



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOTECNOLOGIE PER L'ALIMENTAZIONE

Effetto del trattamento di depurazione sulla comunità dei *Vibrio*
presente nel microbiota della vongola *Ruditapes philippinarum*

Relatore

Prof.ssa Barbara Cardazzo

Correlatore

Dott.ssa Angela Zampieri

Laureanda

Beatrice Bocchi

Matricola n. 1182156

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

RIASSUNTO

I molluschi bivalvi sono un prodotto alimentare di grande rilevanza economica per le regioni del Nord-Est Italia, in particolare la regione Veneto è tra i principali produttori europei di vongole della specie *Ruditapes philippinarum*. I bivalvi sono un prodotto molto apprezzato dai consumatori, ma essendo organismi filtratori, possono accumulare al loro interno molte sostanze dannose presenti nelle acque, tra cui sostanze chimiche e batteri patogeni, come quelli del genere *Vibrio*. Per questo, il Reg. (CE) 852/2004 prevede che i molluschi raccolti in zone contaminate possano essere messi in commercio solo previa depurazione. Inoltre, a causa del surriscaldamento globale, negli ultimi anni si è registrato un aumento di *Vibrio* patogeni nei mari, per cui il Ministero della Salute ha emesso delle linee guida che prevedono la ricerca della presenza e dei geni di virulenza di *Vibrio cholerae* (non-O1 e non-O139) e *Vibrio parahaemolyticus* nei molluschi bivalvi destinati al consumo umano.

Il lavoro sperimentale descritto in questa tesi è stato volto a valutare l'efficacia della depurazione sui *Vibrio* presenti nel microbiota di vongole della specie *Ruditapes philippinarum*. I bivalvi, prelevati da un allevamento sito a Chioggia, sono stati depurati in quattro diversi centri di depurazione, che utilizzano metodi di depurazione differenti. Sia i campioni di vongole, sia i campioni di acqua prelevati, sono stati analizzati tramite metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti. In particolare, l'analisi delle colture ha reso possibile una stima quantitativa dei batteri marini (cresciuti su Marine Agar) e dei *Vibrio* (cresciuti su TCBS), presenti nei campioni. Successivamente è stato estratto il DNA da tutti i campioni per creare delle librerie di sequenziamento per i geni 16s rRNA, *pyrH* e *recA*. Dopo aver sequenziato le librerie tramite tecnologia NGS-Illumina, i dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente tramite software bioinformatici, tra cui QIIME 2, CALYPSO e KRAKEN 2. Dalle sequenze 16s si sono poi ottenute informazioni riguardanti la biodiversità batterica e i generi batterici presenti nei campioni; tramite il sequenziamento dei geni *pyrH* e *recA*, è stato invece possibile identificare le specie di *Vibrio* presenti nei campioni di vongole e di acqua.

Il sequenziamento dei marcatori molecolari *pyrH* e *recA*, unito ad un approccio metagenomico di analisi delle sequenze, ha permesso di evidenziare come alcune specie di *Vibrio* patogene per l'uomo permangano nelle vongole, nonostante il processo di depurazione. Infine, unendo i dati ottenuti dalle varie analisi, è stato possibile ipotizzare come i trattamenti di disinfezione delle acque, la temperatura dell'acqua presente nelle vasche di depurazione e la grandezza degli impianti possano influire sulla carica e la biodiversità microbica dei bivalvi depurati.

Il processo di depurazione può quindi risultare inefficace nell'eliminazione dei *Vibrio* patogeni, per cui, in generale, è consigliabile consumare i molluschi bivalvi solo dopo un'adeguata cottura.

Parole chiave: Depurazione, *Vibrio*, *R. philippinarum*.

ABSTRACT

Bivalve molluscs is a food product of great economic importance for regions of North-East Italy, in particularly the Veneto region is among the main European producers of *Ruditapes philippinarum*. Bivalves are much appreciated by consumers, due to their filter feeding habits, they can accumulate many harmful substances in their edible tissues, including chemical substances and pathogenic bacteria, such as *Vibrio*. For this reason, Reg. (EC) 852/2004 established that molluscs collected in contaminated areas are depurated before their sale to the consumer. Moreover, in recent years, due to global warming *Vibrio* human illness related to the pathogens increased for which the Ministry of Health has issued guidelines that require the search for the presence and virulence genes of *Vibrio cholerae* (non- O1 and non-O139) and *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve molluscs destined to human consumption.

The experimental work described in this thesis was aimed for the evaluation of depuration effectiveness on *Vibrio* community present in the clam microbiota of the species *Ruditapes philippinarum*. The bivalves, taken from a farming area located in Chioggia, have been depurated in four different depuration centers, which use different depuration methods. Both the clam samples and the water samples collected were analyzed using culture-dependent and culture-independent methods. In particular, the culture-dependent analysis made possible a quantitative estimation of marine bacteria (grown on Marine Agar) and *Vibrio* (grown on TCBS), present in the samples. Subsequently DNA was extracted from all the samples to create sequencing libraries for the 16s rRNA, *pyrH* and *recA* genes. After sequencing the libraries using NGS-Illumina technology, the data obtained were statistically analyzed using bioinformatics software, including QIIME 2, CALYPSO and KRAKEN 2. From the 16s sequences information regarding the bacterial biodiversity and the bacterial genera present in the samples was obtained; instead, by sequencing the *pyrH* and *recA* genes, it was possible to identify the *Vibrio* species present in the clam and water samples. The sequencing of the *pyrH* and *recA* molecular markers, combined with a metagenomic analysis of the sequences, allowed us to highlight that some species of human pathogenic *Vibrio* remain in clams, despite the depuration process. Finally, by combining the data obtained from the various analysis, it was possible to hypothesize how the water disinfection treatments, the temperature of the water present in the depuration tanks and the size of the plants can influence the charge and the microbial biodiversity of the depurated bivalves. The depuration process can therefore be ineffective in eliminating the pathogenic *Vibrio*, so it is advisable to consume the bivalve molluscs only after an adequate cooking.

Keywords: Depuration, *Vibrio*, *R. philippinarum*.

Indice

1. INTRODUZIONE	9
1.1 I MOLLUSCHI BIVALVI: CARATTERISTICHE BIOLOGICHE	9
1.1.1 <i>Ruditapes philippinarum</i>	12
1.2 RISCHI LEGATI AL CONSUMO DEI MOLLUSCHI BIVALVI.....	15
1.2.1 <i>Rischi Biologici</i>.....	15
1.2.1.2 <i>Batteri patogeni per l'uomo presenti nei molluschi bivalvi</i>	15
1.2 LA MOLLUSCHICOLTURA IN VENETO	19
1.3.1 <i>Allevamento e produzione: le tecniche principali</i>	20
1.3.2 <i>Legislazione</i>.....	21
1.3.3 <i>La depurazione</i>.....	24
1.4 IL MICROBIOTA DEI MOLLUSCHI BIVALVI	29
1.4.1 <i>Vibrio presenti nel microbiota dei molluschi bivalvi</i>	30
1.5 STUDIO DEL MICROBIOTA DEI MOLLUSCHI BIVALVI	31
1.5.1 <i>Metodi Coltura dipendenti</i>	31
1.5.2 <i>Metodi Coltura indipendenti</i>.....	31
1.5.2.1 Analisi del 16s rRNA.....	32
1.5.2.2 Analisi dei geni <i>recA</i> e <i>pyrH</i>	33
1.5.2.3 Il Next Generation Sequencing e la Tecnologia Illumina	34
2. SCOPO.....	36
3. MATERIALI E METODI	37
3.1 CAMPIONAMENTO.....	37
3.2 METODO CULTURA DIPENDENTE.....	37
3.3 METODO CULTURA INDIPENDENTE.....	39
3.3.1 <i>Estrazione del DNA mediante colonnine a scambio ionico</i>	39
3.3.2 <i>Estrazione del DNA per bollitura</i>	40
3.3.3 <i>Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto</i>	41
3.3.4 <i>Preparazione delle Mock Community</i>	41
3.3.2 <i>Preparazione delle librerie per il sequenziamento dei geni 16s rRNA, recA e pyrH</i>	43
3.3.2.1 Primo step di PCR.....	44
3.3.2.2 Purificazione dei prodotti di PCR del primo step.....	47
3.3.2.2 Secondo step di PCR e purificazione	47
3.3.3.3. Creazione del pool finale per il sequenziamento	50
3.4 ANALISI BIOINFORMATICHE.....	51
3.4.1 <i>QIIME 2</i>.....	52

3.4.2 CALYPSO	53
3.4.3 KRAKEN 2	53
4. RISULTATI.....	55
4.1 ANALISI COLTURALE DEI CAMPIONI.....	55
4.2 METODO CULTURA-INDIPENDENTE	57
4.2.2 <i>Analisi delle sequenze 16s</i>	57
4.2.2.1 Curva di rarefazione.....	58
4.2.2.1 Comunità microbiche nei campioni di vongola pre e post depurazione e nei campioni di acqua.....	59
4.2.2.3 Analisi dell'Alpha Diversity: test ANOVA.....	60
4.2.2.4 Analisi della Beta Diversity: RDA	62
4.2.3 <i>Analisi delle comunità di Vibrio nelle vongole pre e post depurazione e nei campioni di acqua</i>	63
4.2.3.1 Specie batteriche identificate.....	63
4.2.3.2 Analisi della Beta Diversity: dbRDA.....	65
5. DISCUSSIONE.....	66
6. CONCLUSIONI.....	72
7. BIBLIOGRAFIA.....	73

1. INTRODUZIONE

1.1 I Molluschi Bivalvi: caratteristiche biologiche

I molluschi bivalvi sono una classe di invertebrati acquatici molto importante dal punto di vista alimentare, che presenta caratteristiche anatomiche e strutturali tipiche del phylum Mollusca.

Sono organismi compressi lateralmente e caratterizzati da una robusta conchiglia ovoidale (Figura 1), composta da due valve uguali (equivalve) incardinate tra loro sul lato dorsale. Le valve sono unite da legamenti elastici e denti, che formano una cerniera, la cui chiusura e apertura è regolata grazie alla contrazione o al rilassamento dei muscoli adduttori. All'interno delle due valve sono racchiusi il corpo e la cavità del mantello.

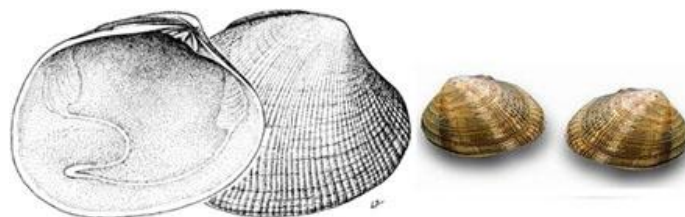


Figura 1. Esempio di mollusco bivalve: *Ruditapes philippinarum* (www.FAO.org)

La conchiglia è costituita da diversi strati calcarei ricoperti da un materiale organico proteico detto periostraco. Gli strati calcarei possono essere costituiti da aragonite o un miscuglio di aragonite e calcite, che incorpora materiale organico. La conchiglia inizia ad essere depositata dalla protuberanza dorsale di ogni valva, detta umbo o umbone (Figura 2), che è la parte più vecchia e il punto dal quale si irradiano le linee concentriche di crescita (Brusca e Brusca, 1996; Trevisan 2011). Il colore della conchiglia è legato dalla presenza di pigmenti, tra cui pirroli e porfirine, mentre il colore degli organi interni è dovuto alla presenza di melanine.

Come tutti i molluschi, i bivalvi sono protostomi celomati a simmetria bilaterale, con celoma ridotto, presente attorno agli organi principali. La cavità corporea, detta emocèle, contiene il **sistema circolatorio** aperto, formato da vari seni separati e un intreccio di vasi nelle branchie, responsabili degli scambi gassosi. L'emolinfa è il sangue che scorre nei vasi ed è costituita da emocianine: dei pigmenti respiratori contenenti rame che legano direttamente l'ossigeno. Il cuore, che pompa l'emolinfa nei vasi, è posto dorsalmente, dentro la camera pericardica, ed è costituito da un paio di atri e un ventricolo.

Il vaso afferente trasporta l'emolinfa povera di ossigeno nelle branchie, dove l'acqua ricca di ossigeno scorre nel senso opposto. L'ossigeno dunque, grazie al gradiente di diffusione, passa nell'emolinfa,

che diventa così di nuovo ossigenata e può essere portata, tramite il vaso efferente, dalle branchie agli atri del cuore.

Il sistema escretore è composto da due nefridi, posti sotto la cavità pericardica, mentre il sistema nervoso è formato principalmente da tre paia di gangli (pedali, cerebro-pleurale, viscerali) e due paia di cordoni nervosi.

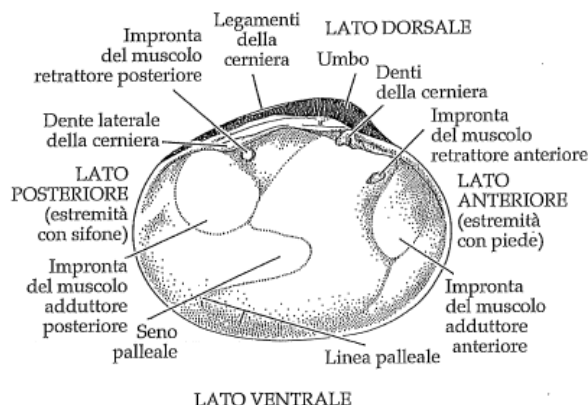


Figura 2. Struttura di un mollusco bivalve (Brusca e Brusca, 1996)

Il corpo dei bivalvi è ricoperto da un **mantello**: un sottile strato epidermico-cuticolare, che avvolge la superficie interna delle valve e separa la massa dei visceri dalla conchiglia. Esso è composto da pliche di vario tipo. La plica più interna contiene i muscoli radiali e circolari che fissano il mantello alla conchiglia. Il punto in cui vi è l'attaccatura del mantello è visibile sottoforma di cicatrice detta linea palleale. La plica mediana svolge funzioni sensorie, mentre la plica esterna è responsabile della secrezione delle sostanze che compongono la conchiglia. Lo spazio presente tra il mantello e la conchiglia prende il nome di spazio extrapalleale ed è il luogo in cui vengono secreti i componenti per la formazione della conchiglia.

Il mantello forma con il corpo uno spazio detto cavità del mantello. In questa cavità si trovano le branchie o ctenidi, ovvero il luogo dove confluiscono, acqua, nutrimento, materiale fecale e i prodotti del sistema escretore e riproduttore.

A livello del bordo posteriore, il mantello è fuso a formare i sifoni inalanti ed esalanti, tramite i quali l'acqua può entrare ed uscire dal bivalve. L'**acqua**, ricca di sostanze nutritive, entra dal sifone inalante e scorre sopra agli ctenidi, i quali hanno il compito di trattenere le particelle alimentari. Poi, grazie alla spinta delle ciglia, passa attraverso strutture riproduttive e ano, raccogliendo sostanze di scarto e uova, per poi fuoriesce dal sifone esalante (Brusca e Brusca, 1996).

I molluschi bivalvi sono detti filtratori sospensivori poiché si nutrono filtrando grandi quantità d'acqua (Trevisan, 2011). Il flusso dell'acqua entra dai sifoni inalanti e passa sopra ad un paio di ctenidi che hanno il compito di incorporare il nutrimento, principalmente composto da fitoplancton e sostanza

organica. La superficie delle branchie in questi organismi è estesa e ricoperta da ciglia branchiali, che intrappolano le particelle alimentari in una rete di muco che verrà poi portata alla bocca.

L'apertura boccale consiste in palpi labiali, che effettuano una cernita delle dimensioni delle particelle inglobate. Se sono a bassa densità vengono trattenute, mentre se sono ad alta densità vengono eliminate nella cavità del mantello, sottoforma di pseudo-feci.

I molluschi bivalvi sono dotati di un esofago, di uno stomaco e di un intestino completo (Figura 3).

