

## Principali patologie di origine batterica osservate in killi allevati in acquario: nota preliminare

### *Main bacterial pathologies in aquarium killifishes: preliminary note*

**Marino Prearo<sup>1\*</sup>, Giuseppe Amato<sup>2</sup>, Loredana Locatelli<sup>1</sup>,  
Paola Arsieni<sup>1</sup>, Alberto Solenne<sup>2</sup>, Donatella Prearo<sup>1</sup>,  
Maria Cesarina Abete<sup>1</sup>, Elena Pavoletti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino

<sup>2</sup> A.I.K. – Associazione Italiana Killifish; 10100 Torino

**RIASSUNTO** – Con il termine killi vengono comprese una serie di famiglie di pesci ornamentali, in parte molto diverse tra loro, con soggetti di piccola taglia ed ovipari. Si conoscono oltre 740 specie inserite in tale categoria. Nel periodo compreso tra settembre 2001 e dicembre 2004 sono stati analizzati 171 killi appartenenti ai generi *Aphyosemion*, *Aplocheilichthys*, *Austrolebias*, *Epiplatys*, *Fundulopanchax*, *Fundulosoma*, *Nothobranchius*, *Pituna*, *Pronothobranchius*, *Rivulus* e *Symptsonichthys* provenienti da acquari domestici e da piccoli allevamenti amatoriali. Su ogni esemplare giunto in laboratorio, è stato eseguito un esame anatomopatologico e un esame culturale, tramite semina su terreni di primo isolamento. Dopo un periodo d'incubazione di 24-48 ore a 22° C, le colonie batteriche eventualmente sviluppatasi, sono state sottoposte ad identificazione mediante prove fenotipiche e biochimiche. All'esame anatomopatologico non sono stati rilevati quadri particolari, ad eccezione di una diffusa presenza di Malattia Branchiale; l'esame culturale ha invece messo in evidenza germi Gram negativi appartenenti, in ordine di frequenza, ai generi *Aeromonas*, *Vibrio*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* e *Plesiomonas*. Circa il 15% dei soggetti esaminati (26 killi su 171) non ha presentato quadri ed isolamenti riferibili a malattie di origine batterica; la loro morte è quindi da ricondursi a cause di origine ambientale. Tale indagine, nonostante il numero ridotto di esemplari esaminati, in parte dovuto alla difficoltà di reperire i killi in commercio, vuole essere un primo contributo allo studio delle patologie batteriche in questo gruppo particolare di pesci ornamentali.

**SUMMARY** – With the term “killi” are normally meant a series of ornamental fish families, in some cases also very different one from the other, all characterised by small size and oviparous type of reproduction. Over 740 species are known to be included in this group. During the period September 2001-December 2004 a number of 171 killi belonging to genus *Aphyosemion*, *Aplocheilichthys*, *Austrolebias*, *Epiplatys*, *Fundulopanchax*, *Fundulosoma*, *Nothobranchius*, *Pituna*, *Pronothobranchius*, *Rivulus* and *Symptsonichthys*, coming from private aquaria and family-run businesses, have been controlled. Every animal underwent a necroscopic examination and a bacterial analysis, by using first isolation growing media. After an incubation period of 24-48 hours at 22° C, bacterial colonies eventually growing have been identified thanks to biochemical and phenotypical examination. No particular signs were registered at the necroscopy, exception made for a widespread gill damage. Bacterial analysis identified Gram negative bacteria belonging, in order, to genus *Aeromonas*, *Vibrio*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* and *Plesiomonas*. About 15% of fish examined (26 killies over 171) did not show any clinical sign and isolations connected to bacterial diseases, being their death probably due to environmental problems. This work, though the minimum number of animals examined, also bound to rare presence of this fish on the market, wants to be a first contribution to the study of bacterial diseases in this very peculiar group of ornamental fish.

**Key words:** Killi, Killifishes, Cyprinodontiformes, Aquarium fish, Bacterial pathologies.

\* Corresponding Author: c/o Area Territoriale Piemonte, Sezione di Torino, Ittiopatologia e Acquacoltura; Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino. Tel. 011-2686251; Fax 011-2448758; E-mail marino.prearo@izsto.it

## INTRODUZIONE

I pesci appartenenti al grande gruppo dei killi sono molto apprezzati come pesci ornamentali, anche se risultano essere poco conosciuti alla maggioranza degli acquariofili. Molte specie risultano particolarmente colorate, ma esistono soggetti con colorazioni molto più semplici. Sia per le loro caratteristiche livree, sia per il loro peculiare comportamento riproduttivo, sono pesci che riscontrano un notevole successo, tanto da dar vita a vere e proprie associazioni specifiche nei vari paesi a maggiore vocazione acquariofila.

Sotto il nome di killifish o più semplicemente killi, vengono raggruppati pesci appartenenti ai Cyprinodontiformes ovipari (Seegers, 1997a; Eschmeyer, 1998). Questo tipo di denominazione è comunemente utilizzata in tutto il mondo, sia dagli appassionati sia dai professionisti. L'origine del termine killifish risale all'inizio del 1600, ai primordi della colonizzazione del Nord America, quando gli olandesi si insediarono in alcuni siti nella parte nord-orientale degli Stati Uniti. Gli emigranti europei trovarono nei fossati di quella terra dei piccoli pesci sconosciuti, che denominarono "kilvis" o "pesci dei fossi"; il termine Kilvis o Killifish è rimasto per definire tali pesci (Seegers, 1997a; 1999).

Il primo killi descritto ad opera di Linnaeus nel 1766 fu il *Cobitis heteroclitus*, che nel 1803 Lacépède rinominò *Fundulus heteroclitus* (Seegers, 1999). Intorno alla fine del XIX secolo furono importati in Europa i primi killi tropicali vivi provenienti dall'Africa, ottenendo subito un discreto successo per la loro livrea; presto però furono soppiantati da altre specie di pesci ornamentali più diffusi e più facilmente reperibili sul mercato. Il ritorno dell'interesse nei confronti dei killi quali specie ornamentali è avvenuto negli anni settanta; già nei primi anni di questo decennio in alcune parti del mondo un certo numero di acquariofili amatoriali si occupò intensamente dei killi, con ripetuti scambi di notizie e di esemplari. Nel 1961 nacque la prima associazione di appassionati di killi, l'American Killifish Association (A.K.A.) (Seegers, 1999).

Pesci appartenenti al gruppo dei killi sono stati descritti in tutti i continenti ad eccezione dell'Oceania. La maggior concentrazione di pesci appartenenti a questo gruppo si trova in Africa centrale e meridionale. Sono stati descritti più di 80 generi ed oltre 740 specie compresi nel grande gruppo dei killifishes.

