

Ricerca di *Vibrio splendidus* e delle specie correlate in esemplari di *Chamelea gallina* prelevati nel tratto di mare Adriatico antistante la regione Abruzzo

Marina Torresi⁽¹⁾, Vicdalia A. Acciari⁽¹⁾, Annamaria Piano⁽²⁾, Patrizia Serratore⁽²⁾, Vincenza Prencipe⁽¹⁾ & Giacomo Migliorati⁽¹⁾

Riassunto

Le specie del genere *Vibrio*, ampiamente diffuse nell'ambiente marino, sono potenzialmente patogene per vertebrati e invertebrati marini. Il presente studio ha avuto l'obiettivo di identificare le specie di *Vibrio*, in particolare *Vibrio splendidus* e specie ad esso correlate, in campioni di *Chamelea gallina* (vongola) prelevate nel tratto di mare Adriatico antistante la regione Abruzzo nel periodo Maggio-Ottobre 2007. I microrganismi isolati dai 37 campioni sono stati caratterizzati fenotipicamente e classificati come specie appartenenti al genere *Vibrio*. In particolare, per l'identificazione di *V. splendidus* sono state effettuate analisi biochimiche secondo lo schema di Alsina. Per confermare gli isolati caratterizzati biochimicamente e per identificare *V. splendidus* e le specie ad esso correlate sono stati utilizzati rispettivamente analisi molecolari della regione intergenica 16S-23S e sequenziamento del gene *recA*. Tutti i campioni sono risultati contaminati da specie di *Vibrio* alofile; è stata riscontrata una maggior frequenza di isolamento per *V. alginolyticus*, *V. splendidus* e specie ad esso correlate e *V. mediterranei*. Le analisi molecolari effettuate hanno confermato l'impossibilità di identificare tutte le specie del genere *Vibrio* con la caratterizzazione fenotipica. I risultati ottenuti hanno dimostrato come il sequenziamento del gene *recA* consenta una discriminazione

maggiore rispetto a quello del 16S rDNA. L'attribuzione delle specie nel gruppo *V. splendidus*-related risulta tuttavia ancora controversa.

Parole chiave

Abruzzo, *Chamelea gallina*, Gene *recA*, Mare Adriatico, *Vibrio splendidus*, *Vibrio* spp.

Introduzione

Il genere *Vibrio* attualmente comprende circa 81 specie di bacilli Gram negativi, alofili, non sporigeni, ampiamente distribuiti negli ambienti marini e negli estuari (18).

Diverse specie sono state implicate in focolai di infezioni gastrointestinali nell'uomo legati al consumo di molluschi bivalvi e di prodotti ittici crudi o poco cotti. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* sono le specie del genere *Vibrio* più frequentemente isolate nelle infezioni intestinali nell'uomo.

Altre specie costituiscono potenziali agenti eziologici di patologie infettive negli animali marini sia vertebrati che invertebrati. Tra questi *Vibrio splendidus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio lentus*, *Vibrio salmonicida* e *Vibrio anguillarum* sono stati ripetutamente segnalati come responsabili di infezione. *V. splendidus* non è patogeno per l'uomo mentre è dimostrata la sua patogenicità in numerose specie ittiche tra cui molluschi

(1) Istituto 'G. Caporale' Teramo, via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
m.torresi@izs.it, g.migliorati@izs.it

(2) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, viale Vespucci, 2, 47042 Cesenatico (FC), Italia

bivalvi (10) e pesci teleostei (8). Inoltre, *V. splendidus* è stato isolato in numerosi episodi di moria di larve di *Crassostrea gigas* (ostrica) e *Pecten jacobaeus* (cappasanta) in Francia (12) e in larve di *Scophthalmus maximus* (rombo) in Spagna (9). Studi recenti effettuati dal Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università degli Studi di Bologna e dal Centro Ricerche Marine di Cesenatico, hanno ipotizzato che alcuni episodi di moria di *Chamelea gallina* (vongola) avvenuti nelle acque del mar Adriatico possono essere correlati con la presenza di *V. splendidus* (16).

