

Donatella Ottaviani <sup>1\*</sup>, Gabriele Angelico <sup>1</sup>, Silvia Perialisi <sup>1</sup>, Elena Rocchegiani <sup>1</sup>, Mario Latini <sup>1</sup>, Francesca Leoni <sup>1</sup>, Jasmine Hattab <sup>2</sup>, Francesco Mosca <sup>2</sup>, Pietro Giorgio Tiscar <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Via Cupa di Posatora 3, 60126, Ancona, Italy

<sup>2</sup> Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria Località Piano d'Accio 64100, Teramo, Italy

## Introduzione

*Halobacteriovorax* comprende batteri predatori che attaccano vibrioni ed altri microrganismi gram-negativi nell'ambiente marino (Koval et al., 2015) (Figura 1). Recenti studi riportano che gli *Halobacteriovorax* sono in grado di ridurre significativamente il livello di *Vibrio parahaemolyticus* ed altri vibrioni patogeni in acqua di mare a scala di laboratorio (Richards et al. 2012, 2016; Williams et al. 2015). In Italia, la contaminazione dei bivalvi da vibrioni patogeni è un problema crescente negli ultimi decenni: *V. parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non-O1 / O139 sono stati isolati da acqua di mare e da *Mytilus galloprovincialis*. Inoltre, negli ultimi anni sono stati segnalati infezioni umane da *V. parahaemolyticus* e da *V. cholerae*, non-O1 / O139 con cozze o acqua di mare dell'Adriatico come fonte di infezione (Masini et al., 2007; Ottaviani et al. 2010, 2013, 2018a). In questo lavoro abbiamo studiato l'abbondanza e la diversità molecolare dei ceppi di *Halobacteriovorax* specifici per *V. parahaemolyticus* isolati dall'acqua di mare in Adriatico (Italia). Dagli stessi campioni, sono stati anche valutati i livelli di *V. parahaemolyticus* e dei vibrioni totali ed è stata studiata la relazione tra le abbondanze predatore / preda. Infine, è stata testata l'efficienza del predatore verso ceppi tossigeni di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* non-O1 / O139 di origine clinica ed ambientale.

## Materiali e metodi

Il campionamento veniva eseguito due volte alla settimana da un banco naturale di cozze in Adriatico centrale nel 2018. La temperatura e la salinità dell'acqua venivano registrate al momento del campionamento. La salinità rimaneva stabilmente compresa tra 38 e 39 ppt. Il ceppo *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 è stato utilizzato come preda primaria per l'isolamento di *Halobacteriovorax* dall'acqua di mare. *Halobacteriovorax*, è stato ricercato e numerato mediante il saggio di placca (Ottaviani et al., 2018b) (Figura 2). L'identificazione molecolare è stata eseguita mediante rilevazione PCR di un frammento del gene 16S rRNA della famiglia *Halobacteriovoraceae* (Ottaviani et al., 2018). Per l'analisi di sequenziamento, sono stati elaborati prodotti PCR di 700 bp e sono state generate sequenze che venivano confrontate ai filotipi e cloni presenti in GenBank (Pineiro et al., 2007; Ottaviani et al., 2018 b). I livelli di *Vibrio* venivano rilevati da 100 ml di acqua filtrata su una membrana a pori di 0,45 µm e ponendo il filtro in agar TCBS (Masini et al., 2007). Le colonie presunte di *Vibrio* sp totale e *V. parahaemolyticus* sono state confermate con metodi standardizzati (Ottaviani et al., 2003; ISO / TS 21872-1: 2017). L'efficienza predatoria nei confronti di ceppi tossigeni di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* non O1/O139 è stata testata monitorando la capacità di *Halobacteriovorax* a formare aloni litici su una coltura di preda mediante un test di placca (Ottaviani et al., 2018 b) (Figura 2,3). Ogni analisi è stata ripetuta 3 volte e ciascuna conta effettuata in duplicato (n = 6). I risultati delle analisi microbiologiche sono stati riportati come valori medi (log trasformati) ± la deviazione standard. I dati sono stati correlati con il coefficiente di correlazione di Spearman ed i valori pi <0,05 sono stati considerati significativi.

