



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Avaluació d'una infestació de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) (Crustacea:Isopoda:Gnathiidae), a partir del seguiment i eradicació d'un brot a un sistema d'aquaris de grans dimensions**

Coral Hispano Vilaseca

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Avaluació d'una infestació de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) (Crustacea:Isopoda:Gnathiidae), a partir del seguiment i eradicació d'un brot a un sistema d'aquaris de grans dimensions.**

Coral Hispano Vilaseca





Departament de Microbiologia  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

**Avaluació d'una infestació de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804)  
(Crustacea:Isopoda:Gnathiidae), a partir del seguiment i eradicació  
d'un brot a un sistema d'aquaris de grans dimensions.**

Memòria presentada per Coral Hispano Vilaseca per optar al grau de Doctora per la  
Universitat de Barcelona.

Programa de doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia.

El director,

El tutor,

El doctorand,

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert   Dr. Anicet R. Blanch Gisbert   Coral Hispano Vilaseca

Barcelona, Novembre 2015



Als meus pares



## Agraïments

I per on començo? Arribar fins aquí ha estat gràcies al suport de molta gent, amics, família, companys de feina, ..., però sobretot aquest període de formació no hagués estat possible sense el suport de l'Aquàrium de Barcelona i de l'Anicet Blanch. Per tant, ara en toca agrair-los la seva ajuda i suport, paciència, treball, no sé, moltes coses més; tot i que qui em coneix una mica ja sap que no sóc gaire de fer aquests escrits, no perquè no apreciï l'esforç i l'amistat que m'han donat, sinó perquè sóc terriblement tímida i tinc un sentit del ridícul enorme (ve de família això, que hi farem).

Agrair a L'aquàrium, perquè no només va recolzar al Departament de Biologia amb tots els medis necessaris per resoldre un dels primers reptes més importants en la nostra trajectòria professional, sinó que també perquè m'ha permès aprofundir molt més enllà del que realment era necessari per complementar aquest treball. En general això ha estat així en diverses ocasions, en nombrosos estudis que s'han realitzat en el departament al llarg de tots aquests anys. Gràcies a aquest suport, crec que hem resolt molts entrebancs, d'altres no tan bé com ens hagués agradat, però sobretot ens ha permès adquirir nous coneixements que ens han permès millorar dia a dia en la nostra feina. Poder fer públic els nostres treballs, compartint-los amb la resta d'aquaris així com en un àmbit més obert, com poden ser els congressos o les publicacions, és d'agrair, ja que dona sentit a la nostra feina.

De fet, d'aquí va venir la idea de fer el doctorat. En principi jo tirava més per les publicacions (per evitar que tot quedés en un armari oblidat) i l'Anicet va ser qui em va proposar fer el doctorat a partir de les publicacions. Quasi tots els treballs tècnics que he realitzat a l'Aquari han estat tutelats per l'Anicet, des del primer protocol pel control de qualitat d'aigua fins al doctorat. Hi ha un munt de treballs tècnics que hem realitzat junts, i dels que he après molt i m'han ajudat a formar-me. Sense el suport de l'Anicet la meua formació a nivell científic no hagués tingut la trajectòria que ha esdevingut al llarg d'aquests anys. T'estic molt agraïda per tot, pels teus ensenyaments, les xerrades que hem mantingut algunes d'elles les recordo molt divertides i per la teua amistat. Ens vam conèixer a Torre de la sal, i allà també vaig coincidir amb molta gent que en va iniciar en el món de la investigació, i dels que mantinc un record molt afectuós, ja que sent becària, sempre els hi vaig agrair molt la seva dedicació i amistat. Part d'aquest treball em fa il·lusió dedicar-lo a tots ells, encara que hagin passat tants anys.

Abans he parlat de l'Aquàrium com empresa, però ara m'agradaria també agrair el seu suport als meus companys de departament. Patrici, moltes gràcies pel teu suport i confiança, portem molt anys treballant plegats i hem compartit un munt d'històries, m'agrada que t'agradi la feina. A l'equip d'Oceanari els hi agraeixo molt que m'ajudessin a recol·lectar el munt de mostres de gnàtia que vam agafar al llarg de tots aquests anys d'estudi; a la Sara, per la seva ajuda al laboratori i fer tan amena la feina amb les seves cançons; a l'Anna Nebot per les hores de feina que hem compartit i per la seva amistat; a la Marta i l'Olga pel temps que van compartir amb mi al laboratori, i en general a tot l'equip amb el que portem tants anys treballant plegats. Up's en deixo la Lucia, timó de l'equip i persona amb la que actualment compartim moltes hores de feina: *muchas gracias por tu amistad y por aguantarme en momentos bajos y altos (☺), sobretodo estos dos últimos meses que he ido un poco zombi por el trabajo.*

Gràcies al meu amic Xavi Isern per ajudar-me amb els dibuixos de la Gnathia, gràcies també pels teus sopars, tot i que ara que estaré més lliure em sembla que em toca a mi convidar-vos a casa.

No vull acabar aquest escrit sense deixar d'agrair a la família tot el seu suport, paciència i ajuda que m'han ofert al llarg de tots aquests anys, i encara més aquests darrers mesos. Sense ells no hagués pogut fer aquest treball. Al meu germà David, li dec poder presentar aquest treball a temps, gràcies a tot un cap de setmana intens d'ofimàtica. A l'Uri, la Carla i la Marina, els hi demano disculpes pels nervis, absències i *kaos* casero d'aquests darrers dies, quina paciència heu tingut amb mi, sempre m'heu animat molt a seguir endavant amb el doctorat i s'hi he arribat fins aquí és gràcies a vosaltres. Finalment m'agradaria dedicar aquest treball a l'Oriol, la Carla, la Marina, als meus germans i als meus pares.





# Índex

1	Introducció.....	17
1.1	Habitat i entorn aquàtic de la infestació estudiada. L'Aquàrium de Barcelona.....	17
1.1.1.	Situació dels aquaris d'exhibició durant el brot de la infestació.....	18
1.1.2.	Sistemes i entorns tècnics per la gestió de les aigües dels aquaris d'exhibició.....	21
1.1.3.	El sistema mediterrani:.....	26
1.1.4.	Gestió de salut de peixos a l'Aquàrium. ....	28
1.2.	Els Gnathidae. ....	32
1.2.1.	Els Gnathidae. ....	32
1.2.2.	Breu història dels gnàtids. ....	34
1.2.3.	Taxonomia actual dels Gnathidae. ....	41
1.2.4.	Morfologia dels Gnàtids.....	46
2	Objectius. ....	57
3.	Publicacions .....	63
3.1.	Capítol 1.....	63
	Journal of Applied Ichthyology 29 (2013), 1139-1144. ....	63
3.1.1.	Introducció. ....	63
3.1.2.	Objectius. ....	64
3.1.3.	Publicació.....	65
3.2.	Capítol 2.....	73
3.2.1.	Introducció. ....	73
3.2.2.	Objectius .....	75
3.2.3.	Publicació.....	77
3.3.	Capítol 3.....	87
3.3.1.	Introducció .....	87
3.3.2.	Objectius .....	88
3.3.3.	Publicació.....	89
3.4.	Capítol 4.....	107
3.4.1.	Introducció. ....	107
3.4.2.	Objectius .....	109
3.4.3.	Publicació.....	111
4.	Informes .....	133
4.1.	Informe sobre l' índex d' impacte.....	133
4.2.	Informe de coautoría. ....	134
5.	Discussió i conclusions .....	137
6.	Resum.....	157
7.	Bibliografia .....	163



## i Llista de taules i figures.

- 1.- Taulat nº1: Nombre d'espècies i organismes a l'Aquàrium de Barcelona.
- 2.- Taula nº2: Característiques dels tancs del S3.
- 1.- Fig.-1 Filtre biològic
- 2.-Fig.-2 Filtre de sorra.
- 3.-Fig.3 Protein skimmer.
- 4.-Fig.- 4 Panel elèctric.
- 5.-Fig.- 5 Ultraviolats.
- 6.-Fig.- 6 L'Oceanari.
- 7.-Fig.- 7 *Labrus bergylta* amb gnàtids a la cavitat bucal. Coral Hispano, 2012.
- 8.-Fig.- 8 Representació de les formes dels Isòpodes marins.
- 9- Fig.- 9 Diferents estadis del cicle biològic de *Gnathia maxillaris*. Zuphea, praniza i adults (femella i mascle). Coral Hispano, 2014.
- 10- Fig.-10 Mascle. Cap. Coral Hispano, 2014.
- 11- Fig.- 11 Femella. Cap. Coral Hispano,2014.
- 12- Fig.- 12 Zuphea. Cap. Coral Hispano, 2014.
- 13- Fig.- 13 Praniza. Cap. Coral Hispano, 2014.
- 14- Fig.-14 Peces bucals d'una larva zuphea. Coral Hispano,2014.
- 15- Fig.-15 Vista dorsal mascle. Femella vista dorsal i ventral. Corall Hispano, 2014.
- 16- Fig.- 16 Zuphea i praniza. Coral Hispano, 2014.
- 17- Fig.- 17 Enumeració de les larves de l'Oceanari, any 1997-2001.

18- Fig.- 18 Enumeració de les larves de l'Oceanari, any 1997.

19- Fig.- 19 Enumeració de les larves a l'Oceanari, any 1998-2003.

20.- Fig.- 20 Enumeració de les larves a l'Oceanari, any 2004-2005.

## **ii Abreviatures**

m<sup>3</sup> metres cúbics

N nitrogen total

P1 praniza 1

P2 praniza 2

P3 praniza 3

PS Protein skimmer

S3 sistema Mediterrani

UV ultraviolats

WoRMS World register of marine species-crustacea

Z1 zuphea 1

Z2 zuphea 2

Z3 zuphea 3



# **1. Introducció**





## **1 Introducció.**

### **1.1 Habitat i entorn aquàtic de la infestació estudiada. L'Aquàrium de Barcelona.**

L'Aquàrium de Barcelona va inaugurar-se al setembre de 1995. Va ser el primer aquari d'exhibició construït a Espanya, d'aquells que llavors se'n deien de nova generació: aquaris de gran volum amb sistemes tecnològics molt avançats. Els aquaris passaren a ser independents dels parcs zoològics i representaven centres on l'educació i la divulgació del medi marí formava part del seu valor afegit, apart evidentment del seu paper comercial i lúdic. L'Aquàrium de Barcelona està ubicat al Moll d'Espanya, centre cultural, lúdic i comercial del Port Vell de Barcelona. És un dels centres lúdics més visitats de la ciutat, junt amb la Sagrada Família, Museu Picasso o el Parc Güell.

L'Aquàrium és membre de la AIZA (Associació Ibèrica de Zoos) i de la EUAC (European Union of Aquaria Curators).

L'edifici té un total de 10.000 m<sup>2</sup> de superfície i 5.000 m<sup>3</sup> d'aigua. Es caracteritza per ser un dels centres amb una col·lecció més important al món d'espècies marines del Mediterrani, tant de peixos com d'invertebrats. Hi ha un total de 116 d'espècies de peixos i un total de 91 d'espècies de invertebrats que mostren la gran biodiversitat d'aquest habitat marí. També podem trobar organismes de diferents ambients tropicals tan marins com d'aigua dolça (Taula nº1).

Hi ha tancs o aquaris de gran volum que mostren diferents ambients, i es per això que les dimensions, la decoració i les espècies d'organismes són un tret diferencial de cada un d'ells, ja que representen un habitat ecològic diferent. Hi ha panels explicatius en cada un dels tancs, on s'explica les característiques d'aquets ambients i s'identifiquen les espècies de peixos

e invertebrats que formen part d'aquests. A la Taula nº2 es descriuen cada un dels tancs d'exhibició.

Tipus	nº Espècies	nº Individus
Amfibis	7	42
Invert. Mediterrani	91	2932
Invert. Tropical	73	248
Peixos mediterranis	116	4338
Peixos tropicals	174	1204
Peixos d'aigua dolça	64	1393
Rèptils	5	9
Aus	1	18
<b>Total</b>	<b>531</b>	<b>10.184</b>

Taula nº1: nombre d'espècies i organismes a L'Aquàrium de Barcelona.

### 1.1.1. Situació dels aquaris d'exhibició durant el brot de la infestació.

A inicis de l'any 1997 es va detectar una infestació de *Gnathia maxillaris* en el sistema mediterrani de l'Aquàrium de Barcelona. El sistema Mediterrani és el sistema més emblemàtic d'aquesta instal·lació, no només pel fet de ser el sistema amb major volum (3,700 m<sup>3</sup>) i nombre de tancs (12), sinó també per què és el sistema amb el major nombre de peixos i diversitat d'espècies. En aquell moment, els sistemes de gran volum encara no havien madurat del tot, i tot just començàvem a conèixer bé el funcionament del sistema de filtració d'aigües. Es disposava ja d'una aportació d'aigua de mar procedent de la platja de la Barceloneta. L'aigua provenia dels pous del Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals (CMIMA) situats a la mateixa platja i gràcies a una conducció de canonades era subministrada a l'Aquàrium. Aquest sistema mediterrani

de l'aquàrium es considera que va trigar aproximadament entre 2 i 3 anys a madurar. La maduresa del sistema es va valorar sota diferents criteris, com van ser: la consolidació i estabilització de la filtració biològica, una correcta qualitat microbiològica de l'aigua, els nivells de nitrats a l'aigua, i sobretot una constància en el funcionament de la filtració, de tal manera que no comportés grans renovacions d'aigua al sistema o canvis bruscos en certs paràmetres fisicoquímics de l'aigua que afectaven a la població d'animals.

Des del punt de vista de la població, la maduresa de cada tanc s'estableix per l'equilibri generat entre les diferents espècies que hi conviuen en captivitat. L'estudi de les poblacions que representen un habitat, i que d'inici es va fonamentar en referències bibliogràfiques, va anar madurant a mida que passa el temps i s'adquireixen experiències i coneixements sobre aquests organismes que hi conviuen sota condicions de captivitat. La biodiversitat de peixos ja havia començat a augmentar degut a una millora de la qualitat d'aigua, tot i que encara el nombre d'espècies de invertebrats era molt baixa. A l'any 1997, hi havien al sistema mediterrani 80 espècies i un total aproximat de 2500 peixos. Aquest sistema portava funcionant un any i mig des de la inauguració de les instal·lacions al setembre de 1995.

A finals d'aquest any, s'acabava de realitzar el primer protocol per al control de patologies de peixos (revisat posteriorment a l'any 2004 i 2013). Aquest protocol es va basar, en dos fonts de informació:

1.- Bibliogràfica: tot i que es disposava en aquell moment d'una bibliografia escassa sobre el control sanitari en aquaris, era prou pràctica (Stoskopf, 1993; Spotte, 1992). També es va consultar bibliografia provinent del camp de l'aqüicultura.

2.- Intercanvi d'informació a nivell tècnic entre els diferents aquaris d'Europa, a través de la European Association of Aquarium Curators (EUAC).

Així, l'aparició de la infestació de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804), fou sobtada, inesperada i realment abrupta, degut a que era un tipus de paràsit desconegut per al personal tècnic de l'Aquàrium; a que no hi havia pràcticament documentació sobre aquestes situacions, ni a nivell d'aqüicultura ni d'aquariofília. En aquells temps les referències bibliogràfiques disponibles no li donaven gaire importància a aquets brots i menys en peixos en captivitat.

Era la primera vegada que s'havia d'enfrontar a una actuació terapèutica sota aquelles condicions de gran volum d'aigua, amb una elevada densitat poblacional de peixos, en un sistema semitancat sota filtració d'aigua i en plena activitat d'exhibició al públic.

És per això, que es va establir urgentment l'objectiu d'estudiar quina era la millor actuació per combatre la infestació del paràsit (capítol 1 d'aquesta tesi), caracteritzar l'agent causant i immediatament es va veure la necessitat de millorar el coneixement d'aquesta espècie (capítol 2 i 3 d'aquesta tesi), i determinar els procediments de tractament més adients sota les condicions del sistema per tal de contenir, controlar i si fora possible eradicar el paràsit (capítol 1 i 4 d'aquesta tesi).

Els estudis realitzats han estat de llarga durada, iniciant-se al 1997 fins a l'actualitat.

L'estudi que es va realitzar a l'Aquàrium de Barcelona, es va basar en quatre camps de informació:

1.- La bibliogràfica i experiència en altres aquaris.

2.- La informació que es podia extraure directament del sistema afectat.

3.- La informació que es podia generar a nivell de laboratori.

4.- El suport tècnic de la Universitat de Barcelona.

### **1.1.2. Sistemes i entorns tècnics per la gestió de les aigües dels aquaris d'exhibició.**

L'Aquàrium funciona com un sistema semitancat, això vol dir que tot i que l'aigua dels sistemes és depurada contínuament gràcies al pas de l'aigua a través de la filtració. Hi ha un 20% de renovació setmanal d'aigua. Aquesta aigua de mar prové d'un pou situat a la platja de la Barceloneta de 7 metres de profunditat. L'aigua es impulsada per una bomba afavorint el pas a través de la sorra cap al pou i d'aquest cap a l'Aquàrium a través d'una conducció que passa sota l'aigua del Moll d'Espanya. Aquesta filtració de l'aigua a través de la sorra suposa una filtració d'aproximadament unes 50 micres. Una vegada l'aigua arriba a les instal·lacions de l'Aquàrium es emmagatzemada en un tanc de reserva de 65 m<sup>3</sup>. Prèviament hi ha un control de temperatura i salinitat.

L'Aquàrium està estructurat en sistemes que cal diferenciar dels aquaris o tancs d'exhibició. Un sistema és un tanc o conjunt de tancs que comparteixen un sistema de filtració d'aigua. Quan un sistema necessita una nova aportació d'aigua, aquesta prové del tanc de reserva. L'aigua és tracta per llum ultraviolada i entra en el sistema corresponent a través de la unitat de filtració, mai directament als aquaris i/o tancs. Es a dir, l'aigua abans d'entrar a l'aquari passa per les diferents unitats que formen la filtració: *protein skimmer*, filtre mecànic, UV, bescanviador de calor, filtre biològic i torre de control de pH. D'aquesta manera no resulta factible l'entrada d'agents patògens de l'exterior, evitant de manera vehicular que es donin malalties d'origen extern. Els sistemes (aquaris i les seves conduccions) tenen un 20% de renovació d'aigua setmanal i un *turn-over* entre 2-4hores, que és el temps que triga a passar tota l'aigua d'un sistema per la filtració.

Com a mesura de seguretat a un possible empitjorament de la qualitat físic-química i biològica de l'aigua, l'entrada d'aigua externa es tanca si hi hagut pluges fortes o temporals a prop de costa.

A l'Aquàrium es parla de "sistemes" per a diferenciar els tancs d'exhibició. Tal i com s'ha indicat anteriorment, un sistema és un tanc o conjunt de tancs que comparteixen un sistema de filtració d'aigua. El sistema de filtració està dissenyat en funció al volum d'aigua que ha de tractar, els elements i el seu ordre sempre és el mateix. L'aigua que baixa per gravetat surt del tanc (aquari) ja sigui per l'escumadora de superfície com per les arquetes de fons cap a un tanc intermedi. La sortida de l'aigua d'aquest tanc que va cap al protein skimmer (PS) ve regulada per bombes de manera que es controla sempre el cabal d'aigua que passa per la filtració (Fig.-3) . L'aigua que entra al PS ho fa per la part superior (conus) en forma de dutxa. Per la part intermèdia del PS s'injecta aire amb ozó. L'ozó millora l'eficiència del PS al trencar les molècules de proteïna i greix afavorint que les cadenes hidrofòbiques s'adhereixin a les bombolles d'aigua i s'elimini d'aquesta manera la matèria orgànica dissolta a l'aigua. Les aigües residuals o escumes s'expulsen a la part superior sent xuclades i derivades cap un tanc d'efluents.

El segon element de la unitat de filtració és el filtre mecànic o de sorra (Fig.-2), que elimina la matèria en suspensió. Aquest filtre conté un llit de sorres estratificades en granulometries descendents i té una capacitat de filtració de 125 m<sup>3</sup>/h. El diàmetre de la partícula filtrada és de 0,01 mm. Posseeix un sistema de reflux per a que la sorra no es compacti. La neteja es realitza per contra rentat amb l'aigua del sistema.

Una vegada l'aigua ha passat a través del filtre de sorra, la conducció es divideix en dos ramals: el primer passa pels UV (Fig.-5) i el bescanviador de calor; i el segon ramal passa per la torre biològica i una petita part de l'aigua posteriorment es deriva a la torre de pH.

El filtre biològic (Fig.-1) consisteix en un dipòsit cilíndric amb dos tercers parts omplert per bioboles, com a substrat per al creixement bacterià de *Nitrobacter* i *Nitrosomonas*. Les bioboles estan dissenyades per aconseguir una màxima superfície de biofilm de bacteries nitrificants en un mínim volum i així afavorir l'eficiència d'aquesta unitat. El paper dels filtres biològics és disminuir els nivells d'amoni i nitrits, substàncies considerades tòxiques per als organismes aquàtics. Les dimensions del dipòsit depenen de la biomassa del sistema, es considera que fa falta  $1\text{m}^2$  de superfície de substrat per 1 gram de N. Les bioboles que s'utilitzen en els grans sistemes tenen una relació de  $250\text{m}^2/\text{m}^3$ . L'aigua entra per la part superior en forma de dutxa.

Els UV (Fig.-5) es fan servir per reduir i controlar la càrrega bacteriana de l'aigua. L'eficiència depèn del cabal que passa a través de les llums, del gruix de làmina i de la matèria en suspensió que hi ha a l'aigua. Les unitats de UV consisteixen en uns dipòsits cilíndrics o cambres amb 18 làmpades de UV (Phillips TUV 55W Ho) protegides per tubs de quars disposats de manera concèntrica.

Una vegada l'aigua ha estat filtrada passant per totes aquestes unitats es reprèn a la canonada d'aportació al sistema que distribueix de nou l'aigua entre els diferents tancs que el formen.

La filtració està controlada per un sistema de monitorització. Cada sistema té un panel elèctric (Fig.-4) que controla el funcionament de cada una de les unitats i dels paràmetres físic-químics que s'analitzen a través de sondes ubicades a diferents punts del circuit. La informació es bolca a l'ordinador en un programa dissenyat per al control de la seguretat funcional del sistema, i disposa d'alarmes acústiques i lumíniques per advertir de qualsevol error que es pugui detectar en el funcionament de la filtració. Addicionalment s'obtenen registres gràfics de les lectures efectuades en continu dels paràmetres que controla el sistema.



L'aigua de mar de rebuig dels sistemes s'aboca al Moll d'Espanya a través de pluvials. Aquesta aigua prèviament passa per la torre d'ozó per a ser desinfectada i minimitzar el risc mediambiental. Semestralment es fa un control de l'aigua que s'aboca per a complir el control exigít per l'Agència Catalana de l'Aigua. Aquest abocament s'analitza per un laboratori extern, mesurant els següents paràmetres: amoni, fosfats, pH, DBO5, TOC i MES. Els resultats s'anoten en el llibre de registre del laboratori.



Fig.1 Filtre biològic



Fig.2 Filtre de sorra



Fig. 3 Protein skimmer



Fig. 4 Panels elèctrics UV



Fig. 5 UV

### 1.1.3. El sistema mediterrani:

El sistema mediterrani està format per 12 tancs de diverses mides que representen un habitat marí diferent. A més a més, també forma part del sistema, tota una sèrie de petits aquaris situats al llarg del recorregut de temàtica específica, com per exemple cavallets de mar, invertebrats o *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758). La descripció dels tancs es mostra a la Taula nº 2.

SISTEMA 3: SISTEMA MEDITERRANI									
Tanc	Nom Tanc/aquari	volum m3	diàmet m	Alçada m	Long m	Amplada m	Biomassa Kg	Nº Sp peixos	Nº Sp Invert.
EM-1	Comunitat rocosa soma	90,56		1,9	7,75	6,15	92,7	13	3
EM-2	Comunitat de costa sorrenca	8,04		1,37	7,79	0,75	15,215	15	8
EM-4	Comunitat de coves i esquerdes	16,46		1,67	2,93	3,36	50,05	10	10
EM-5	Comunitat altina	5,85		1,2	1,74	2,8	16,51	18	11
EM-6	Comunitat d'alguers	7,02		1,57	1,45	3,08	6,93	17	10
EM-7	Comunitat precoral·ligen	7,02		1,57	1,45	3,08	4,82	14	9
EM-8	Comunitat coral·ligen	7,02		1,57	1,45	3,08	2,77	5	18
EM-9	Comunitat zona intermareal	90,2		2,85	9,96	6,24	100,61	21	8
EM-10	Comunitat pelàgica	39,28		2,95	4,03	3,3	82,7	7	0
EM-18	Oceanari	3.700	35	5,2			5,118,4	36	2
EM-19	Illes Medes	125,32		4	7,16	4,37	188,6	10	2
EM-20	Pops	5,85		1,4	2,78	4,37	0,45	1	2
Inv.1	Invertebrats bentònics	0,54		0,6	0,6	1,5		0	11
Inv.2	Crustacis	0,22		0,6	0,6	0,6	0,075	3	2
Inv.3	Cargols i ermitans	0,22		0,6	0,6	0,6		0	8
EM-Cv	Cavallets	0,7		0,5	2	0,7	0,395	12	30
Ps-1	Canícules	0,25		0,45	1,2	0,45	0,2	1	2
Ps-2	Cavallets	0,34		0,9	0,75	0,5	0,5	1	5
Ps-4	Coralls	0,045		0,4	0,25	0,45		0	1
Ps-5	Llagostes	0,06		0,4	0,3	0,5		0	1

Taula nº2: Característiques dels tancs del S3.

És el sistema més complex, amb més nombre de tancs, volum i biodiversitat. Per ell circulen més de 4.000 m<sup>3</sup> d'aigua. L'Oceanari és el tanc més important del sistema ja que conté 3.700 m<sup>3</sup>. Representa la

mediterrània com a mar obert i en ell s'ubiquen diverses espècies de teleostis i d'elasmobranquis, entre els que trobem els taurons toro (*Carcharias taurus*) i els grisos (*Carcharhinus plumbeus*). El tanc de forma circular té 35 m de diàmetre i 5 metres de fondària i l'entravessa un túnel de metacrilat per on s'endinsa el públic al mig del tanc.

La filtració d'aquest sistema consta de 9 mòduls de filtració (A, B, C, D, E, F, G i H), tots ells amb PS, filtre de sorra i UV. Els mòduls A, B i C tenen addicionalment cadascun un filtre biològic de grans dimensions. Una part de l'aigua del filtre biològic del mòdul A es deriva cap a la torre de pH. L'aigua d'aquests tres mòduls de filtració s'aboca directament al tanc de l'Oceanari. Dels mòduls G i H una part de l'aigua que surt dels UV es deriva cap al bescanviador de calor, i l'altra part es reconduïda cap als aquaris. L'aigua que es recull d'aquests mòduls (D, E, F, G i H) es distribueix al sistema a través d'un anell situat al llarg del perímetre de l'Oceanari, des d'on surten diferents canonades de distribució cap als altres tancs del sistema.

No tota l'aigua d'aquest sistema mediterrani passa per la filtració, una tercera part de l'aigua de l'Oceanari recircula contínuament gràcies al mòdul J. El mòdul J està format per 6 bombes que bombegen 600 m<sup>3</sup>/h d'aigua cadascuna. La funció d'aquest mòdul és crear una forta circulació a l'Oceanari per afavorir l'homogeneïtzació de l'aigua en tot el tanc, un bon contingut de gasos dissolts a l'aigua, i facilitar la respiració dels taurons, que neden a contracorrent precisament per afavorir el pas de l'aigua a través de les brànquies.

El *turn-over* del sistema mediterrani és aproximadament de 3 hores, i es renova un 20% setmanal. Les tasques de manteniment comporten una neteja de metacrilats, decoració i sorres de manera continuada. Als animals se'ls dona de menjar en dies alternatius. Cada tanc del sistema mediterrani rep un tipus de menjar diferent en funció de la biomassa i de les espècies que conté. El control de la població dels tancs s'efectua a

través de la base de dades de població que gestiona el departament i que comporta un control del nombre d'espècies, individus i biomassa tan a nivell de peixos com de invertebrats.

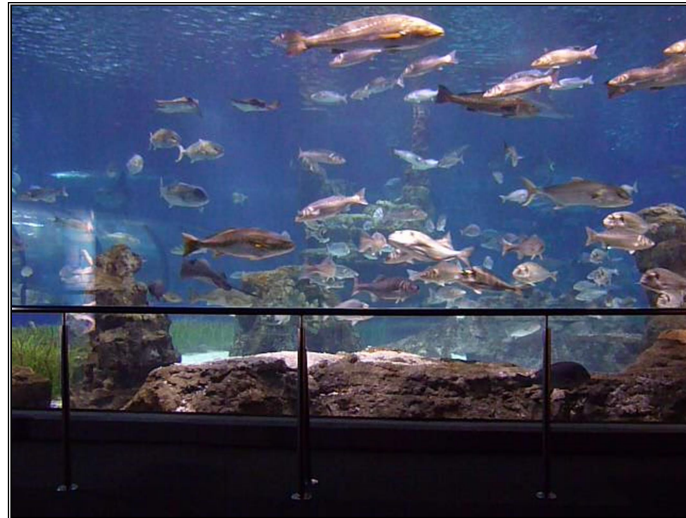


Fig.- 6 L'Oceanari.

Els peixos abans de introduir-los al sistema passen per un període de quarantena (exceptuant els taurons de grans dimensions i els peixos lluna). A la sala de quarantena després de passar per un període d'adaptació a la captivitat se'ls hi fa tota una sèrie de tractaments preventius per tal de minimitzar el risc de patologies.

El sistema però compta amb un pla d'actuació preventiu de patologia, efectuant tractaments periòdics preventius d'aquelles patologies que s'han detectat en els peixos del sistema.

#### **1.1.4. Gestió de salut de peixos a l'Aquàrium.**

El departament de Biologia ha elaborat uns protocols que permeten gestionar la salut dels peixos amb la intenció d'assegurar-se una bona adaptació i manteniment d'aquests en condicions de captivitat. Aquests documents s'han realitzat sota la supervisió del Veterinari responsable de la gestió de salut dels organismes i d'assessors externs.

El Departament considera important tres aspectes principals per dur a terme aquesta tasca:

- 1.- La qualitat de l'aigua.
- 2.- El control de les patologies.
- 3.- La nutrició dels organismes.

Respecte a la qualitat de l'aigua, tenint en compte que els peixos son poiquiloterms i que el seu estat fisiològic depèn directament d'una bona qualitat de l'aigua, es té en compte varis punts que afecten directament a la gestió de l'aigua.

El primer punt seria l'obtenció d'una bona aigua d'aportació a les instal·lacions. El segon punt és el disseny dels sistemes, aquests han de ser adequats a allò que es vol representar, a més, la filtració ha d'estar adequada al volum i biomassa del sistema. El tercer punt, seria la definició dels paràmetres que defineixen un habitat determinat i el control d'aquests per a que l'aquari mantingui al màxim una constància en els valors que han estat establerts. El sistema de filtració ha d'ésser capaç de realitzar-ho de manera constant.

Respecte al control de patologies en aquaris, només l'experiència de cada centre i el seu disseny pot ajudar a establir com realitzar el protocol bàsic d'actuació respecte al control de patologies als aquaris d'exposició. Generalment l'actuació s'inicia fent passar tots els organismes per un període de quarantena. Aquest període te dos objectius, el primer seria l'adaptació dels peixos a la captivitat; el segon paper seria realitzar tractaments preventius per tal de minimitzar la incidència de les malalties a exposició.



Fig. 7 *Labrus bergylta* amb gnàtids a la cavitat bucal. Coral Hispano 2012.

A nivell d'exposició, les actuacions terapèutiques són molt limitades, degut a les dimensions dels tancs/aquaris, a la biodiversitat que presenten i a l'impacte negatiu envers la qualitat de l'aigua. La majoria de productes no es poden aplicar degut a la toxicitat que presenten envers als invertebrats i elasmobranquis. Segons l'afectació que presenten els peixos, per exemple, si és individual o d'uns pocs o generalitzada, es valora el fet de fer el tractament "*in situ*" o bé si es pugen els animals a la secció d'hospital de quarantena. El tractament, a exposició es pot aplicar a nivell oral o de bany. Als aquaris d'exhibició és habitual manipular certs paràmetres físic-químics de l'aigua que poden ajudar a controlar una infestació en un aquari o sistema. Per exemple, el sistema mediterrani, es manté a una temperatura constant a llarg de l'any entre 17 i 18°C, degut a que s'ha comprovat que la incidència de protozous, tant a nivell de ciliats com de flagel·lats, es quasi inexistent. Un altre exemple seria el control de protozous ciliats en peixos tropicals baixant la salinitat a valors fins a 20 per mil, o bé, pel contrari la pujada de la salinitat a 10-15 per mil, en peixos d'aigua dolça.

El laboratori i la sala de quarantena juguen un paper important a l'hora d'avaluar l'eficiència dels productes terapèutics, s'estudien també les

seves aplicacions, així com d'altres actuacions que poden ajudar a controlar una infestació. La sala compta amb tancs i aquaris destinats a realitzar els tractaments, secció hospital, a on es poden estudiar diferents productes per avaluar la seva eficiència, l'afectació al sistema de filtració o la sensibilitat dels peixos. Al laboratori es realitzen necròpsies per tal de determinar la causa de mortalitat (Fig.-7). S'estudien també mètodes per detectar la presència de paràsits per més tard es poden aplicar a exposició. Aquests tipus d'activitat queden ben exposades en els estudis i aplicacions que es detallen en els treballs experimentals realitzats en els capítols 1 i 4 d'aquesta tesi doctoral.

Tant a quarantena com a exposició, els treballs de neteja són constants, el manteniment dels aquaris, tancs i material d'aquariofília és importantíssim tan a nivell de qualitat d'aigua com de control de malalties principalment de tipus parasitàries. Als aquaris d'exposició l'extracció de la sorra del fons i la seva desinfecció, així com el sifonat de la decoració, juguen un paper molt important per controlar les parasitosis, ja sigui per eliminació d'ous o bé directament per l'eliminació dels paràsits. De nou es disposa d'un bon exemple en les tasques realitzades i explicades en el capítol 1.

La gestió de la nutrició dels aquaris està lligada a la gestió de les poblacions del tancs, ja que les dietes que es preparen depenen de les espècies que cohabituen, les talles i la biomassa. Es busca una dieta variada i a l'hora concreta per a cada espècie que compleixi al màxim els valors nutricionals adequats per a la seva salut. El càlcul de la biomassa de cada un dels aquaris ens ajuda a calcular la quantitat de menjar i en cas necessari a aplicar les dosis establertes en els tractaments de tipus orals.



## **1.2. Els Gnathidae.**

### **1.2.1. Els Gnathidae.**

La Família Gnathidae compren els isòpodes marins que pertanyen a la Superfamília Cymothooidea. Són hematòfags i ectoparàsits de peixos, tant de teleostis com d'elasmobranquis. Posseeixen un cicle bifàsic: és a dir una fase larvària paràsita de peixos i una fase d'adults que viuen lliurement en el bentos marí. Els adults no s'alimenten i sobreviuen gràcies a les reserves de nutrients que han acumulat durant la fase larvària (Smith, 1904; Monod, 1926). Presenten un dimorfisme sexual molt acusat (Monod, 1926). Tenen una mida que pot anar des de 1mm en la fase de zuphea 1 (Z1) fins una mida de uns 8-9 mm d'un mascle adult. Com a paràsits tenen una baixa especificitat per l'hoste (Grutter, 1994), tot i que hi ha algunes espècies que sí que són hoste específics (Paperna and Por, 1973).

Respecte als isòpodes els gnàtids presenten diversos caràcters que els identifiquen:

- 1.- Es diferencien per presentar 5 parells de potes envers dels 7 parells que solen presentar els isòpodes (Monod , 1926).
- 2.- El seu tòrax és més ample que l'abdomen.
- 3.- Presenten un cicle bifàsic.

Els Gnathiidae són un grup de isòpodes molt versàtils amb una ampla distribució arreu del món, que va des dels pols fins als tròpics. S'han trobat en els diferents ambients tan costaners i intersticials com a la plataforma continental i al fons batials dels oceans (Coetzee, 2006).

La identificació de les espècies es basa encara actualment a partir de la descripció dels caràcters morfològics que presenten els mascles. Aquest fet dificulta moltes vegades la identificació dels individus que es troben, ja

sigui per mostreig de plàncton o per l'obtenció de larves fixades als peixos. És per això que darrerament s'estan realitzant estudis morfològics per a poder diferenciar les larves (Wilson et al., 2011) o bé s'està treballant per caracteritzar les espècies a partir del seu ADN (Nagël et al., 2008; Grutter, et al., 2000).

De les 230 espècies que representen a la família Gnathiidae el cicle biològic tan sols ha estat descrit en 9 espècies de les quals, 4 son del gènere *Gnathia* (Leach , 1914). El cicle comporta tres fases larvàries, amb dos estats larvaris diferents, el de zuphea i el de praniza. La larva zuphea, a partir de la qual s'inicia el cicle (Z1), neda per a fixar-se a l'hoste i una vegada s'ha fixat comença a xuclar la sang o limfa. El perèion es dilata (pereonite IV, V i VI) perdent la típica segmentació. La praniza formada (P1) passa al bentos a on digereix l'aliment i al cap d'uns dies muda de nou a zuphea (Z2). Aquest procés que es repeteix tres vegades al llarg del cicle es considerat com l'etapa de creixement de les formes juvenils. Per tant es diferencien tres fases de zuphea (Z1, Z2 i Z3 ) i tres fases de praniza (P1, P2,P3). A l'última fase la praniza pateix la metamorfosi per passar a adult. Aquest és el patró de cicle que segueixen en general les espècies de gnàtids que s'ha aconseguit descriure el cicle biològic tot i que s'han trobat algunes variacions com en el cas de *Caecognathia calva* (Vanhöffen, 1914) descrit per Wägele (1987 , 1988) a on s'observa una estat de pre-masclé no descrit en els altres casos.

En estudis realitzats en el medi mostren que les larves de Gnathidae han estat trobades en mostres de plàncton diürnes (Hammer , 1981) i nocturnes (Stepien and Brusca , 1985). Les mostres nocturnes són més elevades en nombre de larves (Hobson and Chess, 1976). S'ha observat que els nivells d'infestació també són més elevats a hores nocturnes (Paperna and Por , 1977: Pots , 1973; Grutter, 1999). Normalment els gnàtids com a plàncton demersal son un component del bentos durant el dia, emergeixen durant la nit per endinsar-se a la columna d'aigua en

busca de l'hoste, i retornen al bentos abans de la sortida del sol. Estudis de camp sobre la dinàmica de les poblacions dels gnàtids realitzats per Grutter, (1997-1998) a l'Illa de Lizard, quantifiquen el nombre de pranizas fixades en els peixos a la sortida i a la posta del sol, demostrant que la presència de paràsits decreixia durant el dia, i que la seva presència era més abundant durant la sortida del sol que no pas a la posta. L'activitat nocturna de les larves *Gnathia vorax* (Lucas, 1849) també ha estat observada en gàbies d'espàrids situades a una profunditat menor als dos metres (Paperna and Por , 1977). En aquaris aquest fet també va ser constatat per Poots i col·laboradors (Poots et al., 1973).