In Europa sono presenti solamente due generi, *Aphanius* (presente in tutto il bacino del Mediterraneo, penisola Arabica, Africa centro-orientale e coste occidentali dell'Oceano Indiano) e *Valencia* (Seegers, 2000).

I killifishes sono un gruppo molto eterogeneo, che presentano caratteristiche morfologiche simili ad altri gruppi di pesci: per tale motivo risulta essere abbastanza difficoltoso poter tracciare una descrizione tipo del killi. Tra le caratteristiche che accomunano tutte le specie appartenenti al gruppo dei killifishes, va menzionata la taglia che risulta essere relativamente limitata; poche specie superano i 10 centimetri di lunghezza totale e mai nessuna specie supera i 25 centimetri. Inoltre, tali pesci colonizzano habitat assai differenti. Per quanto riguarda la riproduzione, tutti i killi sono ovipari. Nella maggior parte dei casi le uova vengono fecondate all'atto della deposizione, ma si conoscono anche specie in cui si ha una fecondazione interna (come nel caso di *Campellolebias*). Un folto numero di specie appartenenti a questo gruppo depongono uova adesive su piante, radici o tra le pietre; nei loro biotopi d'origine, l'acqua scorre tutto l'anno e solo raramente l'ambiente si prosciuga; le uova sono quindi relativamente robuste e la loro schiusa avviene nel giro di 1-2 settimane dalla deposizione. I killi invece che depongono le uova sul fondo, sono specie che generalmente provengono dal continente africano e dal Sud America: sono considerati dei veri e propri pesci stagionali, in quanto si sono adattati all'habitat in cui vivono, caratterizzato dall'alternanza di stagioni umide e secche, con una loro fenologia relativamente breve. Queste specie depongono le uova durante la stagione delle piogge, le

quali presentano uno sviluppo embrionale relativamente lento durante la successiva stagione secca al fondo delle pozze che, nel frattempo si sono prosciugate. All'inizio della seguente stagione delle piogge, le uova si schiuderanno per dar vita ad una nuova generazione. Gli adulti, in questo caso, hanno una vita relativamente breve, che dura l'arco di una stagione umida (Seegers, 1997b; 1999).

Il commercio e la diffusione di questi pesci, molto spesso non avviene con i soliti canali commerciali utilizzati per le altre specie ittiche ornamentali; infatti, molte specie non sono disponibili sul mercato internazionale e vengono allevate solamente da amatori che provvedono alla loro distribuzione mediante canali non convenzionali, come scambi tra allevatori o direttamente alle mostre. Inoltre, alcune specie vengono direttamente prelevate dai loro biotopi naturali ed allevate in acquario.

Quindi, le problematiche che generalmente si vengono a riscontrare nella maggioranza dei casi delle specie importate da paesi con uno stato sanitario poco conosciuto e controllato (Noga, 1996; Manfrin *et al.*, 2002; Locatelli *et al.*, 2003), non sono contemplabili in questo caso; d'altro canto è da ricordare come si possa importare facilmente dai luoghi d'origine, patologie che possono, in condizioni limitative come quelle dell'acquario, causare gravi perdite e diffondersi facilmente.

Proprio per le caratteristiche particolari della commercializzazione di questi pesci, per la loro relativamente scarsa diffusione negli acquari e quindi per la esiguità dei dati in nostro possesso ed infine per la possibilità di introdurre specie batteriche dai luoghi d'origine, si è pensato di effettuare tale ricerca per poter evidenziare l'eventuale pressione batterica che si attua in acquario in specie di pesci così particolari.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra settembre 2001 e dicembre 2004, sono stati esaminati 171 killi provenienti da acquari domestici e piccoli allevamenti amatoriali, per lo più situati in Italia settentrionale.

I soggetti sono giunti al laboratorio di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino in parte congelati ed in parte ancora vivi. Sono giunti al laboratorio soggetti che presentavano una sintomatologia riconducibile a malattie di natura infettiva o che erano deceduti in vasca.

I soggetti morti e giunti congelati in laboratorio sono stati esaminati, previo scongelamento in frigorifero, mentre i pesci giunti vivi sono stati soppressi mediante anestesia profonda con MS-222, loro spinalizzazione e subito esaminati.

Ogni gruppo di killi appartenenti alla stessa specie e stabulati nella stessa vasca, sono stati considerati come un'unica unità campionaria, onde evitare risultati poco attendibili. Di ogni unità campionaria è stata redatta una scheda anamnestica che indicava le modalità di alimentazione e di stabulazione, l'eventuale sintomatologia e la provenienza dei pesci, al fine di poter stabilire delle eventuali correlazioni epidemiologiche.

I soggetti giunti in laboratorio nel periodo considerato, appartengono alle specie *Aphyosemion*, *Aplocheilichthys*, *Austrolebias*, *Epiplatys*, *Fundulopanchax*, *Fundulosoma*, *Nothobranchius*, *Pituna*, *Pronothobranchius*, *Rivulus* e *Symptsonichthys*.

La frequenza numerica degli esemplari esaminati è riportata nella tabella 1.

Genere	Specie	Esemplari esaminati	%	% genere
<i>Aphyosemion</i>	<i>australe</i>	22	12,88%	31,58%
	<i>bitaeniatum</i>	1	0,58%	
	<i>bivittatum</i>	2	1,17%	
	<i>elberti</i>	3	1,75%	
	<i>elegans</i>	3	1,75%	
	<i>filamentosus</i>	2	1,17%	
	<i>gardneri</i>	4	2,34%	
	<i>maculatum</i>	5	2,92%	
	<i>mirabile</i>	2	1,17%	
	<i>splendopleure</i>	6	3,51%	
	<i>striatum</i>	2	1,17%	
	<i>walkeri</i>	2	1,17%	
<i>Aplocheilichthys</i>	<i>spilauchen</i>	4	2,34%	2,34%
<i>Austrolebias</i>	<i>cyaneus</i>	1	0,58%	0,58%
<i>Epiplatys</i>	<i>annulatus</i>	6	3,51%	4,09%
	<i>dageti</i>	1	0,58%	
<i>Fundulopanchax</i>	<i>scheeli</i>	3	1,75%	1,75%
<i>Fundulosoma</i>	<i>thierryi</i>	4	2,34%	2,34%
<i>Nothobranchius</i>	<i>albimarginatus</i>	4	2,34%	46,21%
	<i>eggersi</i>	12	7,03%	
	<i>guentheri</i>	6	3,51%	
	<i>kafuensis</i>	6	3,51%	
	<i>korthausae</i>	2	1,17%	
	<i>palmqvisti</i>	2	1,17%	
	<i>patrizii</i>	18	10,54%	
	<i>rachovii</i>	10	5,85%	
	<i>rubripinnis</i>	1	0,58%	
	spp.	8	4,68%	
<i>ugandensis</i>	10	5,85%		
<i>Pituna</i>	<i>compacta</i>	1	0,58%	0,58%
<i>Pronothobranchius</i>	<i>kiyawensis</i>	3	1,75%	1,75%
<i>Rivulus</i>	<i>pictus</i>	1	0,58%	1,17%
	<i>xiphidius</i>	1	0,58%	
<i>Symptsonichthys</i>	<i>constanciae</i>	1	0,58%	7,61%
	<i>fulminantis</i>	2	1,17%	
	<i>magnificus</i>	2	1,17%	
	<i>notatus</i>	3	1,75%	
	<i>perpendicularis</i>	5	2,92%	
<b>TOTALE</b>		<b>171</b>		100%