Dati bibliografici mostrano come l'identificazione delle specie appartenenti al genere *Vibrio* richieda analisi biochimiche, applicazioni molecolari e soprattutto analisi genetiche che permettano di distinguere specie fortemente affini. È stato dimostrato come il sequenziamento del 16S rDNA non sia sufficientemente discriminante e come il gene *recA*, codificante per la proteina multi-funzionale ricombinasi A (*recA*), coinvolta nella ricombinazione omologa e nella riparazione del DNA, sia un valido marker filogenetico alternativo per l'identificazione delle specie del genere *Vibrio* (17).

Studi effettuati negli ultimi 10 anni sottolineano un'elevata presenza di *Vibrio* spp. nei mari italiani, in particolare nelle acque antistanti le coste adriatiche settentrionali (4) e centrali (3, 14, 22) e le coste del mar Ionio (6), tuttavia non esistono ad oggi indagini simili inerenti le acque antistanti le coste abruzzesi.

Il presente studio si propone di effettuare la ricerca e l'identificazione di *Vibrio* spp. in campioni di *C. gallina* prelevati nel tratto antistante le coste abruzzesi e molisane evidenziando la distribuzione delle specie di *Vibrio*, in particolare, quella del *V. splendidus* e di specie altamente affini dette *V. splendidus*-related.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto nel periodo compreso tra maggio e ottobre 2007. Complessivamente sono stati esaminati 37 campioni (circa 500 g) di *C. gallina* prelevati

nel tratto di mare antistante le regioni Abruzzo e Molise a 500, 750 o 1000 m dalla costa. I campioni sono stati trasportati a temperatura di refrigerazione ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) ed esaminati entro le 24 h dal prelievo. Per l'identificazione di *V. splendidus* sono stati impiegati come controllo i ceppi di riferimento ATCC 33125, ATCC 25914 e ATCC 33870 (LGC Promochem, Milano, Italia).

Ricerca e identificazione biochimica

Da ogni campione sono stati prelevati 25 g di polpa e liquido intervalvare, trasferiti in una busta stomacher contenente 225 ml di Alkaline Peptone Water (APW). Sono state effettuate la ricerca e l'identificazione di *Vibrio* spp. secondo quanto prescritto dalla norma ISO 21872-2:2007 (2). L'incubazione è stata effettuata alle temperature di $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$, quest'ultima in ragione di una miglior capacità di crescita da parte del *V. splendidus*. Le colonie sospette per *Vibrio* spp. sono state identificate biochimicamente applicando lo schema identificativo proposto da Alsina (1).

Analisi molecolari: polymerase chain reaction (PCR)

Tutte le specie isolate e identificate biochimicamente come *Vibrio* sono state sottoposte all'amplificazione del tratto intergenico 16S-23S specifico per *V. splendidus*. Sui positivi è stata effettuata l'amplificazione del gene *recA*. Per ciascuna specie fatta crescere su terreno Tryptic Soy Agar al 2% di NaCl per 48 h a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ è stata allestita una sospensione con 1 ml di Tris-EDTA (50 mM Tris-HCl pH 8,0-1mM EDTA pH 8,0) in seguito sottoposta a centrifugazione (Eppendorf 5402 rotore F-45-18-11, Milano, Italia) a 15000 g per 5 min a 4°C . Il pellet ottenuto è stato ricostituito in 300 μl di Tris-EDTA e scaldato a 100°C per 15 min per determinare la lisi cellulare. Dopo ulteriore centrifugazione a 15000 g per 5 min a 4°C il surnatante, contenente il DNA, è stato trasferito in provetta.

Per l'amplificazione del tratto intergenico (Intergenic Spacer, IGS) compreso tra 16S e 23S rDNA (13) e del gene *recA* (20) sono stati utilizzati i primer (MWG, Ebersberg - Germania) elencati in Tabella I.