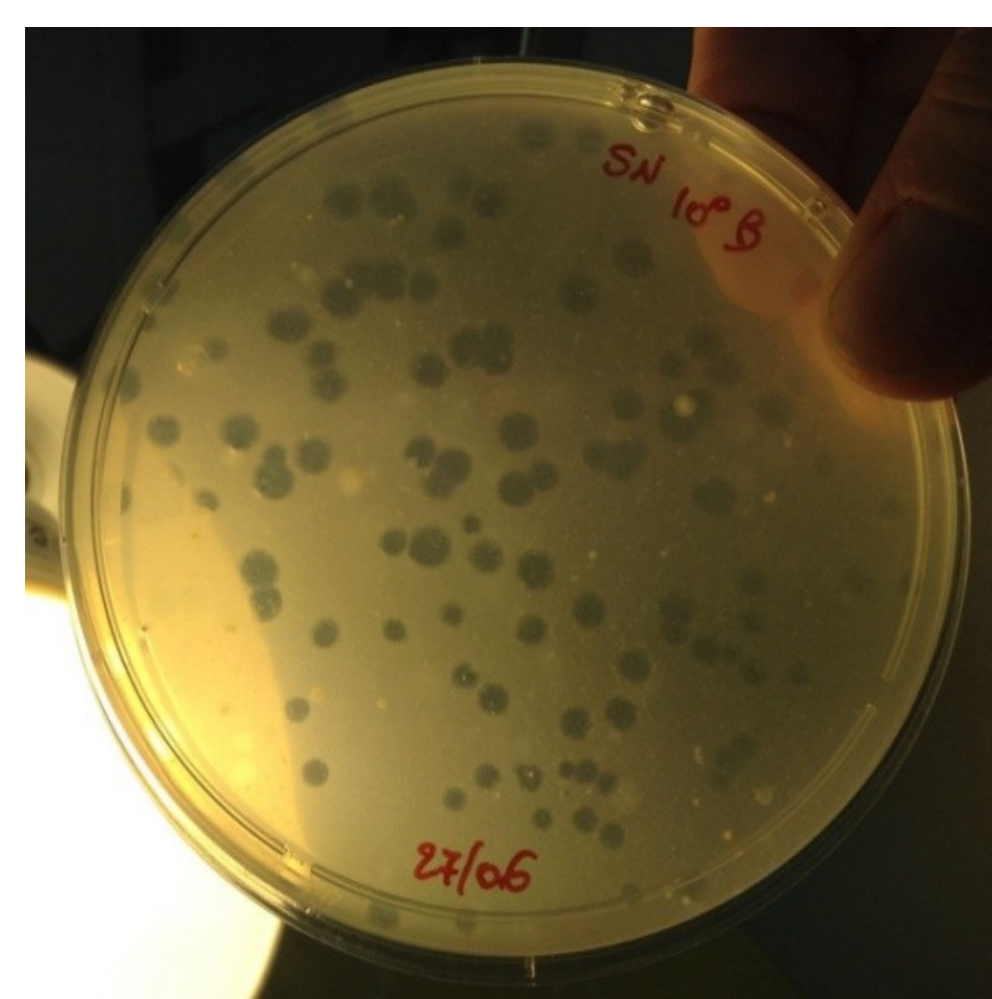


Figura 2. Placche di lisi di *Halobacteriovorax* verso un ceppo preda di *V. parahaemolyticus*