Tabella 1: Distribuzione numerica delle specie di killi analizzate.  
 Table 1: Number distribution of the killifishes species analyzed.

Su tutti i soggetti sono stati condotti l'esame anatomopatologico e l'esame a fresco delle branchie, l'esame colturale di primo isolamento, mediante l'utilizzo di terreni solidi di primo isolamento (Agar sangue e TSA agar) e nei soggetti giunti vivi in laboratorio, l'esame parassitologico a fresco di branchie e cute. Le piastre sono state incubate a  $22 \pm 2^\circ$  C per 24-72 ore ed in caso di positività, le colonie sono state sottoposte a colorazione di Gram e al test dell'ossidasi; successivamente sono state seminate su terreni selettivi (TCBS, PIA, McConkey Agar).

L'identificazione dei ceppi batterici isolati è stata effettuata mediante caratterizzazione fenotipica (temperature di crescita, concentrazione salina e pH dei terreni) e biochimica, utilizzando gallerie API 20E e API 20NE (bioMérieux), incubate a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Sono stati inoltre allestiti antibiogrammi su piastre di Mueller-Hinton Agar (Difco) incubate a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  per 24-36 ore, servendosi di dischetti contenenti i principali antibiotici efficaci contro il trattamento dei germi in questione, compresi principi attivi non autorizzati in Italia, ma normalmente utilizzati per il trattamento dei pesci ornamentali; gli antibiotici saggiati sono stati: amoxicillina, ampicillina, cloramfenicolo, enrofloxacin, florfenicolo, flumequine, furazolidone, neomicina, ossitetraciclina, sulfamidico potenziato con trimethoprim, tetraciclina, tiamfenicolo. Inoltre è stata saggiata l'eventuale sensibilità all'agente vibriostatico O/129.

## RISULTATI

In quasi tutti i soggetti giunti al laboratorio negli oltre 3 anni di indagine, si è potuto riscontrare una più o meno marcata presenza di Malattia Branchiale; questo è in parte dovuto alle caratteristiche di allevamento in acquario, dove molto spesso si ha la presenza di torba e di materiale in sospensione che inevitabilmente conducono ad una irritazione dell'epitelio branchiale, con conseguente risentimento a livello delle lamelle. All'apertura della cavità addominale non sono mai stati evidenziati particolari quadri anatomopatologici, ad esclusione, in qualche esemplare, della presenza di enterite a volte emorragica e di ascite. Nei soggetti giunti vivi, l'esame parassitologico a fresco di cute e branchie non è mai risultato positivo.

Delle 171 unità epidemiologiche analizzate, solamente 26 campioni (pari al 15,20%) sono risultati negativi per la presenza di batteri comunemente evidenziabili con i terreni di coltura di primo isolamento quali Agar sangue e TSA; la negatività è stata espressa, come da procedura di laboratorio, dopo verifica dei terreni a 72 ore dall'inoculo. I restanti 145 esemplari invece, sono risultati positivi alle semine di primo isolamento già nelle 24-36 ore successive, con presenza di numerose colonie. L'identificazione fenotipica (mediante l'utilizzo di terreni selettivi, delle diverse temperature di crescita, del test dell'ossidasi e dell'agente vibriostatico, ecc.) e biochimica (uso delle gallerie API) dei germi isolati, hanno portato ad avere un quadro di isolamento batterico dominato dalle Aeromonosi (80 casi su 145 positivi, pari al 55,17%). Prendendo in esame le specie batteriche identificate, si è potuto isolare, in ordine di frequenza *Aeromonas hydrophila* (29,24%), *A. sobria* (17,54%), *Citrobacter freundii* (5,85%), *Vibrio* spp. (5,26%), *Pseudomonas fluorescens* (4,09%), *Plesiomonas shigelloides* (2,92%) e *V. parahaemolyticus* (1,17%). Solamente in 32 campioni (pari al 18,71% della totalità), non è stato possibile giungere all'identificazione univoca della specie batterica, in quanto presente un polimicrobismo aspecifico (germi tipicamente ambientali). Per maggiori dettagli si rimanda alla tabella 2.

Prendendo in considerazione i singoli generi dove è stato possibile campionare un discreto numero di specie e un numero sufficientemente elevato di esemplari, si può notare come l'andamento degli isolamenti presenta delle specificità particolari.

Il genere *Nothobranchius*, in cui si possono contare 10 specie accertate nel panel di studio più 8 esemplari non classificati e definiti come *Nothobranchius* spp., conta 79 esemplari, in cui si possono osservare 12 soggetti negativi per la presenza di batteri (15,19%); dei restanti 67 pesci risultati positivi, si è potuto isolare 32 *A. hydrophila* (40,50%), 17 *A. sobria* (21,52%), 5 *P. fluorescens* (6,33%), 3 *Vibrio* spp. (3,80%), 2 ciascuno *C. freundii* e *V. parahaemolyticus* (2,53%) e 1 *P. shigelloides* (1,27%); inoltre sono presenti 5 casi di polimicrobismo aspecifico (6,33%).

