSA da), O/129 (10 µg ve

150 µg; Oxoid) vibriostat ajanı ile hassasiyet ve/veya dirençlilik, Metil red ve Voges-Proskauer testleri (Mr-VP buyyonu; Merck), Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) testi (O/F temel besiyerine (Merck) %1 oranında glukoz (Merck) ilave edilerek hazırlandı), lizin (Merck) ve ornitin (Merck) dekarboksilaz üretimi (Moeller yöntemi), arjinin (Merck) dihidrolaz üretimi (Moeller ve Thornley yöntemleri ile hazırlanan besiyerlerinde), TSI da reaksiyon, Simmon's citrate agar da sitratı kullanma, nitrat redüksiyon testi, tuzsuz Nutrient buyyununda (içeriğinde tuz bulunmayan hazır besiyeri kullanılarak) tuzluluk tolerans testleri (%0 ve %7 NaCl), üreaz, jelatinaz ve amilaz üretimi, karbohidratlardan asit üretimi ve swarming (bir merkezden çoğalarak yayılma) testleri yapıldı (Thornley, 1960; Schneider ve Rheinheimer, 1988; Austin ve Austin, 1993; Baron ve diğ., 1994; Stavric ve Buchanan, 1995). API 20 E hızlı identifikasyon sistemi (BioMerieux, France) ile Mono-Va aglütinasyon kiti de (BIONOR, Skien, Norway, Prod. Cod.: DE 020) çalışmaya dahil edildi. API 20E test kitini uygulamak amacı ile bakteriyel süspansiyon %1.5 NaCl içeren steril saf su kullanılarak hazırlandı. Daha sonra homojenliği sağlanan bakteriyel süspansiyon, API 20E test stripte bulunan mikrotüplere dağıtıldı, üzeri plastik inkübasyon kapağı ile örtüldü ve 25 °C de 72 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, ayıraçlar damlatıldı ve API 20E test kitinin sonuçları değerlendirildi (Grisez ve diğ., 1991; Tanrikul ve diğ., 2004). İzole edilen bakteri suşunun antibiyotik duyarlılık testleri Mueller-Hinton Agar (Oxoid; England) da disk diffüzyon test yöntemi ile gerçekleştirildi (Bauer ve diğ., 1966; Barry ve Thomsberry, 1985; NCCLS, 2003). Ampicillin (10 µg), compound sulphonamides (300 µg), erythromycin (15 µg), flumequine (30 µg), kanamycin (30 µg), oxolinic acid (2 µg), novobiocin (15 µg), oxytetracycline (30 µg) ve trimethoprim (5 µg) olmak üzere dokuz antimikrobiyal madde denendi. Çalışmada materyal olarak kullanılan çipura balıklarının iç organlarındaki histolojik bulguların tespiti için karaciğer, dalak, böbrek, mide, bağırsak gibi iç organlara ait dokular ile solungaç ve kas dokularından numuneler alınarak, % 10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular daha sonra rutin doku işleme yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi (Culling, 1963; Bullock, 1989). Deri, kas, solungaç, karaciğer, dalak, böbrek, mide ve bağırsak ile hava kesesinden örnekler alınarak parazitolojik yönden incelendi (Collins, 1993).

Bulgular

Hasta balıkların dış yönden muayenesinde iştahsızlık, durgunluk, pul kaybı, solungaçlarda solgunluk, ağızda, operkulumda, deride ve özellikle anüs civarında kızarıklık görüldü. İç organların muayenesinde, hasta balıklarda dalakta genişleme, dalak, karaciğer ve böbrekte solgunluk, karaciğerde hemoraji, ascites, bağırsakta sarımsı renkli kanlı sıvı ile mukoid kitlenin bulunduğu tespit edildi. Mide-bağırsakta gıda maddelerinin bulunmadığı görüldü. 22 °C de 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hasta balıklardan izole edilen bakteri suşu; konveks, krem, parlak, opak kolonileri