Per l'amplificazione del tratto intergenico, è stata preparata una miscela di reazione con un volume finale di 50 µl contenente 25 µl di PCR master mix (Promega, Madison – USA), 0,5 µM di ciascun primer e 2 µl di DNA (circa 100-175 ng). La reazione è stata effettuata in un termociclatore iCycler (Biorad, Hercules – USA) alle seguenti condizioni: 1 ciclo di 10 min a 94°C, 35 cicli di 1 min a 94°C, 1,5 min a 53°C, 2,5 min a 72°C, 1 ciclo finale di 10 min a 72°C.

Per l'amplificazione del gene *recA* è stata preparata una miscela di reazione con un volume finale di 50 µl, contenente, 25 µl di PCR master mix, 1 µM di ciascun primer, 0,5 µM di MgCl₂ e 2 µl di DNA (circa 100-175 ng). La reazione è stata realizzata alle seguenti condizioni: 1 ciclo di 10 min a 94°C, 35 cicli di 1 min a 94°C, 1,5 min a 53°C, 2,5 min a 72°C e 1 ciclo finale di 10 min a 72°C.

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% (Agarose D-1- LOW EEO, Eppendorf, Milano – Italia) contenente Sybr safe 0,25X (Invitrogen, Oregon – USA). Le bande sono state visualizzate mediante transilluminatore a raggi UV e fotografate con l'ausilio del software Chemilmager 5500 (Cell Biosciences, Santa Clara – USA). Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato AmpliSize™ Molecular Ruler 50-2000 pb Ladder (Biorad).

Analisi genetiche: sequenziamento del gene *recA*

La reazione di sequenza è stata effettuata preparando una miscela di reazione, del volume finale di 10 µl, contenente 2 µl BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Buffer 5X (Applied Biosystems, Carlsbad – USA), 1 µl di BigDye® Ready Reaction mix (Applied

Biosystems), 16nM primer *recA* (Tabella I) e 1-3 µl di DNA purificato (QIAquick® Gel Extraction Kit, Quiagen, Hilden – Germania). Il profilo termico utilizzato ha compreso 25 cicli di 10 sec a 96°C, 10 sec a 58°C, 2,5 min a 60°C.

I prodotti della reazione di sequenza sono stati purificati aggiungendo 10 µl di acqua nucleasi free, 50 µl di etanolo al 96% e 2 µl di sodio acetato 3M, lasciati a temperatura ambiente per 15 min e centrifugati a 14000 g per 20 min. Al pellet sono stati aggiunti 200 µl di etanolo al 70% che è stato eliminato dopo aver centrifugato per 5 min. Il pellet è stato asciugato a temperatura ambiente per 45 min. I prodotti, sospesi in 25 µl di formammide, sono stati denaturati per 2 min a 95°C e caricati nel sequenziatore automatizzato ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Analisi delle sequenze

Le sequenze nucleotidiche relative a ciascuna specie isolata sono state corrette utilizzando il programma ProSeq (version 3.0; Bio-Soft.net [en.bio-soft.net/format/ProSeq.html]) e allineate mediante il programma ClustalX (www.clustal.org) (21). Per effettuare l'analisi genetica e analizzare le relazioni filogenetiche esistenti tra le diverse specie riscontrate, sono stati costruiti alberi filogenetici secondo il metodo statistico Neighbor-Joining, utilizzando la distanza genetica p-distance e impiegando il software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (version 4.0; [www.megasoftware.net/mega4/mega.html]). Le sequenze dei campioni ottenute sono state confrontate con quelle depositate nel database GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) utilizzando il programma on line Basic Local Alignment Search Tool nucleotide (BLASTn) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Tabella I

Primer per l'amplificazione del tratto intergenico (IGS) 16S-23S e per l'amplificazione e sequenziamento del gene *recA*

Gene target	Primer	Sequenza (5'→3')	Lunghezza (pb)	Dimensione dell'amplicone (pb)
IGS 16S-23S rDNA	VSPN-F	GATTTAGTTAAAGCCAGAGC	20	240, 294
	VSPN-R	CCTGATAACTGTTTGCCG	18	
<i>recA</i> gene	<i>recA</i> -F	TGARAARCARTTYGTAAAGG	21	837
	<i>recA</i> -R	TCRCCNITRTAGCTRTACC	19	