S'han descrit nombrosos casos de gnàtids que parasiten peixos tan teleostis com elasmobranquis en el medi natural (Monod , 1926; Honma and Chiba 1991; Genc , 2005 , 2007). Sembla ser que algunes espècies de la família *Gnathiidae* són altament específiques respecte a l'hoste que parasiten mentre que d'altres espècies ho són molt menys, com per exemple, *G.piscivora*, *G.maxillaris*, *G.vorax* (Paperna and Por , 1973; Giannetto et al. , 2003).

Una baixa infestació té poques conseqüències en l'hoste, encara que pot representar danys al teixit branquial (Honma and Chiba, 1991), transmetre coccidis (Davies , 1982) i/o malalties bacterianes (Honma and Chiba, 1991). Un infestació elevada de gnàtids pot provocar la mort de l'hoste, tot i que aquests cas s'ha observat tan sols en peixos mantinguts en captivitat (Bunkley et al. , 1998; Paperna and Por , 1977; Mudgride and Stallinbrass , 1983; Palmer et al., 1984).

### **1.2.2. Breu història dels gnàtids.**

Tal i com s'ha comentat anteriorment, durant el primer període d'estudi d'aquest grup d'isòpodes la seva classificació va ser molt confusa. La diferenciació morfològica i ecològica que presenten les larves i els adults va situar les distintes fases del cicle com a diferents espècies situades en

diferents taxons. Des del punt de vista taxonòmic, aquest grup no està tancat, i actualment s'està treballant en la seva classificació a mida que apareixen noves espècies facilitant l'estructuració de les diferents famílies que el componen.

Els inicis de l'estudi d'aquesta família cal situar-los a finals del segle XVIII tal i com es descriu en el recull històric realitzat per C. Espence Bate a l'any 1868 i posteriorment en els estudis de Theodore Monod a l'any 1926.

A finals del segle XVIII, el zoòleg holandès Martinus Slabber va il·lustrar per primera vegada una larva de Gnathiidae trobada a les costes de la illa de Walcheren (Holanda). En el seu estudi comenta que és "un insecte estrany i difícil de classificar", dins d'un gènere Linneà. Per tal de donar-li a aquesta pràctica una posició taxonòmica, la situa en el gènere de *Oniscus* i la denomina *Oniscus marinus* (Slabber, 1768) tot i que reconeix que té els seus dubtes per la poca similitud d'aquest organisme amb aquest grup taxonòmic. Més tard i després de consultar l'obra de M. Houttuyn conclou que s'assembla més al grup taxonòmic a on es situen els "Taon du mer" (*Asilus marinus*) (Monod, 1926).

A l'any 1804 Montagu descriu per primera vegada un mascle de *Gnathia* al que denomina *Cancer maxillaris* (Montagu, 1804), troba l'exemplar a les costes del sud d'Anglaterra. Tot i que aquest individu no presenta l'uròpode, es reconeix per la il·lustració que és tracta d'un mascle de *Gnathia*. Una dècada més tard el mateix Montagu, a l'any 1813, descriu una larva a la que anomena *Oniscus caeruleatus* (Montagu, 1813). Aquest autor dubta sobre la seva classificació taxonòmica i la relaciona amb el mascle trobat anteriorment pensant-se que potser s'ha de crear un nou gènere dins de la classificació Linneana.

El gènere *Gnathia* va ser proposat per Leach a l'any 1814, i situa a *Cancer maxillaris* (Montagu, 1804) com a *Gnathia termitoides* (Leach,

1814) dins del grup dels Malacostracea. Leach publica una nova classificació dels crustacis a la L'Enciclopèdia d'Edimburg (vol. VII) on divideix els Malacostracis en tres tribus: Brachyuri, Macrouir i Gasteruri. En aquesta classificació els isòpodes (a excepció dels Gnathidae) es continuen situant com a Miriàpodes dins dels insectes, però separa a la resta de crustacis.

Leach sospità que la larva *Oniscus caeruleatus* (Montagu , 1813) és la femella de *Gnathia termitoides* (Leach , 1814). Durant molt temps la larva i la femella es van confondre sota el nom de praniza.

A inicis del segle XIX existia una gran confusió en la sistemàtica d'aquest grup, es creen diferents gèneres per situar larves i adults de gnàtids (Monod , 1926; Smit and Davies, 2004). Així a l'any 1816 Risso proposa el gènere *Anceus* a on situa un mascle que denomina *Anceus forficularis* (Risso , 1816) sense tenir en compte el gènere *Cancer* creat per Montagu al 1804. Més tard a l'any 1817, basant-se en Leach, Latreille crea el gènere *Praniza* (Latreille , 1814) i hi posa les larves amb el perèion inflat. Latreille rebutja per complert el gènere *Anceus* de Risso. Poc després, a l'any 1826, Risso crea el gènere *Zuphea* (Risso , 1826) per a situar les larves segmentades dels Gnathidae. Durant el següents anys varis zoòlegs com Risso, Otto, Westwood, Johnston, Kröyer, Edwards, Lucas descriuen varies espècies dels gèneres *Praniza* (Latreille , 1814) i *Anceus* (Risso , 1816). (Monod , 1926).

La relació entre aquests gèneres va ser descoberta per Hesse en els estudis realitzats entre els anys 1855 i 1857, publicats a l'any 1864 en l'obra "Mémoire sur les pranizes et les Ancées" ,aclarint la confusió que hi havia en aquest grup. En aquesta obra Hesse, descriu els diferents estadis del cicle, constatant per primera vegada el fet de que al final de la fase larvària les larves pranizas pateixen una metamorfosi a adults. El dimorfisme que presenten els adults respecte les pranizas, és la raó per la qual s'havien realitzat diversos errors en la seva classificació. Aquest

autor comenta que en estat larvari no es pot diferenciar el sexe de les pranizas. També indica que el mascle i la femella quan són adults presenten característiques morfològiques molt diferents, fins al punt que és difícil de creure que són de la mateixa espècie, si no s'ha observat anteriorment la seva transformació. Aquesta situació, també es pot observar entre les larves i els adults, i que es podria pensar que són crustacis d'espècies diferents. De fet Hesse, menciona que ell és el primer en descriure una femella adulta de *Gnathia*. Cita també que aquests crustacis tan curiosos presenten aquestes singularitats tan particulars, degut a que la seva vida es troba dividida en dos períodes ben diferenciats: el primer, com a paràsits de peixos a l'estadi de pranizas. En aquest estadi són hematòfags i les seves peces bucals estan modificades per a la succió i la fixació en l'hoste. En el segon període d'adults són bentònics, i ha modificat les peces bucals en apèndix laminars (pilòpodes) i mandíbules. Hesse reconeix que els *Anceus* descrits per Risso i d'altres autors, amb un cap robust i grans mandíbules, és el mascle d'aquest gènere; i que la praniza descrita per Leach i d'altres autors, amb un cap petit, és l'estadi d'adult femella.

El treball de Hesse presentat al 1864 és molt complert. Al conservar pranizas en aigua de mar fa el seguiment a adults, i ho aprofita per a estudiar la metamorfosi, així com els diferents aspectes de la reproducció com la fecundació, el període de incubació i el seguiment dels embrions dins del marsupi. Al mantenir els individus en condicions de laboratori ho aprofita per a fer una descripció morfològica dels diferents estadis.

En observacions fetes a camp, Hesse comenta que la reproducció d'aquests crustacis sembla que es doni al llarg de tot l'any sense que hi hagi una gran interrupció, ja que troba larves al llarg de tot l'any. Viuen en família i en gran nombre. Les pranizas les troba fixades al cap, cos i aletes de l'hoste.

En aquesta obra Hesse descriu 11 mascles d'espècies diferents, que separa en quatre categories, en funció de la forma de les mandíbules. Manté el gènere *Anceus* de Risso per les diferents espècies que troba.

A l'any 1855, Bate descriu una larva que denomina *Praniza edwardsii* (Bates , 1855), tot i que més tard es veuria que es tractava d'una femella de *Gnathia* (Leach, 1914). Després d'estudiar i rebutjar els resultats de Hesse arriba a les següents conclusions: i) que els *Anceus* (observats per Hesse) són individus adults; ii) a l'any 1858 observa postes realitzades per pranizas i per tant aquestes són individus adults; iii) les pranizas, conseqüentment no poden desenvolupar-se en *Anceus*; iv) que *Anceus* (Risso , 1813) és un gènere diferent a *Praniza* (Latreille, 1817); i per últim, v) que els mascles d'ambdós gèneres encara no han estat descoberts. Més tard, accepta la relació que Hesse realitza entre els gèneres *Praniza* (Latreille , 1817) i *Anceus* (Risso , 1813) considerant que poden ser mascle i femella d'un mateix gènere, però rebutja el fet que representin diferents fases del cicle biològic. Està conforme seguint les normes de prioritat en acceptar la denominació del mascle abans que el de la femella per a que es mantingui en el grup en la família dels Anceidae. Bate comenta que com el mateix Leach ha omès el gènere *Gnathia* en els seus últims treballs i a més ja existeix un gènere anomenat *Gnathium* proposat per Kirby prefereix adoptar el nom de *Anceus* per aquests animals (Bate, 1868; Monod, 1926).

A partir d'aquests estudis els autors accepten els termes de praniza i zuphea per a diferenciar entre la larva alimentada de la no alimentada. A finals del segle XIX el gènere *Anceus* es reemplaçat pel gènere *Gnathia*. En aquesta època autors com Wagner (1866), Dohrn (1870) o Sars (1898) entre d'altres van contribuir amb els seus estudis a descriure millor aquest grup, descrivint un gran nombre de noves espècies.

A l'any 1895, G.O. Sars en la seva obra " An account of the Crustacea of Norway" descriu els diferents estadis de *Gnathia maxillaris* (Montagu ,

1804). Més tard al 1972, Naylor descriu la confusió que té l'autor entre dos espècies diferents de Gnathiidae, ja que en realitat la descripció del mascle té moltes mancances i per tant la seva ubicació és dubtosa, i a més a més la femella sembla ser que correspon a *Gnathia oxyuraea* (Lilljeborg , 1855). Al llarg del temps ha estat força habitual la confusió entre *G. maxillaris* (Montagu , 1804), *G. vorax* (Lucas , 1849) i *G. oxyuraea* (Lilljeborg , 1855). Smith al 1904, descriu el cicle biològic de *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) amb mostres recol·lectades a la badia de Nàpols. En aquest treball fa un estudi sobre la metamorfosi de les pranizas a adults. En aquest estudi desconeix les diferents fases del cicle, és per això que no acaba d'entendre les diferents mides que observa en les pranizas; l'aparició d'una larva segmentada gegant i el dimorfisme que observa en els mascles i en les femelles observant mides molt dispars (entre 1 i 8 mm). Això respon a una la confusió d'espècies ja que en la zona de recol·lecció hi conviuen *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1813) i *Gnathia vorax* (Lucas, 1849). Més tard, a l'any 1909, Brian realitza un estudi sobre la descripció de les diferents fases larvàries , barrejant individus de les espècies de *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) i de *Gnathia oxyuraea* (Lilljeborg , 1855).(Monod , 1926). A l'any 1926, Theodor Monod escriu "Les Gnathiidae. Essai monographique (morphologie,biologie, systématique)", que fou un dels treballs més complets fins aleshores sobre la biologia, morfologia i sistemàtica d'aquest grup d'animals. En aquest estudi a més de fer un recull de la bibliografia, estudia la biologia i morfologia de *Paragnathia formica* (Hesse , 1864) i realitza la descripció de totes les espècies conegudes fins llavors. A l'obra es poden trobar un total de 62 espècies, de les quals 24 són noves espècies. Entre elles ja podem trobar una bona descripció de *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804), incloent-hi il·lustracions. Actualment és una de les obres que es fan servir per a identificar espècies de Gnathiidae. El mateix any, Mouchet (1928a) estudia el cicle biològic de *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) descrivint correctament les diferents fases larvàries de zuphea i praniza, i els tres estadis larvaris pels quals



passen abans de convertir-se en adults. El cicle descrit per Mouchet més tard es veuria confirmat per altres autors a l'estudiar altres espècies de gnàtids com és el cas en *Gnathia piscivora* (Paperna and Por , 1977) al 1997 per Paperna et Por o *Gnathia africana* (Barnard , 1914) per Smit and Basson al 2003, entre d'altres.

Al llarg de la primera meitat del segle XX, es van descriure 29 espècies noves de la família Gnathiidae per diferents autors (Stebbing, 1905; Barnard, 1914a,b , 1929, 1925; Monod, 1926 ), donant a conèixer fins a 69 espècies noves de la família Gnathiidae. Destaca el gran nombre de treballs referents als Gnathiids a partir de la segona meitat del segle XX , tan a nivell de taxonomia com de morfologia o d'aspectes generals referents a la seva biologia. Es descriuen un gran nombre d'espècies noves (Cohen and Poore , 1994; Holdich and Harrison , 1980; Nunomura , 1981 , 1982 , 1992 , 1998; Coetzee, 2008). Al final del segle XX es coneixien 166 espècies de la família Gnathiidae.

El treball realitzat per Cohen and Poore a l'any 1994 a nivell de filogènia i biogeografia reorganitza la família Gnathiidae en 10 generes, entre els quals hi ha dos de nous, el gènere *Monodgnathia* Cohen and Poore, 1994 i el gènere *Gibbagnathia* Cohen and Por , 1994. Els altres generes son *Bathygnathia* (Dollfus, 1901); *Bythognathia* (Camp, 1988); *Caecognathia* (Dollfus, 1901); *Elaphognathia* (Monod, 1926); *Euneognathia* (Stebbing, 1893); *Gnathia*, (Leach, 1814); *Paragnathia*, (Omer-cooper&Omer-Cooper, 1916) i *Thaumastognathia* (Monod, 1926). Actualment s'han creat dos gèneres nous, *Tenerognathia*, (Tanaka, 2005) i *Afrignathia*, (Klitgaard, 2008).

Altres treballs referents a la taxonomia d'aquest grup son els realitzats per Brusca and Wilson, 1991, on es ressitua la Família Gnathiidae (Leach , 1814) sota la Superfamília *Cymothooidea* (Leach, 1814) que pertany al Subordre *Cymothoida*, (Wägele 1989).

S'ha realitzat nombrosos estudis referents a diversos aspectes que presenten aquests paràsits tant a nivell morfològic (Davies, 1981); patològic (Poots, 1973; Paperna and Poore, 1977; Davies and Johnston, 1976; Davies, 1982); així com a nivell de taxonomia (Wägele, 1989; Brusca and Wilson, 1991; Brandt and Poore, 2003). Els estudis a nivell ecològic fan principalment referència a la relació hoste-paràsit-peix netejador, o a la seva biologia com és el cas dels treballs realitzats a l'escull coral·lí australià (Grutter, 2000, 2002, 2003). També s'han realitzat noves descripcions del cicle biològic en altres espècies, com és el cas de *Gnathia africana* (Barnard, 1914) per Smith et al., 2003, *Elaphognathia cornigera* (Nunomura, 1992) per Tanaka and Aoki, 2000, o *Caetognathia coralliopila* (Monod, 1926) per Chong et al., 2015.

Actualment s'està treballant en la descripció completa dels individus de totes les fases, per tal d'intentar poder distingir les espècies de manera que no sigui imprescindible el mascle. Així s'afavoriria la identificació a través de les pranizas fixades en els peixos, ja que és com més es troben aquests paràsits. Per afavorir la identificació també s'han iniciat els treballs a nivell de diferenciació genòmica.

### **1.2.3. Taxonomia actual dels Gnathidae.**

Els Gnathiidae són crustacis que pertanyen a l'ordre dels isòpodes.

Els Isòpodes és un Ordre que pertany a la Subclasse dels Pecàrids, i es diferencien de la resta de crustacis per que les femelles porten la posta a la bossa incubadora o marsupi a la part ventral del cos.

La majoria de isòpodes presenten un cicle monofàsic amb un desenvolupament directe de les formes juvenils amb una morfologia i ecologia semblant a la dels adults (Tanaka, 2006), no presenten fases larvàries planctòniques típiques dels crustacis. Algunes de les espècies parasites presenten un tipus diferent de cicle biològic. Es caracteritzen per

portar un parell de uròpodes fusionats al tèlson i els pereiòpodes són de forma i mida semblant (fet que els hi dona nom al grup).

Els isòpodes es poden trobar en ambients marins, d'aigua dolça o terrestre. És un grup molt divers amb aproximadament unes 10.300 espècies conegudes de les quals 6.250 d'aquestes són marines o estuarianes. La seva gran diversitat els hi ha permès adaptar-se a molts tipus de medis diferents, i tenir una gran diversitat geogràfica. Es poden trobar a les aigües de les àrees polars fins al tròpic (Brusca and Brusca, 2003). Habiten en tots els ambients marins, qualsevol ambient costaner, ja sigui sorrenc o rocós, a la plataforma continental o zones intersticials, fins a zones abissals havent-ne agafat espècies als 7000 metres de profunditat.

Posseeixen una gran diversitat morfològica i un ample espectre alimentari trobant espècies en aquest grup que poden ser depredadores, carronyeres, detritívores, filtradores o paràsites. La forma del cos, la seva ornamentació o presència de sedes, la pigmentació críptica d'algunes espècies són mostres de la seva diversitat i adaptació a medis diversos així com estratègies per a la seva defensa (Fig.-8).

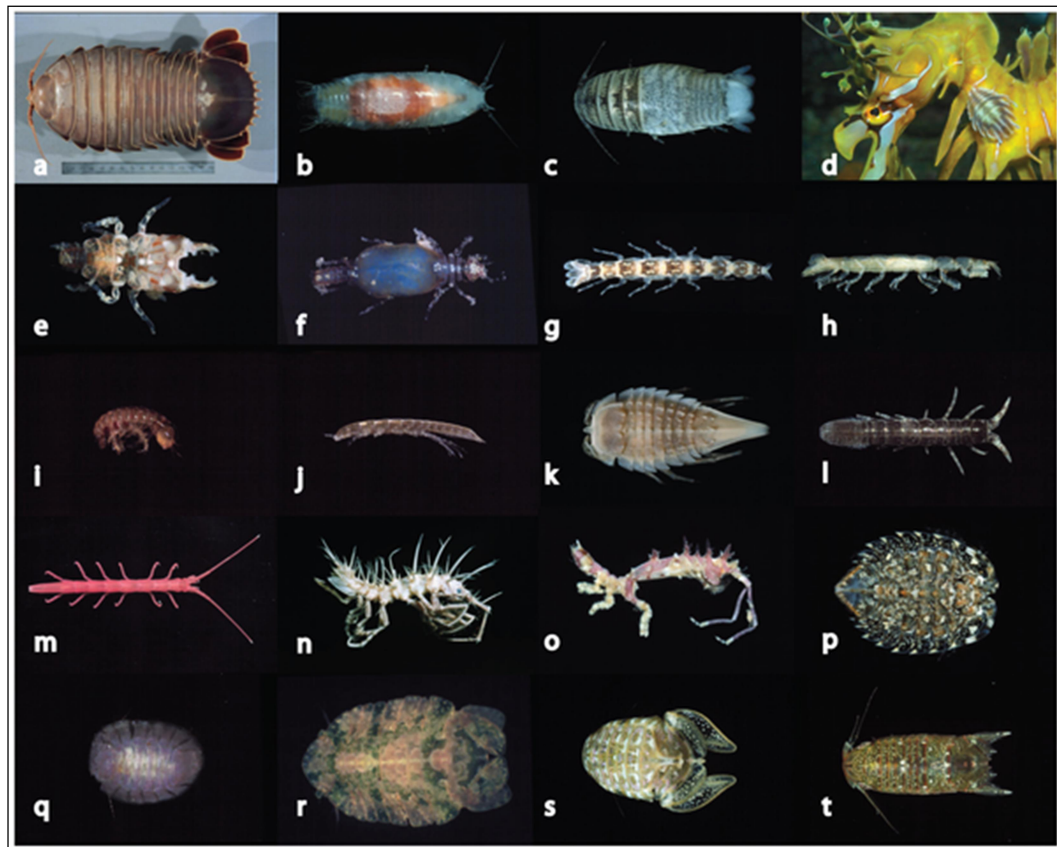


Fig.8. Representació de les formes dels isòpodes marins. Gary C. B. Poore, and Niel L. Bruce. 2012. Global Diversity of Marine Isopods (Except Asellota and Crustacean Symbionts). PLoS One. Cirolanidae: a, *Bathynomus* sp. b, *Natotolana woodjonesi*. c, *Cirolana* sp. Aegidae: d, *Creniola laticauda* on sea dragon. Gnathiidae: e, f, *Elaphognathia ferox* (male and female). Anthuridae: g, *Mesanthura astelia*. Paranthuridae: h, *Paranthura* sp. Limnoriidae: i, *Limnoria* sp. j, *Lynseia himantopoda*. Chaetiliidae: k, *Austrochaetila capeli*. Holognathiidae: l, *Cleantis phryganaea*. Idoteidae: m, *Batedotea collingei*. Antarcturidae: *Antarcturus* sp. Arcturidae: o, *Neastacilla tharnardi*. Serolidae: p, *Serolina delaria*. Plakarthriidae: q, *Plakarthrium australiensis*. Sphaeromatidae: r, *Maricoccus brucei*. s, *Zuzara venosa*. t, *Cerceis tridentata*.

Els isòpodes, posseeixen un cos dorsoventralment aplanat que compren el cap (cèfalon, cefalosoma, cefalotòrax), el tòrax (perèion) i l'abdomen (pleotelson). Solen presentar simetria bilateral (menys alguns espècimens paràsits). És comú que algunes famílies presentin dimorfisme sexual tant a nivell de la forma del cos com en certes parts bucals. El cap té un parell d'ulls compostos sèssils i un parell d'antenes unirràmies; El primer segment del tòrax està fusionat al cap i els apèndix modificats passen a ser peces bucals, els maxil·lípedes. El perèion posseeix 7 segments toràcics lliures o pereionites que porten 7 parells de pereïòpodes o potes. Els pereïòpodes poden tenir una funció ambulatòria, natatòria o prènsil. El

pleotelson amb cinc segments lliures anomenats pleonites i el telson format per la fusió de l'últim pleonite. Presenten un parell d'uròpodes birramis units al telson.

L'Ordre dels Isòpodes està dividit actualment en 12 Subordres, on hi trobem el Subordre dels Cymothoidea que inclou als Gnathidae a la Superfamília dels Cymothoidea; en aquest grup es coneixen varies espècies paràsites de peixos o crustacis (Wagèle , 1981, Schulz , 1969, Brusca and Wilson, 1991). Aquestes espècies poden ser ectoparàsites o endoparàsites, presenten una morfologia i ecologia modificades respecte als isòpodes que els hi permet adaptar-se a la seva condició de paràsit.

Des del punt de vista taxonòmic, aquest grup no està tancat, a l'actualitat s'està treballant en la seva classificació a mida que apareixen noves espècies, que afavoreixen l'estructuració de les diferents famílies que el componen.

La Família Gnathiidae està dividida en dotze generes i en total conté 230 espècies:

*Afrignathia* es tracta d'un gènere monotípic, reconegut per Hadfield and Smit, 2008, al trobar un espècimen recol·lectat a la badia de False (Sud-àfrica). (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Bathygnathia* Les 15 espècies d'aquest gènere es troben al talús continental i a zones batials (245-2698 m). (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Bythognathia* Conté una espècie batial (4000 m) trobada al Carib. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Caecognathia* aquest gènere consta de 46 espècies amb una distribució més propera als pols que no pas a l'equador. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Elaphognathia* Les 21 espècies d'aquest gènere estan confinades a la regió de l'Indo-pacífic, excepte l'espècie *E.bacescoi* que és del Mediterrani. La majoria de les espècies són d'aigües càlides. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Euneognathia* Conté una sola espècie trobada a l'Antàrtic. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Gibbagnathia* es tracta d'un gènere monotípic, l'espècie que el representa és del sud d'Austràlia. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Gnathia* les 135 espècies que conté aquest gènere posseeixen una ampla distribució en aigües someres, en zones temperades i càlides. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail). El gènere *Gnathia* representa quasi un 60% de la família Gnathiidae.

*Monognathia* conté 4 espècies trobades en el talús i a profunditat, amb una ampla distribució que arriba des del Pacífic Occidental al Atlàntic Nord. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Paragnathia* conté una espècie amb una distribució Afro-europea. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Tenerognathia* segons Tanaka (2005) un sol mascle d'aquest gènere va ser recol·lectat a l'Illa de Okinawa, Japó. La morfologia d'aquest espècimen no concordava amb cap dels gèneres descrits. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

*Thaumastognathia* conté 4 espècies trobades a la plataforma continental de Austràlia i Nova Zelanda. (Cohen and Poore, 1994; WoRMs taxon detail).

Seguint el WoRMS (World register of marine species-crustacea) la classificació de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) és la següent:

Biota> Animal (Regne)> artropoda (Filum)> Crustacea (Subfilum)> Multicrustacea (Superclasse)> Malacostraca (Classe)> Eumalacostraca (Subclasse)> Peracarida (Superordre)> Isopoda (Ordre)> Cimothoidea (Subordre)> Cimothooidea (Superfamília)> Gnathiidae (Família)> Gnathia (Gènere)> Gnathia maxillaris (especie).

#### 1.2.4. Morfologia dels Gnàtids.

Els Gnathiidae, al igual que els isòpodes, presenten el cos deprimit, dividit en quatre regions (cèfalon, perèion, plèon i tèlson). El cèfalon presenta ulls sèssils (absent en algunes espècies del gènere *Caecognathia* (Cohen and Poore, 1994) i molt reduïts en espècies batials del gènere *Bathygnathia*, *Bythognathia* i *Monognathia* (Camp, 1988; Svavarsson 1999; Cohen and Poore, 1999); i 2 segments del perèion fusionats amb el cap (aquest segon segment és el que els diferencia de la resta de isòpodes). Com apèndix cefàlics presenten: un parell d'antènules, un parell d'antenes, un parell de mandíbules, un parell de maxíl·les, un parell de maxil·les i un parell de maxil·lípedes. Els maxil·lípedes provenen de la transformació dels apèndix del primer segment toràcic totalment fusionat amb el cap i els pilòpodes dels apèndix del segon segment parcialment fusionat amb el cap. Els pilòpodes són els gnatòpodes de les larves, i tots dos juguen un paper molt important en la definició del grup dels Gnathiidae. La característica més remarcable d'aquest grup de isòpodes, és el nombre de pereionites lliures que presenta. Normalment els isòpodes presenten 8 segments dels quals el primer es troba fusionat al cap, per tan al perèion s'observa habitualment 7 segments, cadascun d'ells amb el seu parell de potes corresponents. En el cas dels Gnathiidae, s'observa el perèion format per tan sols 5 segments i 5 parells de pereïòpodes (o potes ambulatories), degut a que els dos primers segments estan fusionats amb el cap (els apèndix es transformen en apèndix bucals), i a la pèrdua d'apèndix en l'últim segment ja que presenta unes dimensions molt reduïdes. La presència de sedes i

protuberàncies en el perèion varia segons les espècies. Els pereiòpodes que presenten són molt similars entre sí i tenen una funció ambulatoria i/o natatòria. En les fases larvàries les sedes poden ser plomoses afavorint la natació. Estan formats pel basis, ísquium, merus, carpus, propodus i dactylus. El primer parell de pereiòpodes es projecten cap en davant, mentre que la resta ho fa cap en darrera. El plèon està format per 6 segments, cada pleonite a la part ventral, porta un parell de pleòpodes birramis amb funció respiratòria. El plèon dels Gnathiidae a diferència de la majoria dels isòpodes és diferència del perèion per ser molt més estret. L'últim pleonite està fusionat amb el telson formant el pleotelson. El pleotelson de forma triangular porta dues setes apicals a l'àpex. A cada un dels costats del pleotelson es troben els uròpodes apèndix amb una funció natatòria. Estan formats per la base, l'endopodit i l'exopodit.

Els Gnathiidae presenten uns canvis morfològics que els diferencia respecte als isòpodes degut a la seva adaptació al parasitisme i al cicle bifàsic que presenten. Es pot observar una gran diferenciació morfològica entre els diferents estadis del cicle, a l'hora que els adults presenten un fort dimorfisme sexual (Monod , 1926; Schultz, 1969). La seva adaptació respon a la millora de l'eficiència de cada un dels estadis, les larves per aconseguir l'aliment i com formes parasitàries i els adults orientats cap a la reproducció i una vida bentònica.

Al llarg del seu cicle biològic es poden diferenciar 3 estadis: zuphea, larva que no s'ha alimentat; praniza, larva que ja s'ha fixat al peix i ha succionat la sang o limfa; i els adults, el mascle i la femella. A nivell morfològic les diferències entre els estats larvaris i els adults s'observen sobretot a nivell del cap, principalment per les peces bucals i el perèion (Fig.- 9). La resta, plèon, pereiòpodes, pleotelson i uròpodes són molt semblants. Les antenes no presenten variacions al llarg del cicle, i són semblants a les antenes d'altres isòpodes, consisteixen en un peduncle basal i un flagel distal.



Respecte a la segmentació del perèion actualment es segueix la terminologia anatòmica descrita per Cohen and Poore (1994), a diferència dels treballs realitzats per Monod (1926) i Holdich and Harrison (1980) on es considera una terminologia diferent. El primer segment posterior al cefalosoma, pereonite 1 (que seria el pereonite 2 segons Monod , 1926), està semi fusionat al cèfalon formant el cefalosoma (en alguns casos aquest segment no es distingeix dorsalment del cefalosoma). Pereionites 2-6 van darrera del pereonite 1, portant cadascun un parell de pereiópodes o potes ambulatòries. Pereionite 7, quan es distingeix dorsalment, és molt petit i funcionalment forma part del plèon (Monod , 1926; Cohen and Poore , 1994).

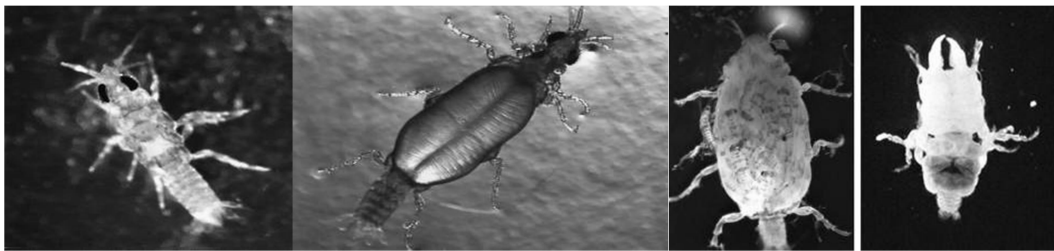


Fig.- 9 Diferents estadis del cicle biològic de *Gnathia maxillaris*. Zuphea, praniza i adults (femella i mascle). Coral Hispano, 2014.

### El cap o cefalosoma:

#### Mascles

El cap es una de les parts del cos més important per a diferenciar les espècies de gnàtids, ja que hi trobem múltiples caràcters morfològics amb els que es pot treballar a nivell taxonòmic. Seguint la matriu realitzada per Cohen and Poore (1994), dels 72 caràcters morfològics que es fan servir per diferenciar les espècies de gnàtids, 48 caràcters es presenten al cèfalon : ulls (1), cap (7), pilòpodes (10), maxil·lípedes (4), antenes (5), marge frontal (13) i mandíbules (8).

Els mascles presenten un cap gran i robust, amb forma quadrangular que pot presentar a nivell frontal tota una sèrie de processos més o menys

accentuats. Al front i projectades cap endavant s'observen un parell de mandíbules, aquests apèndix són únics dels gnàtids i molt característics dels mascles adults (Fig.- 10). Sembla ser que tenen un paper en la defensa i atac (Cohen and Poore, 1964), tot i que Hesse (1855) també els hi dóna una funció relacionada amb l'alimentació. Els mascles presenten un parell d'ulls compostos sèssils, la mida dels quals varia entre les diferents espècies.

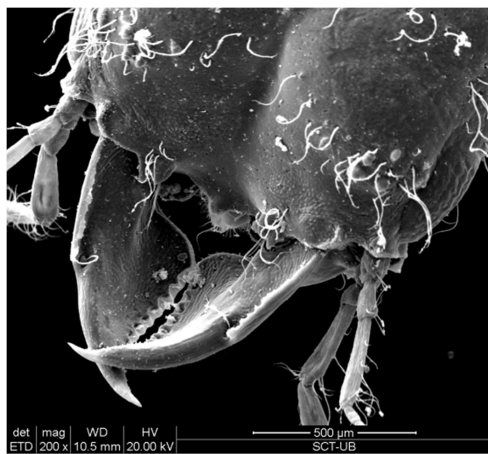


Fig.- 10. Mascle. Cap. Coral Hispano, 2014.



Fig.- 11. Femella. Cap. Coral Hispano, 2014

Al front s'observen dos parells d'antenes. A nivell ventral es troba la cavitat bucal formada per tres parells de peces bucals (mandíbules, maxil·les i maxíl·lules) i dos parells d'apèndix toràcics transformats en peces bucals (pilòpodes i maxil·lípedes). La funció dels pilòpodes, segons Smit and Davies, 2004, podria ser de protecció per a la cavitat bucal (Schultz , 1969) o bé com a òrgan de ventilació (Seed , 1979).

## Femelles

Les femelles presenten un cap de mides reduïdes i amb forma arrodonida. El cap no presenta mandíbules i alguns dels apèndix bucals es troben reduïts. Els ulls laterals presenten una mida menor a la dels mascles (Fig.- 11).

## Larves

Les larves presenten un cefalosoma molt diferent als adults. La seva amplada es diferencia respecte a la del perèion per un constrenyiment respecte al segment anterior al cap. El cap sol tenir una forma arrodonida amb la part anterior cònica, afavorint l'extensió de les peces bucals que serveixen per fixar-se i succionar l'aliment (Fig.- 12 i 13). Els ulls de mida gran afavoreixen una millor visió per a trobar l'hoste (Monod , 1926).

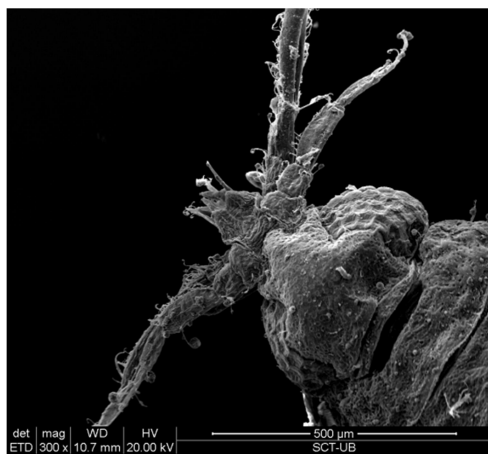


Fig.- 12. Zuphea . Cap. Coral Hispano, 2014.



Fig.- 13. Praniza. Cap. Coral Hispano, 2014.

En els estadis de zuphea i praniza, els apèndix bucals estan adaptats a la fixació, penetració i succió de sang o limfa de l'hoste. Tenen 5 parells de peces bucals: les mandíbules, els paràgnats, els gnatopodes, els maxil·lípedes i les maxíbul·les. Les peces bucals han estat descrites per diversos autors (Monod, 1926; Davies, 1981; Wägele, 1987; Smith and Basson, 2002). Aquestes peces varien entre les diferents espècies de Gnathiidae però a excepció d'unes poques espècies es mantenen semblants en forma entre els diferents estadis larvaris ( zuphea 1(Z1), zuphea 2 (Z2), zuphea 3 (Z3), praniza 1(P1), praniza 2 (P2) i praniza 3 (P3) ). S'observa una variació en la mida de les peces a mesura que les larves muden i augmenten de talla. Poden observar-se petites variacions entre individus de la mateixa espècie com per exemple en el nombre de dents, garfis o sedes.

Les peces bucals es troben a la part anterior del cap. A la part dorsal trobem el labrum (o labrus), una peça de forma hexagonal, lateralment corbada i amb el marge anterior còncau. Exceptuant els gnatopodes i les maxil·les, la part anterior de la resta de peces bucals es troben sota el labrum. A nivell dorsal s'observa sota el marge anterior i còncau del labrus un parell de mandíbules allargades i robustes. El marge intern presenta dents, i la seva mida decreix a mesura que s'apropen a l'extrem anterior de la mandíbula. El nombre de dents varia en funció de l'espècie de Gnathiidae. Les mandíbules són més amples per la base que per l'extrem anterior i poden acabar amb un petit garfi. Per sota i molt propers a cada banda s'observen els paràgnats, que són uns lòbuls allargats que acaben en punxa. Les maxil·lules (maxil·la 1) es troben per sota dels paràgnats, no estan fixades al labrus, són amples per la base i estiliformes a l'extrem. Presenten dents en el marge intern, i el seu nombre pot variar segons l'espècie de Gnathiidae. Les maxil·les (maxil·la 2) són una estructura molt fràgil difícil de localitzar, que es troba generalment a la base dels maxil·lípedes.

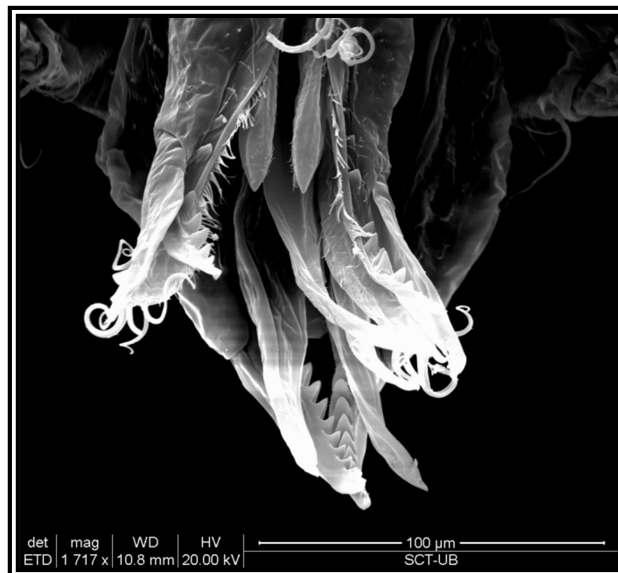


Fig.- 14. Peces bucals d'una larva zuphea  
2. Coral Hispano, 2014.

Els maxil·lípedes són els apèndix del primer segment del perèion. Són robusts i estan formats per una base allargada amb sedes curtes, un endite i un palp format per tres articles, que pot presentar diferent nombre de sedes i dents, variant segons les espècies de Gnathiidae. Els gnatòpodes, sorgeixen del segon segment del perèion i estan ventralment situats respecte a les altres peces bucals. Estan formats per set articles i un dactilus robust amb forma de garfi. L'extrem és molt corbat cap en dins.

Totes les peces bucals a excepció de les maxil·les penetren en el cos de l'hoste (Honma, et al. 1991, Davies , 1981; Monod , 1926). Les peces bucals afilades ajudarien a la fixació i les dentades tenen un paper actiu en la penetració del teixit. La sang passaria a través d'un canal format pels paràgnats i les maxil·lules fins arribar al labrus, actuant com a peces suctores. Segons Cals (1978), la succió es dona en dues etapes. La primera, una vegada les peces bucals han penetrat a l'hoste comença la succió i la sang passa a través del canal per acció capil·lar. Posteriorment l'acció muscular de l'esòfag i l'estómac bombegen la sang i d'altres fluids cap al budell. A l'omplir-se el budell la larva zuphea es dilata i perd la segmentació dels pereionites 4,5, i 6, passant al nou estadi de praniza.