Lo stomaco possiede dotti che conducono in ciechi digerenti ghiandolari, che secernono enzimi per la digestione dei nutrienti. Una delle ghiandole associate all'apparato digerente è l'epatopancreas, che ha funzioni specifiche del fegato e del pancreas nei vertebrati, come per esempio la secrezione di enzimi digestivi (Brusca e Brusca, 1996; Milan *et al.*, 2011).

Alla fine dell'intestino si trova l'ano, posto in corrispondenza del sifone esalante, nella cavità del mantello

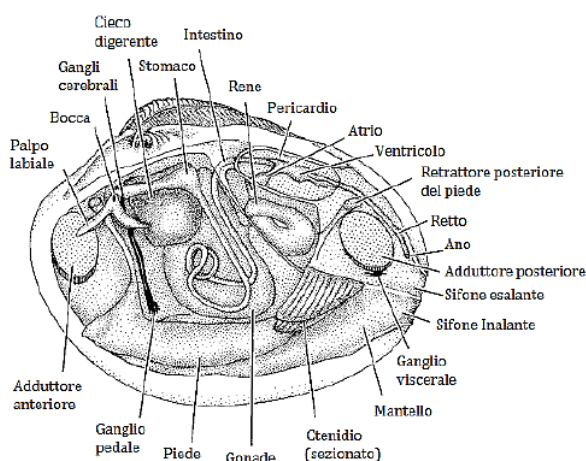


Figura 3. Anatomia di un bivalve (Brusca e Brusca, 1996)

La **locomozione** dei bivalvi avviene grazie alla presenza di un piede compresso lateralmente a forma di lama. Il piede viene diretto in avanti e poi ritratto grazie all'azione congiunta di muscoli e pressione idraulica; questo permette al bivalve di infossarsi nel sedimento anche per una quindicina di centimetri e di ancorarsi alle superfici. I molluschi bivalvi prediligono habitat bentonici molli, in cui potersi affossare, mentre solo alcuni gruppi vivono al di sopra del fondale marino (Brusca e Brusca, 1996; Trevisan 2011).

Gli **organi di senso** si trovano sul margine del mantello. Possono essere presenti ocelli e recettori contenenti sia cellule tattili sia chemorecetttrici. Nel piede, invece, si trovano statocisti responsabili della georecezione dei bivalvi fossori.

La **riproduzione** dei molluschi bivalvi è gonocorica (a sessi separati), con rari casi di ermafroditismo. Le gonadi sono costituite da un tessuto che a maturazione forma una massa biancastra, omogenea e

molle, posta attorno all'apparato digerente. La fecondazione è esterna e lo sviluppo è indiretto, poiché nei primi stadi di sviluppo, dall'uovo fecondato si ha la formazione di una larva trocofora, la quale al termine del processo di metamorfosi andrà ad insediarsi sul fondale. Lo stadio larvale viene trasportato dalla corrente dell'acqua e questo permette ai bivalvi di colonizzare aree sempre più ampie e idonee alla sopravvivenza della specie (Trevisan 2011).

1.1.1 *Ruditapes philippinarum*

Ruditapes philippinarum (Adams & Reeve, 1850) è una specie appartenente alla Classe Bivalvia, famiglia Veneridae (Tabella 1), anche nota come vongola filippina o *Venerupis philippinarum* o *Tapes philippinarum* (NCBI Taxonomy). Ha origine indo-pacifica, ma ad oggi può essere definita ubiquitaria.



Figura 4 *Ruditapes philippinarum* (www.bioimages.org.uk)

Phylum	Mollusca
Classe	Bivalvia
Sottoclasse	Heterodonta
Ordine	Veneroida
Superfamiglia	Veneroidea
Famiglia	Veneridae
Sottofamiglia	Tapetinae
Genere	Tapes
Sottogenere	<i>Ruditapes</i>
Specie	<i>Tapes philippinarum</i> (Adams e Reeve, 1850)
Denominazione	Vongola filippina

Tabella 1. Collocazione sistematica di *Tapes philippinarum* (Trevisan, 2011)

La sua diffusione mondiale iniziò negli anni Trenta, quando venne introdotta accidentalmente nelle coste del pacifico degli Stati Uniti tramite un seme di ostrica importato dal Giappone; successivamente si diffuse dall'Alaska alla California, poi lungo la costa Atlantica Canadese e Statunitense. Venne poi importata nel Regno unito da un ricercatore per degli studi (Trevisan, 2011).

Una volta valutati i requisiti zootecnici di questa specie tra cui la facilità nella riproduzione controllata, la rapida crescita, la resistenza agli stress ambientali e ad agenti patogeni, la delicatezza delle carni, si decise di utilizzarla per scopi produttivi anche in Europa. La produzione in via sperimentale ebbe inizio in Francia, Spagna, Portogallo e Irlanda. In Italia la specie venne introdotta negli anni Ottanta, nel bacino sud della laguna di Venezia, con lo scopo di ampliare il settore produttivo della molluschicoltura, già presente in queste zone.

Negli anni successivi la produzione si estese anche nel Delta del Po, in Sardegna, nel Lazio, nelle lagune di Goro, Marano, Varano e nella Sacca di Goro. *R. philippinarum* si è diffusa rapidamente nelle zone costiere del Nord Adriatico, andando ad occupare una buona parte della nicchia ecologica della specie autoctona *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758), relegandola ad aree sempre più ristrette (Bidegain e Juanes, 2013).

Queste due specie sono facilmente distinguibili, perché *R. philippinarum* presenta sifoni accoppiati per i 2/3, mentre in *T. decussatus* sono completamente separati.

T. philippinarum è una specie definita rustica, in grado di adattarsi a cambiamenti dei parametri ambientali (Tabella 2) e a sedimenti di diverso tipo, pur privilegiando fondali fangoso-sabbiosi.

Parametro	Limite vitale	Limite ottimale
Temperatura (°C)	> 0-31	16-23
Salinità (ppm)	> 13-50	25-35
pH	7,8-8,2	
Ossigeno disciolto (mg/l)	>3,56	6-8
Ossigeno disciolto % saturazione	>40	85-110
Clorofilla (µg/l)	0,312-23,16	>2 - <11
Sedimenti in sospensione	0-100	0-20
Tempo di emersione (%)	0-80	0-10

Tabella 2. Parametri ambientali di *R. philippinarum* (Trevisan, 2011)

Questo mollusco bivalve può raggiungere dimensioni massime di circa 8 cm, anche se in genere si rinvencono esemplari di 30-40 mm. La sua crescita è influenzata da molteplici fattori, tra i quali il cambiamento dei parametri ambientali, il ciclo biologico e le condizioni di allevamento.

I tassi di accrescimento raggiungono i livelli massimi nei primi due anni di vita, con picchi in primavera-estate, grazie all'aumento della temperatura dell'acqua e all'abbondanza di fitoplancton.

La crescita rallenta in inverno, quando le temperature scendono sotto i 5-6°C (Trevisan 2011).

I veneridi sono ad oggi diffusi in tutto il mondo con oltre 400 specie. Sono molto apprezzati dal punto di vista alimentare per la qualità delle loro carni, tanto da essere oggetto di una pesca intensiva e specifiche tecniche di allevamento (venericoltura).

Vista l'importanza che *R. philippinarum* ha assunto nel settore della produzione alieutica, l'Unione Europea ha stabilito, tramite il Regolamento CE n.708/2007, che tale specie possa essere liberamente usata per l'acquicoltura, senza l'obbligo di osservare le prescrizioni previste per le specie alloctone (Trevisan 2011).

A livello globale, nel 2016, la produzione di molluschi derivante dall'acquicoltura è stata di 17,1 milioni di tonnellate, di cui 4 229 tonnellate, ovvero il 25%, riguardanti solo la specie *R. philippinarum*. La Cina è in assoluto il primo produttore di molluschi marini, mentre l'Italia si trova al decimo posto, dopo Stati Uniti d'America e Francia (FAO, 2018).

1.2 Rischi legati al consumo dei molluschi bivalvi

I molluschi bivalvi sono un prodotto molto apprezzato dai consumatori perché fanno parte di una dieta varia ed equilibrata, forniscono una sana fonte di energia, proteine di alta qualità e una vasta gamma di altri importanti nutrienti. Il consumo di questi molluschi favorisce lo sviluppo cognitivo e visivo ed è raccomandato nei regimi dietetici per la riduzione di malattie coronariche.

Allo stesso tempo, però, i molluschi bivalvi sono riconosciuti a livello internazionale come potenziali veicoli di malattie a trasmissione alimentare. Essendo organismi filtratori, tendono a trattenere e concentrare, oltre al nutrimento, sostanze dannose presenti nell'ambiente acquatico come: biotossine algali, metalli pesanti (mercurio, cromo, piombo, cadmio, arsenico), idrocarburi (in particolar modo i policiclici), pesticidi ed erbicidi, virus e batteri.

Quindi il consumo di questi prodotti espone l'uomo sia a rischi chimici, sia a rischi biologici (Crovato *et al.*, 2019; Losasso *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2008; Ryder *et al.*, 2014).

1.2.1 Rischi Biologici

A livello mondiale i principali rischi associati al consumo di molluschi derivano dalla contaminazione microbiologica delle acque in cui crescono, in particolar modo quando i molluschi bivalvi sono destinati a essere consumati crudi.

I principali virus e batteri patogeni riscontrabili nei molluschi possono causare nell'uomo gastroenteriti batteriche o virali, epatiti infettive e febbre tifoidea. In particolare, i virus patogeni per l'uomo più frequentemente ritrovati nei molluschi sono il Norovirus e l'Epatite A (Ryder *et al.*, 2014)

Oltre ai microrganismi responsabili di infezioni o focolai associati ai molluschi, ci sono altri agenti patogeni umani la cui forma infettiva è stata ritrovata nei molluschi. Questi includono protozoi come *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* e Microsporidi: parassiti intracellulari obbligati. Attualmente però non esistono prove che il consumo di molluschi contaminati da questi parassiti abbia causato nelle persone la malattia ad essi associata (Lee *et al.*, 2008; Hirt *et al.*, 1999)

1.2.1.2 Batteri patogeni per l'uomo presenti nei molluschi bivalvi

I batteri patogeni che possono contaminare le acque e quindi i molluschi bivalvi, hanno generalmente tre origini:

- reservoir umano o animale, come *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* e *Campylobacter*;
- l'ambiente acquatico con i patogeni naturalmente presenti, in particolar modo batteri appartenenti al genere *Vibrio spp.*;

- l'ambiente in generale con i patogeni associati alle operazioni di trattamento, trasformazione e distribuzione dei molluschi, come *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* (Cattaneo e Bernardi, 2010; Lee *et al.*, 2008).

Salmonella spp. è un bacillo Gram-negativo, appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae (Bhunia, 2018). Sono batteri patogeni situati principalmente nel tratto gastro-intestinale dei mammiferi (uccelli, pollame, animali da fattoria, esseri umani), ma possono essere ritrovati anche in acque costiere e in aree di coltivazione dei molluschi contaminate da materiale fecale. Le acque marine al largo invece generalmente ne sono prive (Cattaneo e Bernardi, 2010).

S. Typhi e *S. Paratyphi* sono responsabili della febbre tifoide o enterica, le cui manifestazioni cliniche comprendono diarrea, febbre acuta prolungata, dolore addominale e mal di testa. Il miglioramento dell'igiene e della clorazione dell'acqua potabile ha portato a un rapido declino del numero di casi di febbre tifoide nei paesi industrializzati, dove invece la *Salmonella* non tifoidea rimane la principale causa di gastroenteriti acute di origine alimentare. Tuttavia, raramente sono coinvolti pesce e prodotti della pesca (Bean *et al.*, 1996; Ryder *et al.*, 2014).

E. coli è un batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae (Bhunia 2018). *E. coli* fa parte della microflora intestinale di esseri umani, animali e uccelli, per questo viene utilizzato come indicatore di contaminazione fecale. Non è un batterio tipicamente acquatico o dei prodotti della pesca, ma viene spesso ritrovato nelle acque superficiali contaminate da sistemi di depurazione difettosi, scarichi di allevamenti animali, pascoli e città.

Se i molluschi bivalvi vengono allevati in acque contaminate, durante la filtrazione possono accumulare gli *E. coli* nel sistema digestivo. È importante evitare la presenza di questi batteri negli alimenti, attraverso disinfezione delle acque di lavorazione e delle acque reflue, in quanto la dose infettiva è bassa (Cattaneo e Bernardi, 2010).

Vibrio spp. sono batteri Gram-negativi appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae. Hanno forma bastoncellare ricurva, sono mobili e generalmente dotati di un singolo flagello polare. Sono microorganismi anaerobi facoltativi, alofili obbligati (tranne *V. cholerae*), tollerano concentrazioni di NaCl fino al 18% e gli ioni sodio ne stimolano la crescita. Crescono bene ad un pH da neutro a alcalino (~ 9.0) e sono sensibili agli acidi. L'intervallo di pH ottimale è 8,0–8,8, mentre l'intervallo di temperatura ottimale è di 20–37 °C (Bhunia, 2018; Ryder *et al.*, 2014). I *Vibrio* sono microorganismi naturalmente presenti in ambienti marini costieri, negli estuari e nelle acque salmastre delle regioni tropicali e temperate, sebbene *V. cholerae* e *V. mimicus* si ritrovino anche in acqua dolce. I *Vibrio* sono stati isolati da sedimenti, plancton, molluschi, e crostacei (WHO 1999).

Al genere *Vibrio* appartengono più di 80 specie, di cui almeno 12 (Tabella 3) in grado di causare infezioni intestinali e non intestinali nell'uomo. Tra questi, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*, *V.*

vulnificus sono le tre specie maggiormente responsabili di malattie trasmesse dai prodotti della pesca. *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* causano malattie gastrointestinali, mentre *V. vulnificus* provoca setticemia (Ryder *et al.*, 2014; Butt *et al.*, 2004).

Specie	Infezioni intestinali	Infezioni non intestinali
<i>V. cholerae</i> O1/O139	++++	+
<i>Non-O1/O139 V. cholerae</i>	++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	++++	+
<i>V. vulnificus</i>	+	+++
<i>V. fluvialis</i>	++	-
<i>V. furnissi</i>	++	-
<i>V. mimicus</i>	++	+
<i>V. hollisae</i> (ora riclassificato come <i>Grimontia hollisae</i>)	++	-
<i>V. metschnikovii</i>	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	-	++
<i>V. carchariae</i>	-	+
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+
<i>V. damsela</i>	-	+

Note: + indica la frequenza di casi in campioni clinici

Tabella 3. *Vibrio* spp. patogeni per l'uomo (Ryder *et al.*, 2014)

In generale, la dose infettante necessaria per causare malattia intestinale è elevata e pertanto, il rischio legato al consumo di pesce è basso. Ad esempio, per contrarre il colera servirebbe ingerire circa un milione di microorganismi (WHO, 1999).

Vibrio parahaemolyticus è responsabile di gastroenteriti nell'uomo. Per molti anni è stata la principale causa di intossicazione alimentare in Giappone, dove è associato al consumo di pesce crudo e altri frutti di mare. Malattie associate a questo batterio sono state segnalate anche in altre parti dell'Asia, negli Stati Uniti d'America, in Canada, in Africa e nell'Europa meridionale, dove le infezioni sono spesso associate al consumo di ostriche crude o crostacei poco cotti o cross-contaminati. I sintomi principali dell'intossicazione sono nausea, vomito, diarrea, crampi addominali e febbre. Non tutti i ceppi di *V. parahaemolyticus* sono patogeni, infatti la maggior parte dei ceppi presenti nell'ambiente

e nei frutti di mare non causa gastroenterite. La patogenicità di un ceppo dipende dalla presenza di geni specifici, perciò sono necessari test molecolari per capire se esso sia in grado o meno di causare patologie nell'uomo (Lee *et al.*, 2008)

Vibrio vulnificus può causare infezioni, se una ferita o un taglio viene a contatto con acqua di mare contaminata con questo organismo. Può inoltre causare gastroenteriti e setticemia primaria, in genere in seguito all'ingestione di ostriche contaminate. Il microorganismo entra nel corpo attraverso il tratto intestinale e poi infetta il flusso sanguigno (Lee *et al.*, 2008). Dalla circolazione sanguigna, il batterio può invadere il tessuto cutaneo con l'aiuto di tossine, come l'emolisina, ed enzimi, come collagenasi, proteasi, lipasi e fosfolipasi. Questi promuovono una rapida distruzione dei tessuti con conseguente morte entro 24 ore (Bhunia, 2018). Sia le infezioni delle ferite, sia la setticemia primaria possono rivelarsi fatali con tassi di mortalità rispettivamente del 7-25% e del 50% (Lee *et al.*, 2008). La maggior parte delle persone che sviluppano setticemia sono soggetti immunocompromessi (WHO, 1999).