Risultati

I 37 campioni esaminati sono risultati tutti contaminati da *Vibrio* spp. Complessivamente, con metodi biochimici, sono stati identificati 131 isolati appartenenti al genere *Vibrio*. Utilizzando lo schema di Alsina, è stato possibile ottenere l'identificazione a livello di specie per 100 isolati. Sulla base delle analisi biochimiche *V. alginolyticus* è stata la specie isolata con più frequenza seguita da *V. splendidus* biovar II (Figura 1).

Le analisi biochimiche hanno permesso l'identificazione di 28 isolati di *V. splendidus* biovar II e di 1 isolato di *V. splendidus* biovar I, evidenziando la presenza del batterio nel 46% dei campioni prelevati. Rispetto all'identificazione biochimica per *V. splendidus*, l'amplificazione del tratto intergenico 16S-23S condotta sui 131 isolati, ha confermato come veri positivi solo 25 dei 29 isolati e 98 dei 102 isolati come veri negativi.

I 29 ceppi produttori di ampliconi delle dimensioni attese sono stati successivamente sottoposti al sequenziamento automatizzato del gene *recA*. Un frammento del gene di circa 720 pb corrispondente al 68% della regione codificante è stato amplificato e sequenziato. Il dendrogramma prodotto con le sequenze del

gene *recA* ha evidenziato come tutti gli isolati, tranne uno, fossero compresi nel cluster noto come "*V. splendidus*-related group" e avessero una similarità del gene *recA* tra l'87% e il 100%. Questo cluster è risultato suddiviso in due subcluster principali:

- il primo contenente i ceppi di riferimento di *V. chagasii* AJ580874 e AJ580875, ha incluso 11 ceppi isolati nella presente ricerca e ha presentato sequenze con similarità tra il 96% e il 100%;
- il secondo cluster contenente il ceppo di riferimento di *V. splendidus* AJ580878 e di specie affini (*V. cyclitrophicus*, *V. lentus*, *V. kanaloe*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*) ha incluso i restanti 17 ceppi con similarità tra il 90,4% e il 100%.

In particolare, l'unico ceppo non incluso (GenBank accession number: JF432064) nel "*V. splendidus*-related group" si è collocato ai margini del cluster non trovando sequenze con similarità nucleotidica superiore all'82% nel database consultato. L'albero filogenetico, costruito secondo il metodo statistico Neighbour-Joining (N-J) sulla base della distanza genetica p-distance, è riportato in Figura 2. Il dendrogramma riporta i 29 ceppi di "*V. splendidus*-related" isolati nel corso della presente ricerca, i ceppi ATCC 33125, ATCC