### **El perèon i el plèon:**

#### **Els mascles:**

El cos dels mascles està dividit pels 5 segments , acompanyats cadascun per un parell de pereïòpodes o potes ambulatories (Fig.-15). El perèion es caracteritza per tenir una constricció en el quart segment ( més o menys accentuada segons les espècies) que separa els segments anteriors propers al cèfalons dels segments posteriors (Monod , 1926). Presenten el primer parell de pereïòpodes dirigits cap endavant i els tres restants cap enrere . El plèon està format per 5 pleonites i es força més estret que el perèion. El pleotelson presenta els uròpodes.

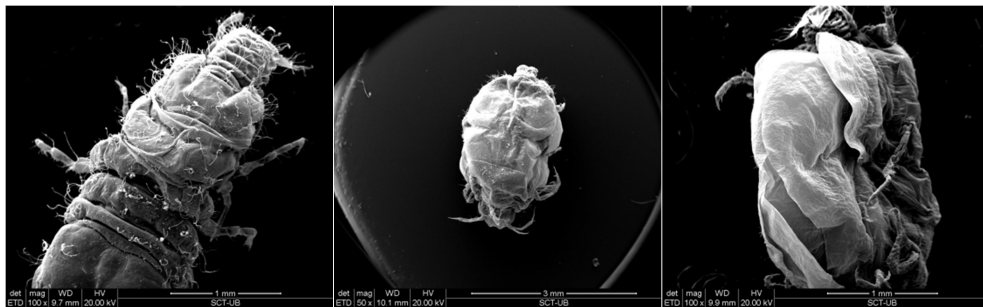


Fig.- 15. Vista dorsal mascle. Femella vista dorsal i ventral. Coral Hispano, 2014.

### Les femelles:

La forma del perèion és similar al que presenten les larves praniza però més gran i ample. Les femelles presenten el marsupi o bossa incubadora a on es desenvolupen els ous fins a donar larves zuphea (Z1). Els pereionites dels segments 4,5,i 6 presenten una membrana fina a la base formant els oostegites que constitueixen el marsupi (Fig.-15).

### Les larves:

Respecte a les larves zuphea i praniza, la diferència més important entre elles, és la dilatació i pèrdua de segmentació del tòrax per part de la praniza (pereionites 4,5 i 6) quan aquesta ha ingerit l'aliment (Fig.-16).



Fig.- 16. Zuphea i praniza. Coral Hispano, 2014.

Les larves zuphea presenten el perèion d'amplada similar al cap dividit en 5 segments o pereionites. El pereionite 6 presenta una longitud major i el 7 resta com a un petit anell unit a la base anterior del plèon. El plèon esta format per 5 pleonites de mides molt semblants. El pleotelson de forma triangular al costat del qual s'observen els uròpodes birramis. Aquets són similars als dels adults tot i que presenten setes plomoses que afavoreixen una bona natació (Wägele and Brandt , 1988).

## **2. Objectius**





## 2 Objectius.

A inicis de l'any 1997 es va detectar una infestació d'un paràsit hematòfag de peixos al sistema Mediterrani. El sistema Mediterrani (S3) és el més important de les instal·lacions de l'Aquàrium de Barcelona, essent el de major nombre de tancs i volum, el més emblemàtic des del punt de vista d'exhibició, ja que entre aquests tancs s'inclou l'Oceanari. Tal i com s'ha explicat anteriorment, l'Oceanari és el tanc més gran d'exhibició, amb un volum de 3.700 m<sup>3</sup> d'aigua, i d'una complexitat elevada per al seu manteniment tan a nivell de gestió d'aigües com d'animals. L'Oceanari és a on hi ha els taurons, animal que genera més atracció als visitants, a l'hora també compta amb una gran biodiversitat de peixos. Conseqüentment la presència d'una infestació de la magnitud que es va produir afectava tant a la salut dels animals com la seva visualització per part dels visitants.

Inicialment només es va detectar la presència del paràsit a l'Oceanari. Així que es va començar a actuar en aquest tanc. Les primeres actuacions van ser principalment a nivell de sifonat de fons i decoració ( per eliminar els organismes bentònics), extracció de peixos malalts i extracció de larves a través de malla mitjançant una bomba i una llum que es feia servir per atraure les larves aprofitant el seu fototropisme positiu (veure capítol 1). Més tard es va veure que els paràsits estaven en tot el sistema, és a dir en els dotze tancs que el formen. Això volia dir que tot i que l'aigua passava pel sistema de filtració el paràsit havia aconseguit passar d'un tanc a un altre infestant tot el sistema. Un estudi amb més deteniment del funcionament de sistema de filtració va facilitar veure que la contaminació entre els diferents tancs havia estat possible degut al disseny de la distribució del aigua a través de l'anell i del mòdul J.

Es va cercar informació sobre aquest paràsit, primer de tot per identificar-lo a nivell d'espècie i poder fer una cerca bibliogràfica més acurada que

permetés controlar la infestació. També es va contactar amb diferents aquaris d'arreu del món per tal d'obtenir informació sobre l'ús de productes antiparasitaris que s'hagueren aplicat en aquaris de gran dimensió, similars als del sistema infectat, a on existia una gran diversitat de peixos. Hi havia un gran interès per saber quins d'aquests tractaments antiparasitaris s'havia aplicat amb suficients garanties en elasmobranquis.

Preliminarment, l'espècie va ser identificada com *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804), amb la col·laboració del Dr. Josep Castelló (Universitat de Barcelona) i seguint la classificació dels Gnathiidae establerta per Theodore Monod al 1926.

El poc coneixement que es disposava sobre aquest tipus d'infestació en les condicions de captivitat, va fer que es plantejés la necessitat de realitzar una sèrie d'estudis que permetessin controlar i eradicar aquesta infestació. La limitació en la informació bibliogràfica trobada inicialment va fer necessari que s'aprofundís en l'estudi sobre el cicle biològic del paràsit i una descripció morfològica més detallada. Al mateix temps, caldria desenvolupar un sistema de cultiu o manteniment del paràsit *in vivo* en el laboratori, no només per fer un estudi detallat del cicle biològic i d'aspectes biomètrics i morfològics, sinó també per a disposar d'un protocol de manteniment de les larves del paràsit que permetés valorar diferents productes antiparasitaris per a la seva aplicació en els aquaris.

Per tant, els objectius que es varen plantejar davant de la infestació i que van donar lloc al treball experimental de recerca d'aquesta tesi han estat:

- 1 Desenvolupar una metodologia que permetis establir el grau real de infestació en el sistema Mediterrani;
- 2 Definir i posar en pràctica mètodes de control de la població del paràsit en la seva fase activa de la infestació.
- 3 Establir un protocol pel manteniment *in vivo* del paràsit en el laboratori que permetés complementar l'observació del seu cicle

de vida i una anàlisi biomètric i morfològica detallada dels diferents estadis.

- 4 Revisió i descripció complerta del seu cicle de vida.
- 5 Revisar i consolidar la descripció morfològica de l'espècie, i en particular de les formes del mascle adult.
- 6 Valorar diferent productes antiparasitaris pel control i possible eradicació del paràsit en sistemes en captivitat amb elevats volums d'aigua en circuits semioberts. Establir una teràpia efectiva.



## **3. Publicacions**



## 3. Publicacions

### 3.1. Capítol 1

***Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies.**

**Journal of Applied Ichthyology 29 (2013), 1139-1144.**

#### 3.1.1. Introducció.

A inicis del 1997 es va detectar una infestació de *Gnathiidae* al sistema Mediterrani de l'Aquàrium de Barcelona. Els gnàtids (Crustacea: Isopode: Gnathiidae) són ectoparàsits hematòfags de peixos que posseeixen un cicle biològic bifàsic: un estadi com adults de vida lliure i un estadi larvari com a paràsits de peixos. L'estadi larvari es presenta com a zuphea (larves que no han ingerit l'aliment) i com a praniza (larves que han ingerit l'aliment) amb característiques morfològiques diferents, sobretot a nivell del perèion, ja que aquest es dilata i perd la segmentació típica una vegada la larva ha ingerit la sang o fluids sanguinis. També és característic d'aquest grup el dimorfisme sexual que presenten els adults.

La identificació de les espècies es fa realitzar a partir de la descripció morfològica dels mascles (Monod , 1926; Cohen and Poore , 1994).

L'afectació d'aquests tipus de paràsits ha estat descrita tant a nivell d'aqüicultura (Paperna and Overstreet, 1981; Patarnello, et al., 1995; Mugridge and Stallybrass, 1983; Chong, et al., 2015) com a nivell d'aquaris (Gianetto et al., 2003; Marino et al., 2004). A més a més de l'afectació directa que suposa el seu parasitisme, poden actuar com a vectors d'altres malalties (Davies , 1982 , 1995; Smit and Davies , 1999; Grutter , 2002).



Els Gnathidae no presenten especificitat d'hoste i per tant tots els peixos teleostis del S3 es van veure afectats. Es va detectar la primera vegada la presència del paràsit em l'Oceanari, i ràpidament es va constatar la necessitat de desenvolupar una metodologia pel seguiment i avaluació del grau de infestació.

### **3.1.2. Objectius.**

Els objectius plantejats en aquest estudi han estat:

- 1 Desenvolupar una metodologia que permetis establir el grau real de infestació en el sistema Mediterrani;
- 2 Definir i posar en pràctica mètodes de control de la població del paràsit en la seva fase activa de la infestació.
- 3 Establir un protocol pel manteniment *in vivo* del paràsit en el laboratori que permetés complementar l'observació del seu cicle de vida i una anàlisi biomètrica i morfològica detallada dels diferents estadis.

### 3.1.3 Publicació





## *Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies

By C. Hispano<sup>1</sup>, P. Bultó<sup>1</sup> and A. R. Blanch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>L'Aquàrium, Moll d'Espanya del Port Vell, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

### Summary

An outbreak of gnathiids in a captive fish population in a large exhibition aquarium is described, including a method for enumeration of the causative agent. This procedure for harvesting and counting the parasites was based on the positive phototropism of their larvae (zuphea and praniza). Water pumps with spotlights allowed capture of larva using a 200-micron plankton net. Harvested samples were rinsed with fresh water in the laboratory to immobilise the zuphea and praniza and thus facilitate the enumeration process by direct observation under a stereoscopic glass. The sampling method was found to be representative of the degree of infestation experienced by the entire aquarium system; this finding is very important as it allows the enumeration of different life-cycle stages (zuphea, praniza and adults). The outbreak was studied and the infestation monitored over a period of many years. Several substrates were assayed for the capture of gnathiid males, with identification of the causative parasite by such morphological characteristics as *Gnathia maxillaris*. Physical and chemical treatments were applied to mitigate the infestation. Selected to control the infestation and its lifetime in closed marine-water systems, the Trichlorfon was evaluated by chromatography.

### Introduction

Gnathiidae is a family of isopod crustaceans that have a biphasic life cycle: a reproductive stage as free-living adults (usually benthonic) and an ectoparasitic larval stage. They are haematophagous ectoparasites that feed on the blood and tissue fluids of fish. Gnathiidae show a remarkable morphological and ecological adaptation to a life cycle. The larval stage has two forms: praniza (replete larvae) and zuphea (unfed larvae). Males and females show sexual dimorphism. Species identification was previously very difficult when only larvae or females were found (Kabata, 1970; Cohen and Poore, 1994). Gnathiidae species descriptions are usually based on the morphology of the adult male (Monod, 1926; Smit and Basson, 2002; Smit et al., 2003). However, DNA-based techniques have recently been developed in an attempt to overcome this limitation (Grutter et al., 2000). The high morphological and ecological diversity of Gnathiidae, variations in the number of life-cycle phases and the host-finding behaviour of larvae make it difficult to identify species or describe the life cycle. Nevertheless, over 170 species in 11 genera have been described (Smit and Davies, 2004; Tanaka, 2007).

Gnathiidae are not host-specific and can infest a wide range of teleost species and Elasmobranchii (Smit and

Basson, 2002; Smit and Davies, 2004; Jones and Grutter, 2005). They also act as vectors, thus allowing other pathogens and parasites to be transmitted between fish (Davies, 1982, 1995; Smit and Davies, 1999; Davies and Johnston, 2000; Grutter, 2002; Davies et al., 2004). Studying the life cycle based on outbreaks in the open sea is very difficult; however, several infestations have been reported and studied (Paperna and Por, 1977; Mugridge and Stallybrass, 1983; Honma and Chiba, 1991; Smit and Basson, 2002). Although several Gnathiidae species adapt well to laboratory culture, studying the life cycle under captivity conditions is complex but not impossible. However, it is possible to study the infestation process, characterise the species and fully describe the life cycle infestations of Gnathiidae in marine aquaria (Gianetto et al., 2003; Marino et al., 2004; Smit and Davies, 2004) and aquaculture facilities (Paperna and Overstreet, 1981).

An outbreak of gnathiids in a captive fish population in a large exhibition aquarium was studied. The infestation was monitored for more than 14 years (1997–2011) and control measures were applied. A method for the enumeration of larvae and adults was established, and the outbreak was quantified and its development characterised. Several substrates were tested in order to capture gnathiid males and identify the species. Knowledge on the treatment and mitigation of this parasitic infestation in large volumes of water is limited. In addition, a large exhibition aquarium limits the application of routine chemical treatments against infestation. Consequently, physical and chemical treatments for mitigating this infestation in high-volume exhibition aquaria were defined and applied.

### Materials and methods

#### Characteristics of exhibition aquaria infested by Gnathiidae

The Mediterranean System at the Barcelona Aquarium has a water volume of 4100 m<sup>3</sup> distributed in 12 aquaria. The aquaria have different shapes and volumes, but the scenery in most of them was designed to reproduce a Mediterranean marine environment. The Oceanarium was selected in order to monitor the progress and eradication of the infestation; this particular tank has a 90.24% of the total system with a volume of 3700 m<sup>3</sup>, 35 m diameter and 5 m depth. At the beginning of the infestation this tank had a biomass of 5674 kg (2384 fish, 53 species). Marine water inflow goes from wells on the beaches to the filtration system prior to use. The water supply is based on a semi-closed system, with a replacement rate of around 20% of the total volume per week. Turnover in the aquaria is 3–4 h. The filtration system

consists of different treatment units: skimmer, sand filter (7 m<sup>3</sup> volume), UV unit, pH unit, biological filter (11.5 m<sup>3</sup> volume with 7.3 m<sup>3</sup> of plastic rings inside as biosubstrate, with a total surface of 250 m<sup>2</sup> m<sup>-3</sup>), heat interchanger and degassing towers.

#### Physical and chemical parameters

Temperature, pH, redox and oxygen concentrations were measured daily throughout the monitoring period. Total ammonium, nitrite, nitrate phosphate and alkalinity were determined weekly by standardised photometry (Anonymous, 1998) using Palintest 7100 according to the manufacturer's instructions. (Palintest Ltd, Gateshead, UK). Salinity was determined using a refractometer (Shibuya). Total aerobic bacteria were analysed monthly by membrane filtration (0.22 µm) using marine agar (MA). The agar plate membrane was incubated at room temperature and colony counts were read after 24 h. Some heavy metals (mainly Zn and Cr) were also measured monthly by chromatographic analysis (PE-D/0026 Metals ICP-MS). At the same time, the filtration system measured on-line temperature, pH, redox and salinity using specific probes. All of these parameters were measured throughout the 14-year surveillance and monitoring period of the infestation.

#### Sampling and monitoring larvae

A procedure for capture of the parasites was established. Gnathiid larvae exhibit positive phototropism, a characteristic that was a key factor in harvesting zuphea and praniza from the water. Four water pumps (15 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>), each with spotlights, were located around the perimeter of the Oceanarium; 24% of the total tank volume (900 m<sup>3</sup>) was pumped through a 200-micron plankton net, with a 15 h sampling time (from 18.00 to 09.00). Harvested samples were rinsed with fresh water in the laboratory to immobilise the zuphea and praniza and thus facilitate the enumeration process. They were then placed in a Petri dish (90 mm) and the enumeration performed by direct observation under a stereoscopic glass. Individual parasites were quantified and classified as zuphea, praniza, or adults.

The sampling date, life-cycle phase of the parasites, total filtered water volume and specific observations, such as zuphea births and changes in praniza size, were documented in a daily report. This data were used to calculate the kinetics and dynamics of the infestation in the water system and aquaria from 1997 to 2001. Later, monitoring and surveillance was decreased and sampling performed only monthly in order to maintain the presence of gnathiid larvae at a lower level until 2005. Sampling via pumping has been carried out in the recent past three years to confirm eradication of the infestation in the entire water system and as a preventive method against the possible introduction of new larvae.

At the same time, hourly controls of the tank were established to remove and count death fish and observe the level of infested fish during the acute phases. Harvesting larvae and surveillance of the fish made it possible to measure the rate of infestation.

During the acute phases of the infestation, the aquarium substrates were cleaned daily by divers who siphoned the tank floor and scenery in order to eliminate the benthic form of the gnathiids, prevent an intense and persistent colonisation of porous materials, and inhibit the settlement of the

infestation. Furthermore, protocols to avoid recruitment of new Gnathiidae from either the scenery materials or from newly introduced organisms were applied in quarantine facilities from the beginning of the infestation.

#### Assays of substrates to capture *Gnathia* adults

Gnathiid males were required for identification of the causative species of the infestation. Males tend to be benthic and live in cavities and porous materials (Monod, 1926; Cohen and Poore, 1994). During the first year, three independent assays were performed to capture males by evaluating several substrates as potential cavities. Three different substrates were tested: sand, gravel, and small and porous stones. Three trays (33 × 47 × 7 cm) were each filled with a substrate and placed on the bottom of the Oceanarium for 2 days. The substrates were then rinsed with marine water and filtered through a 200-micron mesh to harvest the gnathiids. Enumeration of male, female and larvae was conducted as previously described for the plankton samples. Some males were fixed in 10% formaldehyde or 70% ethanol. The various body parts were then observed for species identification: mouth, antennae, pylopods and maxillipeds, one of each pair of limbs and uropods. Identification was based on the work of Monod (1926), who established the taxonomic identification criteria.

#### Chemical treatment to contain infestation

The limited reduction in zuphea and praniza levels by physical extraction necessitated the use of a chemical treatment. Trichlorfon (1-Hydroxy-2,2,2-trichloroethylphosphonate-O, O-dimethyl ester) was selected as the most appropriate treatment after consulting the literature on chemical treatments for stored fish and shellfish (Ludwig, 1993; Brecken-Folse et al., 1994; Forget et al., 1998; Toksen et al., 2010, 2012). At the time, Trichlorfon was permitted for administration to fish and detailed information on the compound and its use in aquatic systems was available. Trichlorfon has also been used successfully to treat sharks (Stoskopf, 1993); this point was particularly interesting since several species of shark are among the most valuable species in infested aquaria.

In November 1997, the Trichlorfon treatment was applied for the first time and administered once every 3 months thereafter in the Oceanarium at a dose of 0.4 (±0.1) ppm by means of three baths each lasting 48 h, with a 1-week interval between baths. During the Trichlorfon treatment the water was not ozonised in order to prevent the rapid degradation of the compound.

#### Chromatographic analysis to determine persistence of Trichlorfon and its derivative compounds during treatment

During the initial baths, the persistence of Trichlorfon and its derivative compound Dichlorvos (a compound derived after administration) in water was evaluated by chromatographic analysis in order to obtain information on the chemical behaviour of the product in seawater and thus ensure its effective therapeutic application. Water samples were taken for chromatographic analyses of the lifetime of Trichlorfon and Dichlorvos in the water following their administration.

Information on the conversion of Trichlorfon (commercial form of the product) into Dichlorvos (the product's

active form) and the degradation of the latter after the bath treatment with the use of ozone and water renewal, would help determine the correct preparation and administration of the product. Moreover, it would make it possible to determine the period of time before normal work in the Oceanarium could resume without there being a risk for the technical staff (especially divers).

A Sep-Pak C18 solid-phase extraction cartridge (Waters, Milford, MA) was used; this cartridge was activated with 10 ml of methanol followed by 10 ml of deionised water. A volume of 100 ml seawater from the aquarium was passed through the cartridge at an appropriate flow rate of  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$ . The retained substances were eluted with 100 ml of chloroform and dried in a nitrogen stream. The dry residue was resuspended in 250  $\mu\text{l}$  of chromatography phosphate buffer eluent [ $1.38 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4$  in 1.0-L of water, adjusted to pH 5.5 with a few drops of 1 M KOH, filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  membrane and mixed (82 : 18) with acetonitrile], filtered through a Millipore  $0.45 \mu\text{m}$  filter (Low Binding Durapore), and a 100  $\mu\text{l}$  aliquot injected into the liquid chromatograph. Pharmacia LKB 2150 pump at a flow rate of  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$  and injector Rheodyne 7125 with 200  $\mu\text{l}$  loop (Column: Kontron S5 ODS  $150 \times 4 \text{ mm}$ ) were used. Absorbance was measured at 205 nm (0.2 AUFS, Kontron 432) using a recorder-integrator (Merck-Hitachi D2500). As the Trichlorfon standard, the same industrial product used in aquaria was used and a calibration curve was plotted with four points at 0.5, 0.3, 0.1 and  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$ .

Dichlorvos cannot be analysed in the same way because it is significantly more volatile than Trichlorfon (vapour pressure at  $20^\circ\text{C}$   $1.2 \times 10^2 \text{ mmHg}$  and  $7.8 \times 10^6 \text{ mmHg}$  for Dichlorvos and Trichlorfon, respectively). Consequently, when the solid-phase extraction cartridge is dried and the chloroform is vaporised, a large part of the Dichlorvos also evaporates and the results are erroneous. A two-dimensional column liquid chromatography system had to be designed to simulate the steps. A washed C18 Guard-Pak precolumn was used as the extraction/concentration column with the same mobile phase described above for Trichlorfon; 5.0 ml of the test sample was introduced using an auxiliary pump. It was then placed on a chromatography column, which required a 6-way valve. The Guard-Pak column captures the Dichlorvos when the seawater passes through, driven by the auxiliary pump. The Dichlorvos is then released into the chromatography column by the mobile phase, driven by the main pump. The standard used to plot the calibration curve was Dichlorvos (Art. No. 125300 supplied by Lab. Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany). The points prepared were: 0.5, 0.3, 0.1 and  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$ , and the calculations were performed by interpolating the sample areas on the regression line. These analyses enabled us to verify that the product had been administered correctly and to obtain graphs of the degradation kinetics of Trichlorfon to Dichlorvos (active form) and the degradation kinetics of Dichlorvos.

## Results

### Main characteristics of the infestation and identification of the causative agent

The average values for the physical and chemical parameters measured in the Oceanarium for a representative period (16 months) are summarised in Table 1. Total aerobic bacteria were always around  $3 \log_{10}$  units CFU  $100 \text{ ml}^{-1}$ . The ectoparasite was first observed on a conger eel (*Conger*

Table 1  
Physical and chemical characteristics of Oceanarium water

Parameter	Average	SD	n
Temperature ( $^\circ\text{C}$ )	17.78	0.28	296
Salinity ( $\text{‰}$ )	39.00	0.19	75
pH	7.78	0.10	299
Oxygen (ppm)	7.79	0.55	248
Redox (mv)	354.48	17.02	214
$\text{NH}_3$ (ppm)	0.00	0.00	141
$\text{NO}_2$ (ppm)	0.020	0.01	141
$\text{NO}_3$ (ppm)	22.11	8.68	62
$\text{PO}_4$ (ppm)	1.91	0.25	22
Redox (mv)	354.48	17.02	214
Alkalinity (ppm)	106.71	25.72	21

SD, standard deviation; n, number of analyses performed in this period.

Values are related to the 16-month period shown in Fig. 3. Units of parameters are indicated in brackets.

*conger*) that had died suddenly. The ectoparasite was detected during the necropsy and was initially identified by a stereoscopic microscopy observation as belonging to Gnathiidae. There was a rapid increase in fish mortality at the beginning (626 dead fish in 1 month), with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) affected the most. Exclusively associated with teleosts, the infestation did not affect elasmobranchii fish species.

Assays of substrates to capture Gnathia adults showed that substrates of small, porous stones were the most effective. Moreover, this substrate captured zuphea and praniza significantly more effectively (Fig. 1). Observation of the adult males by direct analysis using stereoscopic microscopy and by fixed and stained samples using optical microscopy made possible the identification of the ectoparasite as *Gnathia maxillaris*.

### Monitoring of the infestation

As an immediate measure to contain the infestation, the ectoparasitic population was reduced through the positive phototropism of the larvae. Four pumps and spotlights placed at various points in the tank at night proved useful to catch gnathiids by plankton net filtration. Five million larvae were estimated in the first sample, indicating the grade and intensity of the tank infestation. The larval population reduction in the first month of infestation was 98%. When the

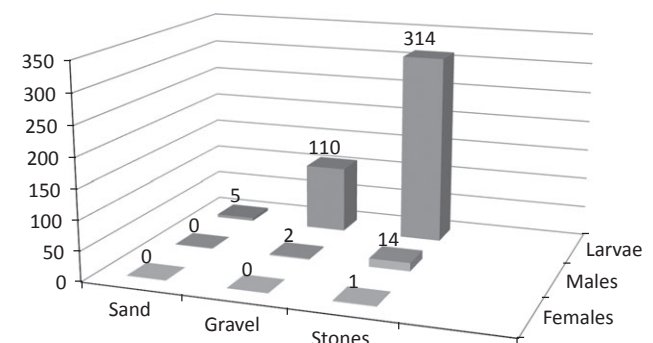


Fig. 1. Accumulative enumeration of larvae and adult males and females during three independent assays to test different substrates for capture of adult stages of Gnathiidae. Assayed tank bottom substrates: sand, gravel, and small and porous stones

population decreased, monitoring was done at night using only one pump with a spotlight.

Daily monitoring during the early years provided useful data for establishing the kinetics of the infestation and the sorting of ectoparasites by stage and size. Sampling and enumeration continued over the years but became less frequent: at first conducted three times a week, by the end of the survey it became just once a week. After many months of partial containment by harvesting larvae using filtration, monitoring showed in order to contain the infestation and progress efficiently toward eradication that more drastic measures were needed. The use of antiparasitic compounds was thus considered. Trichlorfon was administered to the entire infested aquaria system every 3 months, with three 48-h baths 1 week apart, at the dosage described above.

**Control of the infestation**

The dose of Trichlorfon was determined based on previous studies (Stoskopf, 1993), which suggested that Trichlorfon treatments should range in the bath from 0.3 to 0.5 ppm. Chromatographic analysis showed that Trichlorfon begins to convert to Dichlorvos as soon as it is prepared (Fig. 2). Consequently, Trichlorfon must be prepared immediately before use; ozone was not supplied to the system during treatment in order to prevent the rapid degradation to Dichlorvos. Dichlorvos was shown to be more stable than Trichlorfon

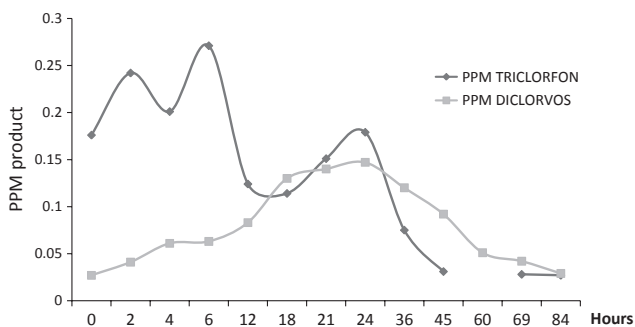


Fig. 2. Concentrations of Trichlorfon and Dichlorvos 96 h after treatment application. Chromatographic values expressed in ppm

and peaked 24 h after Trichlorfon administration. It was calculated that the treatment in the Oceanarium should be extended for at least 48 h.

A total of 20 treatments (each consisting of three successive weekly baths) was carried out approximately every 3–4 months over 7 years. The ectoparasitic population showed that the hatched zuphea stage starts to appear 2 months after treatment with Trichlorfon. This period of time coincides with the time required by *G. maxillaris* for the incubation of eggs and the first hatched zuphea (data not shown). As can be observed in Fig. 3 (arrows), the *G. maxillaris* population declined considerably after the administration of Trichlorfon. Daily enumeration showed very low numbers or no detectable larvae after the treatment. However, a sharp increase in the larval population was always detected after the initial bath with Trichlorfon. The populations of both zuphea and praniza larvae decreased considerably by the end of the third bath. An increase in the larval population was then usually observed after 2 months of treatment, because the life cycle began once again and the number of zuphea and praniza increased (Fig. 3). Throughout the infestation, the total number of zuphea was always much higher than the number of praniza. This is because this stage is dispersive and therefore has a greater swimming activity. Additionally, it should be assumed that not all zuphea transform to praniza because some are eaten by fish, eliminated by sand filters, or die during the moulting process. However, the appearance of praniza was usually observed 3 months after the chemical treatment with Trichlorfon. Therefore, it was determined that the treatment is most effectively applied when the number of praniza III (final larval stage) begins to increase, thus preventing the appearance of future reproductive adult stages.

The Oceanarium is maintained at a constant temperature of 18°C ±0.5 throughout the year, as are most of the physical and chemical parameters. Therefore, any changes in the kinetics of the population due to changes in environmental conditions can be ruled out. Nevertheless, observations and measurements over the years support the fact that the biological cycle kinetics are temperature-related: in 2002, the temperature of the system was increased to 20°C and the number of parasites increased. Thus, the length of the life cycle decreased and the number of eggs laid increased due to

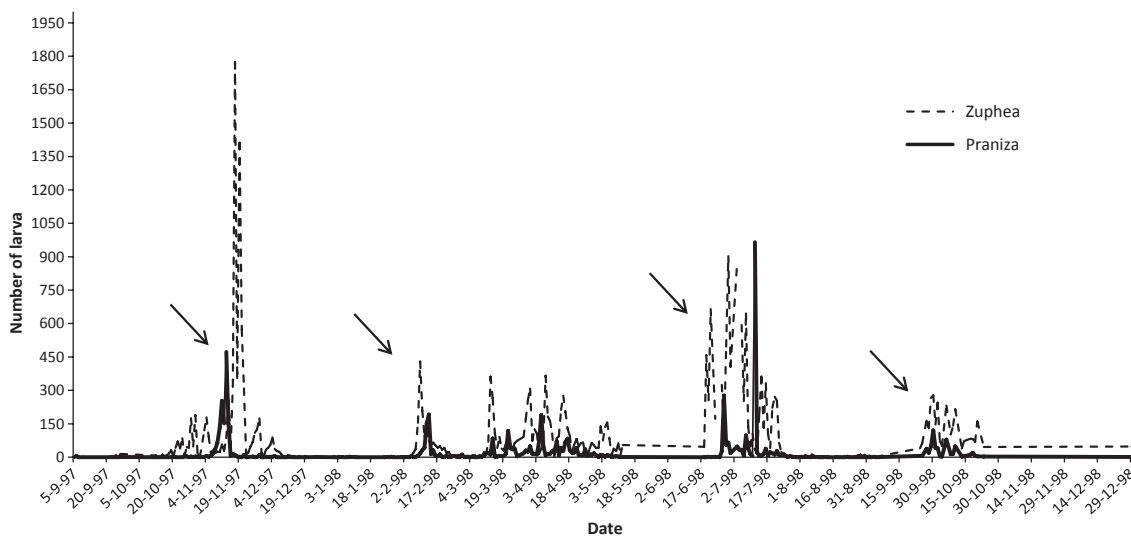


Fig. 3. Enumeration of Gnathiidae larvae over 16-month intense infestation. Arrows = Trichlorfon treatments

the larger females. As a result, the number of Trichlorfon baths was increased and the temperature was returned to the previous level of 17.5°C–18°C. Consequently, changes in temperature made it possible to control the population of *Gnathia maxillaris* in captivity.

The use of Trichlorfon reduced the level of infestation but did not eradicate the parasites. Nevertheless, the biological cycle of *G. maxillaris* in the aquaria showed synchronicity and was linked to the reduction effect caused by the treatment.

## Discussion

The Oceanarium was shown to be an adequate artificial marine environment for successful development of the infestation. Additionally, the aquarium scenery favoured the persistence of the parasite. The causative parasite of this infestation was identified as *Gnathia maxillaris*, based mainly on morphological characteristics of the males.

The sampling method developed for daily enumeration of *G. maxillaris* was shown to be representative of the degree of infestation. Monitoring provided essential information for controlling the infestation. This finding was very important since the life cycle of this parasite presents different proportions of the three juvenile stages, each of which has two forms (zuphea, the unfed larvae and praniza, the fed larvae), in a high synchronicity, as was observed over the years (Mouchet, 1928). The largest praniza (praniza III) moult into the adult stages and transform into females or males.

This quantitative sampling also made it possible to measure the efficiency of the antiparasitic chemical treatment applied. Dynamics of the population (enumeration of the population by different stages of *G. maxillaris*) and observation of the fish behaviour were used to control the infestation and gauge the application of the therapeutic bath. Controlling *G. maxillaris* in the infested aquaria has been very difficult because of the characteristics of large-scale aquaria and complexity of the Gnathiidae life cycle. Consequently, the Trichlorfon treatment was not sufficient to control the infestation, and needed to be accompanied by a continual mechanical elimination of individuals. A sharp increase in the zuphea population was always observed after the initial Trichlorfon treatment, possibly due to a neuromotor system disruption in the parasite. Thus the effect of the treatment was not immediate. Zuphea affected by neural disruption first swim erratically until they die, making it possible to collect more of them in the plankton net.

The eradication of *Gnathia maxillaris* in an aquarium is difficult because Trichlorfon does not reach those individuals (mostly adults or reproductive stages) hiding within the sandy floor of the tank and the scenery. This helps the parasitic population recover. However, over a number of years it was possible to control the *G. maxillaris* infestation and fish mortality by reducing the number of parasites through a combination of physical and chemical treatments. Other measures were also taken at the quarantine facilities such as surveillance of water inflow to avoid new Gnathiidae coming in from the environment.

Other issues regarding the application of Trichlorfon are related to work safety conditions. Determining the degradation kinetics of Dichlorvos was useful to define the application procedure, and to establish when divers could return to the aquarium for routine facility maintenance. Furthermore, Trichlorfon treatment must be applied for long periods to

significantly diminish parasite populations, but information on the possible adverse effects on different fish species was almost completely unavailable. Moreover, Trichlorfon was ill advised for use in fish culture due to the toxic effect on fish and arthropods and thus other drugs were previously considered. However, other drugs such as copper sulphate or formol with malachite green were not suitable due to their toxicity in sharks and the fact that the aquaria design system made their use unfeasible; a rapid removal of water following the bath treatment required for these types of products is impossible and can damage elements of the filtration system such as the biological filter unit. Chemical treatment with other compounds that did not have clear information on the correct dose to be administered in aquaria containing different species of fish and shellfish were rejected (e.g. ivermectin and cypermethrin). After this study, experimental assays on the use of alternative antiparasitic compounds available were again considered in order to contain or eradicate this infestation (data not shown).

In conclusion, the observation of this infestation in a high volume of water over many years constituted an excellent mesocosm to achieve a better understanding of the biological cycle of *G. maxillaris* and identify efficient treatments and prevention measures for future infestations. The defined sampling methodology for monitoring was shown to be suitable to establish the most appropriate treatment to control the infestation.

## Acknowledgements

We thank Dr. J. Castelló for the support provided in the species identification process based on a morphological study of *Gnathia maxillaris* males.

## References

- Anonymous, 1998: Standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Works Association and Water Environment Federation, Washington.
- Brecken-Folse, J. A.; Mayer, F. L.; Pedigo, L. E.; Marking, L. L.; Folse, J. A. B., 1994: Acute toxicity of 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, terbufos and trichlorfon to grass shrimp (*Palaemonetes* spp.) and sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) as affected by salinity and temperature. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 67–77.
- Cohen, B. F.; Poore, G. C. B., 1994: Phylogeny and biogeography of the Gnathiidae (Crustacea: Isopoda) with descriptions of new genera and species, most from south-eastern Australia. *Mem. Mus. Vic.* **54**, 271–397.
- Davies, A. J., 1982: Further studies on *Haemogregarina bigemina* Laveran and Mesnil, the marine fish *Blennius pholis* L., and the isopod *Gnathia maxillaris* Montagu. *J. Protozool.* **29**, 576–583.
- Davies, A. J., 1995: The biology of fish haemogregarines. *Adv. Parasitol.* **36**, 117–203.
- Davies, A.; Johnston, M., 2000: The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. *Adv. Parasitol.* **45**, 1–107.
- Davies, A. J.; Smit, N. J.; Hayes, P. M.; Seddon, A. M.; Wertheim, D., 2004: *Haemogregarina bigemina* (Protozoa : Apicomplexa : Adeleorina) – Past, present and future. *Folia Parasitol.* **51**, 99–108.
- Forget, J.; Pavillon, J. F.; Menasria, M. R.; Bocquene, G., 1998: Mortality and LC<sub>50</sub> values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **40**, 239–244.
- Giannetto, S.; Marino, F.; Paradiso, M. L.; Macri, D.; Bottari, T.; De Vico, G., 2003: Light and scanning electron microscopy



- observations on *Gnathia vorax* (Isopoda: Gnathiidae) larvae. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. **35**, 161–165.
- Grutter, A. S., 2002: Cleaning symbioses from the parasites' perspective. Parasitology **124**, S65–S81.
- Grutter, A. S.; Morgan, J. A. T.; Adlard, R. D., 2000: Characterising parasitic gnathiid isopod species and matching life stages with ribosomal DNA ITS2 sequences. Mar. Biol. **136**, 201–205.
- Honma, Y.; Chiba, A., 1991: Pathological-changes in the branchial chamber wall of stingrays, *Dasyatis* spp., associated with the presence of juvenile gnathiids (Isopoda, Crustacea). Fish Pathol. **26**, 9–16.
- Jones, C. M.; Grutter, A. S., 2005: Parasitic isopods (*Gnathia* sp.) reduce haematocrit in captive blackeye thicklip (Labridae) on the Great Barrier Reef. J. Fish Biol. **66**, 860–864.
- Kabata, Z., 1970. Diseases of Fishes, Book 1. Crustacea as Enemies of Fishes.
- Ludwig, G. M., 1993: Effects of Trichlorfon, Fenthion, and Diflubenzuron on the zooplankton community and on production of reciprocal-cross hybrid striped bass fry in culture ponds. Aquaculture **110**, 301–319.
- Marino, F.; Giannetto, S.; Paradiso, M. L.; Bottari, T.; De Vico, G.; Macri, B., 2004: Tissue damage and haematophagia due to pranzia larvae (Isopoda : Gnathiidae) in some aquarium seawater teleosts. Dis. Aquat. Org. **59**, 43–47.
- Monod, T., 1926: Les Gnathiidae. Essai monographique. Memoir. Soc. Sci. Nat. du Maroc Rabat **13**, 1–668.
- Mouchet, S., 1928: Note sur le cycle évolutif des Gnathiidae. Bull. Soc. Zool. France **53**, 392–400.
- Mugridge, R. E. R.; Stallybrass, H. G., 1983: A mortality of eels, *Anguilla anguilla* L. attributed to gnathiidae. J. Fish Dis. **6**, 81–82.
- Paperna, I.; Overstreet, R. M., 1981: Parasites and diseases of mullets Mugilidae. In: International biological programme, Vol. 26. Aquaculture of grey mullets. Xxi + 507p. O. H. Oren (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp. 411–494.
- Paperna, I.; Por, F. D., 1977: Preliminary data on the Gnathiidae isopoda of the Northern Red Sea the Bitter Lakes Suez Canal Egypt and the Eastern Mediterranean and the biology of *Gnathia-Piscivora* New-Species. Rapp. Proces-Verbaux des Réunion Comm. Internat. l'Exploration Sci. Mer Méditerranée Monaco **24**, 195–198.
- Smit, N. J.; Basson, L., 2002: *Gnathia pantherina* sp. n. (Crustacea : Isopoda : Gnathiidae), a temporary ectoparasite of some elasmobranch species from southern Africa. Folia Parasitol. **49**, 137–151.
- Smit, N. J.; Davies, A. J., 1999: New host records for *Haemogregarina bigemina* from the coast of southern Africa. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. **79**, 933–935.
- Smit, N. J.; Davies, A. J., 2004: The curious life-style of the parasitic stages of gnathiid isopods. Adv. Parasitol. **58**, 289–391.
- Smit, N. J.; Basson, L.; Van As, J. G., 2003: Life cycle of the temporary fish parasite, *Gnathia africana* (Crustacea : Isopoda : Gnathiidae). Folia Parasitol. **50**, 135–142.
- Stoskopf, M. K., 1993: Shark pharmacology and toxicology. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., Philadelphia, London.
- Tanaka, K., 2007: Life history of gnathiid isopods – current knowledge and future directions. Plankton Benthos Res. **2**, 1–11.
- Toksen, E.; Degirmenci, U.; Cankurt, M., 2010: The effect of Trichlorfon on the control of *Lernanthropus kroyeri* (van Beneden, 1851) (Lernanthropidae) infestations in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **30**, 205–210.
- Toksen, E.; Nemli, E.; Koyuncu, E.; Cankurt, M., 2012: Effect of trichlorfon on *Diplectanum aequans* (Monogenea: Diplectanidae) infestations in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **32**, 103–108.
- Author's address:** Coral Hispano, L'Aquàrium, Moll d'Espanya del Port Vell, s/n., E-08039 Barcelona, Spain.  
E-mail: chispano@aspro-ocio.es

## 3.2. Capítol 2

### Life cycle of fish parasite *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae).

Folia Parasitologica 61 (2014), 277-284.