Specie ittica	N°	Neg	Pos	AH	AS	CF	Vsp	PF	PS	VP	Poli
<i>Aphyosemion australe</i>	22	2	20	6	4		2				8
<i>Aphyosemion bitaeniatum</i>	1		1	1							
<i>Aphyosemion bivittatum</i>	2	1	1		1						
<i>Aphyosemion elberti</i>	3	1	2			1			1		
<i>Aphyosemion elegans</i>	3		3								3
<i>Aphyosemion filamentosus</i>	2	1	1						1		
<i>Aphyosemion gardneri</i>	4		4		1						3
<i>Aphyosemion maculatum</i>	5	1	4								4
<i>Aphyosemion mirabile</i>	2		2	2							
<i>Aphyosemion splendopleure</i>	6		6	1	5						
<i>Aphyosemion striatum</i>	2		2								2
<i>Aphyosemion walkeri</i>	2		2						2		
<i>Aplocheilichthys spilauchen</i>	4		4				4				
<i>Austrolebias cyaneus</i>	1		1	1							
<i>Epiplatys annulatus</i>	6	4	2	1							1
<i>Epiplatys dageti</i>	1	1									
<i>Fundulopanchax scheeli</i>	3	1	2	1				1			
<i>Fundulosoma thierryi</i>	4		4	1	1						2
<i>Nothobranchius albimarginatus</i>	4		4	3						1	
<i>Nothobranchius eggersi</i>	12	2	10	3	1	1	1	2	1		1
<i>Nothobranchius guentheri</i>	6		6	1	5						
<i>Nothobranchius kafuensis</i>	6		6	3	3						
<i>Nothobranchius korthausae</i>	2		2								2
<i>Nothobranchius palmqvisti</i>	2	1	1								1
<i>Nothobranchius patrizii</i>	18	2	16	12	2		1			1	
<i>Nothobranchius rachovii</i>	10		10	5	1	1	1	2			
<i>Nothobranchius rubripinnis</i>	1	1									
<i>Nothobranchius spp.</i>	8	6	2	2							
<i>Nothobranchius ugandensis</i>	10		10	3	5			1			1
<i>Pituna compacta</i>	1		1			1					
<i>Pronothobranchius kiyawensis</i>	3		3								3
<i>Rivulus pictus</i>	1		1	1							
<i>Rivulus xiphidius</i>	1		1								1
<i>Sympsonichthys constanciae</i>	1		1	1							
<i>Sympsonichthys fulminantis</i>	2		2			2					
<i>Sympsonichthys magnificus</i>	2	1	1					1			
<i>Sympsonichthys notatus</i>	3	1	2	1	1						
<i>Sympsonichthys perpendicularis</i>	5		5	1		4					
TOTALE	171	26	145	50	30	10	9	7	5	2	32

Legenda: Neg = Negativo/Negative  
 Pos = Positivo/Positive  
 AH = *Aeromonas hydrophila*  
 AS = *Aeromonas sobria*  
 CF = *Citrobacter freundii*  
 Vsp = *Vibrio* spp.  
 PF = *Pseudomonas fluorescens*  
 PS = *Plesiomonas shigelloides*  
 VP = *Vibrio parahaemolyticus*  
 Poli = Polimicrobismo/Polymicrobial

Tabella 2: Isolamenti batterici nelle diverse specie di killi esaminate.  
 Table 2: Bacterial strain on the several killifish species examined.

Il genere *Aphyosemion* annovera 12 specie campionate con 54 esemplari, in cui si sono potuti osservare 6 casi negativi (11,11%), 20 campioni con polimicrobismo aspecifico

(37,04%), mentre nei restanti 28 soggetti, si è potuto isolare 11 *A. sobria* (20,37%), 10 *A. hydrophila* (18,52%), 4 *P. shigelloides* (7,41%), 2 *Vibrio* spp. (3,70%) ed 1 *C. freundii* (1,85%).

Infine, il genere *Sympsonichthys* presenta 13 esemplari campionati, suddivisi in 5 specie diverse; 2 esemplari sono risultati negativi (15,38%), mentre nei restanti 11, si è potuto isolare 6 *C. freundii* (46,15%), 3 *A. hydrophila* (23,08%), e 1 ciascuno *A. sobria* e *P. fluorescens* (7,69%).

Anche suddividendo le specie campionate in killi del vecchio mondo (154 esemplari appartenenti ai generi *Aphyosemion*, *Aplocheilichthys*, *Epiplatys*, *Fundulopanchax*, *Fundulosoma*, *Nothobranchius* e *Pronothobranchius*) e del nuovo mondo (17 esemplari appartenenti ai generi *Austrolebias*, *Pituna*, *Rivulus* e *Sympsonichthys*), si può notare un andamento caratteristico degli isolamenti effettuati nei due gruppi. Nel primo gruppo, ben più numeroso, si può osservare come la specie batterica più frequentemente reperita sia *A. hydrophila* con 45 isolamenti (29,22%), seguita da *A. sobria* (29 isolamenti pari al 18,83%), *Vibrio* sp. (9 isolamenti pari al 5,84%), *P. fluorescens* (6 isolati pari al 3,90%), *P. shigelloides* (5 isolati pari al 3,25%), *C. freundii* (3 isolati pari al 1,95%) e *V. parahaemolyticus* (2 isolati pari al 1,30%); inoltre 31 campioni (pari al 20,13%) sono risultati positivi per polimicrobismo aspecifico, mentre 24 campioni (15,58%) sono risultati negativi all'esame colturale. Nel secondo gruppo invece, la specie batterica maggiormente isolata è stata *C. freundii* (7 casi pari al 41,18%), seguita da *A. hydrophila* (5 isolati pari al 29,41%), *P. fluorescens* e *A. sobria* (1 isolato ciascuno pari al 5,88%); è stato isolato un solo caso di polimicrobismo aspecifico (5,88%) e 2 esemplari sono risultati negativi all'esame colturale (11,77%).

I risultati ottenuti *in vitro* sulla sensibilità agli antibiotici hanno rivelato una diffusa resistenza dei ceppi batterici isolati ai comuni antibiotici e chemioterapici utilizzati, come ossitetraciclina e tetraciclina, amoxicillina e ampicillina, enrofloxacin e flumequine, furazolidone e sulfamidico potenziato..