oluşturdu. Suş; Gram-negatif, hareketli, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, 0/129 Vibriostat testine hassastı (Tablo 1). Çalışmada izole edilen bakteri suşu; *Listonella anguillarum*'a ait olduğu bildirilen fenotipik özelliklere (Baumann ve Furniss, 1994; Austin ve Austin, 1999) gösterdiği benzerlikten dolayı *L. anguillarum*'un bir suşu olarak tanımlanmıştır. Hasta balıklardan izole edilen bakteri suşuna ait fenotipik test sonuçları yine bu suşa ait API 20E sistemi sonuçları ile uyum gösterdi. Çalışmada *L. anguillarum* (önceden *V. anguillarum*) olarak tanımlanmış suş ile Mono-Va aglütinasyon kiti test ayırıcı kuvvetli pozitif aglütinasyon verirken, kite ait negatif kontrol ayırıcı ile suş arasında herhangi bir aglütinasyonun meydana gelmediği gözlemlendi. İzole edilen suşun flumequine, erythromycin, oxytetracycline ve novobiocine'e hassas; ampicillin ve kanamycin'e ise dirençli olduğu tespit edildi. Hasta balıklara yem içerisinde oksitetrasiklin (75 mg/kg/canlı ağırlık) tedavisi uygulandığında tedavinin yedinci gününde balık kayıpları durdu. Hasta balık dokularının histolojik yönden incelenmesi sonucunda karaciğerde hemoraji (Şekil 1), dalağın hemopoietik elementlerinde nekroz, dalak da melanomakrofaq merkezlerinde hemosiderin birikimi (Şekil 2), bağırsak mukoza epitelinde dökülme (Şekil 3), kalp kasında küçük inflamasyon odakları (Şekil 4), böbrek tübüllerinde hemopoietik elementlerinde melanomakrofaq merkezlerinde hemosiderin birikimi, solungaç filamentlerinin serbest uçlarındaki sekonder lamellalarında hemoraji gözlemlendi. Hasta balıklarda herhangi bir ekzo ve/veya endoparazite rastlanılmadı.

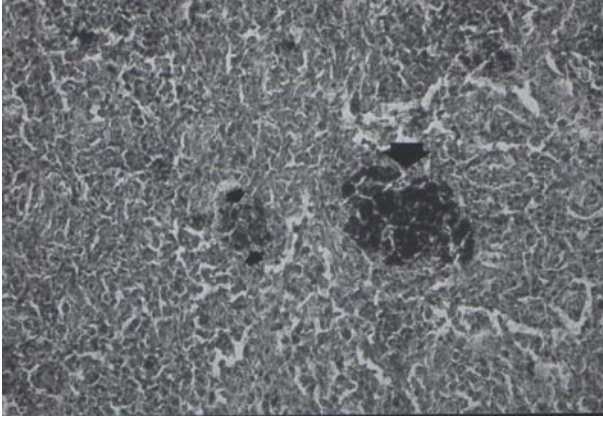


Şekil 1. Karaciğerde hemoraji (okla gösterilmiştir), hematoksilen-eosin boyama X 40