#### 3.2.1. Introducció.

Actualment la família Gnathiidae compren 12 gèneres, entre els quals es troba el gènere *Gnathia* (Leach , 1813), essent el més nombrós de tots, amb més de 130 espècies descrites (Monod , 1926; Cohen and Poore, 1994).

Els Gnathiidae tenen una ampla distribució geogràfica, són un grup de isòpodes molt versàtils en quan a l'adaptació a diferents hàbitats. Es poden trobar tant a nivell costaner a pocs metres de profunditat, com a mar en dins; trobant-se espècies que fins i tot s'han adaptat a ambients abissals (Smit and Davies , 2004). Com es comenta en el treball de Coetzee, 2006, en general la distribució dels paràsits depenen de moltes variables. A nivell biòtic la seva distribució depèn principalment de la biologia del seu hoste i a nivell abiòtic un dels paràmetres més importants és la temperatura. El nombre d'espècies d'ectoparàsits incrementa des de les altes a les baixes latituds (Rohde , 2005). La temperatura afecta a les espècies paràsites de dues formes: la primera és que el nombre d'espècies incrementa en aigües calentes; i la segona en que les espècies varien en funció si són d'aigua calenta o d'aigua freda (Hedgpeth, 2001). Tot i que la seva distribució s'estén pràcticament a tots els mars i oceans (Schultz , 1969), sembla ser que són més abundants en àrees tropicals o d'aigua calenta. Els *Gnathiidae* tenen una ampla distribució a tot el món, el gènere *Gnathia* s'estén en aigües càlides i temperades. Segons Coetzee (2006), un 28% de les espècies descrites de *Gnathia* estan a l'Indo-Pacífic , un 26% d'espècies a Austràlia, un 17%

al Carib i un 11% d'espècies a Sud Àfrica. Les regions Mediterrànies, Boreals ( Nord-est de l'Atlàntic, Mar del Nord i Àrtic) i Panàmiques presenten el 6% de les espècies de *Gnathia* i la regió Peruana tan sols un 2%. Cal tenir en compte que aquests percentatges estan condicionats per un augment d'estudis que darrerament s'han efectuat en zones com Sud Àfrica (Smit and Basson , 2002), la Gran Barrera d'Austràlia (Coetzze, 2006) o Japó (Tanaka, 2004, 2005) en vers a altres de localitzacions com poden ser a l'oceà Pacífic o a l'oceà Índic.

De les 230 espècies que representen la família dels Gnathiidae (World List of Marine, Freshwater and Terrestrial Isopod) tan sols s'ha descrit el cicle biològic de 9 espècies:

- *Gnathia piscivora* (Paperna et Por, 1977) per Paperna and Por , 1977.
- *Paragnathia formica* (Hesse , 1864) per Monod , 1926, Mouchet , 1928, Stoll , 1962-1963, Amanieu, 1963 i Upton, 1987a,b.
- *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) per Smit , 1904, Mouchet , 1928 i Hispano, 2014.
- *Gnathia pilosus* (Hadfield et al.) descrit per Hadfield, Smit and Avenatoldewage al 2009.
- *Caecognathia calva* (Vanhöffen , 1914) per Wägele, 1987-88.
- *Caecognathia abyssorum* (Sars , 1872) per Klitgaard, 1991-97.
- *Elaphognathia cornigera* (Nunomura , 1992) per Tanaka and Aoki (1998-99 i 2000).
- *Gnathia africana* (Barnard , 1914) per Smit and Basson, 2003.
- *Caecognathia coralliophila* (Monod , 1926; Chong, T. 2015) per Chong, K. et al, 2015.

El cicle biològic de *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) ha esta descrit per diferents autors (Smith , 1904; Mouchet , 1928). En el cas de la descripció feta per Smith al 1904, la recol·lecció d'individus es va fer a la badia de Nàpols i no es va tenir en compte que existien més d'una espècie de Gnathiidae en la zona de mostreig. Com a resultat la descripció del cicle és incorrecta ja que els individus pertanyen a espècies diferents. L'estudi realitzat per Mouchet al 1928, es força complert, descrivint les diferents fases del cicle. Resten però alguns punts per aclarir, com són el nombre de mudes, el temps de cada una de les fases, mides dels individus segons l'estat, i informació relativa a la fecundació, incubació i temps de posta.

Un dels problemes més obvis per a estudiar el cicle biològic d'un gnàtid a la natura es el fet de presentar un cicle bifàsic i no poder diferenciar les espècies en la fase larvària. Es per tant necessari realitzar estudis en condicions de laboratori. En l'estudi realitzat en aquest capítol es va disposar de l'avantatge de poder comparar els resultats de laboratori amb les observacions obtingudes directament en el S3. Un altre avantatge va ser comptar amb un elevat nombre d'individus de totes les fases del cicle a través del mostreig realitzat a l'Oceanari, fet que ens va permetre realitzar els estudis al laboratori.

### **3.2.2. Objectius**

El nostre principal objectiu d'aquest capítol ha estat conèixer el cicle biològic que presentava *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) en les mateixes condicions físic-químiques que presenta el S3. Els principals paràmetres que es van tenir en compte van ser la temperatura (entre 17 i 18°C), i la salinitat (entre 37 i 38 ‰). Es va utilitzar com a punt de partida la descripció del cicle feta per Mouchet al 1928.

Per tant, els objectius plantejats han estat:

- 1 Establir un protocol pel manteniment *in vivo* del paràsit en el laboratori que permetés complementar l'observació del seu cicle de vida i una anàlisi biomètrica i morfològica detallada dels diferents estadis.
- 2 Revisar i fer una descripció complerta del seu cicle de vida.

### 3.2.3. Publicació



## Life cycle of the fish parasite *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae)

Coral Hispano<sup>1</sup>, Patrici Bultó<sup>1</sup> and Anicet R. Blanch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>L'Aquàrium, Moll d'Espanya del Port Vell, Barcelona, Spain;

<sup>2</sup>Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Abstract:** The taxonomic classification of some parasitic isopods of the family Gnathiidae has been revised in the last years. However, their biological cycles have been described only partially or incompletely. *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) is one of the most studied species, but certain aspects of its life cycle are still poorly known. A detailed study on the life cycle of *G. maxillaris* was carried out over several years by sampling larvae from an infestation of large volume aquaria at the Aquarium of Barcelona. At the same time, a system of *in vitro* cultivation of *G. maxillaris* was developed, which provided new data to complete the description of its life cycle. Periods of incubation, fertilization, planktonic stages, the attachment site on the fish host and biometric characteristics of larval forms were detailed. The new information may help better control health state of marine fish in aquaculture.

**Keywords:** Gnathiid isopods, aquarium, ectoparasite, harem formation, life history, infestation

In recent decades, interest in parasitic isopods of the family Gnathiidae has increased and their taxonomy has been revised (Cohen and Poore 1994, Smit and Davies 2004). Several new species have been described (Smit and Van As 2000, Smit and Basson 2002, Smit et al. 2002, Ota et al. 2007, Hadfield et al. 2008, Ota 2011). Moreover, ecological studies have been carried out on the role of isopod larvae in the food chain and their relationship with their corresponding hosts, including their pathological effects on wild and captive populations (Davies 1982, Mugridge and Stallybrass 1983, Drinan and Rodger 1990, Wagele 1992, Patarnello et al. 1995, Grutter and Hendrikz 1999, Heupel and Bennett 1999, Grutter et al. 2000, Davies and Smit 2001, Grutter 2003, Tanaka 2003, Marino et al. 2004, Genc 2007, Alas et al. 2009, Genc et al. 2011).

At present, the family Gnathiidae comprises 12 genera, including *Gnathia* Leach, 1813, which is the largest genus with over 190 species distributed worldwide (Cohen and Poore 1994, Hadfield and Smit 2008). Life cycles of only four species of gnathiids have been at least partly elucidated, namely those of *G. africana* (Barnard, 1914), *G. maxillaris* (Montagu, 1804), *G. pilosus* Hadfield, Smit et Avenant-Oldewage, 2008 and *Caecognathia calva* (Vanhöffen, 1914) (see Smith 1904, Wagele, 1988, Smit et al. 2003, Hadfield et al. 2009).

*Gnathia maxillaris* is one of the most studied species of the genus and its morphology was described by several authors (e.g. Smith 1904, Monod 1926, Cordillot 1979, Davies 1981). The species is widely distributed, having been found in the Atlantic Ocean and Baltic, North, Celt-

ic, Mediterranean and Tyrrhenian Seas (Smit and Davies 2004), and its life cycle was studied by Smith (1904) and Mouchet (1928).

In early 1997, the Aquarium of Barcelona detected an infestation of fish with *G. maxillaris* in its biggest tank, the Oceanarium. This exhibition aquarium is the largest exhibition aquarium (approximately 3 700 m<sup>3</sup>) of seawater, where over 3 000 fish of 80 different species are kept (teleosts and elasmobranchs). The infestation was subsequently confirmed in other aquaria of the Mediterranean exhibition section. The autopsy of fish showed an extremely high number of parasites attached to the body and fins with fish mortality (Hispano et al. 2013).

This study presents data on the life cycle of *G. maxillaris*, which was carried out by sampling larvae from aquaria with large volumes of water and a high diversity of fish. The cycle was studied by monitoring the infestation for several years until *G. maxillaris* was eradicated from the aquaria. At the same time, a procedure was developed for cultivating and keeping *G. maxillaris* in the laboratory (mesocosms). This allowed a more detailed descriptive study of the different stages of this ectoparasite during its life cycle.

### MATERIALS AND METHODS

#### Sampling and counting of larvae in the Oceanarium and study of life cycle

Larvae were harvested in the Oceanarium using their positive phototropism. The sampling was always performed at night (from 6 pm to 9 am), by installing lights along the bottom of the



Oceanarium outside the methacrylate walls. At the same time, water was pumped (15 m<sup>3</sup>/h) to that point through a planktonic mesh of 200 µm before returning to the Oceanarium as previously described (Hispano et al. 2013). Harvested larvae (zuphea and praniza forms) were rinsed with fresh water to immobilise them and thus facilitate their counting. Then, they were placed in a Petri dish (diameter of 90 mm) and counted under a stereoscopic microscope. Individual parasites were quantified and classified as zuphea, praniza or adult.

#### Identification of the parasite and its processing

The ectoparasite was identified on the basis of morphological description of males by Monod (1926). A sampling method was developed based on multiple trays containing different substrates that were placed at the bottom of the Oceanarium (Hispano et al. 2013). Then, a photographic register was created using stereoscopic microscopy. Subsequently, some specimens were prepared for examination by scanning electron microscopy.

Briefly, samples of zuphea, praniza and adult forms were fixed with 10% formaldehyde solution. Then, samples were dehydrated with a graded ethanol series up to 100% ethanol. Samples were dried with the E3100 Jumbo Series II Critical Point Drier apparatus (Polaron, Watford, UK). Dehydrated samples were mounted and coated with gold using Sputtering (JEOL JFC 1100) coater, according to the manufacturer's instructions. Mounted samples were examined with a scanning electron microscope FEI Quanta 200 at the University of Barcelona's Scientific and Technical Services.

#### Maintenance and life cycle study of *G. maxillaris* in the laboratory (mesocosms)

The life cycle of *G. maxillaris* was also studied experimentally under laboratory conditions (mesocosms). Live harvested larvae from the Oceanarium or those obtained under laboratory conditions were kept in 100 ml glass bottles with a screw cap at 18 ± 0.5°C. In preliminary tests, the conditions for keeping larvae were evaluated and the maximum maintenance temperature was established at 18 ± 0.5°C. Sampled larvae (zuphea or praniza) were kept individually to follow and record their development. The water was changed every two days. To keep a large number of individuals in the same laboratory mesocosm, bottles of larger volume were used.

#### Attachment of larvae to fish hosts

The study of the attachment of the parasites began with zuphea III larvae collected from the Oceanarium. First, zuphea III were tested on various species of teleosts as potential hosts, including sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus), white sea bream (*Diplodus sargus* Linnaeus), saddle bream (*Oblada melanura* Linnaeus), giant goby (*Gobius cobitis* Pallas) and conger [*Conger conger* (Linnaeus)]. Finally, the transformation from zuphea III to praniza III was achieved using sedation and sea bream (*S. aurata*) as a fish host. Assays were performed using one fish and 20 zuphea III (approximately 3 mm) in a 40 l aquarium at room temperature.

The use of anaesthetics (clove oil, 12–20 ppm) was also evaluated to facilitate the attachment of the ectoparasite to the body of the host and to avoid predation of planktonic larvae by the fish host. Once the experimental conditions had been established, the area of attachment to the host and the length of the blood feeding period were recorded to determine any correlation between these factors. When any zuphea III sucked blood to pass to the praniza stage, it was subsequently removed from

the tank and placed alone in a 100 ml glass bottle with a loose screw cap at 18 ± 0.5°C. Then, each praniza was monitored for the next few days to observe changes to the adult phase.

#### Study of larval stages

The same experimental approach was also used to study the early stages of the cycle (from zuphea I to zuphea III). Different larval stages were obtained from sampling water of Oceanarium (Hispano et al. 2013). The biometric and morphological analyses were performed under a stereoscopic microscope. Average and standard deviation were calculated for all biometric parameters. Larvae were caught from the 100 ml storage vessels with a 3 ml plastic Pasteur pipette whose tip was cut to avoid damage to the larvae. The larvae were then placed in a Petri dish with a drop of seawater, and with the help of a punch were turned and then measured under the stereoscopic microscope using a micrometer. The length of the larval body (zuphea or praniza) was measured from the edge of the cephalosome (the position of the sucking device) to the end of the pleotelson. Males were measured from the edge of the jaws to the pleotelson. Females were measured from the tip of the cephalosome to the end of the pleotelson. Additionally, the evolution of larvae was tracked with a video camera and photography.

#### Breeding assemblage study

The forms involved in breeding were also detected under laboratory conditions. The aim was to determine whether the male could fertilize a praniza III just before it moulted to an adult female. The assay consisted of placing a male with one praniza III in seawater in a 100 ml polypropylene vessel with a screw cap at 18 ± 0.5°C. The male was removed when the female praniza III began to moult. Fifteen assays using sets of an adult female with an adult male were kept in the same conditions. The adult females in these assays were from young praniza III, which were obtained in the laboratory from the zuphea III stage just after metamorphosis. Thus, we were certain that the recently moulted females had never been with a male. A photographic register and biometrics were also performed for all these assays. Praniza III and adult females from both sets of assays were tracked to observe their fertilization and then to describe their progress from embryogenesis to the hatching of zuphea I.

## RESULTS

#### Attachment of larvae to the fish host

Zuphea forms can attach anywhere on the host's body. However, there is a preference for blood irrigated areas or protected parts of the body that make it difficult for the host to remove the parasite by surface friction. Areas such as the base of the fins, around the eyes and near the operculum promote rapid absorption of blood. As a result, parasites attach to these areas for shorter periods. The suction time (feeding period) was calculated from the attachment of zuphea to the host fish until its release (Table 1).

The feeding period was highly variable, ranging from 20 minutes to 2–3 hours. Zuphea that were attached for short feeding periods with low blood ingestion had difficulties in further development and usually died before moulting. In contrast, zuphea with longer feeding periods ingesting significant amounts of blood showed greater ex-

pansion of their bodies and succeeded to the next stages of the life cycle.

### Development of larval stages

**Zuphea I.** The hatching period for zuphea I is between 48 and 72 h (Fig. 1A,B). Zuphea I were  $1.00 \pm 0.08$  mm long by  $0.30 \pm 0.05$  mm wide ( $n = 25$ ) (Fig. 1C). The number of zuphea per hatching varies depending on the size of the female from 30 to 90. Zuphea I larvae hatched in the laboratory were used to study the attachment of this stage on sea bream (*Sparus aurata*) under experimental conditions described above. Though some zuphea attached to the host immediately, others were caught and eaten by fish very quickly.

Sedation could not be used at this stage, because the anaesthetics affected the larvae. Some zuphea I attached to the host and sucked it after hatching, especially when no yolk remained. Zuphea I still having yolk reserves of nutrients that help them survive for some time delayed for a few hours the attachment to the fish host. This first moult from zuphea I to praniza I could be considered similar to other transitions to praniza stages. Zuphea I always showed high activity, swimming energetically and positive phototropism.

**Praniza I.** Detached praniza I measured  $2.6 \pm 0.2$  mm in length by  $0.6 \pm 0.1$  mm in width ( $n = 50$ ). Praniza I were mostly caught in the Oceanarium monitoring. They needed at least 10 days to start the moult into zuphea II under laboratory conditions. The moulting process was a characteristic isopod moult, consisting of a posterior moult followed by an anterior moult. The anterior moult includes the cephalon and up to the third segment of the pereon. The posterior moult includes the rest of the pereon and the pleon (Fig. 1E). The whole moulting process takes approximately 24 hours. Praniza I larvae were also very active and usually swimming.

**Zuphea II.** The average length was  $2.01 \pm 0.15$  mm and width  $0.6 \pm 0.1$  mm ( $n = 55$ ). The average increase in size with respect to zuphea I was around 1 mm. Zuphea II showed a lag time of 10–15 days before they took food (blood sucking) by attachment to the host. These larvae were also very active, with positive phototropic swimming.

**Praniza II.** This larval stage measured  $3.99 \pm 0.32$  mm in length by  $0.9 \pm 0.14$  mm in width ( $n = 50$ ) (Fig. 1D). The increase in size and length with respect to praniza I was around 1.39 mm. Praniza II showed less activity than the previous stages but were still usually swimming. The moulting process was similar to that observed for praniza I. It started in the posterior part of the body and finished in the anterior part. Praniza needed at least 10 days to start the moult into zuphea III under laboratory conditions.

The moulting period was very similar to that from praniza I to zuphea II, taking approximately 24 hours. In some cases, praniza II moulted into adult forms. In particular, a praniza II was observed directly moulting into a female (3.3 mm) and another to a male (3.8 mm). In

**Table 1.** Feeding period of zuphea (20 independent observations) and attachment site when blood was sucked from the fish host under laboratory conditions

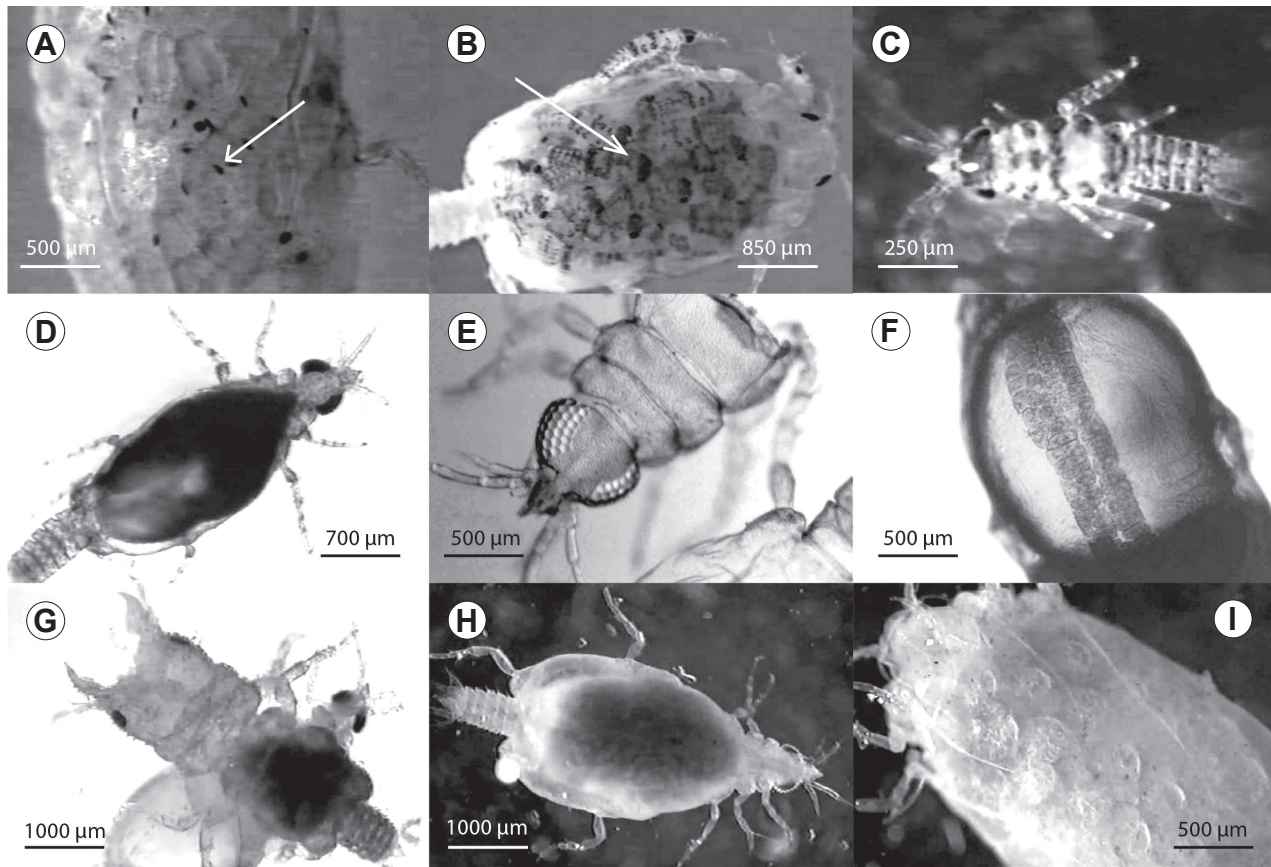
Ingestion time (min)	Attachment place
21	Head
25	Head
25	Head
27	Dorsal fin
35	Head
46	Pectoral fins
59	Head
61	Pectoral fins
74	Ventral fin
81	Dorsal body
89	Ventral fin
95	Ventral fin
100	Dorsal fin
102	Dorsal fin
108	Anus
111	Dorsal fin
115	Dorsal body
115	Dorsal fin
115	Dorsal fin
126	Dorsal fin

the case of this specific female, the whole breeding period was monitored and a total of 33 viable zuphea I were hatched. This moult from praniza II to adult forms was observed several times under the experimental conditions in the laboratory.

**Zuphea III.** Over 400 zuphea III were observed and 50 of these were measured; they were  $3.21 \pm 0.24$  mm long by  $0.9 \pm 0.1$  mm wide (Fig. 2). Zuphea III were on average 1.20 mm longer than zuphea II. Zuphea III were also very active, swimming constantly. They showed positive phototropism.

**Praniza III.** A total of 279 praniza III were observed and they measured  $5.19 \pm 0.38$  mm in length by  $1.54 \pm 0.25$  mm in width ( $n = 50$ ; Fig. 1H). Praniza III were around 1.2 mm longer than praniza II. A decrease in activity was observed in this larval stage. It was possible to differentiate praniza III that would become males from those that would moult into females (Fig. 1F). This differentiation was possible, because the development of the ovary could be observed. In this study, we observed fertilization between an adult male and a future female praniza III (Fig. 1G).

This was first seen when a praniza III from the Oceanarium was isolated in the laboratory. After being kept alone, this praniza III completed the moult into female, hatched eggs and zuphea I emerged. This experience was confirmed experimentally 15 times using a container having an adult virgin female and a male. The eggs laid by these females were not viable. In contrast, when a similar experiment was performed with a future female praniza III and an adult male, mating occurred. The fertilized praniza III moulted into a female and laid viable eggs that hatched.



**Fig. 1.** Life cycle stages of *Gnathia maxillaris*. **A** – adult female hatching zuphea (arrow); **B** – adult female having zuphea (arrow); **C** – posthatched zuphea; **D** – praniza II; **E** – moults; **F** – developed gonads in praniza III; **G** – fertilization between female praniza III and adult male; **H** – first stage of praniza III moulting to adult female; **I** – female carrying embryonic eggs.

This observation was confirmed in 15 assays. The process of moulting from praniza III to adult forms was slower and took between 24 and 48 hours. Offspring were always obtained when metamorphosis and subsequent incubation of praniza III were successful.

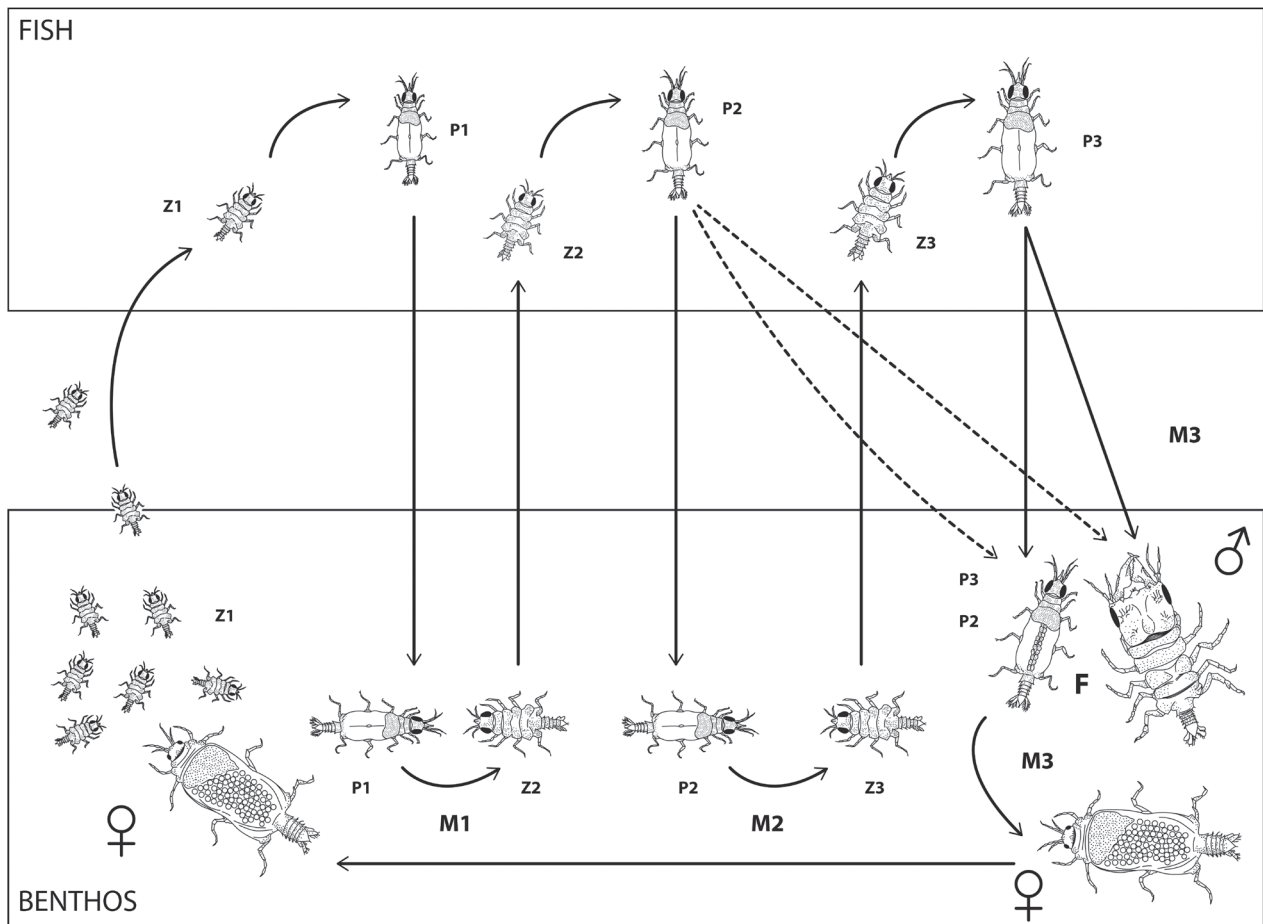
**Adults.** Of a total of 258 praniza III, only 184 moulted into adult forms under laboratory conditions. Twenty-nine per cent mortality was recorded in the moulting process from praniza III to adult. The sex distribution after the moulting process was 56% males and 44% females. There was high synchronicity among the larval population in the moulting process from praniza III to the adult stage. Males require shorter moulting periods than females. Moulting of praniza III to males takes from 12 to 14 days, while praniza III moulting to females takes between 19 and 26 days, with an average of 22 days (Fig. 1E). A total of 35 males were measured. They had an average length of  $5.20 \pm 0.72$  mm. Thirty females were also measured, with an average length of  $4.70 \pm 0.68$  mm. Females showed an incubation period between 19 and 28 days (Fig. 1I). Hatching takes place between 48 and 72 hours. The average number of zuphea I per hatching and female was  $51 \pm 20$  larvae. Females die within a few

days of the birth of zuphea I. Males live about one to two months once they have moulted into adults.

## DISCUSSION

Mouchet (1928) described the different larval stages of the life cycle of Gnathiidae based on observations of a group of individuals of *Gnathia maxillaris*. He described that larvae reached adult forms through progressive phases zuphea-praniza. Previously, other authors (Smith 1904, Monod 1923) recognized only three morphological stages in the cycle but not the larval phases: segmented free larvae, larvae attached to the host, and adult forms. These authors found a large difference in size between larvae of the same morphology, but have no explanation for such biometric diversity. Mouchet (1928) focused on explaining the diversity of sizes observed in each morphological larval type by Smith (1904) and Monod (1923). He did not study the adult phase, the period of incubation, or the size of larvae, nor other biometric values.

In the present study, adult phases have been studied and the period of attachment of larvae on the host has been monitored by determining the suction time (feeding period) and the attachment sites on the host. We also



**Fig. 2.** Life cycle of *Gnathia maxillaris*. Abbreviations: P – praniza; Z – zuphea; F – fecundation; M1, M2 – moult; M3 – metamorphose.

measured all larval stages for the first time, using a representative sample of different stages and forms. Furthermore, we demonstrate the first metamorphoses between praniza I and II zuphea, which was supposed but not proved by Mouchet (1928).

The complementary approach (mesocosm and a large volume exhibition aquarium) used in this study enabled us to describe in detail the life cycle of *G. maxillaris*. Some aspects that could not be observed in the open sea or in the Oceanarium, such as metamorphosis and lifetime of males, were observed in the defined mesocosm.

It was observed that *G. maxillaris* in large aquaria followed the same pattern of activity throughout the day and emerged from the bottom to feed at night or at dusk or dawn. This pattern of activity has also been observed in nature for several isopods (Grutter 1999, Grutter and Hendrikz 1999, Grutter et al. 2000, Chambers and Sikkell 2002, Cote and Molloy 2003). The gregarious behaviour of larvae (both zuphea and praniza) and males was observed *in vivo* assays carried out. However, this behaviour was not as common in females.

The life cycle of *G. maxillaris* at a temperature of 17.5°C takes 3 months. When the temperature rose from

17.5 to 20°C in the Oceanarium, the duration of the cycle decreased to about two months. It was not possible to monitor the whole life cycle under laboratory conditions at higher temperature (room temperature around 22°C), because of problems with the growth of ciliates and diatoms. The temperature increase also promoted growth of the parasite population, because females were larger and the number of eggs per female was higher. This temperature-linked relationship between the size of females and the number of eggs is in agreement with that reported by other authors for other isopod species (Klitgaard 1991, Tanaka and Aoki 2000).

Given the context of captivity and the environment in which this study was carried out, it cannot be said whether the cycle of *G. maxillaris* follows a seasonal pattern or not. A constant temperature was maintained in the aquarium with infected hosts and laboratory assays. The life cycle of another species, *Gnathia africana*, does not follow a seasonal pattern (Smit et al. 2003). This species occurs mainly on the coast of South Africa, which has a climate similar to the Mediterranean area where *G. maxillaris* lives. Other gnathiid species such as *Paragnathia formica* (Hesse, 1864) or *Caecognathia calva* exhibit seasonal

patterns and their short life cycles have been attributed to the high temperature of water found in some seasons (Tanaka and Aoki 2000).

The use of anaesthetic for sedation of host fish was found to be essential to study the development of different larval stages in the laboratory. Otherwise, host fish caught planktonic larvae, especially during the stage of newborn zuphea. The sedation of host fish slowed down or stopped their predation of zuphea.

However, zuphea I were also affected by the anaesthetics. Therefore, we could follow the larval stages and their metamorphosis to adult stages that occurs during the life cycle of *G. maxillaris*. There are up to three moults in the life cycle: first moult of swollen larvae (praniza I) to segmented larvae (zuphea II), second moult of swollen praniza II to segmented zuphea III, and the last moult of praniza III to reproductive adult stages. We also observed that praniza II or praniza III could metamorphose to adult females.

Zuphea I newborns have a similar size to each other (about 1 mm in length). They are completely developed when they hatch and already show typical pigmentation. Soon after hatching, they can attach to the host. Zuphea I may still have yolk reserves, which are used during the first few days. Both observations confirmed previous studies (Monod 1926, Mouchet 1928, Smit et al. 2003).

It seems that *G. maxillaris* zuphea has no preference for any area of the host's body. However, zuphea that attaches to the fins need to suck blood longer and, subsequently, a longer period to change into praniza. This observation supports the suggestions of other authors (Smit et al. 2003), who assumed that the fins are less blood irrigated areas. Newborn zuphea I suck lymph and very few praniza I were found showing the pereon dilated with blood. This observation is in agreement with what other authors have indicated: when the mouthparts are smaller, the larvae cannot swallow blood cells (Grutter 2003).

It seems that this also depends on the position of feeding larvae on the fish and the extent of perforation and suction by the larva (Monod 1926). That is also why praniza II and III were sometimes found with a yellow or white hindgut contents. The green-blue colour of the hindgut of pranizas was also observed on those attached to *Labrus bergylta* (Ascanius) or *Anguilla anguilla* (Linnaeus), as described by other authors (Monod 1926, Mouchet 1928). Additionally, variation in the duration of the feeding period of zuphea could be related to zuphea size and the attachment area on fish. Swollen larvae detach from the host once they have ingested lymph or blood. Praniza I takes at least 10 days to moult into zuphea II.

Mouchet (1928) did not observe the moult to praniza II but he assumed that this moult exists. Zuphea II can still digest the food after finishing the whole moult. Then, zuphea II larvae could again attach to a host to continue the life cycle. However, in this study we observed that

some praniza II can become adult under certain circumstances, while Mouchet (1928) observed only the moult from praniza III to adult forms.

The present study indicates that larvae from each stage are of a similar size, which differs from that of other larval stages and helps in recognition of larval forms. The sizes of *G. maxillaris* larvae in this study varied between 0.9 mm and 6.5 mm, depending on the life cycle stage. Similar differences between larval stages have been reported in other gnathiids (Wagele 1988, Smit et al. 2003, Tanaka 2003).

The sex can be distinguished from praniza III. The transparency of the integument of the dorsal part of the body facilitates the monitoring of sexual differentiation and the development of eggs. It was observed that the width of the pereon in future female praniza increases as eggs are produced. The moult into adult starts after the maturation of the ovary.

Hesse (1864) suggested that fertilization occurs before moulting but did not provide any evidence. In this study, we confirmed that the fertilization occurs at this female praniza stage. This step differentiates *G. maxillaris* from other gnathiid species. For example, fertilization described for *G. africana* by Smit et al. (2003) and *Caeognathia calva* by Wagele (1987) occurs between female and male adults.

After a few days, eggs are laid in the female brood pouch (marsupium). Our observations indicate that embryogenesis progresses if the eggs are fertilized and lasts between 19 and 28 days. The hatching lasts 48–72 hours. Zuphea I leaving the marsupium through oostegites can easily be observed under stereoscopic microscope. Moreover, we observed that zuphea I have sometimes been observed re-entering the brood pouch. Additionally, in this study we saw that larvae of *G. maxillaris* do not moult after hatching before they become zuphea I, as observed for *Gnathia piscivora* Paperna et Por, 1977. The number of zuphea per hatching varies and is correlated with the size of the female, as also observed by other authors (Monod 1926, Tanaka and Aoki 2000).

When this stage starts from female praniza III zuphea I hatch, usually between 50 and 90 days. It has also been observed in the laboratory that what was thought to be praniza II can moult to adult forms (both males and females). The moult at this stage may be related to unfavourable environmental conditions or overlapping generations of males to increase the chances of mating. In such cases, the number of incubated eggs ranges between 20 and 40 and females die a few days after the zuphea have hatched.

The obtained results show that male praniza usually moult to adult males in a shorter period than females. Unlike the life cycle described for *C. calva* by Wagele (1987), praniza III of *G. maxillaris* moult directly to males. There was no stage of immature male as described for *C. calva*.

Males *G. maxillaris* are usually larger than females. The size of their head and jaws makes them much longer than larval forms and adult females as also observed by Monod (1926). Our observation confirms data by Mouchet (1928) that females die after hatching. Once males complete metamorphosis in laboratory conditions, they remained alive for 30 to 50 days.

The 'harem' behaviour of larvae was also observed in the laboratory and is similar to that seen in other species such as *Paragnathia formica* (Hesse, 1864), *Caecognathia abyssorum* (Sars, 1872), *Caecognathia calva* (Vanhöffen, 1914) and *Caecognathia robusta* (Sars, 1879) – see Upton (1987), Wagele (1988), Klitgaard (1991), Barthel and Brandt (1995). This behaviour was previously described by Monod (1926) and Mouchet (1928) in *G. maxillaris*. In this study we confirmed that this behaviour is usual in zuphea, praniza and males but was less common in fertilized adult females.