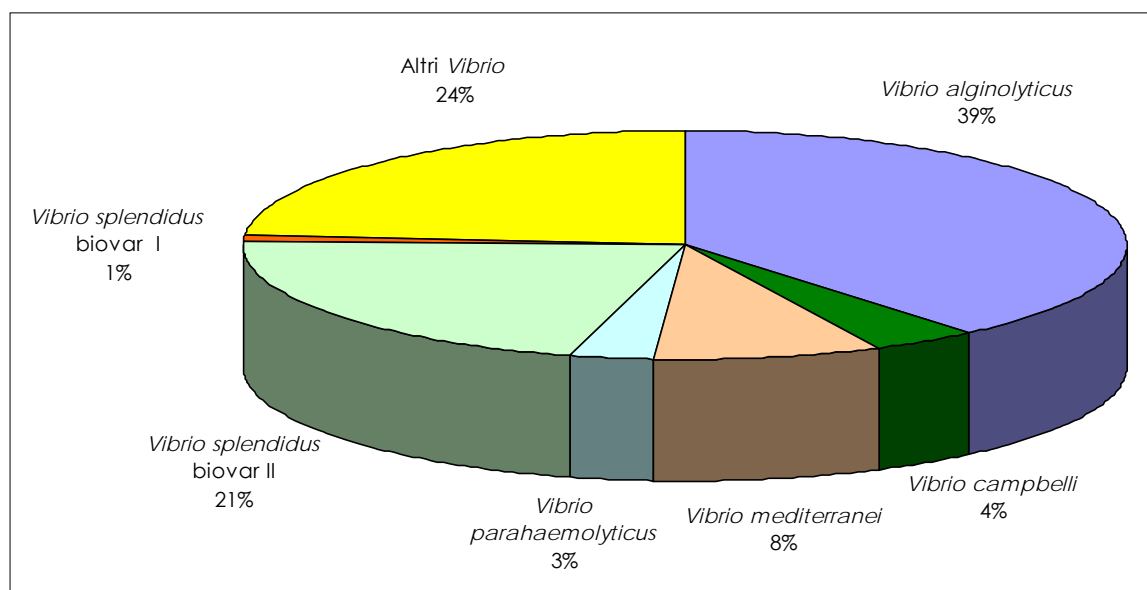


Figura 1 Percentuali delle specie di *Vibrio* identificate mediante analisi biochimiche