V.vulnificus è un microorganismo tipico delle aree subtropicali, ma è stato isolato anche nelle coste Adriatiche (Cattaneo e Bernardi, 2010).

La maggior parte dei ceppi di *Vibrio cholerae* non causano infezioni gastrointestinali nell'uomo, ma una parte di essi è in grado di causare una grave diarrea acquosa, che porta a disidratazione e può essere fatale: il colera epidemico e pandemico.

Altri ceppi invece provocano nell'uomo una gastroenterite simile a quella causata dalla *Salmonella* e sono spesso responsabili di singoli casi o piccoli focolai (Lee *et al.*, 2008). I ceppi associati al colera producono la tossina colerica, un'enterotossina proteica, prodotta solamente da due dei 206 sierotipi di *V. cholerae* conosciuti: O1 e O139. Il sierotipo O1 comprende i biotipi Classico e El Tor, distinti in base ad una serie di tratti fenotipici. I due biotipi vengono poi ulteriormente classificati nei sotto-sierotipi Inaba, Ogawa e Hikojima (Bhunia, 2018). O1 e O139 si trasmettono tramite acqua o fonti alimentari contaminate da feci di persone infette dal colera (<https://www.cdc.gov/cholera/index.html>).

Il colera è tutt'ora endemico in molti paesi, infatti, secondo quanto riportato dalla World Health Organisation (WHO), *V. cholerae* infetta circa 1.3-4 milioni di persone causando 21.000-143.000 morti ogni anno in tutto il mondo (<https://www.afro.who.int/health-topics/cholera>).

La sintomatologia del colera compare dopo 4-5 giorni di incubazione e se non curata può portare a decesso in poche ore, con un tasso di mortalità del 50%; se invece l'infezione viene trattata, la mortalità si riduce al di sotto dell'1%. Nella maggior parte dei casi è sufficiente fornire soluzioni saline reidratanti, mentre nei casi più gravi è richiesta la terapia antibiotica (Ripabelli *et al.*, 1997).

V. cholerae O1 è responsabile di tutti i recenti focolai, mentre *V. cholerae* O139 ha causato focolai in passato, ma recentemente è stato identificato solo in casi sporadici e mai al di fuori dell'Asia. (<https://www.afro.who.int/health-topics/cholera>).

Gli altri ceppi patogeni (*V. cholerae* non-O1 e non-O139) possono essere naturalmente presenti nell'ambiente marino e sono stati associati al consumo di molluschi crudi negli Stati Uniti d'America (Cattaneo e Bernardi, 2010; Lee *et al.*, 2008).

Nei prodotti della pesca europei la frequenza di *Vibrio* patogeni è minore rispetto a quella di zone più calde, in quanto la presenza di questi batteri è in funzione della temperatura delle acque: nei mesi estivi si segnalano maggiori positività. Il batterio viene comunque inattivato in modo efficace tramite cottura (Cattaneo e Bernardi, 2010).

1.2 La Molluschicoltura in Veneto

Tra le produzioni alimentari mondiali, l'acquacoltura è uno dei settori produttivi a più rapida crescita, con una media annua superiore al 10%. Secondo le stime del 2012 della Food and Agriculture Organization (FAO), l'acquacoltura fornisce circa la metà dei pesci, crostacei e molluschi destinati al consumo umano a livello mondiale.

L'acquacoltura è definita come l'allevamento o la coltivazione di organismi acquatici animali o vegetali, che prevede l'intervento dell'uomo su una parte o sull'intero ciclo biologico degli organismi. Questa pratica comprende le attività di *Piscicoltura* (ovvero l'allevamento di pesci), *Crostaceicoltura* (l'allevamento di crostacei, come i granchi comuni) e *Molluschicoltura*. Quest'ultima consiste nell'allevamento di molluschi, tra cui mitili, vongole filippine e ostriche, sia in mare aperto, negli impianti off-shore, sia nelle aree lagunari (Veneto Agricoltura, 2014). In particolare, l'allevamento dei molluschi appartenenti alla famiglia dei veneridi, prende il nome di "venericoltura".

L'Italia è il primo produttore europeo e il secondo a livello mondiale di vongole. La produzione si concentra principalmente nelle lagune salmastre dell'Alto Adriatico, in cui si alleva quasi esclusivamente la specie *Tapes philippinarum*, introdotta volontariamente nel 1983 (Turolla, 2008).

La venericoltura ha assunto un ruolo importante nell'economia Veneta, infatti la Laguna di Venezia rappresenta il primo sito produttore a livello nazionale di *T. philippinarum* (Boscolo Brusà *et al.*, 2011).

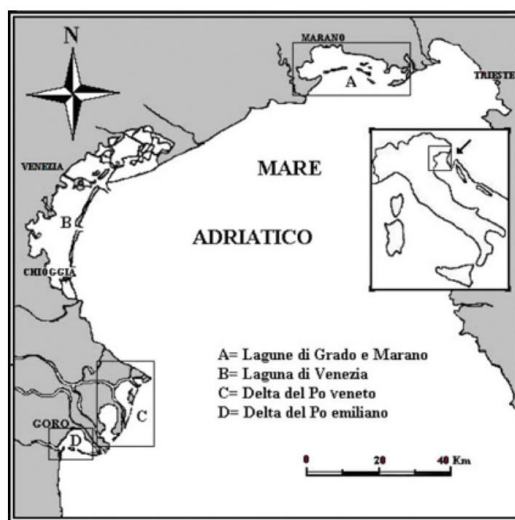


Figura 6. Aree di produzione di *R. philippinarum* nell'Alto Adriatico (Turolla, 2008)

1.3.1 Allevamento e produzione: le tecniche principali

La vongola filippina viene allevata esclusivamente a fondale. Gli allevamenti in sospensione presentano alcuni limiti, tra cui tassi di crescita più lenti e una minore sopravvivenza, rispetto a quelli a fondale. Inoltre, le vongole cresciute in sospensione, in assenza di sedimento, assumono forme e aspetti poco apprezzati dai mercati e dai consumatori.

L'allevamento a fondale della specie *Ruditapes philippinarum* prevede le seguenti fasi:

- Predisposizione dell'area e dei fondali;
- Reperimento del seme;
- Semina;
- Monitoraggio e gestione;
- Raccolta e selezione del prodotto.

L'allevamento viene delimitato in modo visibile con pali di castagno, economici e resistenti all'acqua salata. La delimitazione deve avere basso impatto ambientale, non deve ostacolare la navigazione o limitare il normale flusso d'acqua, che è fondamentale per la crescita e la sopravvivenza delle vongole. In Italia il 95% del seme di vongola viene prelevato dall'ambiente naturale. Solo una minima parte viene fornita da schiudatoi nazionali o stranieri. Questo perché nel territorio vi è una grande disponibilità di seme selvatico, che è migliore dal punto di vista qualitativo ed economico rispetto a quello ottenuto con tecniche di riproduzione controllata (Turolla, 2008).

Nel settore della venericoltura veneta il seme utilizzato è quasi esclusivamente di provenienza selvatica.

La Provincia di Venezia autorizza la raccolta del seme nella Laguna di Venezia solo a pescatori professionisti che lo richiedano e solo in periodi limitati. Inoltre, ne vieta la vendita o l'allevamento al di fuori di questa zona (Boscolo Brusà *et al.*, 2011).

La semina viene praticata durante tutto l'anno, evitando i giorni invernali più freddi, dato che le vongole non crescono a temperature inferiori ai 5-6°C. La dimensione del seme è generalmente di 10-12 mm e viene seminato a fondale senza alcuna protezione. Se invece il seme proviene dagli schiuditoi ha lunghezza inferiore, di 2-3 mm, e richiede una fase preventiva detta "preingrasso". In questo caso il seme viene posto negli stessi fondali dove avverrà l'ingrasso, ma viene protetto all'interno di tasche di rete. Questa fase ha una durata di 1,4-2 mesi, dopo i quali il seme raggiunge la lunghezza di 10-12 mm circa (Turolla, 2008).

Dopo l'insediamento le vongole iniziano la fase di accrescimento che viene influenzata da vari fattori tra cui la temperatura, la disponibilità di nutrimento, il tipo di sedimento e l'idrodinamismo. Durante il primo anno di vita raggiungono dimensioni di 20-25 mm, mentre la taglia commerciale (35 mm) viene raggiunta dopo 2 o 3 anni (Boscolo Brusà *et al.*, 2011).

Per conoscere la biomassa di prodotto presente nei fondali e la sua distribuzione spaziale, si svolgono censimenti periodici. Questi si traducono in grafici con curve di isodensità, fondamentali per sapere quando raccogliere, diradare o integrare il banco.

La raccolta del prodotto avviene durante tutto l'arco dell'anno, ma in modo più consistente nei mesi di agosto e dicembre. Le vongole vengono raccolte quando raggiungono specifiche dimensioni: la taglia minima di cattura, prevista dal Regolamento CE n. 1626, è di 2,5 cm. I bivalvi di taglia inferiore sono considerati "sotto misura", per cui non possono essere raccolti e destinati al consumo.

La taglia commerciale invece è diversa, non è definita per legge, ma viene dettata dal mercato.

Per il prelievo si utilizzano dei rastrelli detti "idrorasche", che, grazie ad un idrogetto, liberano le vongole dal sedimento e le spingono all'interno di una rete. Questo metodo è autorizzato perché rispetto ad altri ha un minore impatto ambientale. L'utilizzo di imbarcazioni attrezzate per la raccolta, con idrogetti e nastro girevole, sono consentite solo in casi di diradamento e spostamenti all'interno degli allevamenti. Le vongole raccolte vengono poi selezionate grazie a vagli manuali o meccanici, dotati di griglie metalliche poste ad una distanza tale da separarle per dimensione (Turolla, 2008).

1.3.2 Legislazione

Al fine di controllare i rischi derivanti dal consumo di molluschi bivalvi l'Unione Europea ha emanato un insieme di norme denominate "Pacchetto Igiene", in vigore dal 1° Gennaio 2006, riguardanti l'igiene degli alimenti, la salute animale e i controlli ufficiali. Il pacchetto igiene comprende tre regolamenti, che sono legalmente vincolanti e devono essere applicati da tutti gli stati membri:

- Reg. (CE) 852/2004 sull'igiene degli alimenti,
- Reg. (CE) 853/2004 che stabilisce norme specifiche di igiene per gli alimenti di Origine Animale (OA),
- Reg. (CE) 854/2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di OA destinati al consumo umano.

Nel Reg. (CE) 852/2004 vengono definiti i requisiti generali di igiene che gli Operatori del Settore Alimentare (OSA) devono rispettare, in quanto responsabili della sicurezza alimentare.

Il regolamento descrive inoltre i principi HACCP che devono essere rispettati nei processi produttivi, come la depurazione o la cottura dei molluschi bivalvi, ma non nella raccolta. Infatti, tali principi non vengono applicati nell'ambito della produzione primaria. In questo regolamento viene inoltre regolamentata la rintracciabilità degli alimenti, mentre i criteri microbiologici che gli alimenti devono rispettare vengono descritti nel Reg. (CE) 2073/2005 e successive modifiche.

Il Reg. (CE) 853/2004 stabilisce i requisiti che agli alimenti di origine animale, derivanti dall'industria, devono rispettare. In particolare, la sezione VII dell'allegato III riguarda i molluschi bivalvi vivi e specifica i requisiti richiesti per la loro depurazione e le norme d'igiene che gli operatori devono osservare durante i processi di depurazione. Nella stessa sezione, al capitolo II, parte A, viene descritta la classificazione delle zone di produzione. La classificazione (Tabella 4) si basa sulla determinazione, mediante metodica standardizzata (ISO 16649-3), dei livelli di *E.coli* (rilevati nella parte edibile e nel liquido intervalvare), indice di contaminazione fecale. Il batterio viene quantificato per rilevare eventuali contaminazioni da acque di scarico delle aree di raccolta e per stabilire i processi a cui i molluschi bivalvi devono essere sottoposti prima di essere messi in commercio.

Molluschi bivalvi raccolti nelle zone di classe A possono essere destinati direttamente al consumo umano, quelli appartenenti alle classi B e C possono essere immessi sul mercato previa depurazione o stabulazione, al fine di raggiungere i requisiti di classe A; oppure possono essere trasformati, dopo un adeguato trattamento termico. La raccolta dei molluschi bivalvi in zone precluse è invece proibita (Cattaneo e Bernardi, 2010).

In Veneto, le zone di classe A sono quelle in mare aperto, dove le correnti sono più forti e c'è un continuo riciclo delle acque; Le zone di classe B sono principalmente le acque lagunari a scarso riciclo, mentre quelle di classe C comprendono alcune aree lagunari e alcuni canali navigabili (Veneto Agricoltura, 2014).

Categoria	<i>E.coli</i>	Trattamento richiesto
Classe A	< 230 MPN/100 g polpa e liquido intervalvare	Nessuno
Classe B	< 4600 MPN/100 g polpa e liquido intervalvare	Depurazione o stabulazione o trattamento termico
Classe C	< 46.000 MPN/100 g polpa e liquido intervalvare	Stabulazione (per almeno due mesi) o trattamento termico.
Zone precluse	>46.000 MPN/100 g polpa e liquido intervalvare	Raccolta proibita

Tabella 4. Classificazione delle zone di raccolta dei molluschi bivalvi (Cattaneo e Bernardi 2010; Barile *et al.*, 2009)

La depurazione permette di eliminare sostanze indesiderate accumulate nei molluschi e prevede la loro sosta in vasche contenenti acqua di mare pulita. La stabulazione invece prevede il loro trasferimento in aree microbiologicamente pulite, ma, data la difficoltà nel trovare questi ambienti incontaminati, in Europa la pratica più diffusa è la depurazione. I regolamenti della comunità europea non stabiliscono però procedure standard indicanti tempi e temperature di depurazione.

Il monitoraggio dei livelli di *E.coli* non esclude la presenza di altri batteri o virus patogeni per l'uomo. Tuttavia, il controllo di tutti i patogeni sarebbe irrealistico, sia per i costi, sia per la difficoltà nel rilevamento.

Il Reg. (CE) 854/2004, nell'Allegato II, stabilisce le modalità con cui l'autorità competente di ciascuno stato deve eseguire i controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi. Inoltre, questo regolamento prevede che ogni area di produzione venga monitorata attraverso programmi di campionamento.

I limiti di carica microbica che i prodotti alimentari, tra cui molluschi bivalvi vivi, devono rispettare per essere venduti, sono indicati nel Reg. (CE) 1441/2007 (che modifica il Reg. (CE) 2073/2005). Tale regolamento stabilisce i seguenti limiti: *E. coli* < 230 MPN/100 g (corpo e liquido intravalvare) e *Salmonella* assente in 25 g. È compito dei produttori eseguire controlli regolari al fine di rispettare questi criteri (Cattaneo e Bernardi 2010).

Le acque destinate alla produzione dei molluschi devono rispettare determinati requisiti di qualità previsti dalla Dir. 2006/113/CE. Nell'allegato I vengono specificati i parametri (tra cui pH, temperatura, colorazione, salinità, ossigeno disciolto, contaminanti chimici e coliformi) e i limiti che devono rispettare. Inoltre, vengono descritti i metodi di analisi e la frequenza dei campionamenti (Cattaneo e Bernardi 2010).