Ceppi preda	Fonte ed anno di isolamento
1. <i>V. parahaemolyticus</i> tdh <sup>+</sup> stx <sup>+</sup> ; trh <sup>-</sup> stx <sup>+</sup> ; toxRS <sup>+</sup> (ceppo pandemico)	fecei, 2007
2. <i>V. parahaemolyticus</i> tdh <sup>-</sup> trh <sup>+</sup> ; toxRS <sup>-</sup>	fecei, 2009
3. <i>V. parahaemolyticus</i> tdh <sup>-</sup> trh <sup>+</sup> ; toxRS <sup>-</sup>	acqua di mare, 2011
4. <i>V. parahaemolyticus</i> tdh <sup>-</sup> trh <sup>-</sup> ; toxRS <sup>-</sup>	cozze, 2014
5. <i>V. parahaemolyticus</i> tdh <sup>-</sup> trh <sup>-</sup> ; toxRS <sup>-</sup>	cozze, 2015
6. <i>V. parahaemolyticus</i> tdh <sup>-</sup> trh <sup>-</sup> ; toxRS <sup>-</sup>	cozze, 2016
7. Non O1/O139 <i>V. cholerae</i> hlyA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; hlyET <sup>+</sup> ; ctxA <sup>+</sup> -tcpA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; tcpAET <sup>+</sup> ; stn/sto <sup>-</sup>	tessuto sottocutaneo, 2009
8. Non O1/O139 <i>V. cholerae</i> hlyA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; hlyET <sup>+</sup> ; ctxA <sup>+</sup> -tcpA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; tcpAET <sup>+</sup> ; stn/sto <sup>+</sup>	acqua di mare, 2011
9. Non O1/O139 <i>V. cholerae</i> hlyA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; hlyET <sup>+</sup> ; ctxA <sup>+</sup> -tcpA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; tcpAET <sup>+</sup> ; stn/sto <sup>-</sup>	tessuto sottocutaneo, 2012
10. Non O1/O139 <i>V. cholerae</i> hlyA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; hlyET <sup>+</sup> ; ctxA <sup>+</sup> -tcpA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; tcpAET <sup>+</sup> ; stn/sto <sup>-</sup>	fecei, 2012
11. Non O1/O139 <i>V. cholerae</i> hlyA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; hlyET <sup>+</sup> ; ctxA <sup>+</sup> -tcpA <sup>+</sup> Class <sup>+</sup> ; tcpAET <sup>+</sup> ; stn/sto <sup>-</sup>	cozze, 2014
12. <i>V. parahaemolyticus</i> NCTC 10885	
13. <i>V. cholerae</i> non O1/O139 NCTC 4711	

Figura 3. Ceppi preda di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* testati con gli isolati di *Halobacteriovorax*