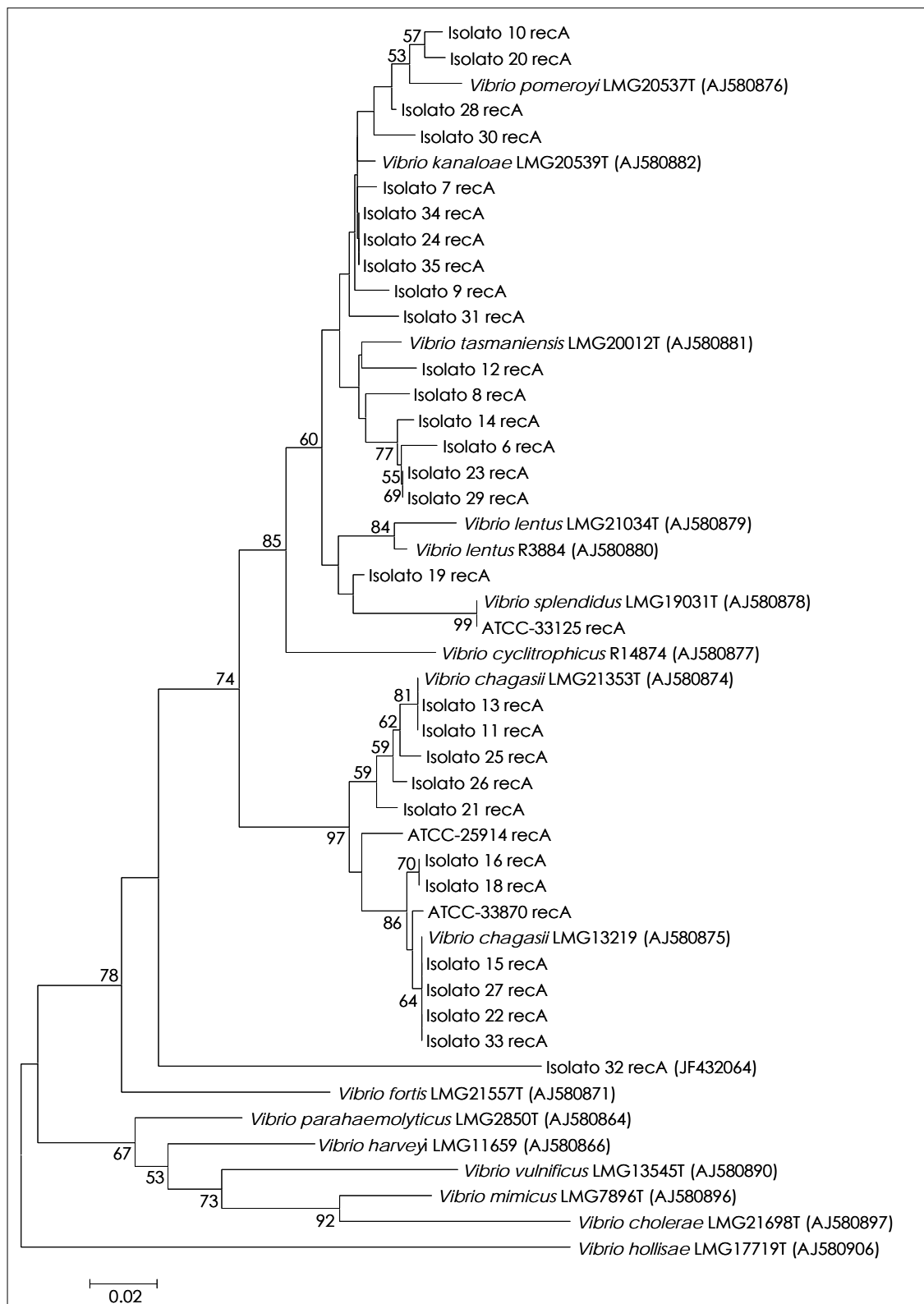


Figura 2

Albero filogenetico ottenuto dall'allineamento delle sequenze del gene *recA* relative ai ceppi isolati nella presente ricerca, agli ATCC sequenziati nella presente ricerca e sequenze di confronto prelevate dalla banca dati GenBank

Tali sequenze sono precedute dal numero di accesso

Il dendrogramma è stato costruito secondo il metodo statistico Neighbour-Joining, utilizzando la distanza genetica p-distance

In corrispondenza dei nodi sono mostrati i valori di bootstrap superiori al 50 %, con 1000 simulazioni

24910, ATCC 33870 e le 16 sequenze di riferimento prelevate dalla banca dati GenBank (*G. hollisae* AJ580906, *V. chagasii* AJ580874, *V. chagasii* AJ580875, *V. cholerae* AJ580897, *V. cyclitrophicus* AJ580877, *V. fortis* AJ580871, *V. harveyi* AJ580866, *V. lentus* AJ580879, *V. lentus* AJ580880, *V. kanaloae* AJ580882, *V. mimicus* AJ580896, *V. parahaemolyticus* AJ580864, *V. pomeroiyi* AJ580876, *V. splendidus* AJ580878, *V. tasmaniensis* AJ580881 e *V. vulnificus* AJ580890).

Discussione

La distribuzione delle specie di *Vibrio* ottenuta mediante analisi biochimiche è in accordo, fatta eccezione per il mancato isolamento di *Vibrio harveyi*, con alcuni precedenti lavori che riportano tra le specie più frequentemente isolate *V. alginolyticus* seguito da *V. harveyi*, *V. mediterranei* e *V. splendidus II* (5, 6, 14). In particolare, nel presente studio, la frequenza dei ceppi di *V. splendidus II* isolati nel tratto di mare delle regioni Abruzzo e Molise è risultata maggiore rispetto a quella riscontrata lungo le coste delle Marche e il golfo di Taranto ma minore rispetto a quella riscontrata lungo le coste della Galizia in Spagna.

Il confronto dei risultati ottenuti per *V. splendidus* mediante analisi fenotipiche e molecolari ha evidenziato, per l'identificazione mediante metodi biochimici, 4 falsi positivi e 4 falsi negativi.

A conferma della complessità del gruppo correlato a *V. splendidus*, gran parte degli isolati positivi alla PCR del tratto intergenico 16S-23S relativo a *V. splendidus*, sono stati successivamente identificati come *V. chagasii*, *V. pomeroiyi*, *V. tasmaniensis* e *V. kanaloae* mediante sequenziamento del gene *recA*. E' da sottolineare come i ceppi di riferimento *V. splendidus* ATCC 25914 e ATCC 33870 siano risultati appartenere al subcluster contenente i ceppi di riferimento *V. chagasii* AJ580874 e AJ580875 e non a quello contenente il ceppo di riferimento *V. splendidus* AJ580878.