Nell'Allegato 7 del documento approvato il 10 novembre 2016 dal Ministero della Salute, intitolato “Linee guida per il controllo ufficiale di prodotti di origine animale destinati al consumo umano ai sensi dei Regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004”, vengono descritti i valori guida dei principali microorganismi presenti nelle matrici alimentari. Questo documento permette di uniformare il controllo ufficiale sul territorio nazionale, inoltre facilita l'interpretazione e la gestione degli esiti analitici di tutti i controlli eseguiti sugli alimenti nei vari laboratori. In questo allegato, oltre ai limiti microbiologici già stabiliti dal Regolamento (CE) 2073/2005, vengono inseriti ulteriori criteri riguardanti non solo i microorganismi di origine fecale, ma anche tossine o loro metaboliti, che devono essere rilevati e misurati negli alimenti destinati al consumo umano. In particolare, per quanto riguarda i molluschi bivalvi, rispetto ai regolamenti comunitari precedenti viene richiesta la ricerca nel loro microbiota di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 e *Vibrio parahaemolyticus*, potenzialmente enteropatogeni. Secondo quanto riportato dai valori guida, questi microorganismi devono essere assenti in 25 g di alimento e la loro patogenicità deve essere confermata mediante ricerca di specifici geni di patogenicità.

I valori guida indicati nel documento, a seconda dei casi, possono essere usati per valutare criteri di igiene di processo o di sicurezza alimentare (indicati con asterisco nell'Allegato 7). I primi possono essere applicati solo negli stabilimenti di produzione, mentre i secondi possono essere applicati a tutti i prodotti finiti commercializzati sul territorio nazionale, compresi quelli importati.

I campioni da analizzare, per verificare il rispetto dei criteri di sicurezza descritti nel Reg. (CE) 2073/2005 e dei criteri contrassegnati da asterisco nell'Allegato 7, devono essere suddivisi in quattro o cinque aliquote. Ogni aliquota deve essere costituita da un numero di unità campionarie il cui peso consenta l'esecuzione delle varie tipologie di analisi. Nel caso dei molluschi bivalvi l'unità campionaria sarà costituita da un numero minimo di esemplari, indicato nel Reg. (CE) 2073/2005.

Come previsto dall'articolo 14 del Regolamento (CE) 178/2002 e dall'articolo 5, lettere c) e d) della Legge 283/1962, se i valori guida, dell'Allegato 7, vengono superati è compito dell'Autorità Competente gestire le non conformità tenendo conto della natura dell'alimento, del suo uso abituale (alimento consumato crudo o poco cotto), del rischio di contaminazione incrociate, delle informazioni messe a disposizione del consumatore e della popolazione a rischio (anziani, bambini, individui immunodepressi) (Ministero della Salute, 2016).

1.3.3 La depurazione

Una volta raccolti i molluschi bivalvi, se provengono da una zona di classe A, vengono mandati ai “centri di spedizione” dove, dopo essere stati lavati, puliti, calibrati, vengono confezionati e immessi sul mercato. Se invece provengono da zone di classe B, gli operatori del settore alimentare possono

immetterli sul mercato solo dopo averli sottoposti al trattamento di depurazione o stabulazione (All. I del Reg. (CE) 853/2004). La depurazione viene eseguita in un “Centro di depurazione”: “lo stabilimento comprendente bacini alimentati con acqua marina pulita, in cui i molluschi bivalvi vivi sono collocati per il tempo necessario alla riduzione dei contaminanti affinché diventino idonei al consumo umano” (All. I del Reg. (CE) 853/2004).

Lo scopo della depurazione è dunque quello della rimozione dei contaminanti microbici dai molluschi bivalvi. Ciò viene garantito dalla ripresa della loro attività di filtrazione e da un flusso ininterrotto di acqua pulita (Figura 7) che allontana dai bivalvi il materiale depurato.

Il processo di depurazione è molto efficace nel ridurre gran parte della carica batterica dai molluschi entro 24-48 ore e questo spiegherebbe la bassa incidenza di malattie batteriche associate al consumo di molluschi bivalvi.

La depurazione è stata sviluppata al fine di rimuovere i contaminanti microbici dai molluschi bivalvi, in particolar modo *S. Typhi*. Generalmente gli indicatori batterici, come *E.coli*, e i patogeni di origine fecale, come *Salmonella*, vengono facilmente rimossi da un sistema di depurazione progettato in modo corretto e ben gestito (Lee *et al.*, 2008).

I batteri marini autoctoni potenzialmente patogeni non sono associati in modo implicito alla presenza di contaminazione fecale, pertanto i classici indicatori di contaminazione fecale non prevedono la loro presenza nei molluschi o nell’acqua. In particolare, diversi studi hanno dimostrato l’assenza di correlazione tra gli indicatori fecali tradizionali e *Vibrio spp.* Inoltre, tali indicatori sottovalutano l’efficienza del processo di depurazione, infatti *Vibrio spp.* ed *E.coli* rispondono in modo diverso alla depurazione. I batteri marini autoctoni hanno bassa efficienza di depurazione e possono addirittura moltiplicare nelle vasche di depurazione e nei sistemi di pompaggio (Oliveira *et al.*, 2011).

Lo studio di Croci *et al* sull’effetto della depurazione su molluschi contaminati in modo sperimentale con *E.coli*, *V.cholerae O1* e *V. parahaemolyticus* conferma l’inadeguatezza di *E.coli* come indicatore di contaminazione microbica e riporta una scarsa efficienza della depurazione sui *Vibrio* (Croci *et al.*, 2002). Gli Enterococchi sono stati proposti come indicatori più appropriati, rispetto ad *E.coli*, nel predire il rischio derivante dai *Vibrio*. (Oliveira *et al.*, 2011).

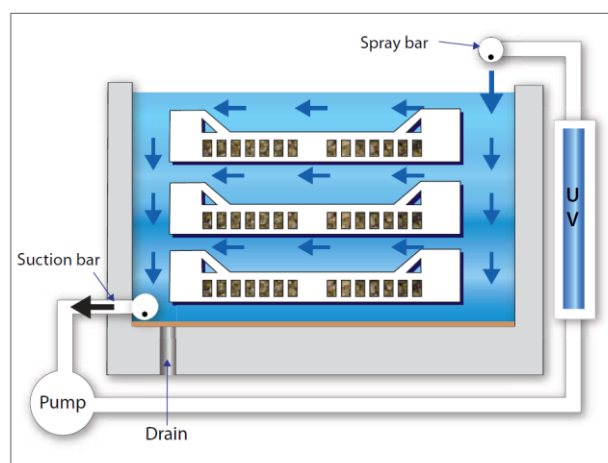


Figura 7. Diagramma del flusso di acqua di mare all'interno di una vasca di depurazione in un sistema a ricircolo (Lee *et al.*, 2008)

Nello studio condotto da Barile *et al* (2009) sono state eseguite delle simulazioni di depurazione, a ciclo chiuso, di campioni di vongole che presentavano cariche batteriche iniziali di *V. parahaemolyticus* comprese tra 2.400 e 9000 mpn/100 g. I risultati ottenuti riportano una scarsa diminuzione della carica batterica alla fine del ciclo di depurazione, in alcuni casi dopo 24 ore si registra un abbattimento della carica del 75%. Un'analoga sperimentazione è stata condotta con vongole contaminate da cariche di *E.coli* compatibili con quelle presenti in bivalvi provenienti da zone B (<4.600 mpn/100 g). In questo caso la depurazione è risultata efficace nell'abbattere la carica microbica, con riduzioni tra il 90 e il 99% dopo 24 ore. Si ipotizza che la presenza di *V. parahaemolyticus* nelle vongole possa influire sulla loro capacità di filtrazione, rallentandone la depurazione. Si consiglia dunque, per tutelare la salute del consumatore, di consumare i molluschi bivalvi solo previa cottura, al fine di abbattere totalmente la carica *V. parahaemolyticus*. Questo studio ha quindi permesso di evidenziare nette differenze nell'efficacia della depurazione sui diversi microorganismi patogeni che possono contaminare i molluschi bivalvi (Barile *et al*, 2009).

La depurazione non è invece sufficiente per l'eliminazione della maggior parte dei virus, infatti questi vengono trattenuti più a lungo nel corpo dei molluschi, rispetto ai batteri. Per questo sono stati riportati numerosi episodi di malattie virali associati al consumo di molluschi bivalvi depurati (Cattaneo e Bernardi, 2010). Inoltre, vari studi hanno dimostrato come la presenza di virus non sia sempre correlata alla presenza di batteri di origine fecale (Barile *et al.*, 2009).

In paesi a clima temperato, per la rimozione dei virus è necessario applicare temperature al di sopra di quelle a cui avviene la filtrazione, ma tali condizioni impedirebbero una corretta eliminazione dei *Vibrio* marini. Inoltre, l'innalzamento della temperatura causerebbe un aumento della proliferazione di questi batteri all'interno del sistema di depurazione (Lee *et al.*, 2008).

Nella sezione VII dell'allegato III del Reg. (CE) 853/2004, al punto 2) si specifica che: "Il sistema di depurazione deve consentire che i molluschi bivalvi vivi riprendano rapidamente e continuino a nutrirsi mediante filtrazione, eliminino la contaminazione residua, non vengano ricontaminati e siano in grado, una volta depurati, di mantenere la propria vitalità in condizioni idonee per il confezionamento, la conservazione e il trasporto prima di essere commercializzati".

Per rispettare questi requisiti, prima della depurazione gli animali non devono subire stress eccessivi o essere esposti a temperature estreme, per cui anche la raccolta e i successivi trattamenti non devono essere causa di shock. Inoltre, durante la depurazione i molluschi devono riprendere l'attività di filtrazione, al fine di espellere i contaminanti. Questo viene assicurato dal mantenimento delle corrette condizioni di salinità, temperatura e ossigeno. La rimozione dei contaminanti viene effettuata tramite sedimentazione e/o rimozione per deflusso e attuando corrette condizioni di depurazione per un periodo di tempo adeguato. Per prevenire un'eventuale ricontaminazione si utilizza il sistema batch "all-in/all-out" e acqua di mare pulita in ogni fase della depurazione. Inoltre, viene evitata la risospensione del materiale espulso dai molluschi e gli impianti vengono accuratamente puliti tra un lotto e l'altro. Infine, per il mantenimento della vitalità e della qualità dei molluschi deve essere garantita una corretta manipolazione prima, durante e dopo la depurazione (Lee *et al*, 2008).

Esistono due tipologie di trattamenti di depurazione: quelli a flusso continuo, detti a ciclo aperto e i sistemi a ricircolo, detti a ciclo chiuso; entrambi presentano vantaggi e svantaggi. In quelli a ciclo aperto l'acqua, una volta venuta a contatto con i molluschi, non viene più recuperata. Viene prelevata acqua di mare o lagunare e pompata in vasche di cemento o in bins di plastica. Prima del suo ingresso nelle vasche, l'acqua passa attraverso filtri meccanici, che consentono l'eliminazione di eventuale materiale corpuscolato, successivamente viene disinfettata con diverse tecniche. Queste ultime possono variare in base al tipo di impianto preso in considerazione, ma le principali prevedono l'utilizzo di: composti del cloro, raggi ultravioletti e ozono. Inoltre, l'acqua di mare subisce il processo di ossigenazione al fine di assicurare ai molluschi bivalvi valori di ossigeno costanti nel tempo (Cattaneo e Bernardi, 2010).

Negli impianti a ciclo chiuso tutta l'acqua utilizzata nel ciclo di depurazione viene riutilizzata per almeno 24 ore prima di essere rilasciata nell'ambiente (Barile, 2009; Schneider *et al*, 2009). Questi impianti hanno il vantaggio di poter variare i parametri fisico-chimici dell'acqua, per adattarli alle condizioni fisiologiche degli animali; infatti se i molluschi bivalvi vengono trasferiti in acqua con diverse caratteristiche rispetto a quella in cui sono stati catturati, non riprendono in modo rapido la filtrazione e quindi la depurazione. I parametri dell'acqua che devono essere presi in considerazione sono: temperatura dell'acqua (non deve essere mai inferiore ai 12°C), salinità (deve essere simile a quella dell'acqua di raccolta) e concentrazione di ossigeno (in entrata 100%, in uscita 60%) (Cattaneo

e Bernardi, 2010). Un altro vantaggio dei sistemi chiusi consiste nella possibilità di eliminare sostanze chimiche tossiche o avverse che possono comparire in modo improvviso nell'acqua di mare, mentre uno degli svantaggi è il potenziale di accumulo di prodotti metabolici finali tossici come l'ammoniaca (Schneider *et al*, 2009).

Il sistema a ciclo aperto necessita di maggiori volumi di acqua rispetto a quello chiuso, ma in entrambi i casi l'acqua di mare, prima di essere utilizzata, viene trattata fisicamente (UV e filtrazione) o chimicamente (cloro, iodofori e ozono) per impedire la contaminazione microbica.

Il trattamento con il cloro è stato il primo metodo utilizzato e si è rivelato efficace nel ridurre la carica batterica (in particolar modo i batteri enterici), ma inefficace nel ridurre quella dei virus enterici, delle spore batteriche e dei protozoi. È stato osservato che il cloro può influire con l'attività di filtrazione dei molluschi; inoltre, si pensa che i sottoprodotti formati dal cloro, a contatto con materiali organici presenti nell'acqua di mare, possano essere accumulati dai molluschi e che a lungo termine possano comportare un potenziale rischio per la salute umana. Per queste ragioni è importante che il cloro residuo presente nell'acqua venga abbattuto mediante tiosolfato e aereazione, prima che l'acqua confluisca di nuovo nelle vasche di depurazione (Barile, 2009; Lee *et al.*, 2008).

Gli iodofori se usati a concentrazioni che variano da 0,1 a 0,4 mg/l non inibiscono l'attività di filtrazione dei molluschi. Sono efficaci nel ridurre in breve tempo la carica batterica, ma sono inefficaci contro i virus enterici. Non sono stati segnalati effetti avversi sulla fisiologia o sulle caratteristiche organolettiche dei molluschi depurati con acqua sanificata con iodofori (Schneider *et al*, 2009).

I raggi UV sono il metodo di disinfezione più utilizzato negli impianti di depurazione, essi risultano essere molto efficaci nell'eliminazione di batteri e virus enterici e nell'eliminazione di spore di protozoi e batteri. Inoltre, questo metodo non produce prodotti tossici o residui chimici che renderebbero i molluschi non edibili alla fine del processo di depurazione. Uno svantaggio è che alcuni batteri sottoposti ai raggi UV, possono attivare sistemi di riparo e sopravvivere, inoltre insieme alle lampade UV devono essere utilizzati dei filtri per eliminare eventuali particelle in sospensione che limiterebbero l'azione penetrante dei raggi e quindi l'efficacia del trattamento. Quest'ultimo aspetto rende questo metodo costoso. Negli ultimi anni, in Italia, si è assistito ad un incremento nell'utilizzo dell'ozonizzazione come metodo di disinfezione dell'acqua.

L'ozono è molto efficace nell'inattivazione di virus e batteri. Il meccanismo d'azione si basa sull'ossidazione delle proteine, l'alterazione delle strutture molecolari e il blocco dell'attività enzimatica cellulare. Tra gli svantaggi nell'utilizzo dell'ozonizzazione troviamo la formazione di bromati, composti considerati potenzialmente tossici e la formazione di residui di ozono. Questi ultimi potrebbero causare nei molluschi una riduzione o inattivazione dell'attività di filtrazione e quindi una diminuzione dell'efficacia della depurazione. Inoltre, è considerato un metodo di disinfezione

relativamente costoso e se utilizzato nella sua forma gassosa è molto tossico, per cui l'utilizzo prevede rigide norme di sicurezza.

Ad oggi, in Italia i sistemi di disinfezione dell'acqua maggiormente usati sono: raggi UV e ozono.