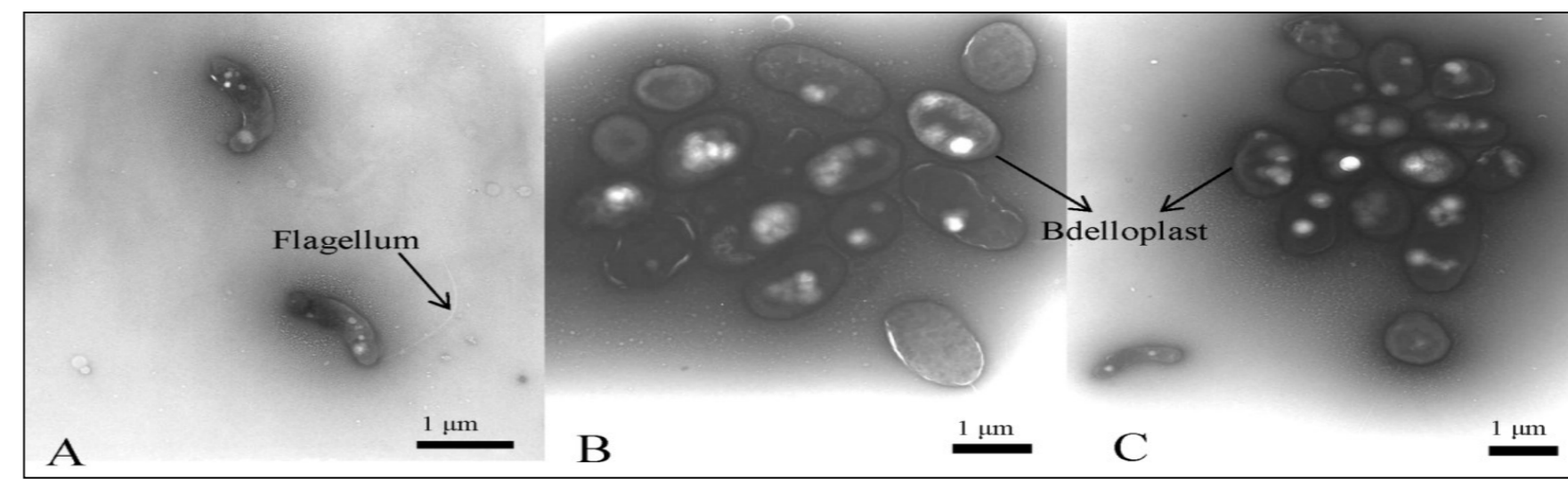


Figura 1. *Halobacteriovorax* isolato da acqua di mare: (A) libero nella fase di attacco della preda (x 13.000); (B) durante la replicazione all'interno del bdelloplast (x10.000); (C) durante la lisi della preda e il rilascio di progenie (x 8.000).

## Risultati e discussione

Dei 25 campioni di acqua di mare analizzati, 20 (83%) sono risultati positivi per la presenza di *Halobacteriovorax* predatore di *V. parahaemolyticus*, con conteggi che vanno da 4 a 1,4 x 10<sup>3</sup> PFU per 7,5 ml. Sorprendentemente, non è stata trovata alcuna relazione significativa tra i livelli di *Halobacteriovorax* e la temperatura dell'acqua di mare. I livelli più alti infatti sono stati rilevati a Gennaio ed Aprile quando la temperatura dell'acqua era di 10°C. Questo trend stagionale di *Halobacteriovorax* in Adriatico non è coerente con un precedente studio condotto nell'Oceano Atlantico e nell'Oceano Pacifico, dove i livelli naturali di erano inferiori ai nostri e si concentravano principalmente nei mesi più caldi dell'anno (Richards et al., 2013). I nostri dati suggeriscono che ceppi di *Halobacteriovorax* psicofili predominano nell'area marina studiata. Tredici campioni (52%) sono risultati positivi per *V. parahaemolyticus* con conteggi compresi tra 1,0 x 10<sup>2</sup> e 1,7 x 10<sup>4</sup> CFU per 100 ml, mentre 17 (68%) per *Vibrio* totali con conteggi compresi tra 2,0 x 10<sup>2</sup> e 1,1 x 10<sup>5</sup> CFU per 100 ml (Figura 4). Non è stata trovata alcuna relazione significativa tra i livelli di *Halobacteriovorax* e *Vibrio*. Non sono noti i meccanismi che regolano la specificità d'ospite di *Halobacteriovorax* all'interno di una complessa comunità batterica. *Halobacteriovorax* può colpire un organismo piuttosto che un altro e la misura in cui ciò si verifica rimane da comprendere. Inoltre, l'abbondanza di *Halobacteriovorax* e *Vibrio* può essere soggetta al controllo da parte di batteriofagi, altri predatori, condizioni ambientali, livelli di nutrienti, effetti di microbi concorrenti e sviluppo della resistenza dell'ospite. Infine, un'ulteriore possibile spiegazione di questa mancata correlazione dei livelli preda/predatore potrebbe essere collegata alla diversa velocità della replicazione di *Halobacteriovorax* e *Vibrio*, che impedisce la massima efficienza di competizione tra di loro. L'analisi delle sequenze rRNA 16S ha rivelato che due isolati di *Halobacteriovorax* da 2 campioni raccolti a Marzo in 2 diverse settimane hanno mostrato un'affinità del 100% tra di loro. Inoltre, questi due ceppi hanno mostrato un'affinità del 100% con il ceppo HBXCO1 isolato nella stessa area marina nel 2016 (numero di accesso Gene-Bank MG 770616) e il ceppo M3S4-F, isolato dall'acqua Oceanica della baia di Chesapeake (numero di accesso GenBank JN934563). Un altro ceppo di *Halobacteriovorax* isolato a Maggio ha mostrato un'affinità del 99% con il ceppo Hawaii isolato dall'acqua oceanica delle Hawaii (numero di accesso GenBank DQ631787). Tutti gli isolati di *Halobacteriovorax* hanno mostrato efficienza predatoria nei confronti della maggior parte dei ceppi tossigeni di *Vibrio* testati direttamente o indirettamente collegati al mare Adriatico.