## REFERENCES

- ALAS A., OKTENER A., YILMAZ M. 2009: *Gnathia* sp. (Gnathiidae) infestations on marine fish species from Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi* 15: 201–204.
- BARTHEL D., BRANDT A. 1995: *Caecognathia robusta* (GO Sars, 1879) (Crustacea, Isopoda) in *Geodia mesotriaena* (Hentschel, 1929) (Demospongiae, Choristidae) at 75 degrees N off NE Greenland. *Sarsia* 80: 223–228.
- CHAMBERS S.D., SIKKEL P.C. 2002: Diel emergence patterns of ecologically important, fish-parasitic, gnathiid isopod larvae on Caribbean coral reefs. *Caribb. J. Sci.* 38: 37–43.
- COHEN B.F., POORE G.C. 1994: Phylogeny and biogeography of the Gnathiidae (Crustacea: Isopoda) with descriptions of new genera and species, most from south-eastern Australia. *Mem. Mus. Victoria* 54: 271–397.
- CORDILLOT F. 1979: Anatomia de *Gnathia maxillaris*. Diplomarbeit in Zoologie, Institut für Zoologie der Universität Basel, 91 pp.
- COTE I.M., MOLLOY P.P. 2003: Temporal variation in cleanerfish and client behaviour: does it reflect ectoparasite availability? *Ethology* 109: 487–499.
- DAVIES A.J. 1981: A scanning electron-microscope study of the praniza larva of *Gnathia maxillaris* Montagu (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae), with special reference to the mouthparts. *J. Nat. Hist.* 15: 545–554.
- DAVIES A.J. 1982: Further studies on *Haemogregarina bigemina* Laveran and Mesnil, the marine mish *Blennius pholis* L., and the isopod *Gnathia maxillaris* Montagu. *J. Protozool.* 29: 576–583.
- DAVIES A.J., SMIT N.J. 2001: The life cycle of *Haemogregarina bigemina* (Adeleina: Haemogregarinidae) in South African hosts. *Folia Parasitol.* 48: 169–177.
- DRINAN E.M., RODGER H.D. 1990: An occurrence of *Gnathia* sp., ectoparasitic isopods, on caged Atlantic salmon. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 10: 141–142.
- GENC E. 2007: Infestation status of gnathiid isopod juveniles parasitic on dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) from the northeast Mediterranean Sea. *Parasitol. Res.* 101: 761–766.
- GENC E., ORAL M., EROL C. 2011: The evaluation of gnathiid (Crustacea: Isopoda: Gnathidae) parasitism in goldblotch grouper (*Epinephelus costae* Steindachner, 1878) in the north-eastern Mediterranean Sea using the self-organizing map (SOM). *Parasitol. Res.* 108: 1417–1424.
- GRUTTER A.S. 1999: Infestation dynamics of gnathiid isopod juveniles parasitic on the coral-reef fish *Hemigymnus melapterus* (Labridae). *Mar. Biol.* 135: 545–552.
- GRUTTER A.S. 2003: Feeding ecology of the fish ectoparasite *Gnathia* sp. (Crustacea: Isopoda) from the Great Barrier Reef, and its implications for fish cleaning behaviour. *Mar. Ecol. Prog. Series* 259: 295–302.
- GRUTTER A.S., HENDRIKZ J. 1999: Diurnal variation in the abundance of juvenile parasitic gnathiid isopods on coral reef fish: implications for parasite-cleaner fish interactions. *Coral Reefs* 18: 187–191.
- GRUTTER A.S., LESTER R.J.G., GREENWOOD J. 2000: Emergence rates from the benthos of the parasitic juveniles of gnathiid isopods. *Mar. Ecol. Prog. Series* 207: 123–127.
- HADFIELD K.A., SMIT, N.J. 2008: Description of a new gnathiid, *Afrignathia multicavea* gen. et sp. n. (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae), from South Africa. *Afr. Zool.* 43: 81–89.
- HADFIELD K.A., SMIT N.J., AVENANT-OLDEWAGE A. 2008: *Gnathia pilosus* sp. nov. (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae) from the East Coast of South Africa. *Zootaxa* 23–41.
- HADFIELD K.A., SMIT N.J., AVENANT-OLDEWAGE A. 2009: Life cycle of the temporary fish parasite, *Gnathia pilosus* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae) from the east coast of South Africa. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 89: 1331–1339.
- HISPANO C., BULTÓ P., BLANCH A.R. 2013: *Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies. *J. Appl. Ichthyol.* 29: 1139–1144.
- HESSE M.R. 1864: Mémoire sur les pranizes et les ancées. *Mém. Savant Étrangers. Acad. Sci.* 18: 231–302.
- HEUPEL M.R., BENNETT M.B. 1999: The occurrence, distribution and pathology associated with gnathiid isopod larvae infecting the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. *Int. J. Parasitol.* 29: 321–330.
- KLITGAARD A.B. 1991: *Gnathia abyssorum* (GO Sars, 1872) (Crustacea, Isopoda) associated with sponges. *Sarsia* 76: 33–39.
- MARINO F., GIANNETTO S., PARADISO M.L., BOTTARI T., DE VICO G., MACRI B. 2004: Tissue damage and haematophagia due to

- praniza larvae (Isopoda: Gnathiidae) in some aquarium seawater teleosts. *Dis. Aquat. Org.* 59: 43–47.
- MONOD T. 1926: A monograph of the Gnathiidae, including the morphology, biology and systematics of the group. *Mem. Soc. Sci. Nat. Maroc.* 13: 1–668.
- MOUCHET S. 1928: Note sur le cycle evolutif des Gnathiidae. *Bull. Soc. Zool. France* 53: 392–400.
- MUGRIDGE R.E.R., STALLYBRASS H.G. 1983: A mortality of eels, *Anguilla anguilla* L., attributed to Gnathiidae. *J. Fish Dis.* 6: 81–82.
- OTA Y. 2011: A new species of the gnathiid isopod, *Gnathia teruyukiae* (Crustacea: Malacostraca), from Japan, parasitizing elasmobranch fish. *Bull. Nat. Mus. Nat. Sci. Series A, Zool., Suppl.* 5: 41–51.
- OTA Y., TANAKA K., HIROSE E. 2007: A new species of *Gnathia* (Isopoda: Cymothoidea: Gnathidae) from Okinawajima island, Ryukyu archipelago, southwestern Japan. *Zool. Sci.* 24: 1266–1277.
- PAPERNA I., POR F.D. 1977: Preliminary data on the Gnathiidae Isopoda of the northern Red Sea, the Bitter Lakes, Suez Canal, Egypt and the Eastern Mediterranean and the biology of *Gnathia piscivora* new species. *Rapp. Proc. Verb. Reun. Comm. Int. Explor. Scient. Mer Medit., Monaco* 24: 195–198.
- PATARNELLO S.P., FIORAVANTI M.L., CAGGIANO M., RESTANI R. 1995: Infestazione da Gnathiidae (Crustacea, Isopoda) in *Paragrus major*. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittic.* 17: 32–36.
- SMIT N.J., BASSON L. 2002: *Gnathia pantherina* sp. n. (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae), a temporary ectoparasite of some elasmobranch species from southern Africa. *Folia Parasitol.* 49: 137–151.
- SMIT N.J., BASSON L., VAN AS J.G. 2003: Life cycle of the temporary fish parasite, *Gnathia africana* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). *Folia Parasitol.* 50: 135–142.
- SMIT N.J., DAVIES A.J. 2004: The curious life-style of the parasitic stages of gnathiid isopods. *Adv. Parasitol.* 58: 289–391.
- SMIT N.J., VAN AS J.G. 2000: A new species, *Gnathia nkulu* sp. n. (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae) from southern Africa. *Folia Parasitol.* 47: 235–240.
- SMIT N.J., VAN AS J.G., BASSON L. 2002: Redescription of the female of *Gnathia africana* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae) from southern Africa. *Folia Parasitol.* 49: 67–72.
- SMITH G. 1904: Metamorphosis and life-history of *Gnathia maxillaris* (Isopoda). *Mt. Stat. Neapol.* 16: 469–479.
- TANAKA K. 2003: Population dynamics of the sponge-dwelling gnathiid isopod *Elaphognathia cornigera*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 83: 95–102.
- TANAKA K., AOKI M. 2000: Seasonal traits of reproduction in a gnathiid isopod *Elaphognathia cornigera* (Nunomura, 1992). *Zool. Sci.* 17: 467–475.
- UPTON N.P.D. 1987: Asynchronous male and female life-cycles in the sexually dimorphic, harem-forming isopod *Paragnathia formica* (Crustacea, Isopoda). *J. Zool.* 212: 677–690.
- WAGELE J.W. 1987: Description of the postembryonal stages of the Antarctic fish parasite *Gnathia calva* Vanhoffen (Crustacea, Isopoda) and synonymy with *Heterognathia* Amar and Roman. *Polar Biol.* 7: 77–92.
- WAGELE J.W. 1988: Aspects of the life-cycle of the Antarctic fish parasite *Gnathia calva* Vanhoffen (Crustacea, Isopoda). *Polar Biol.* 8: 287–291.
- WAGELE J.W. 1992: Antarctic Isopoda (Crustacea: Peracarida): stress in a polar environment? *Bielefel. Ökol. Beitr.* 6: 93–101.

Received 14 May 2013

Accepted 25 October 2013

### 3.3. Capítol 3

#### **Descripció morfològica de *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopod: Gnathiidae) amb microscòpia electrònica.**

*Per ser sotmesa a Zootaxa*

##### **3.3.1. Introducció**

*Gnathia maxillaris* (Montagu , 1814), va ser descrita per Theodore Monod a l'any 1926. La identificació de les espècies de Gnàtids es basa en la descripció de caràcters morfològics dels mascles adults. Actualment en el gènere *Gnathia* (Leach , 1914) hi ha 135 espècies descrites. La Família *Gnathiidae* (Leach , 1914) posseeix una ampla distribució geogràfica. Ha estat localitzada a les costes del Mar del Nord, del sud d'Anglaterra, al Mar d'Irlanda, a la costa nord-est de l'Atlàntic i al Mar Mediterrani. Segons Wye , 1991, un 6% dels gnàtids es troben al Mediterrani (Coetzee, 2006). *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) és una espècie que viu en aigües superficials del litoral marí, trobant-se tan en ambients sorrencs com rocosos.

A l'any 1997 es va detectar la presència de gnàtids al sistema mediterrani de l'Aquàrium de Barcelona. Varies mostres de mascles es van extraure del tanc principal d'aquest sistema per a identificar l'espècie. La tasca d'identificació es va fer fent servir el sistema definit per Monod (1926).

Tot i que els peixos d'aquest sistema infestat provenen del Mediterrani, l'origen exacte d'aquest paràsit es desconeix, ja que els proveïdors eren de localitats diferents del sud d'Espanya (Cadis i Almeria), de la costa de Llevant (València), de la costa Catalana i del sud de França.

Els resultats que vàrem obtenir es van comparar amb un individu mascle salvatge provinent de les Balears per tal de reforçar la seva identificació.



Aquest individu prové de la col·lecció biològica de la campanya Eivissa 1989 realitzada pel Departament de Zoologia de la Facultat de Barcelona.

Per a l'estudi dels caràcters morfològics s'han efectuat disseccions d'un mascle del gnàtid aïllat en l'Aquàrium i del mascle provinent de les Balears. A l'hora també s'han fet fotografies al microscopi electrònic de dos individus macles de l'Aquàrium per a obtenir una visió dorsal i un altre ventral de les mostres.

L'estudi dels caràcters morfològics s'ha basat, tal i com s'ha comentat anteriorment, en la descripció de Monod (1926), i s'han tingut en compte els caràcters que s'estudien a la matriu proposada per Cohen and Poore, 1994. En aquest treball es segueix el criteri anatòmic establert per Cohen and Poore 1994 per a l'enumeració del nombre de pereionites.

### **3.3.2. Objectius**

L'objectiu d'aquest treball ha estat:

- 1 Revisar i consolidar la descripció morfològica de l'espècie, i en particular de les formes del mascle adult.

### 3.3.3. Publicació.

#### **A complementary morphological description of *Gnathia maxillaris* (Crustacea:Isopoda: Gnathiidae) from the Mediterranean Sea.**

Coral Hispano<sup>1\*</sup>, Laura Sala-Comorera<sup>2</sup>, Josep Castelló<sup>3</sup>, Patrici Bultó<sup>1</sup> and Anicet R. Blanch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*L'Aquàrium, Moll d'Espanya del Port Vell, Barcelona, Spain;*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;*

<sup>3</sup>*Department of Teacher Training in Experimental Sciences and Mathematics, University de Barcelona, Barcelona, Spain.*

**\*Address for correspondence:**

Coral Hispano. L'Aquàrium, Moll d'Espanya del Port Vell s/n., 08039 Barcelona, Spain.

Telephone: (+34) 932217474; Fax: (+34) 932216166; Email: [chispano@asproocio.es](mailto:chispano@asproocio.es)

**Running header:** *Gnathia maxillaris* from the Mediterranean Sea

#### **Abstract**

A complementary morphological description of an adult male of *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) based on stereoscope and scanning electron microscopy was performed using samples collected during an outbreak in the Mediterranean system at the Barcelona Aquarium. The description have been compared with the description that Theodore Monod did at “Des assais monographic de Gnathiidae, 1926”, and compare too with an individual of wild male comes from Balear Island.

## Introduction

An outbreak with *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) in the Mediterranean system at the Barcelona Aquarium provided the opportunity to study this fish parasite over an extended period of time (Hispano *et al.* 2013). This infestation affected aquaria and facilities related to the Mediterranean system, that has a total volume of 4.100 m<sup>3</sup> of water distributed in 12 tanks. The biggest tank, called Oceanarium, has 3700 m<sup>3</sup>, 35 m of diameter and 5 m deep. This tank is the most emblematic tank with a high number of species of fishes, including elasmobranchs, which diffculted the eradication of this parasite

*Gnathia maxillaris* is a coastal species in cold and temperate coastal sea, usually located in interstitial zones as interstitial sandy beaches and rocky. It shows a wide geographical distribution, and has been cited in the North East Ocean Atlantic (Monod 1926; Mouchet 1928; Hesse 1891), Irish Sea (Guiry & Guiry 2011), Oriental Atlantic (Castelló & Junoy 2007); North Sea (Monod 1926; Holthuis 1950) and the Mediterranean Sea (Monod 1926; Mouchet 1928; Bibiloni 1981; Castelló & Carballo 2001; Bedini *et al.* 2010; Koukouras 2010; Bakir *et al.* 2014).

Since its inauguration in 1997, the Barcelona Aquarium has been frequently detecting detection Gnathidae infestations in fish caught by fishermen in the Barcelona's coast. The presence of Gnathidae is common in spring and summer, extending to mid-autumn especially during warmer years. These ectoparasites have never been observed in the tropical fish kept in the Aquarium because the entries of these tropical species have been always monitored by strict healthy management and quarantine protocols in the facilities.

The identification of *Gnathia* species is mainly based on the morphological description of adult males (Monod 1926; Smit & Davies 2004; Cohen & Poore 1994). There is a high diversity of morphological forms, allowing species differentiation. This diversity of morphological characters, most of which are found in the cephalon, is due to the adaptation of Gnathiidae to the marine benthos (Monod 1926; Smit & Davies 2004; Farquharson 2001). Although the

taxonomical classification of Gnathiidae species based on morphological characteristics presents important limitations, about 190 species have been described (Tanaka 2007; Smit & Davies 2004). It could be expected that genetic analysis would help to identify the species, in which case classification could be performed without the need to obtain males for the necessary morphological and biometric study; in addition, more life cycle forms would be available for study since the vast majority of samples are larval stages obtained from catching fish to which parasites are attached or from marine plankton. However, very few studies have been conducted to identify the species based on DNA species-specific sequences (Grutter *et al.* 2000; Ota 2012) and still molecular reference materials and species-specific DNA targets are not sufficient consistent. The exact origin of the causative agent of infection is not known. Neither knows what fish species could enter it into the Aquarium. Therefore, biometrics and morphological characteristics were studied under a stereoscopic microscope for species identification in accordance with previously established classification keys (Monod 1926; Cohen & Poore 1994) and compared with other nearby isolated *G.maxillaris* in the Western Mediterranean (Castelló & Carballo 2001). Observation of certain undefined characters suggested the need for a more detailed analysis using stereoscopic microscopy.

### **Materials and methods.**

**Harvest of larvae and adults and identification:** Adults were harvested in the Mediterranean system at the Barcelona Aquarium as previously described (Hispano *et al.* 2013). Also some samples were obtained from metamorphosed pranzia (P3) at laboratory (Hispano *et al.* 2014). The specimens were fixed for further morphological studies. Initial species identification was performed by comparing morphological characteristics of males with Monod's dichotomous keys (Monod 1926). Later, morphological properties observed under stereoscopic microscope and scanning electron microscope were used for species identification based mainly on the features established by Monod (1926) and complemented with the morphological description by Cohen & Poore (1994).

The three isolates males (a, b, i c) from the Aquarium of Barcelona were compared to one male (d) isolated from Balearic Island by col·lecció del Departament de Zoologia, campanya estudio de la fauna bentònica de Ibiza, 1989.. All the observed samples were preserved with 70% ethanol solution.

**Stereoscopy microscope and scanning electron microscopy observations.**

Dissections performed on the males (c) and (d), have been made under stereoscopy microscope using needles that allow the extraction of the tiny size pieces. Each piece was put on a slide and set the cover slip with paraffin with the aid of a heat source. The illustrations were done by hand with the help of a panel of lights.

The adult males (a) and (b) were prepared for examination by scanning electron microscopy in order to conduct a detailed morphological analysis. Briefly, adult forms fixed with 70% ethanol solution were dehydrated with a graded ethanol series up to 100% ethanol. Samples were dried with the E3100 Jumbo Series II Critical Point Drier apparatus (Polaron, Watford, United Kingdom). Dehydrated samples were mounted and gold coated using a JEOL JFC 1100 sputter coater, according to the manufacturer's instructions. The mounted samples were examined with an FEI Quanta 200 scanning electron microscope belonging to the University of Barcelona's Scientific and Technical Services. The male (a) was placed dorsally on a disk and in the same disk the male (b) was placed ventrally.

**Results**

TAXONOMIC PART

Ordre *Isopoda* Latreille , 1817

Subordre *Cymothoida* Wägele, 1989

Superfamilia *Cymothooidea* Leach 1814

Familia *Gnathiidae* Leach, 1814

Gènere *Gnathia* Leach, 1814

*Gnathia maxillaris* Montagu, 1804

**Adult male**

Figs. 1-15, 16-27

The biological reference material for this description of *G. maxillaris* has been deposited in the collection of the *Centre de Recursos de Biodiversitat Animal* (CRBA) at the University of Barcelona: CRBA-21957 to CRBA-21964.

**Description:** Total lengths of new material: male (a) 4.57 cm Fig. ; male (b) 4.69 cm Fig., male (c) 4.1 cm Fig. and male (d) 3.7 cm.

(Fig.-18, 21, 27)

**Cephalon.** Eyes well developed, lateral and sessile. Cephalon is rectangular, 1.2 times as wide as long. Lateral margins straight and antero corner square, posterior margin slightly concave. Cephalosome covered with sensory pits distributed randomly over dorsal and lateral surface. Long simple setae at the lateral margins and 5-6 smaller setae at the superior frontolateral process. A straight line of simple setae runs parallel to the frontal border just above the eyes. V-shape dorsal sulcus, extending half the length of the cephalosome, without sensory pits. Supraocular lobe rounded. Paraocular ornamentation consisting of 7-8 tubercles with various simple dorsal setae (Figs. 2, 3, 4, 24, 25).

**Frontal border.** Frontal border of cephalon transverse, with frontal process. Supraocular lobe rounded without lobus accessorius. Superior frontolateral process conical with median notch, and 5-6 setae. Inferior frontolateral process present, with scales at the margin. Mediofrontal process small and conical. (Figs. 3, 22, 24).

**Antennae.** Antenna 2 longer than antenna 1.

Antenna 1 with three peduncle articles, the third of which is the largest. First article of peduncle with 3 plumose setae. Second article with 4-5 plumose seta distally. Third article with 9-11 simple setae at lateral margins and 4-5 setae distally, at least one plumose. Flagellum of antenna 1 with 5 articles, article 5 terminating with 3-4 longer simple setae and 1 plumose seta (Fig.8).

Antenna 2 with four peduncle articles, of which articles 3 and 4 are the largest. First article with pectinate scales and short setae at external margin. Third article with 2 plumose setae and 9-11 simple setae distally. Fourth article with 18-20 setae along lateral margins, 3-4 plumose setae and 4-5 simple setae distally. Flagellum with seven articles, and article 7 terminating with 3 or 4 simple setae (Fig. 9).

**Mandible.** Mandibles parallel to longitudinal axes of the body. Mandible robust, in rest position mandible tips are slightly crossed and curved inwards. Carina armed and mandibular incisor process with one setae. Dentate mandibular blade with 8-10 processes. Internal lobe present (Fig. 3,23, 26).

**Maxilliped.** Maxilliped with 5 articles, proximal article largest, distal four articles with plumose setae on external margin in order of 5-6-5-9. Endite contiguous with article 2 and reaching article 3. Simple setae on the internal margin of the articles (Fig. 10).

**Pylopod.** Three articles. First article greatly enlarged, with internal border fringed with plumose setae (between 31 and 33) and external margin with short simple setae. Three aereolae. Two simple setae posteriorly near external border and seven near second article. Second article conical, longer than wide, with seven simple setae on ventral surface and short simple setae on margins. Third article minute, with few setae (Fig. 5,6,7).

**Pereon.** Simple setae present all over. Pereon as wide as cephalon, with posterior pereonites narrower than the anterior. Pereon 1.7 times as long as wide. Pereonite 1 fused with cephalon, dorsally visible, anterior border convex, posterior margin straight. Pereonites 2 and 3 similar in size with anterior margin pointing anteriorly. Pereonite 3 longer than 2. Pereonite 4 constricted, with a shallow median groove. Pereonite 5 overlapping pereonites 4 and 6 with areae laterales and dorsal surcus as thin groove. Pereonite 6 the longest, posterior margin deeply concave, with lobi laterals, no lobii present. Pereonite 7 visible dorsally, short

and narrow, overlapping pleon. Presence of long simple setae sparsely on all pereonites. Sensory pits randomly distributed on 2 to 4 pereonites (Fig.1, 17).

**Pereopods.** All the pereopods show: basis, ischium, merus, carpus, propodus and dactylus. The proportion of each segment is very similar in all pereopods. Pereopods 3 to 6 similar in basic form to pereopod 2, but differing in number and placement of setae (see Figs. 11-15), as well as direction; pereopods 4 to 6 directed posteriorly and pereopods 2 and 3 directed anteriorly. Pereopod 4 differs from pereopod 2 in the presence of 6 tooth-like tubercles in posterior margin of the base. The pereopods are smooth on their dorsal surface (Fig. 19).

Pereopod 2: basis is larger than the others, oval-shaped and has a high number of long setae at the posterior and anterior margins. The ischium is three quarters of the length of the basis, with fine simple setae at the posterior margin and two longer setae at the anterior distal corner. The merus is half the length of the ischium, with an anterior bulbous protrusion, with 2 long simple setae and a few short setae at the margin. The posterior distal corner of the merus with 2 long simple setae. The carpus presents the same length as the merus with 2 short simple setae at posterior distal margin. The propodus is 1.5 the length of the carpus with a few simple setae at the anterior margin. Posterior margin dentate with fine setae. The dactylus is half of the length of the propodus, terminating in sharp pointed unguis, pereopods 2 and 3 with unguis posteriorly directed and 4 to 6 anteriorly (Figs.11-15).

**Pleon, pleotelson and uropods.** The pleon consists of five pleonites, each with a pair of pleopods. Pleon longer than wide with epimera prominent, five pleonites dorsally visible, with long pappose setae in a variable number and randomly distributed. The external margin of each pleonite carries 2-3 short setae. Dorsal surface of all pleonites covered with pectinate scales.

Pleotelson triangular, longer than wide, with smooth surface and pectinate scales. Margins slightly concave, dorsal surface with two pairs of simple setae, one apical and the other sub-apical, the latter located beyond apex of pleotelson. Distal apex



terminating in pair of simple setae. Exopod reaching apex of pleotelson, endopod longer and wider than exopod. Exopodite with 14-16 simple setae at the margins and endopodite with 9-10 simple setae (Fig. 16 , 20).

## DISCUSSION

The Gnathiidae family has been studied by scientists since the eighteenth century (Slabber 1778, cited by Monod (1926)). Initially, most studies focused above all on morphology in order to establish the taxonomy. One of the most cited species in the literature is *Gnathia maxillaris*, which was one of the first described species. Montagu (1804) described a male that he named *Cancer maxillaris*, placing it within the group of *Oniscus*. At the same time, he described another form, the praniza, which he named *Oniscus caeruleatus*. Although he suspected a possible relationship between this praniza and *Cancer maxillaris*, he classified them in different genera. Leach (1814) was the first to mention the group of Gnathiideus in crustacean systematics, and he placed them in the Malacostraca. In the Edinburgh Encyclopaedia, Leach proposed the genus *Gnathia* to name *Cancer maxillaris*, but still called the praniza *O. caeruleatus*. However, although the praniza was still located in another group, in agreement with Montagu its potential relation to the genus *Gnathia* was proposed as a possible adult female form.

In 1855, Hesse observed something of great importance in understanding the biology of this group: the praniza was the larval form of “anceus” (adult males), achieving adult form after a true metamorphosis. Later, in 1864, Hesse published “Mémoire sur les Pranizes et les Anceés”, in which he described the different stages of the life cycle and noted for first time the fact that at the end of the larval stage, the praniza metamorphoses to adult forms. Dimorphism in adults but not in the praniza gave rise to numerous errors in their classification for many years. Hesse identified the “anceus” described by Risso and other authors, which has a robust head and large jaws, as the male of this genus. Furthermore, he indicated that the praniza described by Leach and other authors, which has a small head, was the adult female. He also reported that during the larval stage, the Gnathiideus are fish parasites, with mouthparts for sucking blood, but that they

become benthic once they are adults. Hesse also described the incubation period in this study, and mentioned a possible fertilisation between a male and a praniza (larva). This has recently been confirmed in *G. maxillaris* (Hispano *et al.* 2014). Hesse described nine new species of Gnathiidae, but *G. maxillaris* was not included. Furthermore, several studies of Gnathiidae over the years confused *G. maxillaris* with *G. vorax* and *G. oxyurea* (Sars 1895; Smith. 1904; Brian 1909; Naylor 1972). Consequently, for many years there have been numerous misunderstandings due to different morphologies among adults of distinct species, and the similarity between species of the larvae.

In 1926, Monod wrote "The Gnathiidae. Essai monographique", one of the most complete studies at the time on the biology and systematics of this group of Isopoda. He also included a literature review and a complete description of all known species at that time (62 species). Among them is a good description of *G. maxillaris* which includes practical illustrations. At the same time, Mouchet studied the biological cycle of *G. maxillaris*, correctly describing the different larval stages (zuphea and praniza), and the three larval stages through which they pass before becoming adults forms. For many years, no further studies were conducted on *G. maxillaris*, but in 1981 the first scanning electron microscope data were published, focusing particularly on the mouthparts of this species (Davies *et al.* 1981).

Subsequently, a phylogenetic study of 95 species of the Gnathiidae family was performed (Cohen & Poore 1994) which included 43 species in the genus *Gnathia* and gave a description of *Gnathia maxillaris*.

In the present study, the morphological features and biometric data obtained for *G. maxillaris* by scanning electron microscopy and stereoscopy microscope complement and clarify the previous species descriptions. Subsequent detailed observation, mainly under scanning electron microscopy, enabled us to confirm or rule out certain features that did not coincide between Monod (1926) and Cohen & Poore (1994). The matrix of 72 morphological characters for the phylogenetic study of Gnathiidae proposed by Cohen & Poore (1994) was revised using the

results of this study. Some discrepancies in the description of several morphological characters were observed.

The morphological description of the all samples of the males of *G. maxillaries* used in this study almost matches the morphological description for identification proposed by Monod (1926). Monod conducted a thorough description of this species, providing detailed drawings that have helped us to compare his results with ours. Only one of the characters studied differed from our description. This is the inferior frontolateral process, which according to Monod is absent or obsolete but which we found to be present in male (a), as shown in Figure 17. This characteristic was also found in the other isolated and compared males in this study (b, c and d). It was observed some minor variabilities between individuals obtained in the tank of the Aquarium and the sample obtained in Balearics Island. These characters can vary interspecific level, such as the presence or number of setae and their distribution as previously described (Smit & Davies 2004). It was also observed that the basis of pereopods presented a large number of longer simple setae in males captured in the Oceanario tank lower number and shorter simple setae in the Balearic male. The number of plumose setae in the maxillipeda of the Aquarium isolates , at the different articles are: 5-6-5-7/9. However, the male from Balearic Island showed plumose serae at 4-6-5-12. On another hand, Monod (1926) describes that the articles margin of maxillipede present 4-6-5-7/8 plumose setae. Consequently, it could not be discard that this character could be slightly different between individuals.

With respect to the description given by Cohen & Poore (1994), there are some characters, which do not match the observations of studied males in this study. The description of the dorsal sulcus or of the setae andibular observed in the samples of this study, but are absent in the description of Cohen & Poore, 1994. In this study, the characters described by Monod were considered independently if they are included in the matrix proposed by Cohen & Poore (1994). For instance, the size of *G. maxillaries* males, which is about 4 and 5 mm according to Monod (1926) using a n=2. However, a greater number of males (n=35) were measured in

the Aquarium of Barcelona (Hispano *et al.* 2014), obtaining values between 4.20 +/- 0.70. This greater length for *G. maxillaris* is an important character because it is sometimes used to differentiate *G. maxillaris* from other species (i.e., considering that *G. vorax* is larger than *G. maxillaris* or that *G. oxyuraea* and *G. serrulatifrons* are smaller (Monod 1926; Naylor 1972)). However, it should be noted that this character can lead to confusion, since some of the pranzia in the second stage can become adult males with a smaller than usual size (Hispano *et al.* 2014).

Other characters not mentioned in the Cohen & Poore (1994) matrix are the two pairs of setae on the telson (one apical pair and another sub-apical pair), and the number of feathery setae on the internal margin of the pylopods, that are present in the samples of this study and in the Monod description. Furthermore, Monod's description of the penis (penis linear type with rounded apical end) is in agreement with the observations in this study.

Finally, the observation made by both, Monod (1926) and Cohen & Poore (1994), on the presence or absence of setae on the pleopods has also been confirmed in this study after observing several individuals. However, this is a character that shows variation in this species, and therefore loses some of its taxonomic value,

In summary, most of the observations of morphological characteristics of *G. maxillaris* match those indicated by Monod (1926), and therefore the morphological features for this species described by Monod are supported by the scanning electron microscopy performed in the present study. The comparison with the Balearic sample also confirms the identification of the species as *G. maxillaris* (Montagu, 1804). It was observed some morphological differences in some characters that have not significant taxonomical value and which can vary between different individuals.

---

**REFERENCES**

Bakir et al.(2014): the Marine arthropodes of Turkey. Turk. J. Zool. (2014) 18: doi:10.390/zoo-1405-48.

Bedini, R., et al.(2010) *Spatial and Temporal variability of Crustacea assemblages of Posidonia oceanica meadows of Northern Tuscany*. Biol.Mar.Mediterr 17(1):286-287.

Bibiloni, M.A. (1981) *Estudio faunístico del Litoral de Blanes: V Sistemática de Moluscos y Artrópodos (Crustáceos y Picnogónidos)*. Misc. Zool. 7:43-52. Barcelona.

Castelló, J., Carballo, J.L. (2001) *Isopoda fauna, excluding Epicaridea, from the Strait of Gibraltar and nearby areas (Southern Iberian Peninsula)* Sci. MA, 65(3):221-241.

Castelló,J.; Jaunoy,J (2007): Catálogo de las especies de isópodos (crustacea:Isopoda) de los archipiélagos macaronésicos. Bol. Inst. Esp. Oceanogr.23 (1-4). 2007:21-31.

Coetzee, M.L. (2006) *The Taxonomy and Phylogeny of three ganthiid Isopod Species parasiting elasmobranchs from the Great Barrier Reef, Australia*. Dissertation, Magister Scientiae in Zoology in the Faculty of Science at the University of Jorhannesburg.

Cohen, B.F. & Poore, G.C. (1994) Phylogeny and biogeography of the Gnathiidae (Crustacea: Isopoda) with descriptions of new genera and species, most from south-eastern Australia. *Memoirs of Museum Victoria*, 54, 271-397.

- Davies, A.J. (1981) A scanning electron microscope of the praniza larva of *Gnathia maxillaris* Montagu (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae). With special reference to the mouthparts. *Journal of Natural History*, 15 :454-554.
- Farquharson, CH. (2001) *Biodiversity of the fish parasite Gnathiid Isopods from Coral Reef*. Dissertation, Magister Scientiae in Zoology in the Faculty of
- Grutter, A.S., Morgan, J.A.T. & Adlard R.D. (2000) Characterising parasitic gnathiid isopod species and matching life stages with ribosomal DNA ITS2 sequences. *Marine Biology*, 136, 201-205.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M. (2011) *Species ie version 1. 0 World-wide electronic publication* National University of Ireland, Galway (version of 15 March 2010).
- Hesse, E. (1864) Mémoire sur les pranizes et les ancées. *Mémoire savant étrangers Academie des Sciences*, 18, 231-302.
- Hispano, C., Bultó, P. & Blanch, A.R. (2013) *Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies. *Journal of Applied Ichthyology*, 29, 1139-1144.
- Hispano, C., Bultó, P., & Blanch, A.R (2014) Life cycle of the fish parasite *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). *Folia Parasitologica*, 61, 277-284.
- Holthuis, L.B. (1950) *Isopodes et Tanaidaces marins de la Belgique ; remarques sur quelques espèces de la zone meridionale de la Mer du Nord* .  
Med.K.Belg. Inst. Nat. Wet. 26(53) :1-19.

- Koukoras, A. (2010) *Check-list of marine species from Greece*. Aristotil University of Thessaloniki. Assembled in the framework of the EU FP7 PESI project.
- Monod, TH. (1926) A monograph of the Gnathiidae, including the morphology, biology and systematics of the group. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles du Maroc*, 13, 1-668.
- Mouchet, S. (1928) Note sur le cycle évolutif des Gnathiidae. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 53, 392–400
- Naylor, E. (1972) *British Marine Isopods. Synopsis of the british Fauna* (New series) N°3. The Linnean Society of London. Academy Press London and new York.
- Ota Y. 2012: Gnathiidae from Kumejima Island in the Ryunkyu Archipelago, southwertern Japan, with description of the three new Species (Crustacea: Isopoda). *Zootaxa* 3367:79-94.
- Sars, G.O. (1895) *An account of the Crustacean of Norway, with a short descriptions and figures of all species*. Vol.I Chriastiana and Copenhagen Alb. Cammemeyers forlag (Lars Awanstrom).
- Smit, N.J. & Davies, A.J. (2004) The curious life-style of the parasitic stages of gnathiid isopods. *Advances in Parasitology*, 58, 289-391
- Smith, G. (1904) Metamorphosis and Life-History of *Gnathia maxillaris*. *Mitt. Zool Stat. Neapol.* 16, 469-479.
- Tanaka, K. (2007) Life history of gnathiid isopods-current knowledge and future directions. *Plankton Benthos Research*, 2, (1), 1-11.

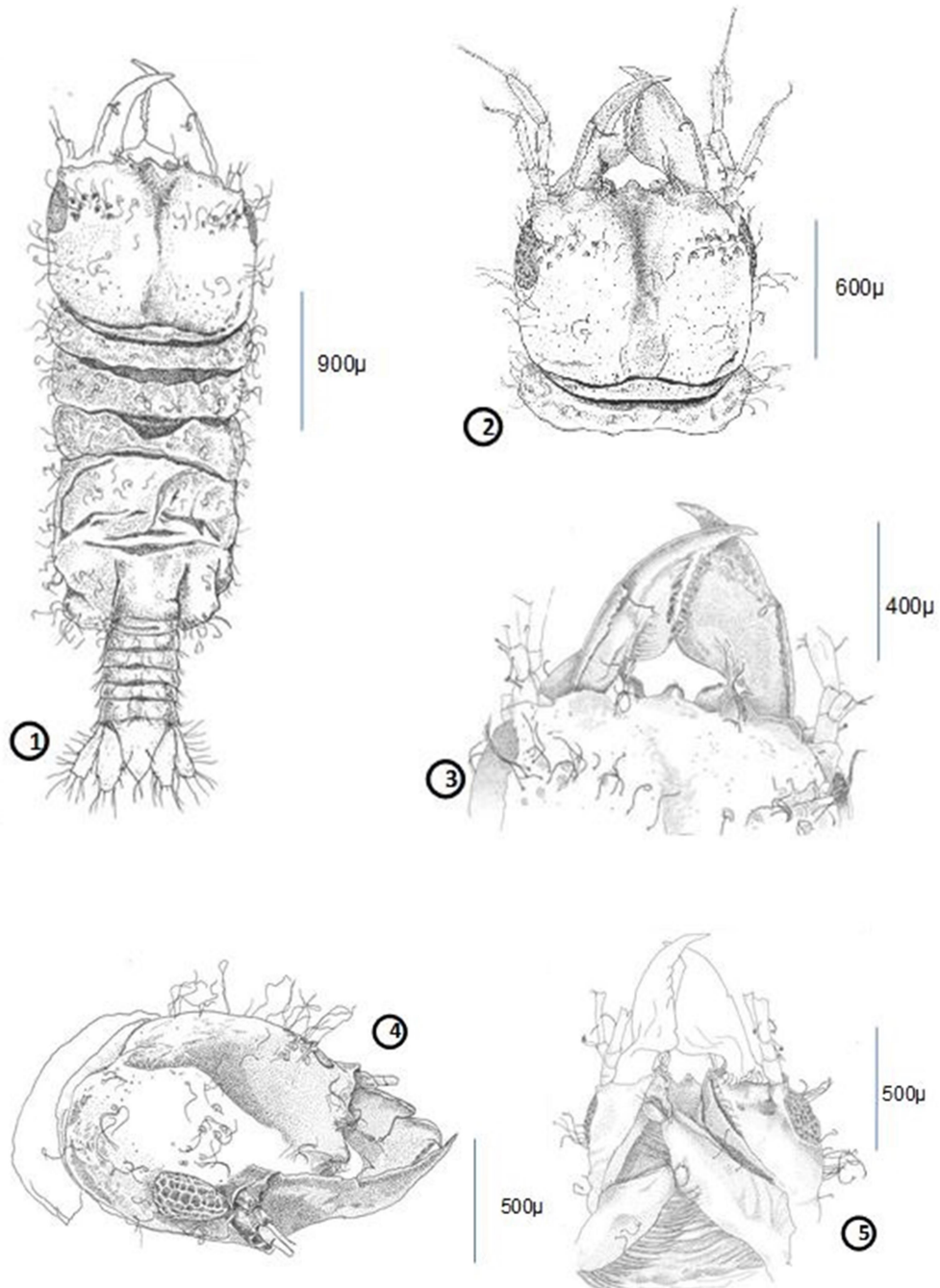


Fig.1.- Dorsal view of male. Fig.2.- Dorsal view of cephalon. Fig.3.- Frontal border. Fig.4.- Lateral view of cephalon. Fig.5.- Ventral view of cephalon.