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Analizzando i risultati, si può notare come circa l'85% dei pesci esaminati sono risultati positivi all'esame colturale di primo isolamento e di questi in circa il 78% (113 campioni su 145 positivi) è stato possibile isolare una specie batterica ben definita. A livello di quadro anatomopatologico non è stato possibile riscontrare lesioni caratteristiche riconducibili a patologie batteriche, quali presenza di emorragie diffuse ai vari organi della cavità peritoneale; se si eccettua la presenza, in alcuni individui, di ascite e di forme a diverso stadio di enterite, nonché di una diffusa presenza di Malattia Branchiale (MB), i pesci esaminati non presentavano altri segni che potessero indirizzare la diagnosi. La presenza di MB a diverso grado di gravità nella maggior parte degli individui analizzati, sia quelli giunti in laboratorio già morti, che quelli inviati alle analisi ancora vivi dai proprietari, associata comunque alla presenza di un'alta percentuale di isolamenti batterici, porta a pensare che tale situazione possa essere considerata come causa primaria dell'insorgenza di patologie batteriche di natura secondaria. Infatti, gli isolati risultano per lo più rappresentati da germi ubiquitari, considerati generalmente di scarsa importanza patologica, ma che sempre più vengono coinvolti in forme batteriche setticemiche che possono causare anche pesanti perdite in ambienti circoscritti come l'acquario. Si può ipotizzare che il danno branchiale rilevato sia dovuto in parte alle particolari condizioni di allevamento che tali pesci subiscono in acquario: infatti, generalmente i pesci vivono in piccole vasche in cui a volte viene immessa della torba, la quale può consentire la presenza di particelle in sospensione che

possono causare irritazione a livello dell'epitelio branchiale, non di gravità tale da causarne direttamente la morte, ma probabilmente abbastanza rilevante da poter consentire l'entrata di germi che si possono facilmente trovare nell'ambiente acquatico e che possono dare, in condizioni particolari di stress, patologie secondarie a volte molto gravi. Inoltre, anche l'uso di cibo fresco vivo o congelato, quasi sempre costituito da tubifex o da altri invertebrati, può essere una possibile fonte di inquinamento batterico dell'acquario. Nonostante i cambi d'acqua ripetuti che generalmente si effettuano nelle vasche in cui si allevano i killi, la presenza costante di particolato e di materiale organico costituito da cibo non subito utilizzato, potrebbero portare ad un possibile inquinamento dell'ambiente e una facile penetrazione dei germi in circolo attraverso microlesioni presenti a livello branchiale. Tale ipotesi sul possibile inquinamento esogeno, risulta essere, a nostro parere, del tutto plausibile, in quanto generalmente nelle vasche di allevamento dei killi, difficilmente si effettuano delle nuove immissioni non controllate, come invece può avvenire in altre tipologie di allevamento amatoriale di pesci ornamentali o in acquari ad uso domestico.

Mettendo a confronto alcuni dati ottenuti in analoghi studi eseguiti su pesci ornamentali nazionali e d'importazione, si può osservare come la percentuale di positività all'esame colturale riscontrata nei killi (113 su 171, pari al 66,08%) risulti notevolmente maggiore rispetto a quella evidenziata in altri pesci; infatti, Locatelli *et al.* (2003) hanno messo in evidenza una positività relativa pari al 48,51%; nell'indagine condotta da Manfrin *et al.* (2002) invece, non si evince esattamente tale percentuale, in quanto vengono inserite le positività relative alle partite esaminate, non commentando il dato ottenuto rispetto alla totalità dei soggetti esaminati.

Prendendo in esame le specie batteriche isolate, si nota una netta prevalenza delle *Aeromonas* (80 isolati pari al 55,17% sul totale dei soggetti risultati positivi all'esame colturale); *Aeromonas hydrophila* presenta la più alta prevalenza con 50 isolati, seguita da *A. sobria* con 30 ceppi. *A. hydrophila* e *A. sobria* vengono considerate delle specie batteriche ubiquitarie, che fanno parte della normale flora batterica degli animali acquatici; possono divenire patogene anche per le specie ittiche, rappresentando comunque dei germi opportunisti, ad irruzione secondaria (Ghittino, 1985; Roberts, 1989; Inglis *et al.*, 1993; Austin & Austin, 1999). Raramente vengono prese in considerazione quali agenti primari di patologie (Wakabayashi *et al.*, 1981); vanno perciò considerate come delle specie che generalmente non causano patologie primarie con elevata mortalità, ma sono da considerarsi delle complicanze, che possono sopraggiungere soprattutto in concomitanza a fattori stressanti che debilitano i soggetti (Locatelli *et al.*, 2003).

I casi di vibriosi sono risultati relativamente scarsi (7,14%) considerando le specie batteriche appartenenti a tale genere, le quali possono rappresentare un gruppo importante di patogeni; sono stati isolati 2 *Vibrio parahaemolyticus* in soggetti appartenenti al genere *Nothobranchius* e 9 soggetti in cui non è stato possibile raggiungere una completa identificazione di specie con i normali metodi fenotipici o biochimici. Nell'ambito di questo studio non è stato possibile isolare altre specie patogene appartenenti a tale genere, come *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, che sono stati isolati invece in un analogo studio condotto su altre specie ittiche ornamentali (Locatelli *et al.*, 2003); inoltre non è mai stato isolato *V. cholerae*. Particolare attenzione va rivolta verso tale specie batterica, in quanto presenta dei risvolti importanti di sanità pubblica, anche se tale germe raramente è stato messo in diretta relazione con eventi patologici nei pesci. Il *V. cholerae* facilmente si può isolare dall'intestino di specie ittiche, anche in assenza totale di manifestazioni cliniche (Manfrin *et al.*, 2002) e presenta una primaria importanza da un punto di vista zoonosico, in quanto la presenza di vibrioni non agglutinanti può rappresentare un potenziale rischio per l'uomo (Locatelli *et al.*, 2003).

La presenza di *Citrobacter freundii* nel 5,85% dei soggetti esaminati (6,49% dei soggetti risultati positivi all'esame colturale) indica come tale specie possa rappresentare una importante causa di mortalità, alla luce anche dei sempre più numerosi casi di infezione descritti in diverse specie ittiche d'allevamento (Austin *et al.*, 1992; Karunasagar *et al.*, 1992) e ornamentali (Prearo *et al.*, 2004).

Anche *Pseudomonas fluorescens* rappresenta una specie che sempre più frequentemente viene isolata da episodi morbosi in specie ittiche (Prearo *et al.*, 2002); nel presente studio gli isolamenti più frequenti sono stati nel gruppo dei *Nothobranchius*.

Per quanto riguarda l'isolamento di *Plesiomonas shigelloides* nell'oltre 3% degli isolati, questo porterebbe a far ritenere che tale germe possa essere considerato come una possibile causa di mortalità nelle specie ittiche; nonostante alcune segnalazioni, attualmente non è possibile ancora definire la sua reale patogenicità nei confronti delle specie ittiche (Brunetti *et al.*, 2004).

Infine, non è stato possibile giungere ad una identificazione univoca della specie batterica oppure all'isolamento di specie riportabili a germi tipicamente ambientali e che non possono essere riconducibili ad episodi morbosi, nel 20% circa degli isolati. I soggetti in cui la positività all'esame colturale di primo isolamento, che poi ha condotto ad una denominazione degli isolati nel termine generico di polimicrobismo, sono riconducibili in parte a pesci giunti in laboratorio congelati, ma in condizioni non sempre ottimali, in cui il prelievo dalle vasche e il conseguente congelamento non è avvenuto in tempi brevi dal loro decesso.