Il più elevato riscontro di ceppi di *V. splendidus* e nel contempo il mancato isolamento di *V. harveyi*, potrebbero essere dovuti a una maggiore attenzione nell'isolamento di *V. splendidus*, target del presente studio e a

punti di prelievo posti ad una profondità tale da presentare temperature più idonee a *V. splendidus*. Difatti, nello studio condotto lungo le coste della riviera del Conero (Ancona) si è evidenziato come a temperature comprese tra 15 e 20°C, *V. splendidus II* sia la specie più frequente insieme a *V. mediterranei*. In queste condizioni è risultato più raro l'isolamento di *V. harveyi* (14). Questi aspetti rendono necessari ulteriori studi finalizzati ad approfondire la relazione tra le caratteristiche chimico-fisiche della zona di prelievo e le specie di *Vibrio* presenti.

La presenza di isolati risultati falsi positivi o falsi negativi ha confermato come le analisi fenotipiche forniscano informazioni insufficienti per l'identificazione di specie nel gruppo "*V. splendidus related*", confermando l'impossibilità di distinguere molte delle specie di *Vibrio*, soprattutto se strettamente correlate, solo sulla base di prove biochimiche (19).

Le analisi condotte hanno confermato il sequenziamento del gene *recA* come valida alternativa a quello del gene 16S rDNA, che in precedenti studi non ha permesso, per alcuni isolati, l'identificazione delle specie di *Vibrio* (17, 20). Il sequenziamento del gene *recA* ha reso possibile la differenziazione di specie altamente correlate, non distinguibili mediante analisi fenotipiche o PCR del tratto intergenico 16S-23S e, nel contempo, ha evidenziato l'elevata affinità genetica tra gli isolati appartenenti al cluster "*V. splendidus-related*" già messa in risalto in lavori precedenti (5, 18, 20). La suddivisione degli isolati analizzati nei due cluster principali comprendenti il ceppo di riferimento di *V. chagasii* e i ceppi di riferimento di *V. splendidus* e di specie affini quali *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroiyi*, *V. tasmaniensis* coincidono con quelli mostrati da altri autori utilizzando il sequenziamento dei geni *recA* e *atpA* (18), analisi multilocus di altri target (16S rDNA, *rpoA* e *pyrH* e *recA*) (20) e Amplified Fragment Length Polymorphism AFLP (5). Le sequenze dei ceppi analizzati hanno mostrato elevate percentuali di appaiamento con quelle contenute nel database GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).

L'elevata similarità genetica riscontrata tra i cluster comprendenti i ceppi di riferimento di

V. splendidus e di *V. chagasii* può essere spiegata come il risultato dell'adattamento di nicchia considerata la loro coesistenza nello stesso ambiente (7, 20). Come suggerito da Cohan, la selezione naturale rappresenta la principale forza guida nell'evoluzione delle specie batteriche e la trasmissione orizzontale di geni tra specie simili costituisce un mezzo evolutivo basilare nel genere *Vibrio* (7). Studi recenti hanno evidenziato numerosi eventi di trasferimento genico orizzontale, inteso come processo di nuove acquisizioni e dislocamenti di geni paraloghi che, in *V. cholerae*, ad esempio, interessano una porzione consistente del genoma (5,6%) (11).

L'unico isolato non incluso nel cluster "*V. splendidus*-related group" ha permesso di ipotizzare l'esistenza di una specie attualmente non nota, aspetto non raro e in accordo con quanto rilevato da altri autori che affermano come il numero di specie attualmente ascrivibili al genere *Vibrio* sia in continuo cambiamento e con prevedibili descrizioni di nuove specie negli anni a venire (15). In un recente studio su molluschi bivalvi (5) non è stato possibile, per il 12% degli isolati di *Vibrio*, ottenere l'identificazione di specie attraverso metodi molecolari.

Attualmente la frequenza di riscontro di specie non identificabili rende necessari ulteriori studi improntati ad un approccio multigenico innovativo per poter lavorare su più target aumentando di conseguenza la probabilità di identificare correttamente tutte le specie di *Vibrio*.