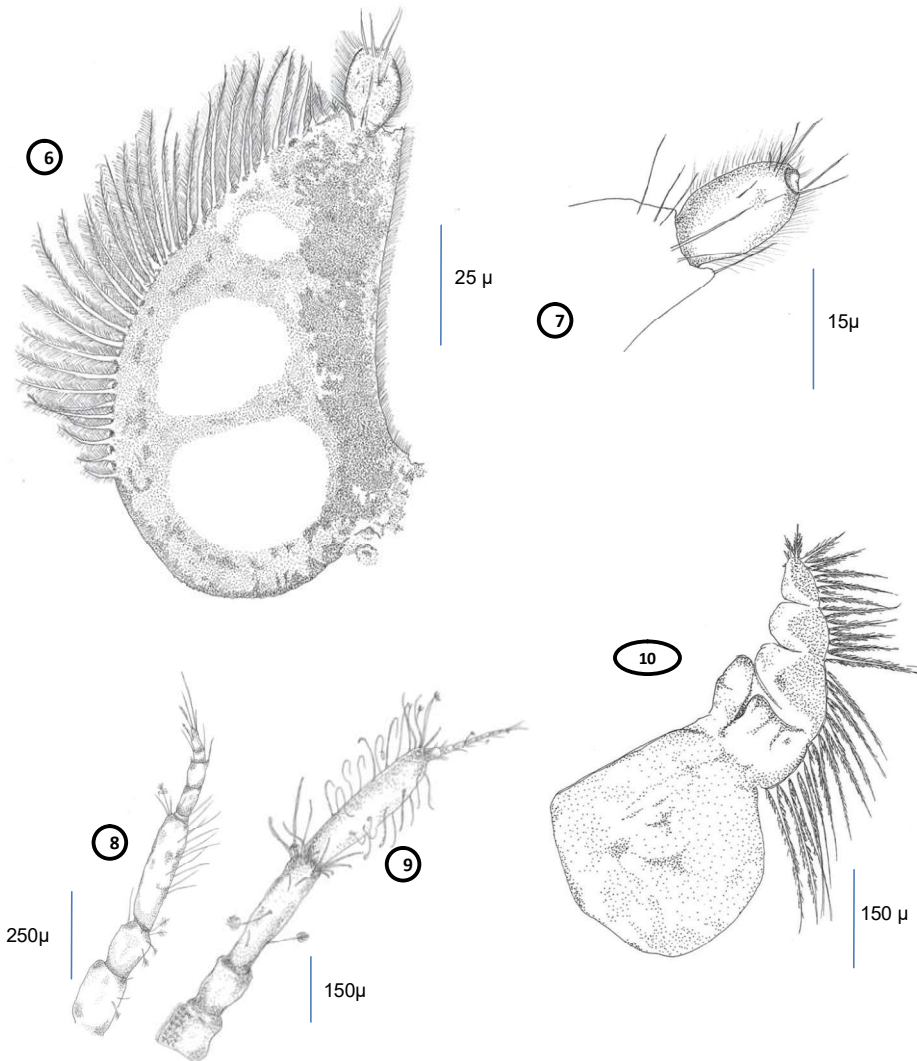


Fig.6.- Pylopod. Fig.7.- Secon and third article of pylopod. Fig.8.-Antenna 1. Fig.9.- Antenna 2. Fig.10.- Maxillipeda.

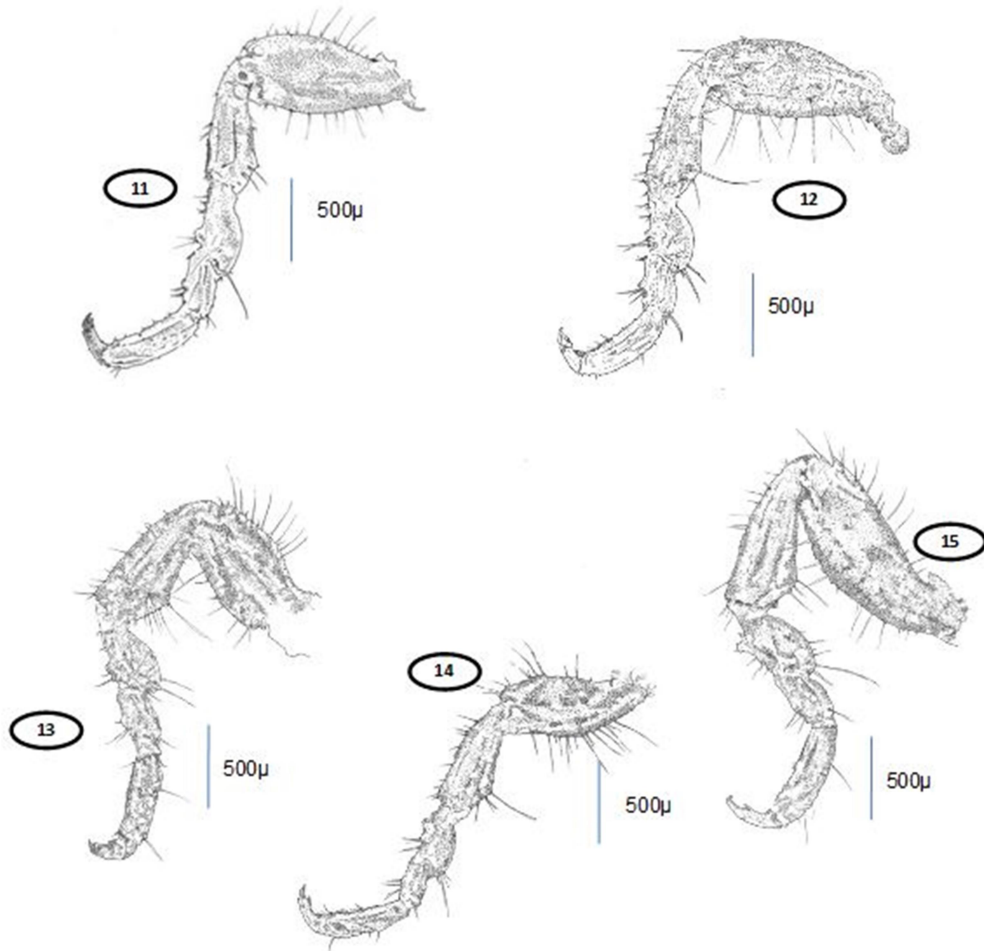


Fig.11.- Pereopod 2. Fig.12.- Pereopod 3. Fig.13.- Pereopod 4. Fig.14.- Pereopod 5. Fig.15.- Pereopod 6.

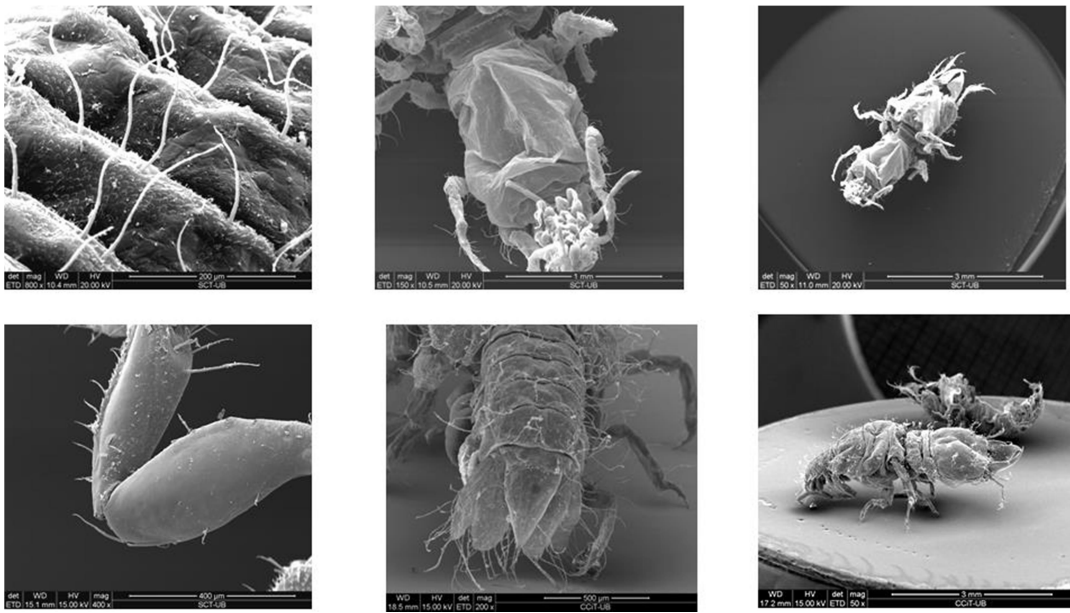


Fig. 16.- Setae of pleopods. Fig. 17.- Ventral view of pereon and pleon. Fig. 18.- Ventral view of the male. Fig. 19.- Smooth dorsal surface of a pereopod. Fig. 20.- Pleotelson and uropods. Fig. 21.- Lateral view of the male.

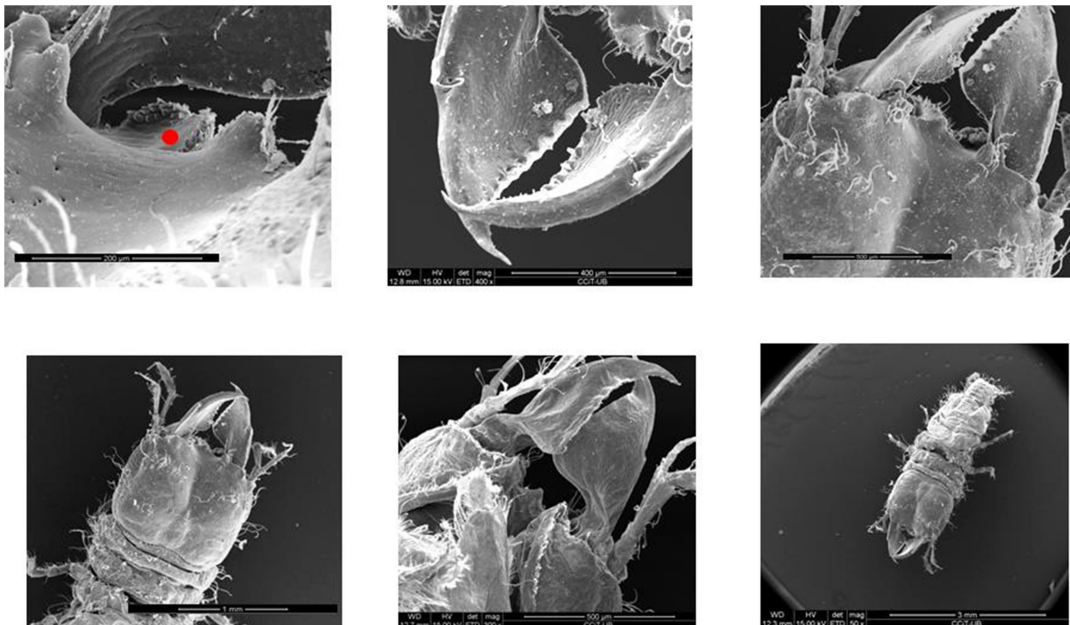


Fig. 22.- Inferior frontolateral process (red spot). Fig. 23.- Mandibles. Fig. 24.-Frontal border. Fig. 25.- Cephalon of the male. Fig. 26.- Ventral view of cephalon. Fig. 27.- Dorsal view of a male.

### 3.4. Capítol 4

#### **Avaluació productes antiparasitaris per al control i eradicació *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae).**

##### **3.4.1. Introducció.**

Al llarg d'un llarg període d'anys (entre 1997 i 2004) l'Aquàrium de Barcelona es va veure obligat a l'ús del triclorfon, per combatre una infestació de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) en el sistema Mediterrani. Paral·lelament per a reforçar l'acció terapèutica es van realitzar tota una sèrie de tasques que van representar un esforç considerable per l'equip humà implicat en el control de la infestació: treballs de sifonat de les roques que formen part de la decoració, l'extracció de les sorres per desinfectar-les, i l'extracció de les larves a través de xarxes de plàncton. Totes aquestes activitats van haver de fer-se diàriament al llarg de tots aquests anys.

El bany de triclorfon s'aplicava trimestralment (veure capítol 1) i cada cop s'havien de treure els invertebrats de tot el sistema infestat, no només els crustacis, sinó que invertebrats com estrelles (*Echinaster sepositus*), garotes (*Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*) tomàquets de mar (*Actinia equina*) o anemones (*Anemona sulcata*) també es veien afectats. El triclorfon actua inhibint l'acetilcolinesterasa a nivell de la sinàpsi. Afecta als sistemes nerviosos central i perifèric. L'enzim acetil colinesterasa és la responsable de la destrucció i per tant de la finalització de l'activitat biològica de l'acetilcolina. Si l'acetil colinesterasa no actua, l'acetilcolina s'acumula en l'espai sinàptic, alterant el funcionament normal de l'impuls nerviós.

Les propietats físic-químiques que presenten els organofosforats, com és el triclorfon, serien que són liposolubles, solubles en aigua, volàtils i altament degradables en medis alcalins, no sent persistents en el medi. Aquestes característiques fan que sigui un producte d'ús fàcil per a la seva aplicació en aquaris, ja que es dissolt bé en aigua i es degrada ràpidament.

L'ús del triclorfon va facilitar controlar el grau d'infestació del paràsit disminuint la seva presència i evitant la mortalitat dels peixos en aquest sistema deguda als gnàtids. Tot i així no es va eradicar del tot i periòdicament s'havia d'aplicar el tractament. L'ús continuat de insecticides amb el temps pot afavorir l'aparició de formes de resistències, segons comenta Roth et al. 1993. Aquest fet també s'ha comprovat en l'ús habitual dels pesticides en l'agricultura (Brown, 1986). La disminució de l'eficiència del diclorvos en *sea lice* (*Lepeophtheirus salmonis*) també s'ha descrit en la bibliografia (Jones et al., 1992).

La possibilitat de mantenir *in vivo* i desenvolupar els diferents estadis de *Gnathia maxillaris* al laboratori va permetre realitzar un estudi per a avaluar l'eficiència d'altres productes antiparasitaris que fossin efectius en crustacis. Es va consultar la bibliografia referent a l'aplicació de quimioterapèutics en *sea lice* (Copepoda: Caligidae) en cultius marins (Roth et al., 1993; Conetti et al., 1992; Davies et al., 2000), i així disposar de possibles fàrmacs candidats pel seu ús terapèutic i d'aplicació a les instal·lacions de l'Aquàrium. Els assaigs experimentals realitzats al laboratori es basarien principalment en contrastar la seva eficiència respecte a la del triclorfon davant *Gnathia maxillaris*. Els productes seleccionats per a realitzar l'estudi van ser: la cipermetrina, l'abamectina, l'emamectina benzoat i el lufenuron. Tots els productes, excepte el lufenuron actuen afectant el funcionament dels sistema nerviós, per vies diferents. L'abamectina i l'emamectina benzoat actuen incrementant el potencial dels neurotransmissors com el glutamat o l'àcid gamma-amino

butíric (GABA) estimulant el influx dels ions de clor en les cèl·lules nervioses, produint una disrupció d'aquesta manera de l'impuls nerviós. Com a resultat, les larves pateixen paràlisi, morint als pocs dies d'estar exposades als productes. La cipermetrina és un piretroid sintètic que es fa servir pel control de plagues d'insectes, i actua sobre els canals de sodi afectant les membranes de les neurones.

Els organofosforats, triclorfon i diclorvos, van ser un dels primers productes químics que es van aplicar quan les extensions de cultiu del salmó (*Salmo salar*) van incrementar considerablement a partir dels anys 80 per combatre les infestacions de *sea lice*. Més tard es van començar a aplicar altres quimioterapèutics d'origen i actuació diferent com són els piretroids, les ivermectines o els productes que actuen com a reguladors del creixement dels insectes. L'ús dels diferents antiparasitaris al llarg de tots aquests anys en els cultius dels salmons, ha estat determinat per la seva eficàcia davant del tractament de les infestacions de *sea lice*, per l'impacte mediambiental del producte, i per l'aparició de resistències que poden forçar un increment de dosi i de freqüència d'aplicació del producte. Això ha fet aparèixer la necessitat d'utilitzar nous productes, fent necessari nous estudis d'impacte mediambiental que es podria donar davant la seva aplicació. L'impacte ambiental dels productes depèn de la quantitat de producte actiu que s'utilitza en l'aplicació del tractament, la freqüència del tractament, l'activitat biològica del producte i dels seus metabòlits o productes de degradació i de la sensibilitat de la fauna al producte.

### **3.4.2. Objectius**

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser:

- 1 Valorar diferents productes antiparasitaris pel control i possible eradicació del paràsit en sistemes en captivitat amb elevats

volums d'aigua en circuits semi-oberts. Establir una teràpia efectiva.

### 3.4.3. Publicació

#### **Evaluation of chemical treatments for the mitigation or eradication of *Gnathia maxillaris* infestations.**

Coral Hispano<sup>1\*</sup>, Javier Méndez<sup>2</sup>, Patrici Bultó<sup>1</sup> and Anicet R. Blanch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>L'Aquàrium, Moll d'Espanya del Port Vell, Barcelona, Spain;

<sup>2</sup>Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Running header:** *Gnathia maxillaris* treatment in exhibition aquaria.

\*Address for correspondence:

Coral Hispano. L'Aquàrium, Moll d'Espanya del Port Vell, s/n. 08039 Barcelona, Spain;

Telephone: (+34) 932217474; Fax: (+34) 932216166. [chispano@aspro-ocio.es](mailto:chispano@aspro-ocio.es)

#### **Summary**

*Gnathia maxillaris* is a haematophagous isopoda ectoparasite for marine fish. Outbreaks caused by this parasite produce important losses to fish stocks in aquaculture or exhibition aquaria. In this study, the efficiency of different potential chemical compounds for the control or eradication of *Gnathia maxillaris* outbreaks is evaluated. The tested compounds were: cypermethrin (at 5, 0.5 0.05 ppb), abamectin (at 10, 1, 0.1 ppb), the trichlorfon (at 5, 0.5 0.05 ppm), the



emabectin Benzoate (50, 5, 0.5 ppb) and the lufenuron (at 60, 80, 130 mg/m<sup>3</sup>). The LD50 (96) values were calculated for each compound, and the morphological deformities produced along the life cycle, decrease of egg-laying and survival of adult forms were also determined. Abamectin, cypermethrin and emabectin benzoate showed to be effective against *Gnathia maxillaris* forward, but their efficacy to eradicate an infestation in large tanks could not be supported by the performed assays at the laboratory level. However, the results obtained in this study are supporting the use of lufenuron at 130 mg/m<sup>3</sup> as a good substitute of trichlorfon for such type of infestations in large volume tanks.

**Key words:** *Gnathia maxillaris*, treatment, lufenuron, trichlorfon; amabectin, cypermethrin, emamectin benzoate

## **Introduction**

The accumulation of fish populations in small areas due to activities such as aquaculture or aquarium exhibition tanks has made, over the years, a chance for outbreaks caused by different types of pathogens or parasites. *Gnathia maxillaris* isopode is a crustacean isopods belonging to the Family Gnathiidae which has a biphasic life cycle; showing a reproductive stage as free-living adults (usually benthonic) and an ectoparasitic larval stage. Their infestations in fish populations could cause important loses due to they act as haematophagous ectoparasites that feed on the blood and tissue fluids of fish (Smit and Davies, 2004; Jones and

Grutter, 2005). Such losses are observed not only in captivated population (Hispano et al., 2013, Marino et al., 2004, Giannetto et al., 2003) but also on outbreaks in the open sea (Paperna and Por, 1977; Mugridge and Stallybrass, 1983; Honma and Chiba, 1991).

The entrance of such parasites in aquaria is not only from fish that could be carriers of Gnathidae. It could also be due to their presence in different types of substrates such as sand and rocks used to recreate the habitat in aquaria, invertebrates or through live food for different species fish kept in this type of facilities. These substrates and invertebrates usually do not pass through any kind of preventive treatment before entering exhibition. Therefore, it is relatively easy for this type of parasites to be introduced in exhibition aquaria. The adaptation and the proliferation of the parasite is very feasible since the system conditions simulating the environment where it arises, and then, it can cause a high degree of infestation and a negative impact on the population of kept fish.

The life cycle of *G. maxillaris* shows remarkable morphological and ecological diversity which limits the application and success of some antiparasitic treatments. The reduction of the total number of parasites from infested populations with *G. maxillaris* has been assayed by applying physical elimination of larvae based on the positive phototropism of larvae (Hispano et al., 2013). Though a certain reduction of the total number of parasite helped on the contention of the infestation, those physical methods were unfruitful for eradicating the infestation. Antiparasitic treatment using chemical compounds have also been used against *Lernanthropus kryeri* and other parasites with different with varying degrees of success (Palmer, et al., 1987; Roth, et al., 1993;

Cognneti Varriale, et al., 1992; Mayer, et al., 2013; Armstrong et al., 2000; Toksen et al., 2010; Toksen et al., 2013).

The use of other anti-parasitic drugs in aquaria or aquaculture facilities is not suitable due to their toxicity in certain fish, shellfish or crustacean species. Moreover, their use on exhibition aquaria is also unfeasible because of the design of the water filtration system. Furthermore, a rapid removal of water following the bath treatment is required for these kinds of products which is impossible and could damage elements of the filtration system such as the biological filter unit. Additionally, some chemical compounds have not clear information on the correct dose to be administered in aquaria containing different species of fish and shellfish and their application is usually rejected. However, some antiparasitic treatments (i.e. copper sulphate, formaldehyde, mebendazole, praziquantel, or trichlorfon) in aquarium and captivity fishes have been assayed for attempting the control of different parasites (Schmalh and Mehlorn, 1985; Treves-Brown, 1990; Toksen et al., 2013; Wang et al., 2010). The appearance of potential resistances, their environmental contamination, and their potential toxicity to some animal species and the risk of residues or by-products have pointed out the need for searching alternative treatment methods. The trichlorfon has been commonly used in aquariums mainly against infections caused by monogeneans. The use of this product in high volume systems is feasible because of its applications is done using a long bath, that allows a progressive water renewal in the tanks. Although its application does not affect the biological filter, the water quality may be impaired by the need of closing the supply of ozone and ultraviolet treatment

during a normal treatment of 48h. Later, the water quality could be quickly recovered after a renewal of the whole water volume. One of the main advantages of trichlorfon treatment in aquaria is that it can be applied in teleost and elasmobranch species (Stoskopf, 1993). The use of trichlorfon in the studied *Gnathia maxillaris* infestation in the Mediterranean tanks of the Barcelona aquarium was not sufficiently efficient to eradicate this parasite. The system features and the decoration of tanks conditioned the effectiveness of the trichlorfon treatment. After many years of routine and methodological application of trichlorfon (every three months), the degree of infestation decreased considerably avoiding fish mortality due to this parasite (Hispano et al., 2013) but the eradication of this parasite was not achieved. The ban of this compound for its application in aquaculture together with the need to find a definitive solution to eradicate the infestation enhanced the need for searching an alternative treatment. At our present knowledge, there is not an efficient alternative drug treatment to eradicate this type of isopoda infestation.

In this study, the LD50 of five antiparasitic drugs (trichlorfon, lufenuron, emamectin benzoate, cypermethrin and abamectin) for control *Gnathia* outbreaks was determined by using in vitro laboratory assays. Additionally, effects on *Gnathia maxillaris* adult survival and viability of their eggs and larva were also evaluated. These criteria could support the potential application of some new treatments for mitigation of *Gnathia maxillaris* infestations.

## **Materials and methods**

### **Experimental conditions.**

*Gnathia maxillaris* larvae (zuphea and praniza) were obtained by collecting water samples through a 200-micron plankton net as explained in a previous study (Hispano et al., 2013). The praniza were also obtained directly from infected fish (mainly sunfish (*Mola mola*) and conger eels (*Conger conger*)). The larvae collected were in the larval stage III, being selected those who had a good external morphological appearance. Polyethylene vessels with screw cap were used for the in vitro assays. All vessels also identified the date of starting the assay (time 0h). Each vessel was monitored throughout the assay recording mortalities and any morphological changes or alterations observed in larvae. A total number of 10 larvae in 100 ml of seawater were placed in each vessel. Assays were performed in duplicate at 17-18°C and low light intensity to mimic conditions where the affected tank and to maintain the conditions already developed to study the life cycle (Hispano et al., 2014)

### **Compounds assayed**

A literature review was first done to select the antiparasitic compounds, being focussed primarily in previous studies applied to marine copepods (i.e., sea lice on salmonids). Although different types of insecticides were initially considered such as derivates of pyrethroid and avermectines, only those compounds previously assayed by other studies with doses of treatment established doses for the LD50 assays were also determined in agreement to previous therapies and studies performed by other authors (Hart, J.L. et al., 1992;

Pretti et al., 2002; Burka et al., 1997; O'Halloran and Hogans, 1996; Sievers et al., 1995). The compounds and selected doses were: Abamectin (Spiro[11,15-methano-2H,13H,17H-furo[4,3,2-pq][2,6] benzodioxacyclooctadecin-13,2'-[2H]pyran]) at 10, 1 and 0.1 ppb (Riedel-de Haën, sigma-Aldrich, CAS-No: [71751-41-2]); Emamectin Benzoate ((4''R)-4''-Deoxy-(methylamino)avermectin B1 benzoate) at 50, 5 and 0.5 ppb (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, CAS-No: [155569-91-8]); Cypermethrin (mixture of isomers) at 5, 0.5 and 0.05 ppb (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, CAS-No: [52315-07-8]); Lufenuron((RS)-1-[2,5-Dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)phenyl]-3-(2,6 difluorobenzoyl) urea), at 60, 80 i 130 mg/m<sup>3</sup>, (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, CAS-No: [103055-07-8]); and Trichlorfon (1-Hydroxy-2,2,2-trichloroethylphosphonate-O,O-dimethyl ester, at 5, 0.5 and 0.05 ppm (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, CAS-No: [52-68-6]).

Each LD50 assay was performed in triplicate with its corresponding blank control. Readings of the number of affected living larva and deaths (mortality) were done at 2, 6, 24, 48, 72 and 96h. The survivors were later monitored throughout their life cycle to assess whether the product was affecting its biological viability. The praniza becoming adult forms were observed specifically considering the number of individuals who presented deformations, the survival rate after metamorphosis and their hatching by adult females. Treated zuphea were also monitored all along their life cycle. Because some of the products (emabectin benzoate, cypermethrin and abamectin) have not only a direct effect on the death of the larvae, other aspects that could be affected in the biological cycle were registered: deformation

of larvae, effects on the hatching (number of zuphea per hatching) and survival of adults.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses and modelling were carried out with the statistical software package R version 3.0.2 (R Development Core Team 2014) and using the statistical software package Stata version 12. LD50 was calculated using the R-packages MASS (Venables and Ripley, 2002) and drc (Ritz and Streibig, 2005). Odds ratio, Kruskal-Wallis and Anova analysis were performed using Stata 12 [StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP.]

## **Results**

### **Determination of LD50**

Different regression models, which are integrated in the drc R-package, were tested with the assessed antiparasitic compounds. The best fits were obtained with the log-logistic model  $[f(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))}]$ . The obtained results of LD50 for the assayed models are summarised in Table 1. The significance of lack of fit to the regression models was determined. Only the effect of abamectin in pranizas showed a significant lack of fit to the regression assessed models (Table n°1).

### **Induced deformity in zuphees and pranizas**

A monitoring and comparison of treated (abamectin, cypermethrin and emabectin benzoate) and untreated praniza was conducted to determine if there could be changes throughout the cycle affecting the viability of the parasite. This monitoring was not needed for praniza treated with lufenuron or trichlorfon. The lufenuron affectss the synthesis of chitin and prevents the metamorphosis of zuphea to adults. Moreover, the praniza (P3) exposed to lufenuron were kept in seawater 17-18°C until they made the metamorphosis to adults. However, after some days, it was observed that no praniza could do sucessfully perform the metamorphosis regardless of the applied dose. In the case of trichlorfon, zuphea (Z3) all died at dose of 5ppm for 2h, at dose of 0,5ppm for 24h, and at dose of 0,05ppm for 72h. The praniza (P3) all died in doses of 5 and 0.5 ppm at 6h, and only 4 survived at 0.05 ppm but none of them performed sucesfully metamorphosis to adult.(Fig.-1).

Consequently, only the indirect effect on deformities along the life cycle induced by abamectin, cypermethrin or emabectin benzoate were monitored. The morphological deformities on *Gnathia maxillaris* larvi was evaluated by Odd-ratios (OR) analyses. The confidence intervals of the OR was calculated according to Woolf, and the *p-value* was calculated by the chi-square test. The lowest concentrations producing significant deformities in any of the larval stages are reported on Table 2. Abamectin and cypermecthrin showed a noticeably deformities effect praniza at 0.1 ppb and 0,5ppb respectively, but the emamectin benzoate at 5.0 ppb has a non-significant effect on praniza. The application dosage of both products matches with the resoults of this study. Most of the



observed deformities affected the viability of individuals causing mortality in most of them within a few days once they had changed the larval stage.

### **Variation on the egg-laying induced by abamectin, cypermethrin and emamectin.**

When the egg-laying of the untreated populations and any of the treated populations are compared a significant statistical difference was observed (Fig. 2) between both populations (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). Nevertheless, when the three treatments were compared between them, neither statistical differences were observed on egg-laying from the different anti-parasitic concentrations nor between the different treated populations (Kruskal-Wallis  $p > 0.05$ ).

### **Effects on survival rate**

The survival of larvi, that reached the adult stage, was analysed. Similar results to those determined for variation of egg-laying were obtained. There is a significant difference (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ) between untreated and treated populations, independently of the used antiparasitic compound. Nevertheless, when the three treatments were compared among them, any significant statistical difference (Kruskal-Wallis  $p > 0.05$ ) was observed (Fig. 3).

## Discussion

The efficacy of the tested compounds was evaluated considering a range of doses from 10 times below and above the theoretical dose of application. In the case of emamectin benzoate and abamectin, the studied doses were determined according to the information available for their use in bath treatments (ED50 48h) of *Daphnia magna*. Both compounds are usually applied in oral for fish and no consistent therapeutic doses for their use on bath treatments for fish were found in literature (Armstrong, 2000; Hart et al., 1992).

The LD50 (96h) obtained for trichlorfon on bath treatment of *Gnathia maxillaris* were consistent with the administration of this product at the praniza stages as performed in the studied aquaria infestation (Hispano et al., 2013). The manufacturer of the applied trichlorfon reports a EC50 (48h) for *Daphnia magna* of 0.015 mg/l, that is very close to the obtained value (0.039 mg/l) for praniza in this study. It has been described a wide range of sensitivity by invertebrates to the trichlorfon as previously reported by other authors (Qin and Dong, 2004).

Trichlorfon and lufenuron showed a high efficacy on the elimination of *Gnathia maxillaris* at the laboratory level, killing all the tested larvi. The other three products showed a minor effect on killing the larvi, and consequently their effectiveness was evaluated by monitoring the effect on the larval progress throughout the life cycle: morphological deformities when changing larval stages, the number of eggs in adult females coming from treated praniza, and survival of larvi that reached to adult stages. Such monitoring was adapted to each larval stage. Praniza were kept in a 100ml recipient with seawater at 17-18°C once

finished the LD50 assay at 96h. Every two days, seawater was changed and praniza were monitored to anotate their progress. On the other hand, treated zuphea were kept into an aquarium with the host to allow their attachment and blood or lymph sucking, and later hosts were removed. The obtained pranizas were then put into a 100 ml recipient with seawater at 17-18°C and monitored similarly to treated praniza as indicated above. Larvi used in the control batches (untreated) were kept under the same conditions. None of the 25 control larvi showed deformities, and a theoretical ratio of 1/100 was considered to calculate OR values. The obtained OR results  $>1$  support that there is a significant effect of the used products with the induction of deformities either zuphea or praniza. Later, the obtained mortality in adult forms coming from the treated larvi was higher than the observed mortality during the life cycle at laboratory (Hispano et al., 2014). However, the obtained results for zuphea could be conditioned by the use of anesthetic (clove oil) to sedate the host and facilitate the attachment of larvi. It was observed that treated larvi hatched fewer eggs than untreated larvi. However, there is not a significant difference between the use of the three tested compounds (abamectin, cypermethrin and emabectin benzoate). Similar results were observed for the survival of larvi that reached to adults. The mortality rate for larvi coming from treated larvi was greater than control sets. Therefore, these tested compounds showed to be highly effective against *Gnathia maxillaris* forward, but their efficacy to eradicate an infestation in large tanks as those of an exhibition aquarium (Hispano et al., 2013) could not be supported by the performed assays at the laboratory level.

The results obtained in this study are supporting the use of lufenuron at 130 mg/m<sup>3</sup> as a good substitute of trichlorfon for such type of infestations in large volume tanks. Moreover, the possibility of an oral administration of lufenuron is favouring their practical implementation on treatments. Finally, it should be noted that the baths of freshwater have been observed very effective when they can be applied in quarantine units with low volume tanks. Consequently, it should not be discarded freshwater baths in the prevention treatments for the entry of new fish or invertebrate specimens or decoration materials in exhibition aquaria.

### **Acknowledgements**

We thank the Aquarium of Barcelona for the support provided to perform the experimental assays.

### **References**

Armstrong, R.; Macphee, T.; Kalz, T., Endris, R, 2000: A field efficacy evaluation for the control of sea lice on Atlantic salmon. *Can Vet J.* Vol. 41.

Burka, J.F.; Hammell, K.L.; Horsberg, T.E.; Johnson, G.R.; Rainnie, D.J.; Speare, D.J., 1997: Drugs in salmonid aquaculture--a review. *J. Vet. Pharmacol. and Therap.* **20**, 333-349.

Cognetti-Varrialli, A.M.; castelli, A.; Cecchini, S.; Saraglia, M., 1992: Study of *Diplectanum aequans* (Monogenea), parasite of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in intensive farming. *Production, Environment and quality Bordeaux*

aquaculture'92. G. Barnadé and P. Kestemont (Eds). European aquaculture Society. Specialy publication, N°18.

Cognetti-Varrialli, A.M.; Cecchini, S.; Saraglia, M., 1992: therapeutic trials against the *Diplectanum aequans* (Monogenea) parasite of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in intensive farming. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., **12(6)**, 204.

Giannetto, S.; marino, F.; Paradiso, M. L.; Macri, D.; Bottari, T.; De Vico, G., 2003: Lightt and scanning electron microscopy observations on *Gnathia vorax* (Isopoda: Gnathiidae) larvae. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. **35(2)**, 161-165.

Hart, J.L.; Thacker, J.R.;Brainnwood, J.C.; Fraser, N.R.; Mattheus, J.E., 1992: Novel cypermethrin formulation for the control of sea lice on salmon (*Salmon salar*). Vet. Rec. **140(7)**: 179-81.

Hispano, C.; Bultó, P.; Blanch, A.R., 2013: *Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies. *Journal of Applied Ichthyology*, **29**, 1139-1144.

Hispano, C.; Bultó, P.; Blanch, A.R 2014: Life cycle of the fish parasite *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). *Folia Parasitologica*, **61**, 277-284.

Honma, Y. ; Chiba, A., 1991: Pathological-changes in the branchial chamber wall of stingrays, *Dasyatis spp.*, associated with the presence of juvenile gnathiids (Isopoda, Crustacea). Fish Pathol. **26**, 9-16.

Johnson, S.C.; Kent, M.L.; whitaker, D.T.; Margolis, L. 1993: Toxicity and pathological effectes of orally administered ivermectin in Atlantic, chinook, and coho salmonid and steelhead trout. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 107-112.

Jones, C. M. ; Grutter, A.S., 2005: Parasitic isopods (*Gnathia sp.*) reduce haematocrit in captive blackeye thicklip (Labridae) on the Great Barrier Reef. *J. Fish. Biol.* **66**, 860-864.

Marino, F.; Giannetto, S.;Paradiso, M.L.; Bottari, T.; De Vico, G.; Macri, B., 2004: Tissue damage and haematophagia due to praniza larvae (Isopoda: gnathiidae) in some aquarium seawater teleost. *Dis. Aquat. Org.* **59**, 43-47.

Mayer, j ; Hensel, P. ; Mejia-Fava, ; Divers, S., 2013 : The use of lufenuron to treat fish lice (*Argulus sp*) in Koi ( *Cyprinus carpio*). *Journal of Exotic pet Medicine* **22** : 65-69.

Mugridge, R.E.R. ; Stallybrass, H.G., 1983 : A mortality of eels, *Anguilla anguilla L.* attribute to *Gnathiidae*. *J. Fish Dis.* **6**, 81-82.

O'Halloran, J.; Hogans, W.E., 1996: First use in North America of azamethiphos to treat Atlantic salmon for sea lice infestation: procedures and efficacy. *Can. Vet. J.* **37**, 610-611.

Palmer, R.; Rodger, H.; Drinan, e.; Dwer, C.; Smith, P.R., 1987: Preliminary trials on the efficacy of ivermectin against parasitic copepods of atlantic salmon. *Bulll. Eur. Ass. Fish Pathol.* **7**, 47-54.

Paperna, I; Por, M.F., 1977: Preliminary data on the Gnathiidae isopoda of the Northern Red Sea the Bitter Lakes Suez Canal Egypt and the Eastern Mediterranean and the biology of *Gnathia-Piscivora* New-species. Rapp. Proces-Vebaux des Réunions Comm. Internat. L'Exploration Sci. Mer Mediterranée Monaco **24**, 195-198.

Pretti, C.; Soldani, G.; Cognetti-Varriale, A. M.; Monni, G.; Meucci, V.; Intorre, L., 2002: Efficacy and safety of azamethiphos for the treatment of pseudodactylogyrosis in the European eel. J. Vet. Pharmacol. and Therap. **25**, 155-157.

Qin, J.G.; Dong, P., 2004: Acute toxicity of trichlorfon to juvenil yabby *Cheak destructor* (Clark) and selected zooplankton species. Aquaculture research, **35**, 1104-1107.

Ritz, C.; Streibig, J.C. 2005: Bioassay Analysis using R. J. Statist. Software, Vol **12**, Issue 5.

Roth, M.; Richards, R.H.; Sommerville, 1993: Current practices in the chemotherapeutic control of the sea lice infestation in aquaculture: a review. J. Fish Diseases, **16**,1-26.

Schmahl, G.; Mehlhorn, H. 1985: Treatment of fish parasites. 1. Praziquantel effective against Monogenea (*Dactylogyrus vastator*, *Dactylogyrus extensus*, *Diplozoon paradoxum*). *Z. Parasitenkd.* **71**, 727-37.

Sievers, G.; Palacios, P.; Inostroza, R.; Dolz, H., 1995: Evaluation of the toxicity of 8 insecticides in *Salmo salar* and the in vitro effects against the isopode parasite, *Ceratothoa gaudichaudii*. *Aquaculture* **134**, 9-16.