La combinazione di diversi trattamenti di sanificazione delle acque aumenta l'efficienza di depurazione e permette la diminuzione del tempo richiesto per completare il processo, che attualmente è di 12-24 ore. I tempi di depurazione in uso si basano su parametri batteriologici, anche se è stato più volte evidenziato che il tempo di rilascio dei virus è più lungo rispetto a quello richiesto da batteri di origine fecale o da batteri patogeni. (Barile *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008).

1.4 Il microbiota dei molluschi bivalvi

Negli ultimi due decenni, le relazioni simbiotiche tra batteri ed eucarioti sono state ampiamente studiate, dimostrando come il microbiota (definito come l'insieme delle comunità microbiche associate ad un ospite) giochi un ruolo chiave nello sviluppo e nella salute dell'ospite, nonché nelle sue risposte ai cambiamenti ambientali (Milan *et al.*, 2018; Meisterhans *et al.*, 2016). I molluschi bivalvi ospitano sulla loro superficie e negli organi interni un ricco microbiota batterico, anche se ad oggi la sua conoscenza è scarsamente documentata, a causa dei pochi studi a riguardo (Leite *et al.*, 2017; Meisterhans *et al.*, 2016). In particolare, le comunità microbiche presenti nell'intestino degli organismi acquatici sono strettamente legate allo sviluppo dell'ospite, allo stato nutrizionale, alla risposta immunitaria e alla resistenza alle malattie (Sun *et al.*, 2019).

Negli animali acquatici la comunità microbica intestinale viene determinata dall'ambiente acquatico, infatti le condizioni presenti nei sistemi di acquacoltura, come i parametri chimici dell'acqua (pH, COD -chemical oxygen demand-, temperatura, salinità, fosforo totale, azoto totale e azoto inorganico) influenzano la composizione della comunità microbica e l'insorgenza di malattie (Sun *et al.*, 2019). Il microbiota negli invertebrati marini può essere acquisito per via verticale e/o laterale. La trasmissione verticale avviene dai genitori alla prole, mentre quella laterale avviene dall'ambiente all'ospite ed è soggetta a fluttuazioni ambientali (Meisterhans *et al.*, 2016).

Grazie alla loro alimentazione tramite filtrazione, i bivalvi accumulano un microbiota batterico ricco e diversificato, composto da varie specie appartenenti a generi diversi come *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Photobacterium*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Micrococcus* e *Bacillus* (Romalde *et al.*, 2014).

Nello studio condotto da Milan *et al.* (2018) è stata caratterizzata la comunità microbica dell'epatopancreas della vongola *R. philippinarum*, sequenziando l'amplicone del gene 16s rRNA. I campioni analizzati sono stati raccolti nella laguna di Venezia. Il microbiota nella ghiandola digestiva può essere parzialmente modificato tramite l'acquisizione di specie microbiche presenti nell'ambiente.

Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che l'associazione ospite-microbiota nel tratto digestivo e nelle branchie di alcune di specie di invertebrati, tra cui crostacei e ostriche, è stabile. Le comunità batteriche associate a *R.philippinarum* sono risultate essere costituite principalmente dai phylum: *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Firmicutes* e *Chlamydiae*. Le classi più abbondanti in entrambe le stagioni in cui è stato eseguito il campionamento (inverno ed estate) erano *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (comprendente i generi *Vibrio* e *Pseudomonas*) (Milan *et al.*, 2018).

1.4.1 Vibrio presenti nel microbiota dei molluschi bivalvi

Microorganismi appartenenti al genere *Vibrio* sono spesso isolati da pesci, prodotti ittici, molluschi, ma molte specie sono patogene per l'uomo e per gli animali. Le specie di *Vibrio* principalmente associate ai molluschi bivalvi sono: *V. splendidus*, *V. alginolyticus* e *V. harveyi*. La combinazione di queste specie (o di alcune di esse) è la causa più frequente di malattie che colpiscono tutte le fasi della vita dei bivalvi. Inoltre, anche *V. tapetis* è stato descritto come batterio patogeno per le vongole (Rahman *et al.*, 2014).

Nello studio condotto da Rahman *et al.* (2014), *Vibrio* isolati da campioni di molluschi (tra cui *R.philippinarum*) provenienti dalla laguna di Venezia, sono stati analizzati tramite multilocus sequence analysis (MLSA), sviluppata su quattro geni housekeeping (*gyrB*, *pyrH*, *recA*, e *atpA*).

La maggior parte dei ceppi isolati dai molluschi erano specie appartenenti al gruppo di *Vibrio* considerato “a basso rischio”: *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, e *V. mimicus*. Sono state inoltre isolate le specie *V. parahaemolyticus* e *V.vulnificus*, appartenenti invece al gruppo di *Vibrio* definito “ad alto rischio” (Rahman *et al.*, 2014). *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* interagiscono con l'emolinfa del mollusco stesso, causando una maggiore permanenza al loro interno e difficoltà nell'eliminazione (Cattaneo and Bernardi 2010).

Il test biochimico per l'identificazione di specie, condotto in parallelo, ha sovrastimato la presenza di questi due batteri ad alto rischio. Per questo è importante confermare i dati biochimici con metodi molecolari, per evitare falsi positivi. Dunque, è necessaria un'identificazione accurata, delle specie di *Vibrio* presenti nei molluschi bivalvi, al fine di prevenire i rischi relativi alla salute pubblica e le malattie causate dal consumo di tali organismi (Rahman *et al.*, 2014). Inoltre, un certo numero di studi ha evidenziato come il potenziale patogeno dei *Vibrio* verso l'uomo e gli animali potrebbe essere correlato all'innalzamento delle temperature dei mari, a causa del surriscaldamento globale (Thompson *et al.*, 2004). I *Vibrio* crescono preferibilmente in acqua salata calda (> 15 ° C), per cui il surriscaldamento delle acque marine favorisce lo sviluppo di un numero maggiore di popolazioni di *Vibrio* e di conseguenza porta ad un aumentato rischio di infezioni causate da questi batteri marini.

Negli ultimi anni, in Europa, si è registrato un aumento della prevalenza di infezioni umane causate da *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1-non-O139 e *V. vulnificus* anche in paesi ad alte latitudini. Inoltre, negli ultimi 44 anni nelle coste del mare del Nord è aumentata la prevalenza del genere *Vibrio*, incluso *V. cholerae* e questo aumento è stato correlato all'innalzamento globale della temperatura superficiale dei mari (Le Roux *et al.*, 2015).

1.5 Studio del microbiota dei molluschi bivalvi

Conoscere la composizione della comunità microbica presente all'interno delle matrici di origine alimentare è fondamentale, al fine di garantire la produzione di alimenti sicuri e di alta qualità (Justè *et al.*, 2008). Per studiare il microbiota di un dato ecosistema possono essere utilizzati metodi coltura-dipendenti o coltura-indipendenti (Carraro *et al.*, 2011).

1.5.1 Metodi Coltura dipendenti

I metodi coltura-dipendenti consistono nell'isolare e coltivare i microrganismi per poi identificarli attraverso caratteristiche morfologiche, biochimiche o genetiche (Jany e Barbier, 2008).

Tuttavia, è noto che i sistemi coltura-dipendenti presentano numerosi svantaggi: ad esempio molti microrganismi possono essere coltivabili solo in terreni che soddisfino i loro esatti requisiti metabolici e fisiologici. Inoltre, un mezzo di coltura artificiale in genere consente la crescita solo di alcune specie e la composizione della frazione coltivabile risulta distorta durante la coltura perché i tempi di replicazione variano nelle diverse specie (Carraro *et al.*, 2011).

In diversi studi di microbiologia ambientale sono stati rilevati numerosi batteri patogeni, tra cui *E. coli*, *S. enteritidis*, *V. cholerae*, in uno stato batterico vitale ma non coltivabile (VBNC) (Besnard *et al.*, 2000). I metodi di coltura tradizionali non sono in grado di rilevare cellule microbiche non coltivabili, per cui, per superare tale limite, sono state sviluppate tecniche coltura-indipendenti (Justè *et al.*, 2008).

1.5.2 Metodi Coltura indipendenti

Negli ultimi 30 anni c'è stato un cambiamento significativo negli approcci utilizzati nello studio della microbiologia degli alimenti. L'invenzione, nel 1986, della PCR ha permesso lo sviluppo di nuove strategie coltura-indipendenti per lo studio dei microrganismi presenti negli alimenti (Cocolin *et al.*, 2013).

Con il termine “coltura-indipendenti” si indicano tutti i metodi che non sono basati sulla coltivazione, utilizzati per studiare i microrganismi in uno specifico ecosistema. Questi offrono molti vantaggi

rispetto ai metodi coltura-indipendenti. I microrganismi vengono rilevati grazie al loro DNA, RNA e proteine, non perché in grado di crescere su un terreno microbiologico specifico. Inoltre, lo stato fisiologico della cellula batterica non influenza l'esito dell'indagine (Cocolin *et al.*, 2013), infatti il DNA utilizzato per l'analisi può provenire sia da batteri vivi, sia da batteri morti. Questi metodi molecolari permettono la distinzione tra specie con caratteristiche fenotipiche simili e anche tra ceppi appartenenti alla stessa specie (Carraro *et al.*, 2011).

Tuttavia, potrebbero sorgere problemi tecnici: il DNA potrebbe non essere raccolto da tutti i genotipi, alcuni genotipi potrebbero non essere rilevati a causa della loro scarsa abbondanza della specie nel substrato o a causa di una lisi cellulare inadeguata. Inoltre, l'amplificazione della PCR potrebbe risultare inaccurata o inibita (Jany e Barbier, 2008).

Le tecniche molecolari sviluppate prevedono il clonaggio e il successivo sequenziamento dei frammenti di DNA, oppure l'amplificazione delle sequenze bersaglio mediante l'uso della PCR, prima del loro sequenziamento. I prodotti ottenuti dalla PCR possono essere clonati e sequenziati o utilizzati per ottenere profili genetici (Carraro *et al.*, 2011).

Il clonaggio e il sequenziamento di un particolare gene, il 16s rRNA, ha permesso di approfondire ulteriormente l'analisi delle comunità microbiche. (Robinson *et al.*, 2010).

1.5.2.1 Analisi del 16s rRNA

Il clonaggio e il sequenziamento dei geni codificanti il 16s rRNA è considerato il metodo gold standard per la caratterizzazione delle comunità microbiche, in quanto permette l'identificazione delle specie batteriche. In particolare, è possibile ricostruire la filogenesi dei batteri in modo indipendente dalle loro caratteristiche morfologiche e biochimiche. Questa tecnica è stata utilizzata, ad esempio, per descrivere la composizione microbica del tratto gastrointestinale dell'uomo e degli insetti (Robinson *et al.*, 2010; Chakravorty *et al.*, 2007). Il gene 16S rRNA è stato scelto come marcatore di diversità genetica per le sue ridotte dimensioni (1,5 kb), perché presente in tutti i batteri e perché mostra una variabilità interspecifica maggiore rispetto a quella intraspecifica (Sekirov *et al.*, 2010).

La sequenza genica del 16S rRNA (Figura 8.) è lunga circa 1.550 pb e contiene generalmente nove "regioni ipervariabili" (V1-V9) che mostrano una notevole diversità di sequenza nei diversi batteri, per cui possono essere sfruttate per l'identificazione di specie. Queste regioni target hanno lunghezza variabile da 50 a 100 basi e sono amplificabili tramite PCR, utilizzando primer universali disegnati su sequenze conservate che fiancheggiano le regioni ipervariabili. (Chakravorty *et al.*, 2007; Clarridge, 2004; Petrosino *et al.*, 2008). Una volta determinata la sequenza del gene 16s RNA di un ceppo sconosciuto, è possibile confrontarla, tramite analisi bioinformatiche, con quelle presenti in un database genomico. In GenBank, la più grande banca dati di sequenze nucleotidiche, sono depositate

oltre 90.000 sequenze di 16s rRNA batterico. Tale confronto permette di distinguere gli organismi a livello di genere, in tutti i principali phyla batterici, oltre a classificare i ceppi a livello di specie e sottospecie. In alcuni casi è necessario il sequenziamento dell'intera regione di 1.500 pb per riuscire a distinguere alcuni taxa o nuove specie. Tuttavia, per la maggior parte dei batteri di rilevanza clinica è sufficiente determinare la sequenza iniziale di 500 pb per una corretta identificazione (Clarridge, 2004).

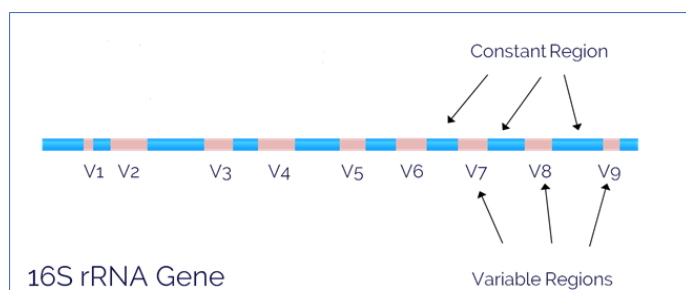


Figura 8. Schema del gene 16s rRNA (www.lcsciences.com)

1.5.2.2 Analisi dei geni *recA* e *pyrH*

Vibrio è stato uno dei primi generi batterici ad essere riconosciuto in natura e descritto tassonomicamente. Nel 1883, Robert Koch isolò per la prima volta ceppi di *Vibrio cholerae* durante un focolaio di colera scoppiato in India e Egitto. Inizialmente la tassonomia dei *Vibrio* era basata su studi morfologici delle colture, poi i metodi di identificazione batterica si sono evoluti nel tempo (Thompson e Swing, 2006). Oggi per l'identificazione dei batteri vengono applicati soprattutto metodi biochimici o metodi basati sull'analisi degli acidi nucleici. In particolare, per la caratterizzazione delle Vibrionaceae possono essere utilizzati test biochimici, ma questi risultano spesso imprecisi a causa dell'elevata variabilità fenotipica dei *Vibrio*. Per identificare *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* sono stati messi a punto alcuni protocolli ufficiali, ma questi non permettono di riconoscere altre specie di *Vibrio*.

I metodi molecolari basati sul DNA risultano essere quelli più affidabili. Il Next Generation Sequencing consente un'identificazione di specie accurata, ma produce una quantità di dati elevata, per cui il metodo più utilizzato è quello della multilocus sequence analysis (MLSA) (Rahman *et al.*, 2014). Questo approccio è stato utilizzato in diversi studi, tra cui quello di Rahman *et al* (2014), in cui sono stati sequenziati quattro geni (*gyrB*, *pyrH*, *recA* e *atpA*), utilizzati come marcatori molecolari per identificare specie di *Vibrio* presenti in campioni di molluschi provenienti dalla laguna di Venezia. Inoltre, nello studio condotto da Thompson *et al* (2008) i geni housekeeping *recA*, *pyrH* e *rpoA* sono

stati utilizzati per l'identificazione di *V. cholerae* e *V. vulnificus*, tramite multilocus sequence analysis (MLSA).

Dunque, il sequenziamento dei geni *recA* e *pyrH* permette l'identificazione tassonomica, a livello di specie, dei batteri del genere *Vibrio*.

1.5.2.3 Il Next Generation Sequencing e la Tecnologia Illumina

Il rapido sviluppo, negli ultimi quattro decenni, delle tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici, ha permesso una migliore caratterizzazione del microbioma presente in matrici complesse di origine alimentare e ambientale (Cao *et al.*, 2017).

Il sequenziamento del DNA si è gradualmente evoluto dai sequenziamenti di prima generazione a basso rendimento, come il *Sanger*, alle *Next generation sequencing* ad alto rendimento (NGS), fino ad arrivare alle tecnologie di terza generazione. Il sequenziamento del 16s rRNA con il metodo *Sanger* consente il sequenziamento solo di una proporzione limitata di ampliconi. Questo porta alla perdita delle specie meno abbondanti presenti all'interno di una comunità microbica. Lo sviluppo di piattaforme di *Next generation sequencing* per il sequenziamento del 16s rRNA ha permesso un'identificazione tassonomica più accurata dei microbiomi complessi, a costi inferiori (Cao *et al.*, 2017).