Bibliografia

1. Alsina M. & Blanch A.R. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol*, **76**, 79-85.
2. Anon. 2007. ISO/TS 21872-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. – Part 2: Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. International Organization for Standardization, Geneva, 24 pp.
3. Baffone W., Pianetti A., Bruscolini F., Barbieri E. & Citterio B. 2000. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int J Food Microbiol*, **54**, 9-18.
4. Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casiere A., Katouli M., Kühn I., Möllby R., Bruscolini F. & Donelli G. 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2748-2753.

Conclusioni

Questo studio ha evidenziato che:

- molluschi bivalvi prelevati lungo le coste italiane ospitano una varia e dinamica comunità di *Vibrio* spp., una frazione delle quali appartenenti a specie *Vibrio splendidus*-related;
- molte specie di *Vibrio* risultano di difficile identificazione utilizzando i metodi convenzionali;
- il sequenziamento del gene *recA* contribuisce ad un'identificazione più precisa rispetto a quelle ottenute in precedenti studi basati sull'analisi biochimica o PCR della regione spacer 16S-23S intergenica;
- una frazione di *Vibrio* spp. risulta tuttavia difficile da classificare esclusivamente con il sequenziamento del gene *recA* confermando la necessità di utilizzare più marcatori genetici per migliorare la discriminazione di tutte le specie di *Vibrio* attualmente conosciute.

Supporto finanziario

Questo studio è stato condotto nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

5. Beaz-Hidalgo R., Cleenwerck I., Balboa S., De Wachter M., Thompson F.L., Swings J., De Vos P. & Romalde J.L. 2008. Diversity of vibrios associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Syst Appl Microbiol*, **31**, 215-222.
6. Cavallo R.A. & Stabili L. 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Res*, **36**, 3719-3726.
7. Cohan F.M. 2004. Concepts of bacterial diversity for the age of genomics. In *Microbial genomes* (C.M. Fraser, T.D. Read, & K.E. Nelson, eds). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 175-194.
8. Farto R., Montes M., Pérez M.J., Nieto T.P., Larsen J.L. & Pedersen K. 1999. Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *J Appl Microbiol*, **86**, 796-804.
9. Gatesoupe F.J., Lambert C. & Nicolas J.L. 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Microbiol*, **87**, 757-763.
10. Gómez-León J., Villamil L., Lemos M.L., Novoa B. & Figueras A. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 98-104.
11. Koonin E.V., Makarova K.S. & Aravind L. 2001. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu Rev Microbiol*, **55**, 709-742.
12. Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cuff A., Gelebart F., Cordevant C., Lange M. & Poulet S.A. 2001. A *Vibrio splendidus* strain associated with summer mortality of juvenile oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ*, **46**, 139-145.
13. Lee S.K.Y., Wang H.Z., Law S.H.W., Wu R.S.S. & Kong R.Y.C. 2002. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Mar Pollut Bull*, **44**, 412-420.
14. 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 Res*, **41**, 4031-4040.
15. Noguerola I. & Blanch A.R. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *J Appl Microbiol*, **105**, 175-185.
16. Serratore P., Cattani O., Vitali G., Bosi S., Milandri S., Buda D. & Zoffoli S. 2001. Factors influencing mortality in *Chamelea gallina* populations: identifications of associated bacteria and their metabolic effects. *Ital J Biochem*, **50** (1-2), 62-63.
17. Thompson C.C., Thompson F.L., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Dawyndt P. & Swings J. 2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**, 919-924.
18. Thompson C.C., Thompson F.L., Vicente A.C.P. & Swings J. 2007. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**, 2480-2484.
19. Thompson F.L., Lida T. & Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 403-431.
20. Thompson F.L., Gevers D., Thompson C.C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C.B. & Swings J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 5107-5115.
21. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The Clustal_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4876-4882.
22. Vernocchi P., Maffei M., Panciotti R., Suzzi, G. & Gardini F. 2007. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). *Food Control*, **18**, 1575-1583.