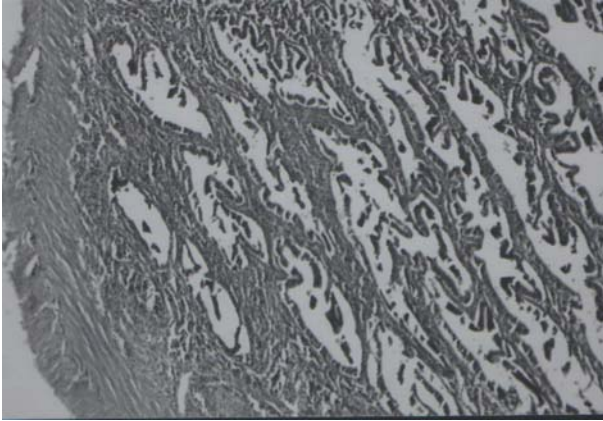
Tartışma ve Sonuç

Vibriosis deniz balıklarının en önemli hastalık sorunlarından bir tanesi olup bugüne kadar *Vibrio ordalii*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (önceden *V. damsela*), *V. carchariae*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* (non O1), *V. fischeri*, *V. harveyi* ve *V. splendidus* gibi diğer *Vibrio* türlerinin bildirilmesine karşın, *Listonella anguillarum* başlıca patojen olarak uzun süredir bilinmektedir (Christofilogiannis, 1993;

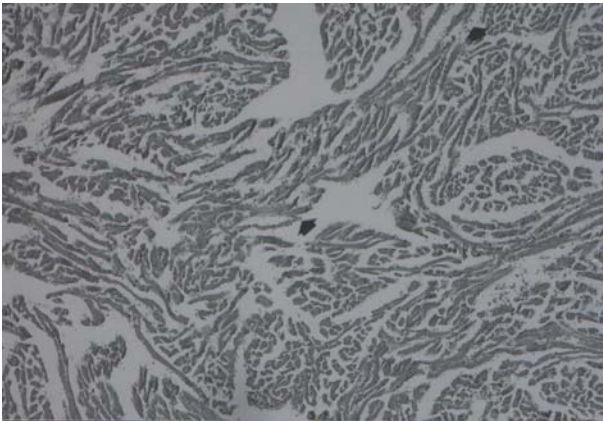
Noga, 2000). Ülkemizde kültür çipura balıklarında *Listonella anguillarum*'un görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur (Candan, 1993; Çağırman ve Yüreklitürk, 1996).



Şekil 2. Dalağın hemopoietik elementlerinde boşalma ve melanomakrofaj merkezlerinde yoğun hemosiderin birikimi (okla gösterilmiştir), hematoxilen-eosin boyama X 40.



Şekil 3. Bağırsak mukoza epitelinde dökülme, hematoxilen-eosin boyama X 10.



Şekil 4. Kalp kasında küçük inflamasyon odakları (ok ile gösterilmiştir), hematoxilen-eosin X 10.

Çalışmada *L. anguillarum* ile enfekte çipura balıklarında diğer araştırmacıların (Candan, 1991; Çağırman ve Yüreklitürk, 1996) bulgularına benzer klinik bulgular gözlemlendi. Bu bulgular; iştahsızlık, durgunluk, pul kaybı, solungaçlarda solgunluk, ağızda, operkulumda, özellikle yüzgeçlerin dip kısımlarında ve anüste kızarıklık, splenomegali, karaciğerde hemoraji, bağırsakta sarımsı renkli kanlı sıvı ile mukoid kitle idi. Bununla birlikte, bu çalışmada hasta çipura balıklarında Candan (1991) tarafından bildirilen ağız kenarında krem renkli mukus bulgusuna rastlanılmadı.

L. anguillarum, *V. ordalii*, *V. tubiashii* ve *Ph. damsela* subsp. *damselae* türlerinin bir dizi ortak fenotipik özelliklerinin bulunmasına karşın, bu türler bazı biyokimyasal testler ile birbirlerinden ayırt edilebilir (Toranzo ve Barja, 1990). Bu çalışmada izole edilen bakteri suşu; diğer araştırmacılar (Baumann ve Furniss, 1994; Actis ve diğ., 1999; Austin ve Austin, 1999) tarafından *Listonella anguillarum* için bildirilen özelliklere gösterdiği benzerlikten dolayı *L. anguillarum* bir suşu olarak tanımlanmıştır.

Mono-Va aglütinasyon test ayırıcı, *L. anguillarum* olarak tanımlanmış suş ile kuvvetli aglütinasyon meydana getirirken; kontrol ayırıcı ile herhangi bir aglütinasyonun meydana gelmediği tespit edildi. Bu bulgu, Romalde ve diğ. (1995) tarafından *L. anguillarum* için bildirilen bulgulara benzerlik gösterdi.