Smit, N.J.; Davies, A.J., 2004: The curious life-style of the parasitic stages of gnathiid isopods. *Advances in Parasitology*, **58**, 289-391.

Stoskopf, M.K., 1993: *Fish medicine*. W.B. Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc., Philadelphia, London.

Treves-Brown, K.M. 1999: Availability of medicines for fish. *Fish. Vet. J.* **4**, 40-55.

Toksen, E.; Degirmenci, U.; Cankurt, M. 2010: The effect of Trichlorfon on the control of *Lernanthropus kroyeri* (van Beneden, 1851) (Lernanthropidae) infestations in Cultured Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **30**, 205 – 210.

Toksen, E.; Nemli, E.; Degirmenci, U.; Karacalar, U. 2013: The effects of azamethiphos and trichlorfon on the control of *Diplectanum aequans* (Monogenea: Diplectanidae) infestations in cultured broodstock sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **33**, 144 – 149.



Venables, W.N.; Ripley, B.D. 2002: Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0

Wang, G.X.; Jian, D.X.; Li, J.; Han, J. 2010: Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. **107**, 1365-1371.

Table 1. LD50 on pranizas and zupheas of the different tested compounds.\*Lack to fit the models.

Treatment	Units	Praniza			Zuphea				
		LD50	CI 95%	P*	LD50	CI 95%	P*		
Abamectin	ppb	3.00x10 <sup>0</sup>	0.00x10 <sup>0</sup>	1.04x10 <sup>1</sup>	<0.05	1.41x10 <sup>1</sup>	4.64x10 <sup>0</sup>	2.36x10 <sup>1</sup>	0.86
Cypermethrin	ppb	3.64x10 <sup>1</sup>	0.00x10 <sup>0</sup>	3.77x10 <sup>2</sup>	0.83	3.80x10 <sup>1</sup>	0.00x10 <sup>0</sup>	3.86x10 <sup>2</sup>	0.95
Emamectin	ppb	5.49x10 <sup>1</sup>	0.00x10 <sup>0</sup>	2.51x10 <sup>2</sup>	1.00	2.08x10 <sup>1</sup>	1.11x10 <sup>1</sup>	3.06x10 <sup>1</sup>	0.70
Lufenuron	ppb	5.58x10 <sup>1</sup>	2.29x10 <sup>0</sup>	1.09x10 <sup>2</sup>	0.84	7.08x10 <sup>1</sup>	4.75x10 <sup>1</sup>	9.34x10 <sup>2</sup>	0.97
Trichlorfon	ppm	3.92x10 <sup>-2</sup>	0.00x10 <sup>0</sup>	4.39x10 <sup>-1</sup>	1.00	7.96x10 <sup>-2</sup>	0.00x10 <sup>0</sup>	8.44x10 <sup>-1</sup>	0.64

Table 2. The induced deformity in praniza and zuphea by the treatment using abamectin, cypermethrin and emamectin benzoate at the lowest concentration affecting at least one of the larval stages.

Treatment	Dose	Praniza			Zuphea		
		OR	CI 95%	<i>p</i>	OR	CI 95%	<i>p</i>
Abamectin	0.1ppb	40.00	4.06 393.30	<0.05	1.67	0.92 30.06	>0.05
Cypermethrin	0.5 ppb	27.27	2.60 285.18	<0.05	20.0	1.61 247.98	<0,05
Emamectin	5.0 ppb	7.14	0.42 120.75	>0.05	37.5	2.77 507.47	<0,05

Fig.-1 Effect of the dose of trichlorfon.

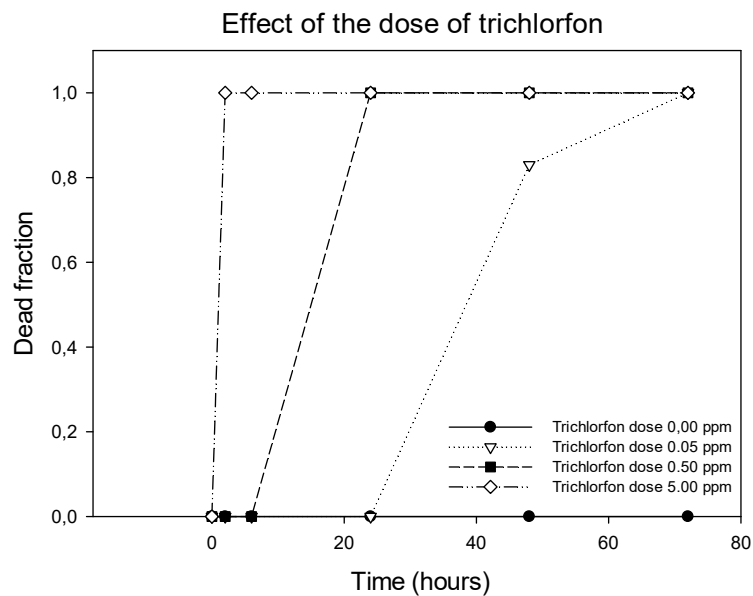


Figure 2. Variation in the egg-laying induced by the treatment with abamectin, cypermethrin and emamectin benzoate. Control: untreated population.

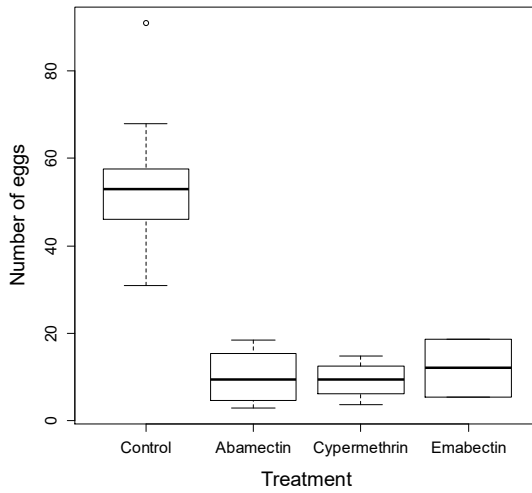
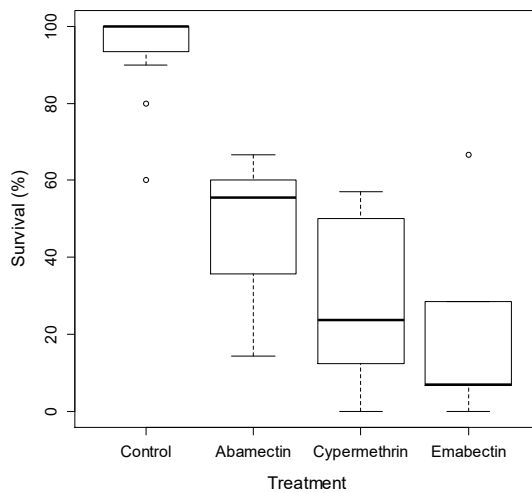


Figure 3. Variation in the survival percentage of larvi that reached the adult stage related to the three assayed compounds (abamectin, cypermethrin and emamectin benzoate) and untreated populations (control).



## **4. Informes**



## 4. Informes

### 4.1. Informe sobre l'índex d'impacte.

Els articles que formen part de la Memòria de la Tesi Doctoral presentada per Coral Hispano Vilaseca han estat publicats o seran sotmesos per a la seva publicació en revistes internacionals indexades al Journal Citation Index tal i com es detalla a continuació:

- **Hispano, C., P. Bultó, and A. R. Blanch.** 2013. *Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies. *Journal of Applied Ichthyology* 29, 1139-1144.

Aquesta revista es troba inclosa en l'àrea temàtica de Fisheries (32/52) i Marine and Freshwater Biology (54/103) amb un factor d'impacte per a l'any 2014 de 0,867.

- **Hispano, C., P. Bulto, and A. R. Blanch.** 2014. Life cycle of the fish parasite *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). *Folia Parasitologica* 61, 277-284.

Aquesta revista es troba inclosa en l'àrea temàtica de Parasitology (25/36) amb un factor d'impacte per a l'any 2014 de 1,147.

- **Hispano, C., Sala-Comorera, L.; Castelló, J.; Bultó, P. and A. R. Blanch.** 2015. A complementary morphological description of *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae) using electron microscopy. (Per ser sotmès a *Zootaxa*)

Aquesta revista es troba inclosa en el primer quartil de l'àrea temàtica de Zoology (89/154) amb un factor d'impacte per a l'any 2014 de 0,906.

- **Hispano, C., Méndez, J.; Bultó, P. and A. R. Blanch.** 2015. Evaluation of chemical treatments for the mitigation or eradication of *Gnathia maxillaris* infestations. (Per ser sotmès a *Journal of Applied Ichthyology*)

Aquesta revista es troba inclosa en l'àrea temàtica de Fisheries (32/52) i Marine and Freshwater Biology (54/103) amb un factor d'impacte per a l'any 2014 de 0,867.

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert  
Barcelona, 2 de novembre de 2015.

## 4.2. Informe de coautoria.

La doctoranda Coral Hispano Vilaseca ha participat en els articles que formen part de la seva Tesi Doctoral de la manera que es detalla a continuació:

- **Hispano, C., P. Bultó, and A. R. Blanch.** 2013. *Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies. *Journal of Applied Ichthyology* 29, 1139-1144.

La doctoranda va dur a terme pràcticament la totalitat de les tasques experimentals: l'establiment del calendari de mostreig, la presa de mostres, l'enumeració i biometria de les larves, el desenvolupament del mètode de manteniment de les larves en el laboratori, la conservació de mostres, l'establiment i valoració del tractament. També va participar activament en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

- **Hispano, C., P. Bulto, and A. R. Blanch.** 2014. Life cycle of the fish parasite *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). *Folia Parasitologica* 61, 277-284.

La doctoranda va dur a terme pràcticament la totalitat de les tasques experimentals: la posta a punt del sistema *in vitro* del manteniment de les larves, els estudis morfològics i biomètrics de les diferents fases del cicle biològic, la preparació de mostres i l'observació per microscòpia estereoscòpica i electrònica. També va participar activament en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

- **Hispano, C., Sala-Comorera, L.; Castelló, J.; Bultó, P. and A. R. Blanch.** 2015. A complementary morphological description of *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae) using electron microscopy. (Per ser sotmès a *Zootaxa*)

La doctoranda va dur a terme pràcticament la totalitat de les tasques experimentals, incloent la preparació de mostres i l'observació per microscòpia estereoscòpica i electrònica, així com la comparació amb altres espècimens d'altres espècies, ja sigui per anàlisi directa comparatiu (mostra Balears) o documental en les referències gràfiques de les taules de classificació taxonòmica. També va participar activament en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

- **Hispano, C., Méndez, J.; Bultó, P. and A. R. Blanch.** 2015. Evaluation of chemical treatments for the mitigation or eradication of *Gnathia maxillaris* infestations. (Sotmès a *Journal of Applied Ichthyology*)

La doctoranda va dur a terme pràcticament la totalitat de les tasques experimentals: la preparació i obtenció de l'estoc de larves, els assaig de LD50 i el seguiment de l'evolució de les larves tractades fins al final del cicle. Va participar també en l'anàlisi dels resultats i en la redacció del manuscrit i en l'elaboració de les taules i figures.

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert  
 Barcelona, 2 de novembre de 2015.

## **5. Discussió i conclusions**





## 5. Discussió i conclusions

En les darreres dècades ha crescut el nombre d'aquaris d'exhibició arreu del món. L'interès de la població pel medi marí tan a nivell lúdic com mediambiental i educatiu ha fet possible l'augment d'aquests tipus d'instal·lacions. A l'hora també ha existit un canvi de model en els parcs zoològics en mostrar el món animal. El nou concepte es basa en millorar el coneixement i la sensibilització per la natura. Ja no es tracta de mostrar col·leccions biològiques per mostrar animals al visitant, sinó, que es tracta de mostrar els animals en el seu entorn. La recreació d'un habitat mostrant el medi i la seva diversitat representa el repte actual per als parcs d'avui dia. Aquest fet és el que ha marcat les línies a seguir en els aquaris de nova generació i l'aplicació de les noves tecnologies és el que ha fet possible que es pogués dur a terme.

El manteniment en captivitat d'un gran nombre d'espècies de peixos i invertebrats necessari per a la representació d'una comunitat és una tasca complexa de realitzar. Des del punt de vista tècnic és molt important el disseny del sistema, aquest està lligat al volum, al nombre de tancs i a la biomassa que alberga. La filtració del sistema ha de garantir una bona qualitat d'aigua i la constància dels paràmetres marcats per representar l'hàbitat específic que es vol ambientar. Mostrar una comunitat comporta mantenir en captivitat un gran nombre d'espècies salvatges de les quals sovint no existeix gaire bibliografia ni experiència. Recrear una comunitat representa haver de trobar un equilibri entre les dimensions del tanc, els paràmetres específics de l'aigua, la representació de l'entorn i les espècies que cohabiten en el tanc.

L'Aquàrium de Barcelona és l'aquari que posseeix una de les col·leccions més gran al món d'espècies del Mediterrani. La gestió de salut dels peixos en instal·lacions d'aquest tipus és complexa. El gran nombre d'espècies de peixos provinents directament de mar comporten un risc en

la possible entrada d'agents patològics biològics. Els protocols d'entrada i el període de quarantena s'han mostrat eficaços per a minimitzar aquests riscos. La gestió preventiva que es realitza als tancs d'exhibició, tant a nivell de manteniment dels aquaris com d'aplicació de tractaments terapèutics ajuda al control de malalties, fet que disminueix les taxes de mortalitat.

Al llarg dels darrers 20 anys, des de que es va inaugurar l'Aquàrium, els protocols aplicats pel manteniment dels peixos en captivitat, ja sigui pel control de la qualitat de l'aigua, la nutrició o la gestió de salut, han anat ajustant-se als nous coneixements adquirits gràcies a l'experiència i la formació adquirida per l'intercanvi tècnic entre aquaris, per la informació obtinguda a través de la bibliografia generada en l'àmbit de l'aqüicultura, o bé per la relació amb empreses relacionades amb l'avanç tecnològic a nivell d'aquariofília i/o d'aqüicultura.

La gestió de salut dels peixos en instal·lacions d'aquest tipus és molt complexa ja que s'ha de tenir en compte un gran nombre de factors que estan implicats. La infestació de *Gnathia maxillaris* (Montagu , 1804) en el sistema mediterrani va instar a realitzar un estudi global de gestió i actuació davant d'una parasitosi que afectava de manera generalitzada un sistema de grans dimensions. L'avaluació del nivell d'afectació del sistema i el seu control, així com l'estudi del paràsit "*in situ*" i l'efectivitat de les actuacions aplicades l'inici de la seva detecció van ser crucials per a minimitzar els seus efectes negatius.

L'elevat nivell d'infestació que es va detectar a inicis del 1997, mostra l'adaptació que poden tenir els gnàtids en aquests tipus d'instal·lacions, sent un risc elevat degut a les altes mortalitats que poden ocasionar. Per tant s'ha d'evitar al màxim l'entrada d'aquests tipus de paràsits fent ús d'uns protocols a quarantena que siguin eficaços en la seva eradicació. La detecció de la seva presència en els tancs és difícil, degut a la seva mida, a la seva dinàmica d'activitat al llarg del dia i al fet a que el paràsit es fixa

al peix durant un curt període de temps. La primera vegada que es va detectar la seva presència va ser arrel d'una necròpsia d'un congre (*Conger conger*) de l'Oceanari, per comprovar si el paràsit estava present a tots els tancs del sistema es van realitzar observacions a hores de baixa intensitat de llum o bé a la nit fent l'ús de lots, que ens va ajudar a verificar la seva presència ja que creen un focus puntual de llum que atrau les larves cap al metacrilat (capítol 1).

Quan es va detectar la presència del paràsit el tipus d'actuació de control que es va seguir va ser mecànica. Tal i com es descriu en el capítol 1 (Hispano et al. 2013) es basava principalment en el sifonat del fons i de la decoració com en l'extracció de larves per bombeig d'aigua a través d'una xarxa de plàncton. Per a millorar l'eficiència d'aquesta última actuació, i havent detectat el fototropisme positiu de les larves de la *Gnathia*, es feia durant la nit amb un focus situat just on era la mànega d'extracció per afavorir que les larves anessin cap a aquell punt. Més tard i després d'haver consultat a altres aquaris, es va decidir actuar aplicant el triclorfon en el sistema, ja que només amb l'eliminació física per filtració no s'aconseguia eradicar la infestació, tot i que la monitorització del nombre de larves si que ens indicava un relatiu control del paràsit. Tal i com s'ha comentat anteriorment, el triclorfon és un organofosforat que afecta al sistema nerviós central dels crustacis. Degut a que el triclorfon no va ser tampoc eficaç per a l'eradicació del paràsit, les actuacions mecàniques que es realitzaven en el sistema es van mantenir al llarg de la seva aplicació. Totes dues actuacions van permetre però evitar la mortalitat de peixos atribuïda als gnàtids, i mantenir reduïda la seva població.

El mètode de mostreig i d'enumeració que es va dissenyar i aplicar a l'Oceanari va ser efectiu perquè ens va mostrar com disminuïa la població de gnàtids en el tanc al llarg del temps, gràcies a les actuacions mecàniques i els banys de triclorfon (Fig. 17). La quantificació de larves obtingudes en el mostreig, va ser també efectiva per a avaluar l'eficiència

del triclorfon seguint les dinàmiques de la població del paràsit al llarg de l'any. També va permetre definir un criteri per a establir l'aplicació del tractament amb triclorfon. De manera cíclica es va veure que quan apareixien les larves zuphea als pocs dies es començava a recol·lectar les larves praniza (Fig.-18), el bany s'aplicava quan el nombre de P3 començava a augmentar. La caracterització biomètrica dels estadis larvaris va permetre determinar la freqüència del tractament amb triclorfon. Es va establir el criteri d'aplicar el tractament quan s'observés que començaven a aparèixer les larves praniza P3 per tal d'evitar que passessin a adults i disminuir d'aquesta manera la població del paràsit.

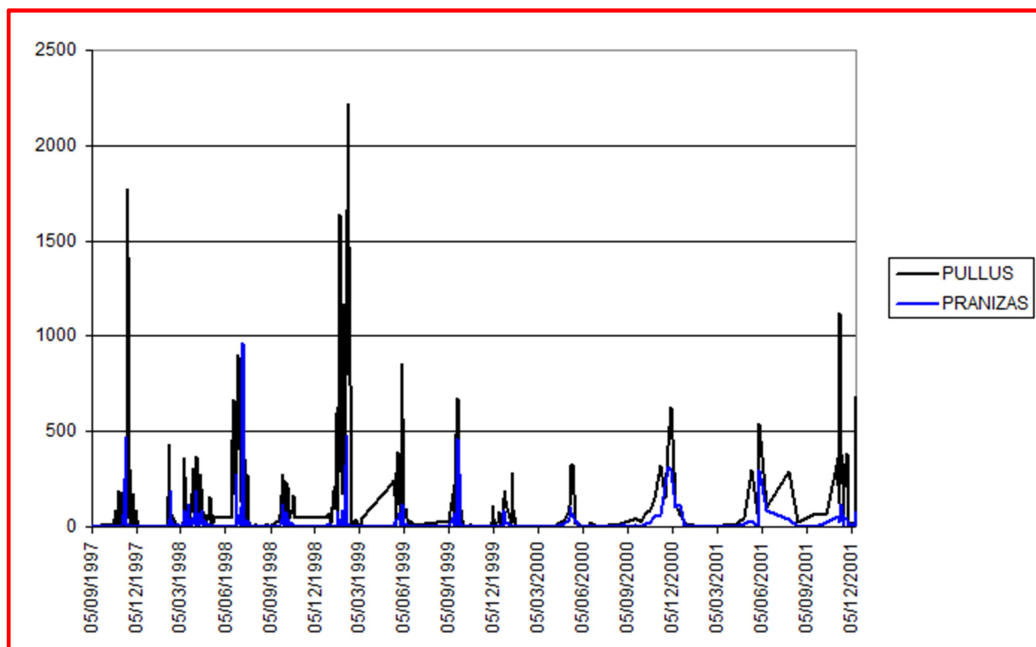


Fig.- 17. Enumeració de les larves de l'Oceanari, any 1997-2001.

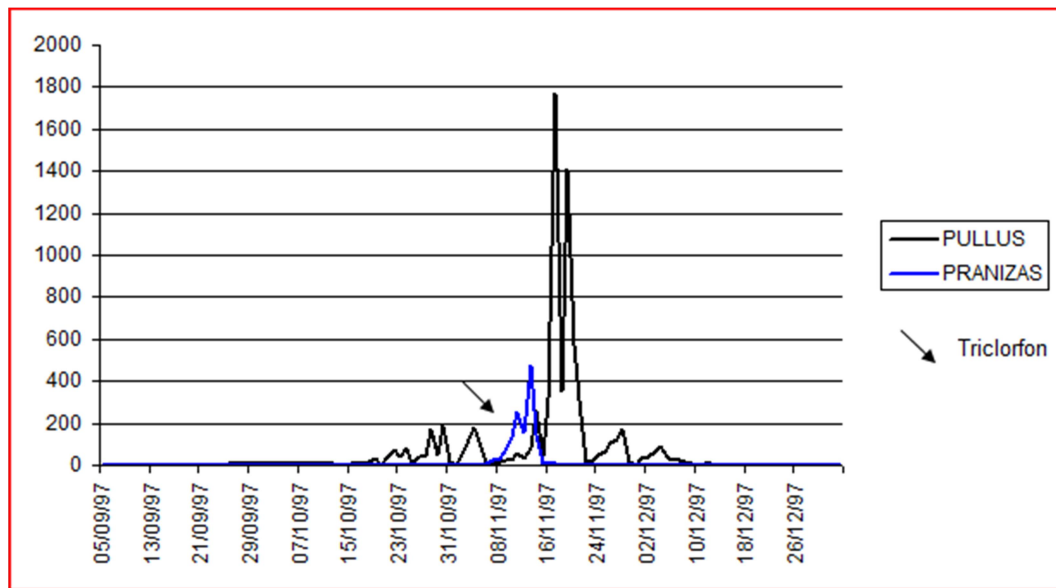


Fig.- 18. Enumeració de les larves de l'Oceanari, any 1997.

Aplicar aquesta hipòtesi va ser possible perquè a partir de l'enumeració diària de les larves en l'Oceanari també es va poder observar que el cicle era molt sincrònic al llarg de l'any. A partir del mostreig diari de les larves, es podia acotar cada un dels estadis larvaris. Així va ser fàcil determinar la durada de cada un dels estadis i aprofitar les observacions per l'anàlisi biomètrica que facilitaria posteriorment la identificació del diferents estadis. A més a més, els resultats obtinguts van servir per complementar i verificar l'estudi sobre el cicle realitzat en condicions de laboratori. Pels resultats obtinguts, a 17°C, el cicle biològic de *Gnathia maxillaris* triga un temps d' aproximadament 3 mesos en un tanc de les dimensions i característiques de l'Oceanari. La monitorització de la infestació mitjançant paràmetres físics, químics i del nombre de larves va permetre determinar que la temperatura és un factor condicionant del cicle biològic en *Gnathia maxillaris*. Aquesta relació també ha estat observada per altres autors en altres espècies de gnàtids (Monod, 1926; Kliggaard, 1991; Tanaka & Aoki, 2000). A finals d'agost es va augmentar la temperatura del sistema mediterrani de 17.5° a 20°C, al maig del 2003 al veure l'increment de larves en el sistema es va decidir baixar-la de nou a 17.5C

(Fig.-19). Aquest augment, com es va comprovar més tard, corresponia no només a una disminució de la durada del cicle, sinó que també a que les femelles feien postes amb un nombre major d'ous relacionat a que havien augmentat la seva mida.

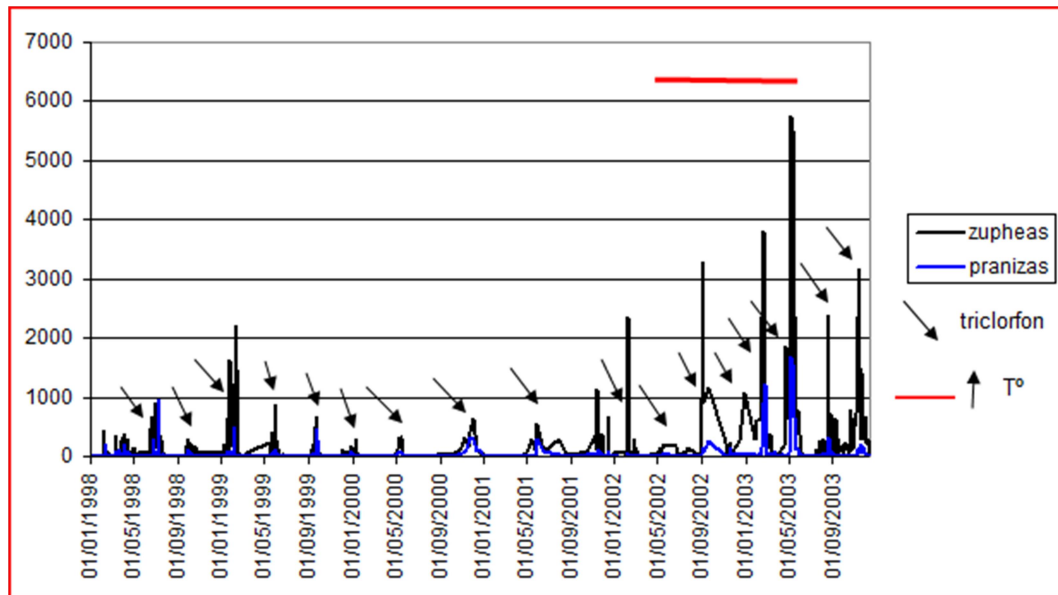


Fig.- 19. Enumeració de les larves de l'Oceanari, any 1998-2003.

El tractament amb triclorfon va quedar definit amb tres banys de 48 h de duració i una periodicitat setmanal amb una dosi de 0,4 ppm. Aquesta pauta de tractament va resultar efectiva i és la que es va aplicar al llarg de tots els anys pel control del paràsit. L'efecte sobre els paràsits s'observava principalment en les larves, ja que aquestes són nedadores. A l'aplicar el bany les larves tenien una natació erràtica i el nombre de larves que es recol·lectaven era molt elevat, tal i com es pot veure a la (Fig.-18). A l'acabar el tractament el nombre de larves disminuïa dràsticament fins a no ser detectables pel sistema de numeració establert. Als dos mesos aproximadament després d'haver aplicat el triclorfon al sistema es tornaven a detectar larves, Z1. Posteriorment i tal com s'indica al capítol 1 i 2, aquest fet coincidia amb les dades de l'estudi del cicle

biològic al laboratori si sumem el temps que triguen les P3 a passar a femelles, el temps de incubació i el temps de posta de les Z1.

L'estudi de la cinètica de degradació del triclorfon al llarg de les primeres aplicacions va ajudar a ajustar la dosi del producte per tal d'ajustar-se a les dosis terapèutiques indicades en diferents treballs (Stoskopf, 1993). A més el seguiment de la seva cinètica de degradació i aparició de subproductes va aportar informació sobre el triclorfon i els seus derivats al llarg de les 48h de durada del tractament. La cinètica del triclorfon (Fig.2, Hispano et al., 2013) mostra que aquest comença a degradar-se a diclorvos des de bon principi ja en la seva preparació i durant l'aplicació. El diclorvos que és el principi actiu, és més tòxic per als peixos que el triclorfon (Roth et al., 1993). A les 24h. d'aplicació el diclorvos mostra el seu pic més elevat havent una concentració al sistema de 0,17 ppm . Obtenir la cinètica del diclorvos ens va facilitar la presa de mesures de seguretat de cara als submarinistes que habitualment treballen en el sistema. A les 48h d'aplicar el tractament es començava a renovar aigua al sistema i s'obria l'aportació d'ozó per tal de facilitar l'oxidació i dilució del diclorvos. Al cap de 48h de renovar aigua els nivells de diclorvos en el sistema eren insignificants. Per prudència, els submarinistes no entraven fins a les 72h. d'acabar el tractament. Tota aquesta informació és realment important si es té en compte que en els sistemes de grans dimensions els càlculs del volum sempre són estimats, ja que es fa difícil conèixer qui és el volum real d'aigua que passa a través de canonades i sistema de filtració; o bé quin és el volum real que ocupen les roques i sorres que formen part de la decoració dels aquaris.

L'efectivitat del triclorfon no va ser l'esperada degut possiblement per les característiques que presenta el cicle biològic de *Gnathia maxillaris* conjuntament amb les condicions que es donen en un sistema d'aquaris de grans dimensions. Tot i que es va aconseguir una disminució significativa del grau de infestació respecte a l'inici del brot, va ser



necessària la seva aplicació al llarg d'un període llarg de temps per aconseguir controlar-la però no eradicar-la. Avaluat el grau d'afecció del triclorfon degut a la seva toxicitat en les espècies de peixos que habitaven en el sistema, no va ser possible degut a la mancança d'informació i d'experiències prèvies descrites en la bibliografia. Per exemple, el verat (*Scomber scombrus*) va resultar ser l'única espècie que era sensible al triclorfon, ja que es va observar una alta mortalitat d'individus d'aquesta espècie en la primera aplicació de triclorfon en el sistema. Respecte a la resta no es va observar directament cap efecte nociu més enllà de presentar cert nerviosisme en el comportament dels peixos a l'administrar el producte. És probable que aquesta irritabilitat observada fos causada a nivell dèrmic i/o mucoses, però no es va considerar l'anàlisi d'aquest aspecte. Aquest efecte s'observava principalment en elasmobranquis, com els taurons toros (*C.taurus*) i els grisos (*C. plumbeus*) durant les primeres hores d'aplicació.

Es va considerar la possibilitat d'aplicar altres alternatives al triclorfon, però en aquaris es disposava d'experiències prèvies aplicant altres productes antiparasitaris que fossin efectius més enllà del triclorfon o l'aigua dolça. Evidentment, l'aplicació de banys d'aigua dolça no resultava operativa atenent als volums d'aigua i al context i complexitat del sistema infestat i estudiat. Altres alternatives, com l'ús d'ivermectines o cipermetrines, es van rebutjar degut a la manca d'una informació sòlida i contrastada sobre la seva toxicitat en un aquari tenint en compte la gran diversitat d'espècies de peixos. No obstant, l'aigua dolça si que s'ha fet servir a quarantena com a bany obligatori, no només en peixos sinó també en substrats i en tots aquells invertebrats que ho toleren.

Un dels motius pel quals es va estudiar el cicle biològic en les condicions en les que estava la *Gnathia maxillaris* en el sistema, va ser per a avaluar quin era el millor moment de l'aplicació del triclorfon. Tal i com s'ha comentat anteriorment, es va plantejar la hipòtesi de que el tractament

seria més efectiu si s'aplicava just quan apareixien les larves P3. Aquesta hipòtesi es veuria reforçada posteriorment pels resultats obtinguts en els estudis de la LD50 (capítol 4), ja que com es va observar les larves praniza mostraren una major sensibilitat al triclorfon que les zuphea en els assaigs de toxicitat.

L'estudi del cicle biològic de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) al laboratori, ha aportat quasi tota la informació necessària per a complementar la seva descripció. Va resultar difícil, estudiar les larves Z1 en el seu pas a larves P1, degut a la sensibilitat que presentaven a l'anestèsic que es feia servir en el model *in vivo* de manteniment en el laboratori. Tot i així es va poder estudiar amb larves que provenien del tanc infestat complementant-ho amb la informació que aportava el mostreig del sistema per a la monitorització de la infestació al llarg dels anys. En les condicions del S3 (Oceanari a 17°C), *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) manté un període de temps molt similar a l'hora de passar de praniza a zuphea en els dos primers cicles larvaris, trigant 10 dies en realitzar la muda que implica aquesta transformació. No obstant, es va observar que les larves P3 triguen entre 12 i 14 dies a passar a mascle i entre 19 i 26 dies a femella. A 17°C de temperatura la durada del cicle de *Gnathia maxillaris* és similar al descrit per a d'altres espècies de Gnathiidae d'aigües calentes o temperades, com és el cas de *G.africana* (Smit et al., 2003), *G.piscivora* (Paperna and Por, 1977) i *E.cornigera* (Tanaka and Aoki, 1998, 1999, 2003). Les espècies d'aigua freda tenen un cicle de durada molt més llarg, com és el cas de *P.formica* (Monod, 1926; Mouchet, 1928,a; Stoll, 1962; Amanieu, 1963; Upton, 1987a; Tinsley and Reilly, 2002) , *C.calva* (Wägele, 1987), i *C.abysorum* (Klitgaard, 1991, 1997). Els Gnathiidae es caracteritzen per tenir un cicle biològic que passa per tres estadis larvaris de desenvolupament seguit per un estadi adult bentònic. En aquest estudi però, s'ha pogut constatar que per a *Gnathia maxillaris* no sempre és així, ja que una part de les larves P2 s'ha observat que passen a adults. Per les observacions fetes al

laboratori, s'estima que només ho fan una petita part de la població, ja que aquest fet no es donava amb molta freqüència. Es va desestimar estudiar en quina proporció es donava ja que possiblement els resultats no hagueren estat concloents en condicions de laboratori, ja que no es pot descartar que fos precisament aquestes condicions les causants de provocar aquest canvi. Un altre aspecte que caracteritza el cicle biològic de *Gnathia maxillaris*, és que la fecundació es doni entre una larva P3 i el mascle adult. Les descripcions d'altres espècies de *Gnathiidae* sempre descriuen que la fecundació es dona entre individus adults. Les observacions realitzades en aquest estudi confirmen els estudis fets per Hesse (1864) sobre la fecundació de *Gnathia maxillaris*.

L'estudi realitzat del cicle biològic coincideix amb la descripció realitzada per Mouchet (1928) i aporta noves dades per complementar el seu treball. S'han obtingut dades de les mides de tots els estadis del cicle, així com la periodicitat de cada una de les fases (capítol 3). La descoberta del procés de fecundació entre una larva P3 i el mascle va permetre poder estudiar el període d'incubació i les característiques de les postes. Les dades obtingudes es van reafirmar amb la informació obtinguda directament del sistema mitjançant l'enumeració de la concentració de larves a l'Oceanari. La durada del cicle biològic, és aproximadament de 3 mesos a 17°C. Aquest temps es va confirmar amb l'estudi de la dinàmica de la població de larves de *Gnathia maxillaris* en l'Oceanari, sent necessaris aproximadament un nombre de quatre aplicacions de triclorfon a l'any. Possiblement a la natura el cicle de *Gnathia maxillaris* pugui tenir unes pautes diferents, ja que al viure en un ambient intersticial les poblacions estan sotmeses a un rang de temperatura que pot oscil·lar entre 13°C a l'hivern i 26°C a l'estiu al Mediterrani (Margalef, 1989), i per tant es podrien donar canvis de duració del cicle biològic al llarg de l'any relacionat amb els efectes estacionals.

El fet d'aconseguir definir una metodologia per a mantenir larves al laboratori, que aquestes puguin seguir el seu desenvolupament fins a adults i obtenir una nova generació, va ser una eina determinant per a poder realitzar els següents estudis i aconseguir els objectius plantejats. Per una banda es podia aprofitar l'obtenció de mascles per a actualitzar la descripció de l'espècie fent ús de les noves tecnologies; i per un altra banda va permetre poder realitzar els assaig de toxicitat de compostos alternatius al triclorfon. Aquests assaigs no només es varen realitzar per a trobar un antiparasitari que afavorís l'alternança de l'aplicació de tractaments terapèutics i evitar així l'aparició de resistències, sinó també per a trobar una solució definitiva i eradicar *Gnathia maxillaris* del sistema infestat.

L'estudi morfològic del mascle de *G. maxillaris* ha permès completar la seva descripció i facilitar i millorar la seva identificació. Actualment els treballs científics que es poden consultar a nivell d'identificació d'espècies de Gnathiidae es recolzen en els dibuixos científics i amb fotografies realitzades al microscopi electrònic. Aquestes imatges permeten visualitzar i diferenciar molts dels caràcters que ajuden a distingir les espècies, i que fins la disponibilitat d'aquesta microscòpia no es podien apreciar. Les imatges de microscòpia electrònica de rastreig presenten una avantatge respecte a les il·lustracions, ja que el seu augment permet observar les característiques morfològiques amb més precisió i detall. Tot i així, les il·lustracions són encara imprescindibles, per dos raons: la primera és la seva necessitat per a realitzar una correcta descripció dels apèndix bucal, pereïòpodes, pereionite i uròpodes; i la segona per a mostrar el paràsit a una escala que permeti reconèixer-ho fàcilment en un laboratori convencional.

L'obtenció d'un mascle salvatge de *Gnathia maxillaris* capturat a la campanya d'Eivissa (1984), va permetre comparar els individus d'aquest estudi amb una mostra d'origen conegut a la Mediterrània. La descripció

de tots dos mascles coincideix amb la descripció realitzada per Monod (1926) per a *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804). Des del punt de vista morfològic, hi ha certs aspectes, però, que podem afegir a la seva descripció: el nombre de setes plomoses que presenta el maxil·lípede i que es considera un caràcter específic segons la bibliografia (Cohen and Poore, 1994; Smit and Basson, 2004) pot variar entre individus d'una mateixa espècie, ja que tot i ser molt semblant s'han observat diferències entre la mostra salvatge de les Balears, les mostres de l'Aquàrium i la descripció realitzada per Monod. S'ha observat que un dels individus capturats a l'Aquàrium, presentava poca cutinització, degut possiblement a que en el moment de captura feia poc que havia mudat. No és fins al cap d'uns dies després de la metamorfosi quan els adults acaben de completar la cutinització. Per tant, certes característiques dels mascles triguen en acabar-se de formar i fer-se recognoscibles (Monod, 1926). Aquesta mostra, per tant, no presentava de manera clara algun dels caràcters morfològics que s'estudien, com són per exemple, l'ornamentació para-ocular, o el procés fronto-lateral inferior molt disminuït, quasi inexistent. Aquest fet evidencia que a l'hora d'efectuar les descripcions morfològiques cal assegurar que el mascle ja ha finalitzat el procés de muda correctament i ha donat temps a que s'acabi també el procés de cutinització. Aquest procés és el que dona robustesa a l'animal, per tant aquest aspecte s'ha de tenir en comte per no cometre confusions en la descripció.

Un altra observació realitzada respecte les mostres és el nombre de sedes que presenten en la primera articulació dels pereïòpodes, la basis. Els individus procedents de l'Aquàrium presenten la superfície i els marges de la basis amb un gran nombre de sedes distribuïdes a l'atzar, mentre que l'individu recol·lectat a Eivissa presenta un nombre de sedes molt inferior a la basis. Aquesta observació recolza que el nombre de sedes al llarg del cos pot veure's alterat en funció de les condicions del medi, en aquests cas no coneixem l'origen extern real de la mostra de

l'Aquàrium, només sabem que procedia de la costa del Mediterrani occidental. Ara bé, el fet de saber que les sedes als pereiòpodes en les larves tenen a veure amb la funció natatòria, es podria suposar que la diferència observada podria ser deguda a diferències a nivell de corrents d'aigua del medi on les mostres foren recol·lectades.

Respecte la descripció realitzada per Cohen and Poore (1994) la no coincidència de varis caràcters morfològics tant amb la descripció realitzada per Monod com amb la nostra realitzada en aquests estudis, fa suposar que l'individu mascle observat per aquests autors podria no ser *Gnathia maxillaris*. En el seu treball no queda clar l'origen de la mostra, i a més a més la descripció no ve acompanyada d'il·lustracions, i per tant tampoc s'afavoreix la seva comparació.