Il sequenziamento di nuova generazione NGS, chiamato anche *high-throughput* o *massively parallel sequencing*, è una tecnologia che consente di sequenziare simultaneamente e indipendentemente migliaia di miliardi di frammenti di DNA (Gu *et al.*, 2019). Sono state commercializzate cinque diverse tecnologie NGS, differenziabili in base ai diversi metodi utilizzati per l'amplificazione clonale e il sequenziamento. Nel 2005 è stata introdotta la piattaforma 454 (Roche), seguita dall'introduzione, nel 2006, della tecnologia Illumina (SOLEXA). Entrambe utilizzano il metodo di sequenziamento detto *sequencing-by-synthesis*.

Successivamente sono state immesse sul mercato le piattaforme SOLiD (Applied Biosystems), Ion Torrent e PacBio (Hodkinson *et al.*, 2014).

La tecnologia Illumina ha rapidamente sostituito la tecnologia 454, perché in grado di fornire una maggiore quantità di dati a un costo minore (Hodkinson *et al.*, 2014). Illumina (San Diego, CA) offre varie piattaforme di sequenziamento: iSeq, MiSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq e NovaSeq (Gu *et al.*, 2019). Attualmente Miseq è quella che produce le reads di lunghezza maggiore, infatti permette di ottenere paired-end-reads da 300 pb, mentre la piattaforma con il più alto numero di output è la HiSeq 2500, che produce in una singola corsa 4 miliardi di frammenti paired-end da 125 pb ciascuno (Hodkinson *et al.*, 2014).

Il sistema di sequenziamento Illumina si basa su quattro step principali (Figura 9):

1. **Preparazione delle librerie:** Le librerie per il sequenziamento vengono create attraverso la frammentazione del campione di DNA. Successivamente vengono legati degli adattatori alle estremità 5' e 3' di ogni frammento. I frammenti così legati agli adattatori sono poi amplificati tramite PCR e purificati tramite gel.
2. **Formazione dei cluster:** Per la generazione dei cluster la libreria viene caricata su una flow cell, sulla cui superficie ci sono oligonucleotidi complementari agli adattatori della libreria. Ogni frammento viene quindi amplificato in cluster clonali distinti, tramite *bridge amplification*. Al termine della formazione dei cluster avviene il sequenziamento.
3. **Sequenziamento:** In ogni ciclo di sequenziamento vengono inseriti tutti e quattro i nucleotidi, ciascuno marcato con un fluoroforo diverso. Durante la reazione di polimerizzazione, ad ogni sequenza viene aggiunto il nucleotide marcato complementare, poi la reazione viene bloccata. I nucleotidi non incorporati vengono lavati via, mentre quelli legati alle sequenze vengono identificati attraverso un lettore ottico di fluorescenza. La polimerizzazione poi riprende per iniziare un nuovo ciclo di sequenziamento.
4. **Analisi dati:** Si utilizzano software bioinformatici per allineare le sequenze ottenute a genomi di riferimento depositati nelle banche dati (www.Illumina.com, Mardis, 2013).

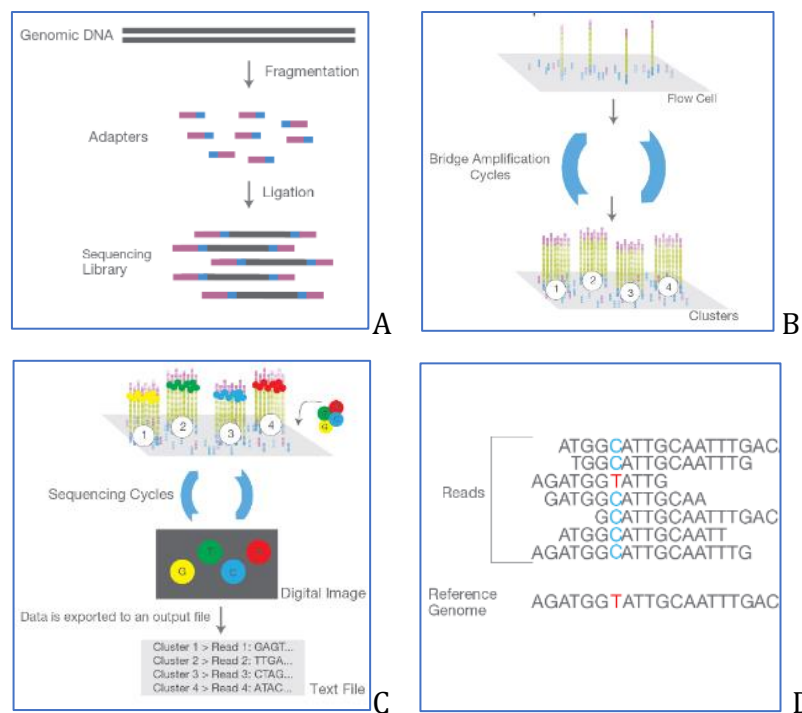


Figura 9. Step della tecnologia Illumina: A) Preparazione delle librerie, B) Amplificazione dei cluster, C) Sequenziamento, D) Analisi dati (www.Illumina.com)

2. SCOPO

Lo scopo del lavoro sperimentale descritto in questa tesi è stato quello di valutare, tramite metodi coltura dipendenti e coltura indipendenti, l'efficienza del processo di depurazione in vongole della specie *Ruditapes philippinarum*. Sono stati presi in considerazione quattro diversi centri di depurazione a cui è stato affidato lo stesso lotto di vongole, proveniente da un allevamento situato a Chioggia (VE). L'esperimento permette di osservare come i diversi metodi di depurazione utilizzati dai vari centri, possano influenzare la carica e la diversità dei *Vibrio* presenti nelle vongole. È importante studiare questi batteri, poiché alcune specie di vibrioni sono in grado di causare malattie nell'uomo e nelle vongole. Inoltre, alcuni studi hanno messo in evidenza come, a causa del surriscaldamento globale, negli ultimi anni sia aumentato il rischio di infezioni umane causate da batteri del genere *Vibrio*.

Per questo, per tutelare la sicurezza del consumatore, da Gennaio 2018, in Italia, è entrato in vigore l'obbligo di ricercare la presenza e i geni di patogenicità di *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*, nei molluschi bivalvi destinati al consumo umano.

In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un metodo di analisi biomolecolare per la corretta identificazione delle specie di *Vibrio*, presenti nel microbiota della vongola *Ruditapes Philippinarum*. In particolare, per il metodo coltura indipendente oltre al classico gene marcatore 16S è stato utilizzato un approccio di Multilocus Sequence Analysis (MLSA) adattato alla piattaforma NGS, utilizzando due saggi dello schema proposto da Rahman et al 2014 (*recA* e *pyrH*).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

In questo studio, è stato analizzato un lotto di vongole della specie *R. philippinarum* prelevato a Maggio 2019 da un sito di allevamento di classe B, situato a Chioggia (VE).

Il lotto iniziale è stato diviso in due aliquote, la prima è stata utilizzata per eseguire le analisi pre-depurazione, mentre la seconda è stata suddivisa ulteriormente in 4 sub aliquote, inviate poi a 4 diversi centri di depurazione (PLANT A, PLANT B, PLANT C, EXPERIMENTAL PLANT). Queste sub aliquote sono state successivamente sottoposte alle analisi post-depurazione, al fine di valutare gli effetti della depurazione.

I molluschi pre-depurazione, prelevati dall'allevamento di Chioggia, sono stati conservati in frigorifero a 4°C per 24 h e analizzati il giorno seguente, insieme ai campioni post-depurazione.

Per effettuare le analisi microbiologiche e molecolari sui campioni, è stato prelevato da ogni mollusco sia il corpo intero, sia il liquido intervalvare.

3.2 Metodo coltura dipendente

Dalla partita di vongole pre-depurazione proveniente da Chioggia, sono state raccolte 5 repliche biologiche da 25 g ciascuna (circa 5 individui). Per ogni replica biologica si sono poi eseguite 2 repliche tecniche per le diluizioni seriali e per gli omogenati.

Quindi in totale sono stati analizzati 10 campioni di pre-depurazione.

Dopo aver prelevato le vongole dal frigorifero a 4°C, sono state lavate con acqua corrente e la conchiglia è stata pulita esternamente con etanolo 100%, per rimuovere i microorganismi eventualmente presenti sulle valve. Si è misurato e annotato il peso e il diametro maggiore di ogni mollusco utilizzato. Quindi si sono pesati 5 sacchetti Stomacher da 25 g di prodotto ciascuno (corpo e liquido intervalvare) e all'interno di ogni sacchetto sono stati versati 225 ml di APW (2% NaCl, 1% peptone, pH 8.5). Poi il tutto è stato omogenato con Stomacher (VWR Laboratory Blender) per 1 minuto e 30 secondi. Questo strumento serve ad omogeneizzare il campione e a disgregare i tessuti del mollusco in modo da facilitare la fuoriuscita dei batteri in esso contenuti. Da ciascun sacchetto Stomacher (diluizione -1) sono stati poi prelevati 2 ml di omogenato e posti in criovals. Queste sono state centrifugate a 10.000 rpm e dopo aver eliminato il surnatante formatosi sono state conservate a -80°C per le successive analisi molecolari.

Dallo stesso sacchetto Stomacher si è prelevato 1 ml di omogenato, che è stato aggiunto a 9 ml di APW per creare le diluizioni seriali, dalla -2, alla -4.

In seguito, sono stati seminati per spatolamento 100 µl di ciascuna diluizione in piastre Petri, contenenti i terreni di coltura Marine Agar (MA) e TCBS. Le piastre sono state poi incubate in un termostato a 22°C per 24 ore.

Il Marine Agar (Marine Broth, 1,5% Agar) Kobayashi Agar è un terreno generico utilizzato per la coltivazione e l'isolamento di batteri marini eterotrofi. Contiene Sali minerali, peptoni ed estratto di lievito, che assicurano una crescita ottimale di questi batteri (www.microbiol.it). Le colonie appaiono di colore bianco o trasparenti.

Il TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile-Salts-Sucrose Agar) è un terreno differenziale selettivo per la coltivazione e l'isolamento dei batteri del genere *Vibrio*, da campioni alimentari (previsto dalla ISO 21872), clinici e ambientali. Il terreno inibisce la crescita di tutti i microorganismi non alofili, inoltre, in base alla diversa fermentazione del saccarosio, è possibile distinguere *Vibrio cholerae*, che cresce formando colonie gialle e *Vibrio parahaemolyticus*, che forma colonie blu-verdi.

Trascorso il tempo di incubazione sono state effettuate le conte delle colonie cresciute sulle piastre di MA e TCBS. Per la conta, per ogni campione, sono state prese in considerazione le due diluizioni successive che presentavano un numero di colonie compreso tra 10 e 300 ed è stata applicata la seguente formula:

$$N = \frac{\sum C}{V (n1 + 0,1 n2) d}$$

dove:

- **N**: è il numero di microorganismi, espresso in UFC (unità formanti colonia)
- **ΣC**: è la somma delle colonie contate nelle due piastre consecutive scelte;
- **V**: rappresenta il volume utilizzato per l'inoculo;
- **n1 e n2**: sono il numero di piastre impiegate per ciascuna diluizione considerata;
- **d**: è la prima diluizione considerata nella conta.

Successivamente, dalle piastre di TCBS sono state selezionate le colonie morfologicamente più rappresentative (colore verde e gialle), ovvero quelle sospette essere *Vibrio*. Queste sono state strisciate su piastre contenenti TSA + 2% NaCl e incubate per 24h-48h. Il terreno TSA è composto da estratti di soia ed elementi nutritivi, che facilitano la crescita dei microorganismi. Inoltre, l'NaCl aggiunto seleziona i batteri alofili.

Trascorse le 24 ore, da ciascuna piastra è stata prelevata una colonia pura e disciolta in 1 ml di PBS. Il tutto è stato poi centrifugato per 1 minuto a 10000 rpm, il surnatante è stato quindi rimosso e i pellet utilizzati per la successiva estrazione del DNA.

Il protocollo descritto è stato applicato anche per l'analisi dei campioni post-depurazione.

Dai campioni provenienti da ciascuno dei 4 centri di depurazione, sono state raccolte 5 repliche biologiche da 25g ciascuna. Poi, per ogni replica biologica, si sono poi eseguite 2 repliche tecniche per le diluizioni seriali e per gli omogenati. Quindi in totale sono stati analizzati 40 campioni post-depurazione.

Inoltre, sono stati prelevati 50 ml di acqua dalle docce degli impianti di depurazione denominati PLANT A, PLANT B e PLANT C e dalla vasca di depurazione dell'impianto EXPERIMENTAL PLANT. Si sono ottenuti in tutto 4 campioni di acqua, che sono stati poi analizzati in laboratorio. Per prima cosa i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 20 minuti, il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 1 ml di PBS. I campioni sono stati poi centrifugati per 1 minuto a 12000 rpm, il surnatante è stato eliminato ed infine il pellet conservato a -80°C per la successiva estrazione del DNA.

Alla fine del campionamento sono stati raccolti 54 campioni così suddivisi: 10 campioni di pre-depurazione, 40 campioni di post-depurazione e 4 campioni di acqua.

3.3 Metodo coltura indipendente

3.3.1 Estrazione del DNA mediante colonnine a scambio ionico

Per l'applicazione dei metodi coltura-indipendenti è stato estratto il DNA sia dagli omogenati, sia dai ceppi isolati, utilizzando però due protocolli di estrazione differenti.

L'estrazione del DNA dagli omogenati è stata effettuata con il Kit Dneasy PowerSoil Kit (Qiagen), mentre l'estrazione del DNA dagli isolati è stata eseguita seguendo il protocollo dell'Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Stratec molecular gmbH). Gli omogenati, precedentemente conservati a -80°C, sono stati per prima cosa centrifugati (Centrifuge 5425, Eppendorf) per 1 minuto a 12.000 rpm. In seguito, all'interno delle criovals sono stati trasferiti 600 µl di Buffer e le microsfere fornite dal kit, che effettuano una lisi meccanica del contenuto; poi sono stati aggiunti 60 µl di soluzione C1 e il tutto è stato mescolato tramite Vortex (Velp Scientifica).

Le criovals sono poi state inserite nel Tissue Lyser II (Qiagen), uno strumento che permette di completare la lisi dei campioni. È stata impostata la massima velocità per 30 secondi e poi l'operazione è stata ripetuta.

I campioni sono stati successivamente centrifugati a 10.000 rpm per 30 secondi a temperatura ambiente e 450 µl di surnatante sono stati trasferiti all'interno delle Eppendorf da 2 ml fornite dal Kit. Dopo aver aggiunto alle Eppendorf 250 µl di soluzione C2, sono state mescolate al Vortex per 5 secondi e incubate per 5 minuti a 4°C.

Dopo l'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a temperatura ambiente per 1 minuto a 10.000 rpm. Si sono quindi prelevati non più di 600 µl di surnatante, avendo cura di non prelevare il pellet sul fondo della provetta, e si sono trasferiti all'interno di nuove Eppendorf da 2 ml. A queste si sono aggiunti 200 µl di soluzione C3, poi il tutto è stato mescolato al Vortex per 5 secondi ed incubato per 5 minuti a 4°C. È seguita un'ulteriore volta centrifuga a 10.000 rfc per 1 minuto, alla fine della quale sono stati trasferiti 700 µl di surnatante in nuove provette da 2 ml. A queste sono stati aggiunti 1200 µl di soluzione C4 (precedentemente agitata) e il tutto è stato mescolato al vortex per 5 secondi.

Infine, 675 µl di campione sono stati caricati all'interno di colonnine provviste di filtro (DNeasy Mini spin column), che sono state poi centrifugate per 1 minuto a 10.000 rpm. Tutto ciò che è stato filtrato è stato eliminato e il filtro reinserito all'interno della colonnina. Questo passaggio è stato ripetuto fino all'esaurimento del surnatante da filtrare.