I dati relativi alle prevalenze relative ottenute nei 3 gruppi di killi presi in esame nei risultati (*Nothobranchius*, *Aphyosemion* e *Sympsonichthys*) appaiono essere difficilmente raffrontabili (per la differente numerosità campionaria), ma soprattutto non presentano una possibile spiegazione eco-patogenetica. Si può annotare come nel gruppo dei *Nothobranchius*, le percentuali relative ottenute rispecchiano grossomodo l'andamento generale delle frequenze delle specie batteriche; nel gruppo degli *Aphyosemion* è da evidenziare invece una percentuale relativamente alta di isolamenti di *P. shigelloides* rispetto agli altri gruppi (7,40%). Nel gruppo dei *Sympsonichthys* invece è possibile osservare come la specie batterica maggiormente isolata sia *C. freundii* e non *A. hydrophila* come invece avviene negli altri raggruppamenti. Infine, prendendo in considerazione i due grandi gruppi in cui si possono suddividere i killi, cioè le specie del vecchio mondo e del nuovo mondo, anche in questo caso non si possono effettuare delle correlazioni statistiche utili, per la estrema variabilità delle unità campionarie dei due gruppi (154 e 17 soggetti rispettivamente).

Per quanto riguarda i risultati ottenuti *in vitro* sulla sensibilità agli antibiotici, si è rilevata una diffusa resistenza alle comuni molecole utilizzate in terapia ittica, facilmente ritrovabili sul mercato. Un discorso a parte va fatto per molecole quali cloramfenicolo, florfenicolo e tiamfenicolo, le quali hanno fornito delle risposte quasi sempre favorevoli alla lettura dell'antibiogramma; purtroppo tali molecole risultano di difficile reperimento sul mercato. Inoltre, la terapia per i killi appare particolarmente difficile in quanto essendo specie che assumono generalmente cibo vivo o congelato, risulta particolarmente indaginoso e a volte impossibile somministrare una eventuale sostanza terapeutica attraverso l'alimento. La terapia quindi può essere condotta mediante bagni medicati, utilizzando preparazioni farmaceutiche solubili in acqua. I prodotti che possono avere un tale utilizzo, nei casi analizzati da questo studio hanno dimostrato spesso una scarsa efficacia, in quanto i germi isolati presentavano evidenti resistenze alle molecole. Appare quindi particolarmente difficile l'approccio terapeutico nel settore acquariofilo, soprattutto per specie di pesci come i killi.

In ultima analisi resta da annotare come esista una fiorente bibliografia scientifica riguardante questo particolare gruppo di pesci, ma sono alquanto scarse le descrizioni di patologie o sindromi legate ad isolamenti di tipo batterico; eccezioni sono i lavori sulla patogenicità di streptococchi non emolitici (Rasheed & Plumb, 1984) e sulla valutazione dell'ipossia sull'attività battericida del rene anteriore nei confronti di agenti patogeni ambientali opportunisti (Boleza *et al.*, 2001). Appaiono scarsi anche i lavori su agenti virali che possono colpire i killi (Ahne *et al.*, 2003), mentre risultano abbondanti le pubblicazioni su malattie di origine parassitaria (Fournie & Solangi, 1980; Fournie & Overstreet, 1993; Abdul-Salam *et al.*, 2000; Scholz *et al.*, 2002; Akaishi *et al.*, 2004; Goulding *et al.*, 2004; Prearo *et al.*, 2004), con descrizioni di nuove specie di parassiti (Rapacz *et al.*, 1973; Billeter *et al.*, 2000; Mendoza-Franco & Vidal-Martinez, 2001; Helt *et al.*, 2003).

Molto spesso invece i killi sono presi come oggetto di studio per indagini sulla loro ecologia (Frenkel & Goren, 2000; Valdesalici & Cellerino, 2003), per studi di fisiologia (Balmer, 1982; Paxton *et al.*, 1984; Honkanen & Patton, 1987; Cerdà *et al.*, 1998; Roszell & Rice, 1998; Marshall *et al.*, 2000; Sweet *et al.*, 2000; Daborn *et al.*, 2001; Cohen, 2002; Frick & Wright, 2002a; 2002b), di filogenesi (Costa, 1996; Murphy & Collier, 1996; Murphy *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2001) e di genetica (Turner *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1992; Park *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002). Numerose appaiono anche le ricerche inerenti argomenti di farmacologia e tossicologia riguardanti i killi, con studi di tossicità diretta (Lin & Dunson, 1993; Tsuda *et al.*, 1995; Tsuda *et al.*, 1996; 1997a; 1997b; 1997c; Shedd *et al.*, 1999; Hegelund *et al.*, 2004) e sui meccanismi di risposta ai tossici stessi (Albertus & Laine, 2001; Bello *et al.*, 2001; Terlouw *et al.*, 2001).

Alla luce di quanto evidenziato da questo studio e dalle poche informazioni che si hanno sulle patologie di origine batterica che possono colpire i killi, risulta opportuno proseguire gli studi a tal riguardo, estendendo eventualmente gli studi batteriologici anche sulle popolazioni selvatiche.

Appare quindi auspicabile, nell'ottica di una maggiore conoscenza di queste problematiche, una più ampia collaborazione con gli acquariofili e gli allevatori amatoriali onde poter disporre di maggiori informazioni e di poter effettuare studi più particolareggiati e mirati su questo interessante gruppo di pesci.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano, per la loro collaborazione tutti i proprietari dei pesci esaminati; inoltre si desidera ringraziare l'Associazione Italiana Killifish (A.I.K.) e l'Associazione Piemontese di Erpetologia ed Acquariofilia (A.P.E.A.) per il supporto logistico fornito.

## BIBLIOGRAFIA

Abdul-Salam J., Sreelatha B.S. & Ashkanani H. (2000). Surface ultrastructure of *Stictodora tridactyla* (Trematoda: Heterophyidae) from Kuwait Bay. *Parasitol. Int.*, 49, 1: 1-7.

Ahne W., Blake S., Essbauer S. & Nicholson B.L. (2003). Characterization of aquabirnaviruses from flounder *Pseudopleuronectes americanus* and mummichog *Fundulus heteroclitus* in the Chesapeake Bay, Virginia, USA. *Dis. Aquat. Org.*, 56, 3: 201-206.