L'estudi d'eficiència d'antiparasitaris amb l'objectiu principal de substituir el triclorfon i trobar una alternativa que fos definitiva, es va basar principalment en l'ús de productes que s'han aplicat o suggerit per aqüicultura pel control d'infestacions de *sea lice* (Roth et al., 1993; Cognetti-Variide et al., 1992) Tot i no haver a la bibliografia cap referència d'estudis de toxicitat dels productes seleccionats en front dels gnàtids, es va considerar que s'havien d'estudiar productes que tinguessin una via d'actuació diferent als organofosforats, ja que si es podia actuar per vies diferents potser s'afavoriria l'eradicació més ràpidament. Això volia dir que seguint la bibliografia s'havia de testar algun producte que representés als piretroids sintètics, als productes derivats de les ivermectines i per últim un producte que actués com a regulador del creixement.

Els assaigs experimentals al laboratori es van fer com sempre sota les mateixes condicions que es donaven en la infestació al sistema mediterrani, a 17°C, per tal de poder valorar l'efectivitat dels productes a les mateixes condicions que finalment serien aplicats.

Pel que fa a l'emamectina benzoat i a l'abamectina la determinació del rang de concentracions valorades es va fonamentar en dades de LD50(48) de *Daphnia magna*, ja que les dosis en peixos que es troben a la bibliografia són per a tractaments orals.

Els assaigs per a la determinació de la LD50(96) per a les larves de *Gnathia maxillaris* ha permès establir aquest valors pels diferents productes analitzats (abamectina, cipermetrina, lufenuron i triclorfon). Tot i així, aquestes dades no es podem contrastar amb les dades de LD50(48) de *Daphnia magna* o d'altres invertebrats obtingudes a través de la bibliografia, ja que la informació disponible per diferents autors és molt variable, ja sigui perquè els invertebrats presenten una variació respecte al grau de sensibilitat davant del producte, com és el cas del triclorfon (Qin et al., 2004); o bé, perquè a vegades les dades varien en funció de la font d'informació.

Els resultats sobre l'eficiència dels productes pel seu ús en tractaments antiparasitaris, no varen resultar concloents per a, l'abamectina, la cipermetrina i l'emamectina benzoat, ja que no es podem comparar amb un assaig a gran escala aplicant-los al sistema infestat. Per altra banda, tot i que s'observa una afectació en la viabilitat de les larves, els efectes de mortalitat per aquests tres compostos no han estat tan directes com en el cas del lufenuron o el triclorfon. Els resultats comparatius dels estudis experimentals de toxicitat realitzats recolzen que probablement l'abamectina, la cipermetrina i l'emamectina benzoat serien fins i tot menys efectius que el triclorfon per a controlar la infestació en sistemes amb elevats volums d'aigua.

El lufenuron va mostrar una gran eficàcia davant les larves de *G.maxillaris* presentant valors del 100% de mortalitat en totes les mostres de tots els lots exposats a diferents concentracions. Aquests resultats recolzaren la seva aplicació al sistema d'aquaris infestat. Tot i que no existia gaire informació bibliogràfica referent a la seva aplicació en peixos, si que es

van trobar dues possibles vies d'aplicació: com a bany a una dosi de 130 mg/m<sup>3</sup> durant 5 dies; o com tractament oral a una dosi de 10 mg/Kg peix (actualment una de les dosi recomanades per peixos és entre 1-10mg/Kg 7 tomes seguides (Blaser, et al., 2013). L'aplicació en bany es va considerar que podria afectar a la qualitat de l'aigua en el sistema infestat, ja que suposava tancar l'aportació d'ozó durant els 5 dies de durada del tractament, no netejar els filtres de sorra i fer funcionar al mínim els PS al llarg de tot aquest temps. Atenent a que no fou possible conèixer la sensibilitat que presentaven les espècies exposades en els aquaris, es varen realitzar uns assaigs preliminars controlats amb algunes espècies de peixos en condicions de laboratori. Es van escollir peixos d'espècies diferents i disposar en la sala de quarantena i se'ls va subministrar una dosi única de 10 mg/Kg de lufenuron per via oral que es va determinar a partir de la informació aconseguida. No es va observar cap cas de mortalitat ni alteracions negatives en el comportament dels peixos. Aquest assaig va permetre aplicar amb majors garanties el tractament del lufenuron al sistema infestat.

Les dues primeres vegades que es va subministrar lufenuron al sistema mediterrani es va fer als pocs dies d'haver finalitzar el tractament de triclorfon. El tractament de lufenuron consistia en una sola dosi de 10mg/Kg de peix. Posteriorment es va repetir la mateixa pauta amb una periodicitat mensual al llarg de tot un any, tot i que els darrers mesos es va donar per prevenció ja que no es recol·lectaven larves en les mostres. En total van ser 12 tomes de lufenuron. Tal i com es pot veure a la (Fig.-20) es va aconseguir eradicar *G.maxillaris* del sistema infestat. A partir de la tercera toma es va observar una disminució en el nombre de larves que es recol·lectaven passant d'extraure entre dos i quatre mil individus a comptar per sota del miler. El fet de tractar al sistema amb triclorfon a l'hora que es feien les primeres tomes de lufenuron fa pensar que va ajudar a que l'efectivitat de l'actuació fos encara més bona. Les larves en les següents tomes van disminuir tant que només de manera puntual se'n



treien algunes poques desenes, fins que vam deixar de detectar-les. Actualment, i per evitar noves entrades en els aquaris d'exhibició, s'apliquen banys d'aigua dolça als peixos, substrats i invertebrats (tot aquells que ho toleren). A més a més durant la primavera i estiu, es realitza un tractament via oral de lufenuron com a preventiu en els peixos d'entrada de quarantena. El lufenuron ha passat actualment a formar part dels tractaments preventius del sistema mediterrani, que comporta una administració oral mitjançant l'alimentació dels peixos una vegada al juliol i un altra al setembre. Resulta important indicar que sempre que s'aplica el tractament de lufenuron en el sistema mediterrani, prèviament s'extreuen els crustacis dels aquaris d'exhibició i al cap d'una setmana es tornen a posar, evitant d'aquesta manera que puguin ingerir part del producte a través de la ingesta de restes de menjar que van a parar al fons del tanc. Conseqüentment, els estudis experimentals de toxicitat realitzats, la monitorització de la infestació i els assaigs d'aplicació pràctica han permès determinar un tractament efectiu per a l'eradicació de la infestació per *G.maxillaris*.

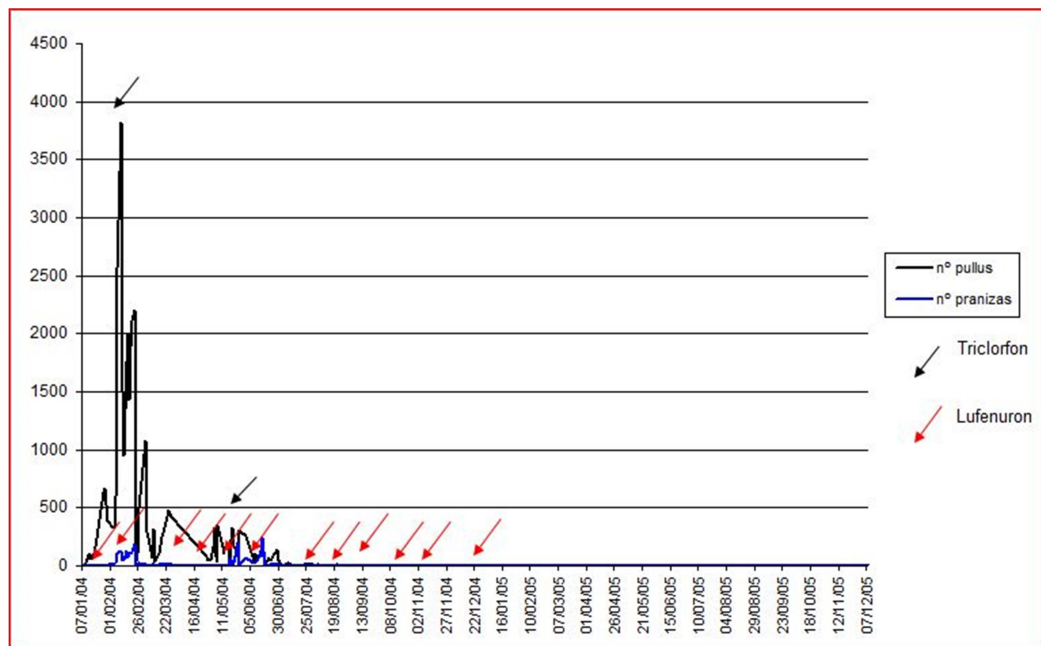


Fig.- 20. Enumeració de les larves de l'Oceanari, any 2004-2005.

## Conclusions

1. L'enumeració diària de la concentració de larves en el sistema infestat extretes mitjançant el filtrat d'aigua a través d'una xarxa de plàncton ha estat efectiu per a establir la dinàmica de la població de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) en el sistema i definir les mesures de control. Aquest procediment d'enumeració també va permetre conèixer quin era el grau de infestació al llarg de tots els anys fins a l'eradicació de l'agent causal
2. L'enumeració selectiva de larves zuphea i praniza de les diferents fases larvàries va permetre obtenir una informació sobre les característiques que presenta el cicle biològic de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) en les condicions del sistema. Aquesta informació va permetre establir el moment més idoni per a aplicar el tractament de triclorfon al sistema.
3. Els treballs mecànics realitzats en el tanc conjuntament amb l'aplicació del tractament amb triclorfon disminuïren el grau d'infestació però no aconseguiren l'eradicació del paràsit.
4. L'estudi de la cinètica del triclorfon en el sistema va permetre establir la dosi correcta del tractament així com el temps de degradació a diclorvos, i la posterior disminució de la seva concentració facilitada per l'oxidació amb tractament d'ozonització i per la renovació de l'aigua del sistema. La definició d'unes pautes i criteris de seguretat per a la salut del personal que habitualment realitzen tasques bussejant va estar una de les aplicacions més immediates d'aquest coneixement.
5. L'estudi del cicle biològic de *Gnathia maxillaris* (Montagu, 1804) ha permès complementar la informació bibliogràfica sobre

aquesta espècie i ha contribuït a entendre la dinàmica de la seva població en el sistema afectat.

6. El desenvolupament i la definició d'un sistema de manteniment i reproducció de les diferents fases de *G.maxillaris* al laboratori ha estat una eina determinant per a poder fer assaigs experimentals i avaluar l'eficiència de diferents productes terapèutics que no són d'ús habituals en aquariofília.
7. La descripció dels caràcters morfològics del mascle de *G.maxillaris* fent ús del microscopi electrònic de rastreig complementa la descripció realitzada per Monod a l'any 1926. Les observacions realitzades aporten nous coneixements i eines per a la identificació de possibles noves espècies dintre de la família Gnathiidae que s'aïllen en peixos salvatges.
8. Els assaigs de toxicitat realitzats in vivo en el laboratori pels productes antiparasitaris abamectina, cipermetrina, emamectina benzoat, lufenuron i triclorfon ha permès establir els valors LD50(96) per *Gnathia maxillaris*.
9. Els resultats obtinguts en els assaigs de toxicitat complementen la informació disponible per aquest compost antiparasitari, i han permès establir una dosi de 10 mg/Kg de periodicitat mensual per via oral a través de l'aliment dels peixos per a la prevenció, el control i l'eradicació de *Gnathia maxillaris*.

## 6. Resum



## 6. Resum

*Gnathia maxillaris* és un isòpode marí ectoparàsit hematòfag de peixos. Diferents brots d'infestacions han estat descrits en animals salvatges i més recentment en sistemes de producció de l'aqüicultura o en tancs d'exhibició d'aquaris. El control d'aquests brots o l'aplicació de mesures o programes d'eradicació resulten molt complexos degut a que el seu cicle biològic ha estat només parcialment descrit, no es disposa d'un coneixement detallat sobre l'ecologia de l'espècie i no existeix informació sòlida sobre tractaments terapèutics o preventius específics per aquesta parasitosi. En aquest treball es segueix el desenvolupament d'una infestació de *Gnathia maxillaris* en un aquari de gran volum. Per tal d'avaluar el grau d'infestació del sistema es va desenvolupar un mètode que permetés conèixer quina era la dinàmica de la població del paràsit i l'eficiència de les actuacions realitzades per controlar-lo la infestació en el sistema. Aquest mètode consistia en realitzar un mostreig freqüent en el tanc, no només a nivell quantitatiu sinó que es diferenciaven els individus segons el seu estadi larvari. En l'estudi també s'ha avaluat l'eficiència del tractament de la parasitosi amb triclorfon, al mateix temps es va estudiar la cinètica de degradació del triclorfon al llarg de la seva aplicació. Disposar d'exemplars de larves d'aquesta espècie ha permès desenvolupar un sistema pel manteniment dels diferents estadis del paràsit al laboratori. A més a més, aquest sistema de manteniment ha facilitat que es desenvolupés en condicions de laboratori el cicle biològic, i així permetre el seu estudi. S'ha complementat la descripció del cicle de vida de *G. maxillaris* fet per Mouchet (1928) i s'ha aportat informació per entendre les dinàmiques del paràsit en el tanc afectat. A l'hora s'ha realitzat una descripció del mascle amb l'ajut del microscopi electrònic que ha permès complementar la descripció de l'espècie realitzada per Monod (1926). El manteniment de larves al laboratori i la possibilitat de desenvolupar el cicle ens ha permès avaluar el grau d'eficiència de

productes quimioterapèutics alternatius que s'han aplicat a nivell d'aqüicultura per combatre *sea lice* en cultius de salmó (*Salmo salar*). L'objectiu pràctic d'aquest treball ha estat eradicar la *Gnathia maxillaris* del sistema mediterrani afectat de l'Aquàrium i ha permès que cada un dels estudis realitzats han ajudat a adquirir nous coneixements sobre *G.maxillaris* i sobre com controlar una infestació en aquaris de gran volum i de gran complexitat en la gestió de les aigües i les poblacions d'animals.

#### Abstract

*Gnathiamaxillaris* is a haematophagous isopoda ectoparasite that feed on the blood and tissue fluids of marine fish. Several outbreaks of infestations have been described in wild animals and more recently aquaculture production systems or in tanks of aquaria. The control of these outbreaks or measures for eradication are very complex due to its biological cycle has been only partially described, to a limited knowledge about the ecology of this species and to the lack of solid information on specific preventive or therapeutic treatment. This study monitored the development of an infestation *Gnathia maxillaris* in a large volume aquarium. In order to assess the degree of infestation, a method for monitoring the development of the outbreaks was defined. It allowed to know the population dynamics of the parasite and to assess the efficiency of the applied actions to control the infestation in the system. The monitoring was based on practical daily sampling of the affected tank to quantify the number of larvi and to determine the proportions of the parasite at the different larval stages of its life cycle.. Additionally, it was evaluated the efficiency of the trichlorfon as treatment to control this type of crustacean infestation. The kinetics of decay of this compound after application in the water tank were also determined.. The availability of larvi from the affected tank allowed to define a methodology for maintenance *in vivo* at the laboratory and facilitate to follow the life cycle.The obtained observations are

complementary new contributions to the first description of the life cycle by Mouchet (1928). Moreover, it provided practical and useful information to understand the dynamics of *G.maxillaris* in the infested tank. The scanning electronic microscopy studies of males obtained in this outbreak aided to supplement the morphological and biometric description of this species made by Monod (1926). The maintenance of larvi in the laboratory and the possibility of developing its life cycle at the laboratory *in vivo* allowed assessing the efficiency of some potential chemotherapeutic compounds that have been already applied in aquaculture against sea lice in cultured salmon (*Salmo salar*). The practical application of the results of this study was to eradicate *G.maxillaris* from the infested Mediterranean aquaria. Every performed study contribute with new knowledge on *G.maxillaris* biology and ecology, and provided practical information to control and eradicate this parasite from a large volume and complex biological system in terms of diversity and concentration of aquatic organism.





## **7. Bibliografia**



## 7. Bibliografia

Alas, A.; Oktener, A.; Yilmaz, M., (2009): *Gnathia sp* (Gnathiidae) infestations on marine fish species from Turkey. Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi 15: 201-204.

Anonymous, (1998): Standard methods for examination of water and wastewater. American Works Association and water Environment Federation, Washington.

Bakir et al., (2014): the Marine arthropodes of Turkey. Turk. J. Zool. 18: doi:10.390/zoo-1405-48.

Barthel, D.; Brant, A., (1995): *Caecognathia robusta* (GO Sars, 1879) (Crustacea, Isopoda) in *Geodia mesotriaena* (Hentschel, 1929) (*Demospongiae, Choristidae*) at 75 degrees N off NE Greenland. Sarsia 80: 223-228.

Bate, C.S.; Westwood, A., (1868) *A History of the British Sessile-eyed crustacea*. Vol.II. London: John van Voort, Paternoster Row.

Bedini, R. et al., (2010): Spatial and Temporal variability of Crustacea assemblages of *Posidonia oceanica* meadows of Northern Tuscany. Biol. Mar. Medit. 17(1): 286-287.

Bibiloni, M.A., (1981): Estudio faunístico del Litoral de Blanes: V Sistemática de Moluscos y Artrópodos (Crustáceos y Picnogónidos). Misc. Zool. 7: 43-52. Barcelona.

Blaser, J; Bouvier, J; Fink, M.; Michener, J.G.; Nanchen, S., (2013): Treatment of fish with lufenuro. WO/2013/167640A1. Novartis.

Brecken-Folse, J.A.; Mayer, F.L.; Pedigo, L. E.; Marking, L.L.; Folse, K.A.B., (1994): Acute toxicity of 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, terbufos and trichlorfon to grass shrimp (*Palaemonetes spp.*) and sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) as affected by salinity and temperature. Environ. Toxicol. Chem. 13, 67-77.

Castelló, J. ; Carballo, J.L., (2001): Isopoda fauna, excluding Epicaridea, from the Strait of Gibraltar and nearby areas (Southern Iberian Peninsula) Sci. MA, 65(3): 221-241.

Castelló,J.; Jaunoy,J (2007): Catálogo de las especies de isópodos (crustacea:Isopoda) de los archipiélagos macaronésicos. Bol. Inst. Esp. Oceanogr.23 (1-4):. 21-31.

Chambers, S.D.; Sikkel, P.C., (2002): Diel emergence patterns of ecologically important, fish-parasitic, gnathiid isopod larvae on Caribbean coral reefs. Carib. J. Sci. 38: 37-43.

Chong, T.; Hatai,K.; Ransangan, J., (2015): Life cycle of *Caecognathia coralliophila* (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae) in hatchery reared tiger grouper (*Epinephelus fuscogutattus*). Bull.Eur. Fish Pathol., 35(5): 177.

Chong,T.; Ota,Y; Hatai, K; Ransangan, J., 2015: Redescription of *Caecognathia coralliophila* (Monod , 1926) (Crustacea,Isopoda, Gnathiidae), collected from a fish hatchery in Sabah, Borneo Island, Malasia. Biological Society of Washington, 128 (1): 51-62.

Coetzee, M.L., (2006): *The Taxonomy and Phylogeny of three ganthiid Isopod Species parasiting elasmobranchs from the Great Barrier Reef, Australia.* Dissertation, Magister Scientiae in Zoology in the Faculty of Science at the University of Johannesburg.

Cohen, B.F.; Poore, G.C., (1994): Phylogeny and biogeography of the Gnathiidae (Crustacea: Isopoda) with descriptions of new genera and species, most from south-eastern Australia. *Memoirs of Museum Victoria*, 54: 271-397.

Cordillot, F., (1979) : Anatomia de *Gnathia maxillaris*. Diplomarbeit in Zoologie, Institut für Zoologie der Universität Basel, 91pp.

Cote, I.M. ; Molloy, P.P., (2003) : Temporal variation in cleanerfishes and client behavior : does it reflect ectoparasite availability ? *Ethology* 109 : 487-499.

Davies, A.J. ; Smit, N.J., (2001) : The life cycle of *Haemogregarina bigemina* (Adeleina : Haemogregarina) in South African hosts. *Folia Parasitol.* 48 : 169-177.

Davies, A.J. ; Smit,N.J. ; Hayes, P.M. ; Seddon, A.M. ; Wertheim,D., (2004) : *Haemogregarina bigemina* (Protozoa :Apicomplexa :Adeleorina)- Past, present and future. *Folia Parasitolol.* 51, 99-108.

Davies, A.J., (1981) : A scanning electron-microscope study of the praniza larva of *Gnathia maxillaris* Montagu (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae), with special reference to the mouthparts. *J. Nat. Hist.* 15 : 545-554.

Davies, A.J., (1982) : Further studies on *Haemogregarina bigemina* Laveran and Mesnil, the marine fish *Blennius pholis* L., and the isopod *Gnathia maxillaris* Montagu. *J. Protozool.* 29: 576-583.

Davies, A.J., (1995) : The biology of fish haemogregarines. *Adv. Parasitol.* 36, 117-203.

Davies, A.J., (2000) : The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptils. *Adv. Parasitol.* 45: 1-107.

Drian, E.M. ; Rodger, H.D., (1990) : An occurrence of *Gnathia* sp., ectoparasitic isopods, on caged Atlantic Salmon. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 10 : 141-142.

Edwasds, M.M., (1834) : Histoire naturelle des Crustacés,comprendant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux. Paris. Librairie encyclopédique de Roret.

Farquharson, CA.; Smit, N.J. ; Sillel, P.C., (2012): *Gnathia marleyi* sp. nov. (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae) from the Eastern Caribbean. *Zootaxa*, 3381, 47-61.

Farquharson, CH., (2001): *Biodiversity of the fish parasite Gnathiid Isopods from Coral Reef*. Dissertation, Magister Scientiae in Zoology in the Faculty of Science at the University of Johannesburg.

Farquharson, CH.; Smit, N.J.; Davies, A.J., (2012): *Gnathia masca*, sp nov. (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae) from Lizard Island, Great Barrier reef, Australia. *Zootaxa*, 3233, 22-36.

Ferreira, M.L.; Smit, N.J.; Davies, A.J., (2010): *Gnathia grutterae* sp (Crustacea, Isopoda: Gnathiidae) parasiting representatives of the Balistidae, Labridae and tetraodontidae from Lizard Island, Great Barrier Reef, Australia. *Zootaxa*, 2718, 39-50.

Forget, J.; Pavillon, J.F.; Menasria, M.R.; Bocquene, G., (1998): Mortality and LC<sub>50</sub> values for several stages of the marine cocppod *Trigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 239-244.

Genc, E. ; Oral, M. ; Erol, C., (2001) : The evaluation of gnathiid (Crustacea : Isopod : Gnathiidae) parasitism in goldbloctch grouper (*Epinephelus costae* Steinddachner, 1878) in the north-eastern Mediterranean Sea using the self-organizing map (SOM). *Parasitol. Res.* 108 : 1417-1424.

Genc, E., (2007) : Infestation status of gnathiid isopod juvenils parasitinc on Dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) from the northeast Mediterranean Sea. *Parasitol. Res.* 101 : 761-766.

Giannetto, S.; Marino, F.; Paradiso, M. L.; Macri, D.; Bottari, T.; De Vico, G., (2003): Lightt and scanning electron microscopy observations on *Gnathia vorax* (Isopoda: Gnathiidae) larvae. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 35(2): 161-5.

Golovan, O.A., (2006): *Gnathia gurjanovae* sp. n., A new species of Gnathiids (Isopoda: Gnathiidae) from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian of Marine Biology*, 32, 28-36.

Grutter , A.S., (2002) : Cleaning symbioses from the parasites perspective. *Parasitology* 124, S65-S81.

Grutter, A.J.; Hendrikz, J., (1999): Diurnal variation in the abundance of juvenile parasitic gnathiid isopods on coral reef fish: implications for parasite-cleaner fish interactions. *Coral reefs* 18: 187-191.

Grutter, A.J.; Lester, R.J.G.; Greenwood, J., (2000): Emergence rates from the benthos of the parasitic juveniles of gnathiid isopods. *Mar. Ecol. Prog. Series* 207:123-127.

Grutter, A.S, (2003) : Feeding ecology of the fish ectoparasite *Gnathia* sp. (Crustacea :Isopoda) from the Great Barrier Reef, and its implications for fish cleaning behaviour. *Mar. Ecol. Prog. Series* 259 : 295-302.

Grutter, A.S., (1999): Infestation ecology of the fish ectoparasite Gnathiid isopod juveniles parasitic on the coral-reef fish *Hemigymmus melapterus* (Labridae). *Mar. Biol.* 135: 545-552.

Grutter, A.S.; Morgan, J.A.T.; Adlard R.D., (2000): Characterising parasitic gnathiid isopod species and matching life stages with ribosomal DNA ITS2 sequences. *Marine Biology*, 136, 201-205.

Guiry, M.D.; Guiry, G.M. (2011) : Species ie version 1. 0 World-wide electronic publication National University of Ireland, Galway (version of 15 March 2010).

Hadfield, K.A. ; Smit, N.J. ; Avenant-Oldewage, A., (2008) : *Gnathia pilosus* sp. nov. (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae) from the East Coast of South Africa. *Zootaxa* 23-41.

Hadfield, K.A. ; Smit, N.J. ; Avenant-Oldewage, A., (2009) : Life cycle of the temporary fish parasite, *Gnathia pilosus* (Crustacea :Isopoda : Gnathiidae) from the east coast of South Africa. *J.Mar. Biol. Assoc. UK* 89 : 1331-1339.

Hadfield, K.A. ; Smit, N.J., (2008) : Description of a new gnathiid, *Afrignathia multicavea* gen. et sp. n. (Crustacea : Isopoda : Gnathiidae), from South Africa. *Afr. Zool.* 43 : 81-89.

Hesse, E. (1864) : Mémoire sur les pranizes et les ancées. *Mémoire savant étrangers Academie des Sciences*, 18, 231-302.

Heupel, M.R. ; Bennet, M. B., (1999) : The occurrence, distribution and pathology associated with gnathiid isopod larvae enfecting the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. *Int. J. Parasitol.* 29 : 321-330.



Hispano, C.; Bultó, P.; Blanch, A.R (2014): Life cycle of the fish parasite *Gnathia maxillaris* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). *Folia Parasitologica*, 61, 277-284.

Hispano, C.; Bultó, P.; Blanch, A.R., (2013): *Gnathia maxillaris* infestation in exhibition aquaria: control and treatment strategies. *Journal of Applied Ichthyology*, 29, 1139-1144.

Holthuis, L.B., (1950): Isopodes et Tanaidaces marins de la Belgique ; remarques sur quelques espèces de la zone meridionale de la Mer du Nord . *Med.K.Belg. Inst. Nat. Wet.* 26(53) :1-19.

Honma, Y. ; Chiba, A., (1991) : Pathological-changes in the branchial chamber wall of stingrays, *Dasyatis spp.*, associated with the presence of juvenile gnathiids (Isopoda, Crustacea). *Fish Pathol.* 26, 9-16.

Johnson, S.C.; Kent, M.L.; Whitaker, D.T.; Margolis, L., (1993): Toxicity and pathological effects of orally administered ivermectin in Atlantic, chinook, and coho salmonid and steelhead trout. *Dis. Aquat. Org.*, Vol 17: 107-112.

Jones, C. M. ; Grutter, A.S., (2005) : Parasitic isopods (*Gnathia sp.*) reduce haematocrit in captive blackeye thicklip (Labridae) on the Great Barrier Reef. *J. Fish. Biol.* 66, 860-864.

Kabata, Z., (1970) : Diseases of Fishes, Book 1. Crustacean as Enemies of Fishes.

Klitgaard, A.B., (1991) : *Gnathia abyssorum* (GO Sars, 1872) (Crustacea, Isopoda) associated with sponges. *Sarsia* 76 : 33-39.

Koukoras, A., (2010) : Check-list of marine species from Greece. Aristotle University of Thessaloniki. Assembled in the framework of the EU FP7 PESI project.

Lucas, H., (1849) : Histoire Naturelle de animaux articulés. Primere part: Crustacés, Arachnides, Myriapodes et hexapodes. Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840 , 1841 , 1842. Sciences Physiques Zoologie I. Paris, Imprimerie Nationale.

Ludwig, G.M., (1993) : Effects of Trichorfon, Fenthion, and Diflubenzuron on the zooplankton community and on production of reciprocal-cross hybrid striped bass fry in culture ponds. *Aquaculture* 110, 301-319.

Marino, F.; Giannetto, S.;Paradiso, M.L.; Bottari, T.; De Vico, G.; Macri, B., (2004): Tissue damage and haematophagia due to praniza larvae (Isopoda: gnathiidae) in some aquarium seawater teleost. *Dis. Aquat. Org.* 59, 43-47.

Mayer, J. ; Hensel, P. ; Mejia-Fava, J. ;Brandão, J.; Divers, S., 2013 : The use of lufenuron to treat fish lice (*Argulus sp*) in Koi (*Cyprinus carpio*). *Journal of Exotic pet Medicine* 22 : 65-69.

Monod, Th., (1926): A monograph of the Gnathiidae, including the morphology, biology and systematics of the group. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles du Maroc*, 13, 1-668.

Mouchet, S., (1928) : Note sur le cycle évolutif des Gnathiidae. *Bulletin de la Société Zoologique de France*,53, 392–400.

Mugridge, R.E.R. ; Stallybrass, H.G., (1983) : A mortality of eels, *Anguilla anguilla* L. attribute to *Gnathiidae*. *J. Fish Dis.* 6, 81-82.

Nagel, L. ; Montgomerie, R. ; Loughheed, S.C., (2008) : Evolutionary divergence in common marine ectoparasites *Gnathia spp.* (Isopoda: Gnathiidae) on the Great Barrier Reef: phylogeography, morphology, and behaviour. *Biological Journal of the Linnean Society*, 94, 569–587.

Naylor, E., (1972): British Marine Isopods. Synopsess of the british Fauna (New series) N°3. The Linnean Society of London.Academy Press London and new York.

O'Halloran, J.; Hogans, W.E., (1996): First use in North America of azamethiphos to treat Atlantic salmon for sea lice infestation: procedures and efficacy. *Can. Vet. J.* 37, 610-611.

Ota Y., (2012): Gnathiidae from Kumejima Island in the Ryunkyu Archipelago, southwern Japan, with description of the three new Species (Crustacea: Isopoda). *Zootaxa* 3367:79-94.

Ota, Y., (2011): A new species of the gnathiid isopod, *Gnathia teruyukiae* (Crustacea: Malacostraca), from Japan, parasitizing elasmobranch fish. *Bull. Nat. Sci. Series A, Zool., Suppl.* 5: 41-51.

Ota, Y.; Hoshino, O.; Hirose, M.; Tanaka, K.; Hirose, E., (2012): Third-stage larva shifts host fish from teleost to elasmobranch in the temporary parasitic isopod, *Gnathia trimaculata* (Crustacea; Gnathiidae). *Marine Biology*, 159, 2333-2347.

Ota, Y.; Tanaka, K.; Hirose, E., (2007): A new Species of *Gnathia* (Isopoda: Cymothoida: Gnathiidae) from Okinawajima Island, Ryukyu archipelago, Southwestern Japan. *Zoological Science*, 24, 1266-1277.

Palmer, R.; Rodger, H.; Drinan, E.; Dwer, C.; Smith, P.R., (1987): Preliminary trials on the efficacy of ivermectin against parasitic copepods of atlantic salmon. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 7(2), 47.

Paperna, I; Overstreet,R.M., (1981): Parasites and diseases of mullets Mugilidae. In: International biological programme, Vol. 26. Aquaculture of grey mullets. Xxi+507p. O.H. Oren (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp. 411-494.

Paperna, I; Por, M.F., (1977): Preliminary data on the Gnathiidae isopoda of the Northern Red Sea the Bitter Lakes Suez Canal Egypt and the Eastern Mediterranean and the biology of *Gnathia-Piscivora* New-species. *Rapp. Proces-Vebaux des Réunions Comm. Internat. L'Exploration Sci. Mer Méditerranée Monaco* 24, 195-198.

Partanello, S.P.; Fioravanti, M.L.; Caggiano, M.; Restani, R., (1995): Infestazione da Gnathiidae (Crustacea, Isopoda) in *Pagrus major*. *Boll. Soc. Ital. patol. Aittic.* 17: 32-36.

Podsiadlowski, L.; Bartolomaeus, T., (2005): Organization of the mitochondrial genome of mantis shrimp *Pseudosquilla ciliata* (Crustacea: Stomatopoda). *Marine Biotechnology*, 7, 618–24.

Pretti, C.; Soldani, G.; Cognetti-Varriale, A. M.; Monni, G.; Meucci, V.; Intorre, L., (2002): Efficacy and safety of azamethiphos for the treatment of pseudodactylogyrosis in the European eel. *J. Vet. Pharmacol. and Therap.* 25, 155-157

Qin, J.G.; Dong, P., (2004): Acute toxicity of trichlorfon to juvenil yabby *Cheak destructor* (Clark) and selected zooplankton species. *Aquaculture research*, 35: 1104-1107.

Ritz, C.; Streibig, J.C., (2005): Bioassay Analysis using R. *J. Statist. Software*, Vol 12, Issue 5.

Roth, M.; Richards, R.H.; Sommerville, (1993): Current practices in the chemotherapeutic control of the sea lice infestation in aquaculture: a review. *J. Fish Diseases*, 16:1-26.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T., (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sars, G.O., (1895): *An account of the Crustacean of Norway, with a short descriptions and figures of all species*. Vol.I Christiania and Copenhagen Alb. Cammemeyers forlag (Lars Awanstrom).

Schmahl, G.; Mehlhorn, H., (1985): Treatment of fish parasites. 1. Praziquantel effective against Monogenea (*Dactylogyrus vastator*, *Dactylogyrus extensus*, *Diplozoon paradoxum*). *Z. Parasitenkd.* 71: 727-37.

Schotte, M., (1995) *Gnathia arabica*, n. s. first record of a gnathiid from the Arabian Sea, and new records of isopods (Crustacea: Isopoda) from Pakistan in collections of the Smithsonian Institution. 111–118. in Thompson, M-F. and N. S. Tirmizi. *The Arabian Sea. Living resources and the environment* Vanguard Press. Lahore.

Sievers, G.; Palacios, P.; Inostroza, R.; Dolz, H., (1995): Evaluation of the toxicity of 8 insecticides in *Salmo salar* and the in vitro effects against the isopode parasite, *Ceratothoa gaudichaudii*. *Aquaculture* 134, 9-16.

Smit, N.,J.; Van As, J.G.; Basson, L., (1999): A redescription of the adult male and praniza of *Gnathia africana* Barnard, 1914 (Crustacea, Isopoda, Gnathiidae) from southern Africa. *Folia Parasitologica*, 46, (3), 229-240.

Smit, N.J.; Basson, L., (2002): *Gnathia pantherina* sp n. (Crustacea : Isopoda : Gnathiidae), a temporary ectoparasite of some elasmobranch species from southern Africa. *Folia Parasitologica*, 49, 137-151.

Smit, N.J.; Basson, L.; Van As, J.G., (2003): Life cycle of the temporary fish parasite, *Gnathia africana* (Crustacea : Isopoda : Gnathiidae). *Folia Parasitologica*, 50, 135-142.

Smit, N.J.; Davies, A.J., (1999): New host records for *Haemogregarina bigemina* from the coast of southern Africa. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 79: 933-935.

Smit, N.J.; Davies, A.J., (2004): The curious life-style of the parasitic stages of gnathiid isopods. *Advances in Parasitology*, 58, 289-391.

Smit, N.J.; Van As, J.G., (2000): A new species, *Gnathia nkulu* sp n. (Crustacea : Isopoda : Gnathiidae) from southern Africa. *Folia Parasitologica*, 47, 235-240.

Smit, N.J.; VanAs, J.G.; Basson, L., (2002): Redescription of the female of *Gnathia africana* (Crustacea : Isopoda : Gnathiidae) from southern Africa. *Folia Parasitologica*, 49, 67-72.

Smith, G., (1904): Metamorphosis and Life-History of *Gnathia maxillaris* (Isopoda). *Mt. Stat. Neapol.* 16: 469-479.

Stoskopf, M.K., (1993): Shark pharmacology and toxicology. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., Philadelphia, London.

Stoskopf, M.K.. (1993): Fish medicine. W.B. Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc., Philadelphia, London.

Svavarsson, J., (2006): New species of Gnathiidae (Crustacea, Isopoda, Cymothoidea) from seamounts off northern New Zealand. *Zootaxa*, 1173, 39-56.

Svavarsson, J.; Bruce N.L., (2012): New and little-known gnathiid isopod crustacean (Cymothoidea) from the northern Great Barrier Reef and the Coral Sea. *Zootaxa*, 3380, 1-33.

Svavarsson, J.; Bruce, N.L., (2012): New and little-known gnathiid isopod crustaceans (Cymothoidea) from the northern Great Barrier Reef and the Coral Sea. *Zootaxa*, 3380:1-33.

Tanaka, K. (2007): Life history of gnathiid isopods-current knowledge and future directions. *Plankton Benthos Research*, 2, (1), 1-11.

Tanaka, K., (2003): Population dynamics of the sponge-dwelling gnathiids isopod *Elaphognathia cornigera*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 83: 95-102.

Tanaka, K.; Aoki, M., (2000): Seasonal traits of reproduction in a gnathiids isopod *Elaphognathia cornigera* (Nunomura, 1992). *Zool. Sci.* 17: 467-475.

Toksen, E.; Degirmenci, U.; Cankurt, M., (2010): The effect of Trichlorfon on the control of *Lernanthropus kroyeri* (van Beneden, 1851) (Lernanthropidae) infestations in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 30. 205-210.

Toksen, E.; Nemli, E.; Koyuncu, E.; Cankurt, M., (2012): Effect of trichlorfon on *Diplectanum aequans* (Monogenea: Diplectanidae) infestations in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Patol.* 32, 103-108.

Treves-Brown, K.M., (1999): Availability of medicines for fish. *Fish Vet J* 4: 40-55.

Upton, N.P. D., (1987): Asynchronous male and female life-cycles in the sexually dimorphic, harem-forming isopod *Paragnathia formica* (Crustacea, Isopoda). *J. Zool.* 212: 677-690.

Venables, W.N.; Ripley, B.D., (2002): *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.

Wägele, J.W., (1987): Description of the postembryonal stages of the Antarctic fish parasite *Gnathia calva* Vanhoffen (Crustacea: Isopoda) and synonymy with heterognathia Amar and Roman. Polar Biol. 7: 77-92.

Wägele, J.W., (1988): Aspects of the life-cycle of the Antarctic fish parasite *Gnathia calva* Vaanhoffen (Crustacea, Isopoda). Polar Biol. 8: 287-291.

Wägele, J.W., (1992): Antarctic Isopoda (Crustacea: Pecarida): stress in a polar environment? Bielefel. Ökol. Beitr. 6: 93-101.

WangG-X.; Jian, D-X.; Li, J.; Han, J., (2010): Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitology Research 107: 1365-1371.

Wetzer, R.; Brusca, R.C.; Wilson, G.D.F., (2000): The Order Isopoda. Introduction to the Marine Isopoda. Key to the California species of *Gnathia* (adult males).