Le placche di lisi diventavano visibili dopo 72 ore e poi le loro dimensioni si espandevano nel tempo, raggiungendo il massimo dopo 5 giorni di incubazione a 26°C. Alla fine dell'incubazione, il diametro delle placche di lisi era simile a quello della preda primaria, compreso tra 7 e 9 mm di diametro. In conclusione, *Halobacteriovorax* indigeni predatori di *V. parahaemolyticus* sono presenti nell'acqua di mare dell'Adriatico centrale dove, probabilmente, svolgono un ruolo fisiologico, come modulatori naturali. Sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere meglio i meccanismi attraverso i quali *Halobacteriovorax* riesca a modulare *V. parahaemolyticus* e altri vibrioni in un ecosistema marino complesso e l'effetto complessivo che esercitano sulla struttura delle comunità microbiche.

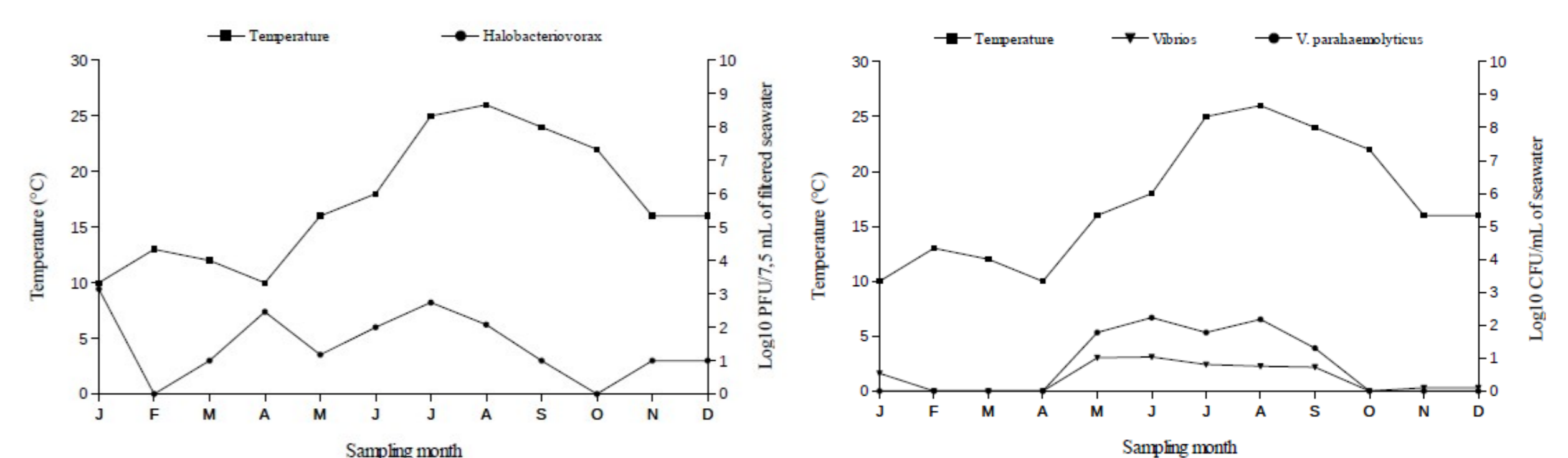


Figura 4. Andamento temporale di *Halobacteriovorax* (A) *V. parahaemolyticus* e vibrioni totali (B) in rapporto alla temperatura dell'acqua di mare