Akaishi F., Easy R., St-Jeans S., Courtenay S., Ribeiro C.A. de O. & Cone D. (2004). Supplemental diagnosis of *Kudoa funduli* (Myxozoa) parasitizing of *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontidae) from coastal Northeastern North America. *J. Parasitol.*, 90, 3: 477-480.

- Albertus J.A. & Laine R.O. (2001). Enhanced xenobiotic transporter expression in normal teleost hepatocytes: response to environmental and chemotherapeutic toxins. *J. Experim. Biol.*, 204: 217-227.
- Austin B. & Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. 3<sup>rd</sup> edition. *Springer Praxis Publishing, Chichester, England*.
- Austin B., Stobie M. & Robertson P.A.W. (1992). *Citrobacter freundii*: the cause of gastro-enteritis leading to progressive low level mortalities in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, in Scotland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 166-167.
- Balmer R.T. (1982). The effect of age on body energy content of the annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Exp. Gerontol.*, 17, 2: 139-143.
- Bello S.M., Franks D.G., Stegeman J.J. & Hahn M.E. (2001). Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: *in vivo* and *in vitro* studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol. Sciences*, 60: 77-91.
- Billeter P.A., Klink M.M. & Mangel T.K. (2000). A new species of *Swingleus* (Monogenea: Gyrodactylidae) from the mummichog *Fundulus heteroclitus*, in the Delaware Bay. *J. Parasitol.*, 86, 6: 1219-1222.
- Boleza K.A., Burnett L.E. & Burnett K.G. (2001). Hypercapnic hypoxia compromises bactericidal activity of fish anterior kidney cells against opportunistic environmental pathogens. *Fish Shellfish Immunol.*, 11, 7: 593-610.
- Brunetti R., Amato G., Colussi S., Pavoletti E., Brusa F. & Prearo M. (2004). *Plesiomonas shigelloides* come causa di mortalità: prove sperimentali d'infezione in gurami (*Helostoma temminckii*) d'acquario. *Atti XI Convegno Nazionale Soc. It. Patol. Ittica*, 7-9 ottobre 2004: 15.
- Cerdà J., Subhedar N., Reich G., Wallace R.A. & Selman K. (1998). Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, 59: 53-61.
- Cohen S. (2002). Strong positive selection and habitat-specific amino acid substitution patterns in Mhc from an estuarine fish under intense pollution stress. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 11: 1870-1880.
- Costa W.J.E.M. (1996). Phylogenetic and biogeographic analysis of the neotropical annual fish genus *Symponichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *J. Comp. Biol.*, 1, 3-4: 129-140.
- Daborn K., Cozzi R.R.F. & Marshall W.S. (2001). Dynamic of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. *J. Experim. Biol.*, 204: 1889-1899.
- Eschmeyer W. (1998). The catalog of fishes on-line. *California Academy of Sciences*, <http://www.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatsearch.html>.
- Fournie J.W. & Overstreet R.M. (1993). Host specificity of *Calyptospora funduli* (Apicomplexa: Calyptosporidae) in atheriniform fishes. *J. Parasitol.*, 79, 5: 720-727.
- Fournie J.W. & Solangi M.A. (1980). Prevalence of *Eimeria funduli* (Protozoa: Eimeriidae) in the longnose killifish *Fundulus similis* from Horn Island, Mississippi. *Gulf Resear. Rep.*, 6, 4: 427-428.
- Frenkel V. & Goren M. (2000). Factors affecting growth of killifish, *Aphanius dispar*, a potential biological control of mosquitoes. *Aquaculture*, 184, 3-4: 255-265.

- Frick N.T. & Wright P.A. (2002a). Nitrogen metabolism and excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus*. I. The influence of environmental salinity and external ammonia. *J. Experim. Biol.*, 205: 79-89.
- Frick N.T. & Wright P.A. (2002b). Nitrogen metabolism and excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus*. II. Significant ammonia volatilization in a teleost during air-exposure. *J. Experim. Biol.*, 205: 91-100.
- Garcia G., Lalanne A.I., Aguirre G. & Cappetta M. (2001). Chromosome evolution in the annual killifish genus *Cynolebias* and mitochondrial phylogenetic analysis. *Chromosome Research*, 9, 6: 437-448.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. Vol. 2 – Patologia. Ed. Bono, Torino.
- Goulding D.R., Blankenship-Paris T.L., Lewbart G.A., Myers P.H., Demianenko T.K., Clark J.A. & Forsythe D.B. (2004). Gill trematodes (flukes) in wild-caught killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, 43, 2: 32-34.
- Hegelund T., Ottosson K., Radinger M., Tomberg P. & Celander M.C. (2004). Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on *CYP1A* and *CYP3A* in rainbow trout and killifish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 5: 1326-1334.
- Helt J., Janovy J. Jr. & Ubelaker J. (2003). *Phyllostomum funduli* n. sp. (Trematoda: Gorgoderidae) in *Fundulus sciadicus* Cope from Cedar Creek in Western Nebraska. *J. Parasitol.*, 89, 2: 346-350.
- Honkanen R.E. & Patton J.S. (1987). Bile salt absorption in killifish intestine. *Am. J. Physiol.*, 253, 6: G730-G736.
- Inglis V., Roberts R.J. & Bromage N.R. (1993). Bacterial diseases of fish. *Blackwell Science, Oxford, England*.
- Karunasagar I., Karunasagar I. & Pai R. (1992). Systemic *Citrobacter freundii* infection in common carp. *Cyprinus carpio* L., fingerlings. *J. Fish Dis.*, 15: 95-98.
- Lin H.C. & Dunson W.A. (1993). The effect of salinity on the acute toxicity of cadmium to the tropical, estuarine, hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*, comparison of Cd, Cu and Zn tolerance with *Fundulus heteroclitus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25, 1: 41-47.
- Locatelli L., Pavoletti E., Moroni P., Cabra S., Gilli P., Prearo D. & Prearo M. (2003). Principali patologie batteriche riscontrate in pesci d'acquario nazionali e d'importazione. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 36: 42-52.
- Manfrin A., Rubini S., Caffara M., Volpin M., Alborali L. & Fioravanti M.L. (2002). Patologie batteriche e parassitarie in pesci ornamentali provenienti da paesi extracomunitari: risultati preliminari. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 33: 44-54.
- Marshall W.S., Bryson S.E. & Luby T. (2000). Control of epithelial Cl<sup>-</sup> secretion by basolateral osmolality in the euryaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Experim. Biol.*, 203: 1897-1905.
- Mendoza-Franco E.F. & Vidal-Martinez V.M. (2001). *Salsuginus neotropicalis* n. sp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) from the pike killifish *Belonesox belizanus* (Atheriniformes: Poeciliidae) from southeastern Mexico. *Syst. Parasitol.*, 48, 1: 41-45.