Al termine di questi passaggi il DNA si trova legato al filtro della colonnina, quindi i successivi passaggi servono a rimuovere dalla membrana filtrante gli eventuali residui di contaminanti.

Questi passaggi prevedono:

- l'aggiunta di 500 µl di soluzione C5;
- la centrifuga dei campioni a 10.000 rpm per 30 secondi a temperatura ambiente e l'eliminazione del filtrato;
- un'ulteriore centrifuga a 10.000 rpm per 1 minuto a temperatura ambiente e il trasferimento del filtro dentro una nuova provetta da 2 ml.

Successivamente sono stati aggiunti, al centro del filtro, 100 µl dell'ultima soluzione, la C6, e poi i campioni sono stati centrifugati a temperatura ambiente per 30 secondi ad una velocità di 10.000 rpm; poi il volume eluito è stato ritrasferito all'interno del filtro. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto una seconda volta.

A questo punto della procedura il DNA si trova all'interno della Eppendorf da 2 ml, quindi il filtro è stato eliminato e il DNA così estratto conservato a -20°C.

3.3.2 Estrazione del DNA per bollitura

I pellet ottenuti dagli isolati sospetti *Vibrio*, precedentemente strisciati su TSA+2% NaCl, sono stati risospesi in 100 µl di acqua sterile. Successivamente il DNA è stato estratto per bollitura, utilizzando

il termociclatore Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler ed impostando il programma specifico per questo tipo di estrazione, che prevede una denaturazione a 98°C per 10 minuti.

Dopo aver centrifugato i campioni a 4000 rpm per 4 minuti (Centrifuge 5425, Eppendorf), sono stati trasferiti 2 µl di DNA estratto all'interno di nuove strip contenenti 98 µl di acqua sterile, al fine di effettuare una diluizione 1:50 di ciascun DNA estratto.

3.3.3 Valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto

La qualità e la quantità del DNA estratto mediante colonnine a scambio ionico e per bollitura è stata valutata al NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Questo strumento effettua un'analisi spettrofotometrica dei campioni, per cui permette di determinare la concentrazione e la purezza del DNA estratto, attraverso la misura dell'assorbanza a determinate lunghezze d'onda.

I dati ottenuti da quest'analisi comprendono:

- la concentrazione di DNA, presente in ciascun campione, in ng/µl, determinata dall'assorbanza del DNA alla lunghezza d'onda di 260 nm;
- il rapporto fra l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm: se questo valore è inferiore a 1,8 significa che probabilmente è presente una contaminazione proteica. Il valore ottimale è quello che si avvicina a 2;
- il rapporto fra l'assorbanza a 260 nm e 230 nm: anche per questo parametro il valore ottimale è quello che si avvicina a 2, se inferiore indica la presenza di contaminanti diversi da quelli proteici, ad esempio carboidrati, fenoli o residui di solventi.

Inoltre, la qualità del DNA estratto è stata valutata caricando ciascun campione su gel d'agarosio all'1%. Questo permette di valutare il livello di degradazione delle molecole di DNA. Infatti, è fondamentale avere un DNA di buona qualità per procedere con le successive analisi molecolari. In ogni pozzetto del gel sono stati caricati:

- 5 µl di Loading Dye 2X (Green GoTaq Flexi Buffer Promega),
- 5 µl di DNA estratto,

mentre nel primo pozzetto è stato caricato il marcatore di pesi molecolari Lambda Hind III.

3.3.4 Preparazione delle Mock Community

Nei giorni precedenti al campionamento delle vongole, sono state create due comunità fittizie di batteri denominate Mock Community, da utilizzare come controllo positivo per la preparazione delle librerie e per il sequenziamento. Queste contengono una miscela di DNA di diversi batteri: la Mock A è composta di soli ceppi di *Vibrio*, mentre la B include batteri Gram-positivi e Gram-negativi. La Mock composta da *Vibrio* contiene i seguenti ceppi di referencia: *P. damsela* ATCC 35083, *V. aestuarianus*

LMG 7909, *V. alginolyticus* LMG 17749, *V. anguillarum* LMG 10861, *V. campbelli* CECT 523, *V. chagasii* LMG 21353, *V. diabolicus* LMG 23867, *V. fluvialis* LMG 7894, *V. furnissi* CECT 4203, *V. harveyi* CECT 4215, *V. orientalis* CECT 629, *V. owensii* LMG 25443, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. parahaemolyticus* ATCC 43996, *V. rotiferianus* LMG 21460, *V. shilonii* LMG 19703, *V. splendidus* LMG 19031, *V. tapetis* DSMZ 21475, *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. cholerae* ATCC 25872, *V. cholerae* ISS 17b, *V. cholerae* ATCC 9459, *V. cholerae* ATCC 9458.

Ciascun ceppo è stato rivitalizzato su piastre contenenti TSA + 2% NaCl a 22 gradi per 24 ore. In seguito, 5 colonie per ceppo sono state disciolte in 1 ml di PBS ed è stato misurato l'O.D. a 600 nm tramite uno Spettrofotometro Multiskan GO Microplate.

Per assemblare la Mock sono stati aggiunti 100 µl di ciascun ceppo stemperato in PBS. Il pool finale è stato poi centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, il DNA della Mock è stato estratto seguendo il protocollo dell'Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Strattec molecular gmbH). Come primo step, a ciascuna Mock sono stati aggiunti 50 µl di lisozima (Millipore 10 mg/ml) e poi sono state incubate per 90 minuti a 37 ° C. Successivamente ai due campioni sono state aggiunte le beads e 400 µl di Lysis Buffer G. I campioni sono stati lisati mediante Tissue lyser per 30 secondi x 30 1 / s, quindi sono stati spinnati. Sono stati aggiunti 40 µl di Proteinasi S, poi i campioni sono stati mescolati tramite vortex e trasferiti in un termo-blocco a 56 ° C per 60 min. Programma per il termo-blocco: 450 rpm, 90 min, 37 ° C, Velocità orbitale 2,90 min, 37 ° C. è seguita una centrifuga a 11.000 x g (11.000 rpm) per 2 minuti, per separare il materiale non lisato. Il surnatante è stato quindi trasferito in una nuova provetta da 1,5 ml. A questo sono stati aggiunti 200 µl di Binding Buffer A e il tutto è stato vortexato per 10 sec.

Per filtrare i campioni, è stato inserito uno Spin Filer in una provetta da 2,0 ml, quindi i campioni sono stati trasferiti sul filtro e incubati per 1 minuto. Le provette contenenti il filtro sono state poi chiuse e centrifugate a 13.500 x g (12.000 rpm) per 3 min. Nel frattempo il tampone di eluizione (Elution Buffer) è stato riscaldato a 52 ° C. Successivamente l'eluato è stato scartato ed il filtro è stato posizionato nuovamente nella provetta. Sopra al filtro si sono aggiunti 550 µl di Wash Buffer, poi le provette sono state chiuse e centrifugate a 11.000 x g (11.000 rpm) per 1 minuto. Il filtrato è stato nuovamente scartato e riposizionato nella provetta. Questa fase di lavaggio è stata ripetuta e il filtrato di nuovo scartato. Il filtro è stato reinserito nella provetta e l'etanolo residuo è stato rimosso mediante centrifugazione finale alla massima velocità per 4 minuti. Il filtro è stato poi trasferito in una provetta da 1,5 ml e sono stati aggiunti 100 µl di Elution Buffer, precedentemente scaldato a 56°C.

I due campioni sono stati incubati per 3 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugati per 1 minuto a 11.000 x g (11.000 rpm). Infine, l'eluato è stato reinserito nel filtro e nuovamente centrifugato.

All'interno della seconda Mock si trovano i seguenti ceppi: *V. parahaemolyticus* ATCC 43996, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. tapetis* DSMZ 21475, *A. sobria* CECT 4245, *A. hydrophila* ATCC 7966T, *A. veronii* CECT 4257T, *P. fluorescens* MOZ3, *P. putida* CECT 324, *P. fluorescens* CECT 378, *P. lemmonieri* DSM 50415, *P. L34*, *Shewanella* QA1, *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* K12, *A. serratia* 803QA, *L. monocytogenes* ATCC 19117, *L. innocua* ATCC 33090, *L. fleischmannii* 106, *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* LMG 8197, *S. aureus* 415, *S. xylosus* 787, *L. sakei*, *P. pentosaceus* 923 CECT. Anche in questo caso il DNA di ogni ceppo batterico è stato rivitalizzato e poi estratto utilizzando l'Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Strattec molecular gmbH), omettendo però il primo passaggio con il lisozima. Inoltre, per i ceppi Gram negativi è stato saltato lo step di lisi meccanica mediante biglie.

Il DNA estratto dai ceppi è stato quantificato mediante NanoDrop e la sua degradazione è stata valutata in un gel d'agarosio all'1%. Infine, il pool finale delle due Mock è stato assemblato in due Eppendorf in cui sono stati trasferiti 5 µl di DNA appartenente a ciascun ceppo.

3.3.2 Preparazione delle librerie per il sequenziamento dei geni 16s rRNA, recA e pyrH

Per sequenziare il DNA di tutti i campioni e delle Mock Community sono state costruite le librerie dei geni 16s RNA, recA e pyrH, richieste per il sequenziamento. Per effettuare il sequenziamento tramite la tecnologia MiSeq (Illumina), i campioni sono stati inviati alla ditta UCDAVIS Genome Center (California).

Sono state create tre librerie separate per i tre geni 16s RNA, recA e pyrH. Per realizzare le tre librerie è stato seguito lo stesso protocollo, che prevede due step di PCR consecutivi, seguiti da una purificazione del DNA amplificato.

Nella seconda PCR è stato utilizzato come template l'amplificato purificato ottenuto dal primo step di PCR.

Nella prima PCR i primer utilizzati servono ad amplificare i geni target, mentre nella seconda reazione di PCR i primers vanno ad aggiungere ai frammenti precedentemente amplificati gli adattatori per il sequenziamento e il Barcode o Index. Questa breve sequenza è specifica per ogni campione e permette il sequenziamento di più campioni in contemporanea (Multiplexing). Quindi ciò ha permesso di riunire tutte le librerie in un unico pool equimolare ed effettuare un'unica corsa al MiSeq. Grazie ai Barcode alla fine del sequenziamento è stato possibile ricollegare ogni reads al rispettivo campione, operazione detta di de-multiplexing.

Il metodo di sequenziamento utilizzato, ovvero il Next Generation Sequencing, tecnologia Illumina MiSeq, prevede che la libreria genomica da sequenziare soddisfi dei requisiti qualitativi minimi.

Il DNA dei campioni deve essere a doppio filamento, non degradato e purificato. Per ottenere questi requisiti di qualità, il pool finale è stato valutato attraverso una corsa al Bioanalyzer e per la purificazione è stata utilizzato lo SPRIselect Reagent Kit (Beckman Coulter), come richiesto dal Next Generation Sequencing.

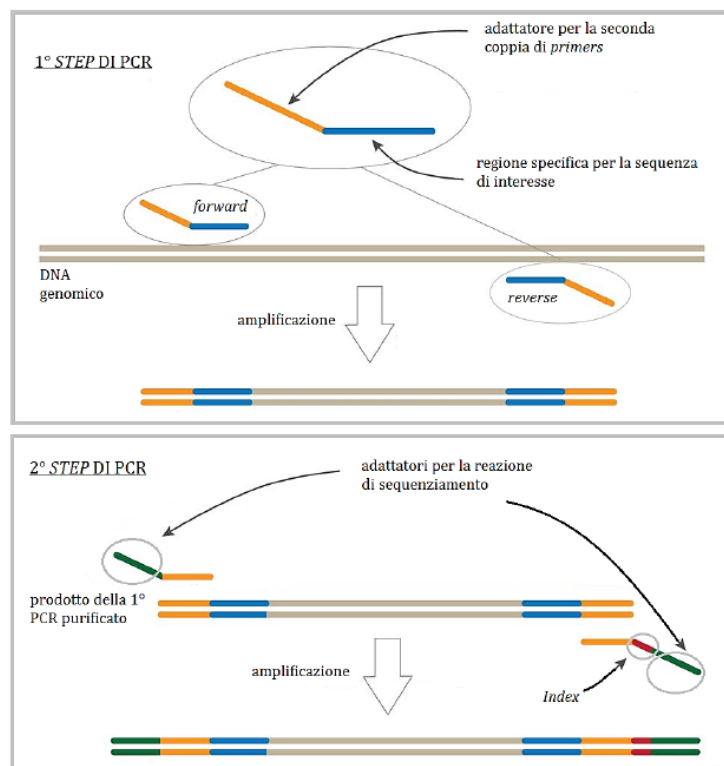


Figura 9. Schema dei due steps di PCR utilizzati per la costruzione delle librerie

3.3.2.1 Primo step di PCR

Nel primo step di PCR per l'amplificazione del 16s rRNA è stata utilizzata la coppia di primers 16S_For_Illumina (5'-CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TTC CTA CGG GAG GCA GCA GT-3') e 16S_Rev_Illumina (5'-CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG ACT ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT-3'). La sequenza dei due primer forward e reverse è disegnata in modo tale da legarsi alla regione costante che fiancheggia la regione variabile V3-V4 del gene.

Questi due primers contengono due regioni fondamentali: una al 3', che permette l'amplificazione della regione variabile V3-V4 del gene 16s rRNA dei batteri presenti nel campione e una al 5', che funge da adattatore, a cui si lega il primer del secondo step di PCR.

L'amplificazione è stata condotta in triplicato, per aumentare la probabilità di amplificazione anche delle sequenze meno rappresentate. È stata quindi preparata la mix per l'amplificazione del 16s rRNA e successivamente è stata suddivisa in tre piastre per ridurre l'errore della polimerasi.

La mix conteneva i seguenti reagenti:

Reagenti	1X
H ₂ O BDH	9,3 µl
HF Buffer 5X	4 µl
dNTPs 25 mM	0,2 µl
16S_PCR_Forward Primer (10 µl)	0,5 µl
16S_PCR Reverse Primer (10 µl)	0,5 µl
Taq Phusion	0,5 µl

Tabella 5. Reagenti utilizzati per la mix della prima PCR per l'amplificazione del 16s rRNA

Il volume di ciascun reagente è stato moltiplicato per tre (per condurre l'amplificazione in triplicato) e per il numero dei campioni. In seguito, 40 µl di mix sono stati aliquotati in ciascun pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. Ai 45 µl sono stati aggiunti 15 µl di DNA di ciascun campione, ottenendo un volume finale, per ciascun pozzetto, di 60 µl di mix + DNA. Il DNA dei campioni aggiunto è stato precedentemente diluito 1:50, tranne quello della Mock B, che è stato diluito 1:30.

Dopo aver mescolato la plate, grazie ad un agitatore (VELP Scientifica), il volume di ogni pozzetto è stato suddiviso in tre parti uguali (20 µl ciascuna) e posto in tre piastre da 96 pozzetti. Queste sono state poi amplificate, una dopo l'altra, nello stesso termociclatore (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler), applicando il profilo termico qui riportato:

	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	3 min	25
Denaturazione	95°C	30 sec	
Annealing	60°C	30 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Estensione finale	72 °C	7 min	
	4°C	∞	-

Tabella 6. Profilo termico utilizzato per lo svolgimento della prima PCR per il 16 s rRNA.

Dopo aver eseguito le tre amplificazioni le piastre sono state spinnate e tutti gli amplificati sono stati riunite in un'unica piastra. Quindi si è preparata una nuova piastra da 96 pozzetti per l'elettroforesi, in cui in ogni pozzetto sono stati aggiunti 3 µl di Loading Dye 2X (Green GoTaq Flexi Buffer; Promega)

e 3 μ l del prodotto di PCR. I campioni sono stati poi caricati nei pozzetti del gel, insieme al Marker 100 bp. L'elettroforesi in gel d'agarosio all'1,8 % serve per assicurarsi che l'amplificazione sia avvenuta correttamente, per verificare che gli ampliconi siano della dimensione attesa (circa 500 pb) e per verificare l'eventuale formazione di prodotti aspecifici o dimeri di primers.