## Bibliografia

- ISO/TS 21872-1: 2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. — Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* International Organization for Standardization (ISO) 1, Chemin de la Voie Creuse, case postale 56, CH-1211 Geneva 20, Switzerland (2017).
- Koval, S.F., Williams, H.N. & Stine, O.C. (2015). Reclassification of *Bacteriovorax marinus* as *Halobacteriovorax marinus* gen. nov., comb. nov. and *Bacteriovorax litoralis* as *Halobacteriovorax litoralis* comb. nov.; description of *Halobacteriovoraceae* fam. nov. in the class *Deltaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 593–597.
- Masini, L., De Grandis, G., Principi, F., Mengarelli, C., & Ottaviani, D. (2007). Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). *Water Research*, 41, 4031-4040.
- Ottaviani, D., Masini, L., Bacchiocchi, S., 2003. A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of *Vibrio* in seafood. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1277–1284.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Canonico, C., Potenziani, S., Santarelli, S., et al. (2010). *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66, 452-455.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Mioni, R., Costa, A., Virgilio, S., et al. (2013). An extensive investigation into the prevalence and the genetic and serological diversity of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* in Italian marine coastal waters. *Environmental Microbiology*, 15, 1377-1386.
- Ottaviani D., Medici L., Talevi G., Napoleoni M., Serratore P., Zavatta E., et al (2018a) Molecular characterization and drug susceptibility of non-O1/O139 *V. cholerae* strains of seafood, environmental and clinical origin, Italy Food Microbiology 72, 82-88.
- Ottaviani, D., Chierichetti, S., Angelico, G., Forte, C., Rocchegiani, E., Manuali, E., & Leoni, F. (2018b). *Halobacteriovorax* isolated from marine water of the Adriatic sea, Italy, as an effective predator of *Vibrio parahaemolyticus*, non-O1/O139 *V. cholerae*, *V. vulnificus*. *Journal of Applied Microbiology*, 4, 1199-1207.
- Pineiro, S.A., Stine, O. C., Chauhan, A., Steyert, S. R., Smith, R. & Williams, H. N. (2007). Global survey of diversity among environmental saltwater *Bacteriovoracaceae*. *Environmental Microbiology*, 9, 2441–2450.
- Richards, G.P., Fay, J.P., Dickens, K.A., Parent, M.A., Soroka, D.S., & Boyd, E.F. (2012). Predatory bacteria as natural modulators of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater and oysters. *Applied Environmental Microbiology*, 78, 7455–7466.
- Richards, G.P., Watson, M.A., Boyd, E.F., Burkhardt, W.III., Lau, R., Uknalis, J., & Fay, J.P. (2013). Seasonal levels of the *Vibrio* predator *Bacteriovorax* in Atlantic, Pacific and Gulf Coast seawater. *International Journal of Microbiology*, Article ID 375371, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/375371>.
- Richards, G.P., Fay, J.P., Uknalis, J., Olanya, O.M., & Watson, M.A. (2016). Purification and host specificity of predatory *Halobacteriovorax* isolates from seawater. *Applied Environmental Microbiology*, 82, 922–927.
- Williams, H.N., Lymperopoulou, D.S., Athar, R., Chauhan, A., Dickerson, T.L., Chen, H., et al. (2015). *Halobacteriovorax*, an underestimated predator on bacteria: potential impact relative to viruses on bacterial mortality. *ISME Journal*, 10, 491-499.