- Murphy W.J. & Collier G.E. (1996). Phylogenetic relationship within the Aplocheiloid fish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae): implications for Caribbean and Central American biogeography. *Mol. Biol. Evol.*, 13, 5: 642-649.
- Murphy W.J., Thomerson J.E. & Collier G.E. (1999). Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontidae, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13, 2: 289-301.
- Noga E.J. (1996). Fish disease. Diagnosis and treatment. *Mosby-Year Book, Inc.*
- Park J.H., Lee J.J., Yoon S., Lee J.-S., Choe S.Y., Choe J., Park E.-H. & Kim C.G. (2001). Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element. *Nucleic Acids Research*, 29, 14: 3041-3050.
- Paxton R., Gist D.H. & Umminger B.L. (1984). Serum cortisol levels in thermally-acclimated goldfish (*Carassius auratus*) and killifish (*Fundulus heteroclitus*): implications in control of hepatic glycogen metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 78, 4: 813-816.
- Prearo M., Brunetti R., Arsieni P., Locatelli L., Prearo D. & Amato G. (2004). Infezione sperimentale da *Citrobacter freundii* in pesci rossi (*Carassius auratus*) d'acquario. *Atti XI Convegno Nazionale Soc. It. Patol. Ittica, Finale Ligure (SV), 7-9 ottobre 2004*: 18.
- Prearo M., Colussi S., Marchis D., Ferrari A. & Amato G. (2004). Presenza di *Piscinoodinium pillulare* in *Fundulosoma* e *Nothobranchius* d'acquario. *Atti XI Convegno Nazionale Soc. It. Patol. Ittica, Finale Ligure (SV), 7-9 ottobre 2004*: 29.
- Prearo M., Gilli P., Mazzone P. & Ghittino C. (2002). Caso di Pseudomonosi in trote fario (*Salmo trutta* spp. *trutta*) e trote marmorata (*Salmo trutta* ssp. *marmoratus*) allevate a scopo di ripopolamento. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 33: 3-9.
- Rapacz E., Iversen E.S. & Feigenbaum D. (1973). *Zschokkella floridanae* sp. n. (Myxosporidea) from the goldspotted killifish, *Floridichthys carpio* (Gunther). *J. Protozool.*, 20, 3: 367-369.
- Rasheed V. & Plumb J.A. (1984). Pathogenicity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. In gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). *Aquaculture*, 37, 1: 97-105.
- Roberts R.J. (1989). Fish pathology. *Ed. Baillière Tindall, London.*
- Roszell L.E. & Rice C.D. (1998). Innate cellular immune function of anterior kidney leucocytes in the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 8, 2: 129-142.
- Sato A., Satta Y., Figueroa F., Mayer W.E., Zaleska-Rutczynska Z., Toyosawa S., Travius J. & Klein J. (2002). Persistence of Mhc heterozygosity in homozygous clonal killifish, *Rivulus marmoratus*: implications for the origin of hermaphroditism. *Genetics*, 162: 1791-1803.
- Scholz T., Steele E., Beckham M. & Bray R.A. (2002). Larval tapeworm (Cestoda: Dilepididae) from the mummichog *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766) and striped killifish *Fundulus majalis* (Walbaum, 1792) from South Carolina, U.S.A. *Comp. Parasitol.*, 69, 1: 104-108.
- Seegers L. (1997a). Killifishes of the world. Old world Killis – I. *Aqualog, Verlag A.C.S. GmbH, Mörfelden-Walldorf, Germany*, 7: 1-160.
- Seegers L. (1997b). Killifishes of the world. Old world Killis – II. *Aqualog, Verlag A.C.S. GmbH, Mörfelden-Walldorf, Germany*, 8: 1-112.

- Seegers L. (1999). Killi. Allevamento e riproduzione. *Ed. Primaris, Milano*: 1-72.
- Seegers L. (2000). Killifishes of the world. New world Killis. *Aqualog, Verlag A.C.S. GmbH, Mörfelden-Walldorf, Germany*, 14: 1-222.
- Shedd T.R., Widder M.W., Toussaint M.W., Sunkel M.C. & Hull E. (1999). Evaluation of the annual killifish *Nothobranchius guentheri* as a tool for rapid acute toxicity screening. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 10: 2258-2261.
- Sweet D.H., Miller D.S. & Pritchard J.B. (2000). Basolateral localization of organic cation transporter 2 in intact renal proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 279: F826-F834.
- Terlouw S.A., Masereeuw R., Russel F.G.M. & Miller D.S. (2001). Nephrotoxicants induce endothelin release and signaling in renal proximal tubules: effect on drug efflux. *Mol. Pharmacol.*, 59, 6: 1433-1440.
- Tsuda T., Aoki S., Inoue T. & Kojima M. (1995). Accumulation of IBP, parathion and EPN by killifish: comparison of individual and mixed pesticides. *Comp. Biochem. Physiol., C Pharmacol., Toxicol. and Endocrinol.*, 111, 1: 19-22.
- Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A. & Aoki S. (1996). Accumulation and excretion of fenthion, fenthion sulfoxide and fenthion sulfone by killifish (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol., C Pharmacol., Toxicol. and Endocrinol.*, 113, 1: 45-49.
- Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A. & Aoki S. (1997a). Acute toxicity, accumulation and excretion of isoprothiolane and its degradation products in killifish. *Water Research*, 31, 2: 323-327.
- Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A. & Aoki S. (1997b). Acute toxicity, accumulation, and excretion of benthocarb and its degradation products in killifish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 4: 603-610.
- Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A. & Aoki S. (1997c). Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorous insecticides and their oxidation products in killifish. *Chemosphere*, 35, 5: 939-949.
- Turner B.J., Elder J.F.Jr., Laughlin T.F. & Davis W.P. (1990). Genetic variation in clonal vertebrates detected by simple-sequence DNA fingerprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5653-5657.
- Turner B.J., Elder J.F.Jr., Laughlin T.F., Davis W.P. & Taylor D.S. (1992). Extreme clonal diversity and divergence in populations of a selfing hermaphroditic fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10643-10647.
- Valdesalici S. & Cellerino A. (2003). Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 270 Suppl.: 189-191.
- Wakabayashi H., Kanai H., Hsu T.C. & Egusa S. (1981). Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* biovar. *hydrophila* (Chester) Popoff & Veron, 1976 to fish. *Fish Pathol.*, 15: 319-325.