Bu çalışmada, *L. anguillarum*'un diğer balık türlerinde neden olduğu bildirilen histolojik değişikliklere (Frerichs ve Roberts, 1989; Noga, 2000; Korun, 2004; Timur ve Korun, 2004) enfekte çipura balıklarında da rastlanıldı. Hasta balık dokularının histolojik yönden incelenmesi sonucunda dalağın hemopoietik elementlerinde nekroz ve melanomakrofaj merkezlerinde hemosiderin birikimi, böbrekte hemopoietik dokudaki melanomakrofaj merkezlerinde hemosiderin birikimi gibi histopatolojik bulguların Candan (1991) tarafından bildirilen bulgulara benzerlik gösterdiği tespit edildi.

L. anguillarum'un kontrolünde, antibiyotiklerle tedavi, aşılama ve *L. anguillarum*'un gelişmesini engelleyen probiyotikler kullanılmalıdır (Actis ve diğ., 1999). Vibriosis'in kontrolünde oksitetrasiklin, potansiye sulphonamidler ve oxolinic acid gibi antimikrobiyal maddelerin etkili olmasına karşın, *L. anguillarum* ve *V. salmonicida* da bu ilaçlara karşı direnç artışı söz konusudur (Noga, 2000). Bu çalışmada yukarıda bahsedilenlerden farklı olarak izole edilen suşun oksitetrasiklin'e hassasiyet gösterdiği tespit edildi.

Mevcut çalışmanın sonucunda; hasta çipura balıklarında gözlenen vibriosis vakasından *Listonella anguillarum* bir suşu tanımlanmıştır. Hasta balıklara yem içerisinde oksitetrasiklin uygulandığında, ölümlerin azalarak tedavinin yedinci gününde ise balık kayıplarının durduğu gözlemlendi.

Tablo 1. Hasta çipura (*Sparus aurata* L.) balıklarından izole edilen bakteri suşunun fenotipik özellikleri ile API 20E test sonuçları.

Test	Fenotipik testler	API 20 E	Baumann ve Furniss (1994) & Austin ve Austin (1999)
Hareketlilik	+	*	+
Gram-boyama	-	*	-
Sitokrom-oksidadaz	+	+	+
O/F (Leifson)			
(Glükoz kullanılarak)	F	*	F
Katalaz	+	*	+
İndol	+	+	D
Metil-Red	-	*	-
Voges-Proskauer	+	+	+
Nitrat indirgeme	+	+	+
Swarming	-	*	-
ADH	+	+	+
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
H ₂ S üretimi	-	-	-
Jelatinaz	+	+	+
Üreaz	-	-	-
Amilaz	+	*	+
ONPG	+	+	+
% 0 NaCl de gelişme	-	*	-
% 7 NaCl de gelişme	-	*	*
Glükozdan gaz üretimi	-	*	-
Asit üretimi:			
Amygdalin	*	-	*
Arabinoz	-	-	D
Glükoz	+	+	+
İnositol	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Mellibioz	*	-	-
Ramnoz	*	-	-
Sorbitol	*	+	+
Sukroz	+	+	+
S. sitrat	+	+	+
Koyun hemolizi	+	*	*
TCBS de gelişme	+,S	*	+,S
0/129'a hassasiyet:			
10 µg/disk	H	*	H
150 µg/disk	H	*	H

+: pozitif, -: negatif, S: sarı, H: hassas, D: değişebilen sonuç, F: fermentatif, *: mevcut değil.

Kaynakça

- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., J. H. Crosa (1999): Vibriosis, p. 523-557. P. T. Woo and D. W. Bruno [eds.], Fish Disease and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, CABl.
- Austin, B. and A. Austin (1993): Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish, Chichester, Ellis Horwood.
- Austin, B. and A. Austin (1999): Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish, Third (Revised) edition, Chichester, Ellis Horwood.
- Baron, E. J., L. R. Peterson, S. M. Finegold (1994): Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 9th ed., USA, Mosby-Year Inc.
- Barry, A. L. and C. Thornsberrry (1985): Manual of Clinical Microbiology, Washington.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45: 36-49.
- Baumann, P. and A. L. Furniss (1994): Vibrionaceae, p. 190-272. W. R. Hensyl [ed.], Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Bullock, A. M. (1989): Laboratory methods, p. 374-405. R. J. Roberts [ed.], Fish Pathology. London, Baillière Tindall.
- Candan, A. A (1991): Çipura (*Sparus aurata* L. 1758) yetiştiriciliğinde mevsimsel olarak görülen hastalık etkenlerinin tesbit ve tedavi yönteminin geliştirilmesi. Fen Bil. Enst. İstanbul Univ. 76 s.
- Candan, A., 1993: Çipura (*Sparus aurata* L. 1758) balıklarında *Vibrio anguillarum* infeksiyonu. Türk Mikrobiyoloji Cem. Dergisi, 23: 25-27.
- Christoflogiannis, P. (1993): The veterinary approach to sea-bass and sea-bream, p. 379-385. L. Brown [ed.], Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Oxford, Pergamon Press.
- Collins, R. (1993): Principles of disease diagnosis, p. 69-89. L. Brown [ed.], Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Oxford, Pergamon Press.
- Culling, C. F. A. (1963): Handbook of Histopathological Techniques. London, Butter Worth Co. Ltd.
- Çağırğan, H. ve O. Yürekli Türk (1996): Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma. Bornova vet. Kontr. ve Araşt. Ens. Md. Derg., 21: 113-122.
- Frerichs, G. N. and R. J. Roberts (1989): The bacteriology of teleost, p. 320-336. R. J. Roberts [ed.], Fish Pathology. London, Baillière Tindall.
- Grizes, L., R. Ceusters, F. Ollevier (1991): The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. J. of Fish Diseases, 14: 359-365.
- Korun, J. (2004): Kültür levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax* L.) vibriosis ve pasteurellosis'in bazı diagnostik kitle ve laboratuvar yöntemleri ile teşhisi üzerinde bir çalışma. Fen Bil. Enst., İstanbul Üniv., 143 s.
- Kubilay, A. and G. Uluköy (2004): First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 24(3): 137-143.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard of Antimicrobial Susceptibility) (2003): Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests: Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS Document M2-A8, Pennsylvania, Wayne.
- Noga, E. J (2000): Fish Disease, Diagnosis and Treatment. Ames, First Iowa

- State University Press Edition.
- Romalde, J. L., B. Magariños, B. Fouz, I. Bandín, S. Núñez, A. E., and Toranzo A. E (1995): Evaluation of BIONOR Mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Dis. aquat. Org.*, 21: 25-34.
- Schneider, J. and G. Rheinheimer, G (1988): *Isolations Methods*, p. 73-95, *Methods in Aquatic Bacteriology*, Chicester, England, John Wiley and Sons Ltd.
- Stavric, S. and B. Buchanan (1995): The isolation and enumeration of *Vibrio vulnificus* from fish and seafoods, *Laboratory Procedure, MFLP-73*, Health Protection Branch, Ottawa, Government of Canada.
- Tanrikul, T. T., H. Çağırğan, E. Tokşen (2004): Levreklerden (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) İzole Edilen *Vibrio* Türlerinin API 20E Yöntemiyle İdentifikasyonu. *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 21(3-4):243-247.
- Thornley, M (1960): The differantiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism, *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 37-52.
- Timur, G. and J. Korun (2004): First outbreak of vibriosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 18(18): 1-9.
- Toranzo, A. E. and J. L. Barja (1990): A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. aquat. Org.*, 9: 73-82.