Poi sono state costruite le due librerie, rispettivamente dei geni *recA* e *pyrH*. Per effettuare la prima PCR di ciascuna libreria sono stati seguiti gli stessi passaggi descritti per il gene 16s rRNA, variando però i reagenti (Tabella 7), la sequenza dei primer (Tabella 8) e il profilo termico dell'amplificazione (Tabella 9).

Reagenti	1X
H ₂ O BDH	7,63 μ l
HF Buffer 5X	4 μ l
dNTPs 25 mM	0,2 μ l
RecA/pyrH_PCR_Forward Primer (10 μ l)	0,5 μ l
RecA/pyrH_PCR Reverse Primer (10 μ l)	0,5 μ l
Taq Phusion	0,5 μ l

Tabella 7. Reagenti utilizzati nella mix della prima PCR per l'amplificazione dei geni *recA* e *pyrH*

Primers	Sequenza
VirecAF_NGS	5'-TG CGC TAG GTC AAA TTG AAA-3'
VirecAR_NGS	5'-GT TTC WGG GTT ACC RAA CAT YAC ACC-3'
VipyrH_NGS_F	5'-CC CTA AAC CAG CGT ATC AAC GTA TTC-3'
VipyrH_NGS_R	5'-CG GAT WGG CAT TTT GTG GTC ACG WGC-3'

Tabella 8. Primer utilizzati nella prima PCR per l'amplificazione dei geni *recA* e *pyrH*

	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	3 min	25
Denaturazione	95°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Estensione finale	72 °C	7 min	
	4°C	∞	-

Tabella 9. Profilo termico utilizzato nella prima PCR per l'amplificazione di *recA* e *pyrH*

Al termine della prima amplificazione i campioni sono stati fatti correre in gel d'agarosio all'1,8% per verificare la qualità degli amplificati.

3.3.2.2 Purificazione dei prodotti di PCR del primo step

Dopo il primo step di PCR per il gene 16s rRNA tutti gli amplificati ottenuti sono stati purificati utilizzando lo SPRIselect Reagent Kit (Beckman Coulter). Questo kit permette di selezionare i frammenti di DNA in base alla loro lunghezza, per cui può essere utilizzato per rimuovere i primers e i loro dimeri presenti in soluzione; in particolare, il kit prevede l'utilizzo di biglie magnetiche, a cui si legano molecole di DNA di dimensioni inferiori ad una determinata soglia.

In ciascun pozzetto della piastra, contenente gli amplificati purificati del primo step di PCR, è stato aggiunto un volume di biglie pari a 0,8 volte quello del campione. La piastra è stata poi mescolata ed incubata su un agitatore (Alpaqua Magnetic Plate) per 3 minuti, a 240/230 rpm, a temperatura ambiente. In seguito, la piastra è stata alloggiata su un supporto magnetico, in modo che le biglie ne venissero attratte formando un anello sulla parete di ogni pozzetto. Il surnatante è stato eliminato, stando attenti a non scartare le biglie, poiché ad esse è legato il DNA avente la lunghezza desiderata. Mantenendo la piastra sul supporto magnetico è stato effettuato un lavaggio delle biglie presenti in ogni pozzetto con 180 µl di etanolo all' 85%, rimosso dopo 30 secondi di incubazione a temperatura ambiente, avendo l'accortezza, anche in questo caso, di non prelevare le biglie.

Dopo che l'etanolo residuo è evaporato, la piastra è stata tolta dal supporto magnetico e il DNA eluito dalle biglie, risospendendole in 52.5 µl di H₂O BDH. Il tutto è stato mescolato e poi incubato per 1 minuto. Come ultimo passaggio la piastra è stata posta nuovamente sul supporto magnetico, le biglie sono ritornate ad essere adese alle pareti, per cui è stato possibile prelevare, da ciascun pozzetto, il prodotto di PCR (50 µl) purificato.

Per verificare la buona riuscita della purificazione, gli amplificati purificati, sono stati fatti correre in gel d'agarosio all'1,8%, aggiungendo ad ogni pozzetto 3 µl di ciascun campione e 3 µl di Loading Dye 2X (Green GoTaq Flexi Buffer; Promega), mentre nel primo pozzetto è stato inserito il Marker 100bp.

Nel primo step di purificazione delle librerie dei geni *recA* e *pyrH* è stato seguito lo stesso protocollo di purificazione descritto per il 16s rRNA.

3.3.2.2 Secondo step di PCR e purificazione

Nel secondo step di PCR per l'amplificazione del 16s RNA sono state utilizzate due diverse coppie di primers, riportate in Tabella 9. Il primer Reverse 2bRAD_BC_R contiene all'interno della sequenza 7

nucleotidi, indicati con “X”, che sono l’index (Barcode), ovvero la sequenza di nucleotidi che identifica ogni campione. Quindi ogni pozzetto conterrà un primer 2bRAD_BC_R con sequenza univoca, che permette di associare a ciascun amplificato il campione corrispondente, anche dopo averli riuniti in un unico pool. La sequenza degli altri tre primer utilizzati è invece identica per tutti i campioni. L’impiego di tutti e quattro questi primers permette: un’ulteriore amplificazione del prodotto amplificato con la prima PCR, l’aggiunta degli index e l’aggiunta di specifici adattatori che permettono il successivo sequenziamento dei campioni.

Primers	Sequenza
2bRAD_ampl_F	5’-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA-3’
2bRAD_ampl_R	5’-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA-3’
2bRAD_F	5’-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TTC-3’
2bRAD_BC_R	5’-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT XXXXXXXXGTGACTGGAGTT C AGA C GT GTG CTC TTC CGA TCT-3’

Tabella 10. Primers utilizzati nel secondo step di amplificazione del 16s rRNA.

Anche in questo caso l’amplificazione è stata condotta in triplicato ed è stata preparata una mix contenente i seguenti reagenti:

Reagenti	3X
H ₂ O BDH	26,375 µl
HF Buffer 5X	10 µl
dNTPs 25 mM	0,625 µl
p 10 µM amp F **	1 µl
p 10 µM amp R **	1 µl
P BC 10 µM	2,5 µl
2 bRad FOR	2,5 µl
Taq	1 µl

Tabella 11. Reagenti utilizzati nel secondo step della preparazione librerie del gene 16s rRNA.

Quindi 42.5 µl di mix sono stati aliquotati in tutti i pozzetti della piastra, in cui sono poi stati aggiunti 5 µl di ciascun template e 2.5 µl del corrispondente primer BC 10 µl, per un totale di 50 µl. Dopo aver mescolato la piastra, attraverso un agitatore, il volume contenuto all’interno di ciascun pozzetto è stato suddiviso in tre parti uguali e trasferito in tre nuove piastre; ottenendo un volume finale di 16.5 µl, in ogni pozzetto. Le tre piastre sono state spinnate e poi amplificate in termociclatore, impostando il seguente ciclo termico:

	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	98°C	3 min	10
Denaturazione	98°C	30 sec	
Annealing	60°C	30 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Estensione finale	72 °C	7 min	
	4°C	∞	-

Tabella 12. Ciclo termico utilizzato nel secondo step di amplificazione per la creazione di librerie del gene 16 s rRNA

Al termine di questa seconda amplificazione, gli amplificati sono stati riuniti in un'unica piastra e la loro qualità è stata valutata tramite elettroforesi in gel d'agarosio all'1,8%.

Infine, gli amplificati sono stati purificati seguendo lo stesso protocollo descritto al paragrafo 3.3.2.2. In questo caso, però, è stato utilizzato un volume di biglie pari a 1.1 volte quello di ogni campione; inoltre per l'eluizione sono stati utilizzati 27.5 µl di H₂O BDH e si è ottenuto un volume finale di 25 µl per ciascun amplificato purificato.

Anche alla fine di questa seconda purificazione i campioni sono stati corsi su un gel d'agarosio all'1.8%, per valutarne la qualità.

Il secondo step e la purificazione delle librerie per i geni *recA* e *pyrH* sono stati eseguiti seguendo gli stessi passaggi descritti per il 16s rRNA. Anche i reagenti e il profilo termico erano uguali a quelli utilizzati per il 16s rRNA, ma in questo caso sono stati impiegati barcode e primer con sequenze differenti:

Primers	Sequenza
VirecAF_NGS	5'- <u>CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TTG</u> CGC TAG GTC AAA TTG AAA-3'
VirecAR_NGS	5'- <u>CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGT</u> TTC WGG GTT ACC RAA CAT YAC ACC-3'
VipyrH_NGS_F	5'- <u>CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TCC</u> CTA AAC CAG CGT ATC AAC GTA TTC -3'
VipyrH_NGS_R	5'- <u>CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCG</u> GAT WGG CAT TTT GTG GTC ACG WGC -3'

Tabella 13. Sequenze dei primers utilizzati per il secondo step di PCR per la creazione delle librerie dei geni *recA* e *pyrH* (la porzione di sequenza sottolineata è l'adattatore Illumina).

Al termine del secondo step di PCR, è seguita la valutazione della qualità e della lunghezza degli ampliconi tramite elettroforesi in gel d'agarosio all'1,8%, la purificazione (condotta seguendo lo stesso procedimento descritto al paragrafo 3.3.2.2) ed infine il controllo degli ampliconi purificati, attraverso la corsa in gel d'agarosio all'1,8%.

3.3.3.3. Creazione del pool finale per il sequenziamento

Alla fine della seconda purificazione e della corsa elettroforetica di tutti i campioni, per poter creare un pool finale di librerie di DNA equimolare, i campioni sono stati quantificati utilizzando i reagenti (buffer e fluoroforo) del Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific). I campioni e gli standard per la retta di taratura sono stati preparati all'interno di una piastra da 96 pozzetti, la cui lettura è avvenuta utilizzando il termociclatore per Real Time PCR Mx3000 PRO Systems (Agilent Technologies) e seguendo il protocollo Quantitative Plate Read. In questo saggio fluorimetrico, il colorante si lega in modo specifico al DNA a doppio filamento. Per questo, la quantificazione degli amplificati è più precisa rispetto ad altre misure spettrofotometriche - ad esempio quelle eseguite al Nanodrop - poiché non viene influenzata dalla presenza di singoli nucleotidi, composti organici o eventuali contaminanti.

Con i valori di fluorescenza ottenuti per gli standard, è stata costruita una retta di taratura con il programma Excell, in particolare si è ottenuta una linea di tendenza polinomiale di terzo ordine, che mette in relazione la fluorescenza degli standard con la loro concentrazione, che è nota. Quindi utilizzando questo grafico e i valori di fluorescenza ottenuti per ciascun campione è stato possibile ricavare la concentrazione di DNA (in ng/μl) di ogni singolo campione. Da questa è stato calcolato il volume da prelevare da ogni campione, per ottenere un pool finale equimolare. In questo modo tutte le librerie presenti nel pool, destinate al sequenziamento, contenevano la stessa quantità di DNA.

Per assicurarsi che la concentrazione del pool finale fosse quella attesa, dopo aver aggiunto il volume esatto di ogni campione in una eppendorf, il pool è stato mescolato e quantificato con il Qubit dsDNA BR Assay Kit. In questo caso la lettura della concentrazione è stata effettuata con il Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific), come previsto dal protocollo del kit.

Infine, prima di inviare il pool equimolare a sequenziare, ne è stata valutata la qualità utilizzando il 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), seguendo il procedimento riportato nel manuale dello strumento. Quest'analisi prevede l'aggiunta del campione e del marcatore di pesi molecolari all'interno dei pozzetti di un chip, che viene poi inserito nello strumento. I campioni poi migrano in un unico canale, in cui avviene una corsa elettroforetica che li separa in base alla loro dimensione (Figura 10). I campioni così separati vengono rilevati grazie alla loro fluorescenza e le informazioni ricavate vengono elaborate tramite il software 2100 Expert. Questo visualizza i dati sottoforma di bande, simili

a quelle ottenute con le corse elettroforetiche su gel, o picchi, restituendo dei veri e propri elettroferogrammi.

Il Bioanalyzer permette quindi l'analisi elettroforetica del DNA, fornendo informazioni digitali, riguardanti la sua concentrazione, dimensione e integrità. Rispetto alla tradizionale elettroforesi su gel permette un risparmio di tempo, campioni (sono richiesti solo 1–4 µl) e reagenti (www.agilent.com). Dopo l'analisi al Bioanalyzer, dal pool equimolare è stata prelevata un'aliquota di DNA contenente il volume di DNA richiesto dalla UCDAVIS Genome Center (California), ed è stata inserita all'interno di una nuova provetta, per il successivo sequenziamento.



Figura 10. Chip per Bioanalyzer e percorso dei campioni al suo interno (www.agilent.com)

3.4 Analisi bioinformatiche

Al termine del sequenziamento, si sono ottenute 6.487.279 sequenze grezze per il 16s e 10.869.501 sequenze grezze per *recA* e *pyrH*. Le reads ottenute sono state ricollegate a ciascun campione (operazione detta di Demultiplexing), grazie ai Barcode aggiunti nel secondo step di amplificazione. Questa operazione è stata eseguita dall'azienda di sequenziamento UC Davis Campus Core Facility (California), che ha poi fornito come output i file FASTQ contenenti le sequenze grezze da 300 pb (Forward e Reverse) di tutti i campioni. I file FASTQ associano ad ogni nucleotide della sequenza un punteggio che indica l'accuratezza con cui è stato assegnato quel determinato nucleotide, in modo da poter valutare la qualità del sequenziamento.

Le sequenze sono state poi caricate all'interno del software FASTQC, per effettuare un'analisi qualitativa e sono state scartate quelle con un quality score inferiore a 20.

Nel caso del sequenziamento del gene 16s rRNA le coppie di sequenze ottenute erano in tutto 57: 55 campioni di omogenato, più le due Mock Community.

Prima di analizzare le sequenze con i vari software è stato creato un file Excell denominato *meta data*, che associa ai nomi dei campioni i nomi dei file corrispondenti, contenenti le sequenze. Il file *meta*

data segue un modello prestabilito, che varia per ogni software utilizzato, per cui in alcuni casi è necessario inserire informazioni aggiuntive.

Per analizzare le sequenze ottenute dal sequenziamento dei geni 16s rRNA, *recA* e *pyrH* sono stati utilizzati diversi software bioinformatici. In particolare, per l'elaborazione delle sequenze del 16s rRNA sono stati impiegati QIIME 2 e CALYPSO, mentre per l'analisi dei dati ottenuti dal sequenziamento di *recA* e *pyrH* sono stati utilizzati i software KRACKEN 2 e CALYPSO.

3.4.1 QIIME 2

Le reads ottenute dal sequenziamento dei geni 16s rRNA sono state analizzate con il software QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2, versione 2019.10), una pipeline bioinformatica open source utilizzata per effettuare analisi di microbiomi partendo da sequenze di DNA grezze. QIIME 2 permette l'elaborazione delle sequenze grezze ottenute da Illumina o altre piattaforme e permette di generare grafici e statistiche. Inoltre, consente di effettuare: operazioni di demultiplexing, l'analisi della qualità delle sequenze, l'assegnazione tassonomica, la ricostruzione filogenetica e l'analisi e visualizzazione della diversità microbica (www.qiime.org).

Una volta importati i dati delle sequenze in QIIME 2, il programma ha effettuato il trimming e il merging delle sequenze grezze. Con l'operazione di trimming vengono rimosse dalle reads le sequenze degli adattatori e vengono scartate le porzioni di sequenza con qualità inferiore ad una soglia stabilita. Il merging, invece, allinea le reads R1 e R2 di ciascun campione, in modo da ottenere un'unica sequenza. Successivamente il programma ha generato un file con estensione “.qza”, i cui dati sono stati elaborati tramite DADA 2, un software presente all'interno di QIIME 2.

DADA 2 è un algoritmo che permette l'inferenza degli ASV (varianti di sequenza di ampliconi, ovvero le sequenze prive di errori) presenti in una libreria generata da un sequenziamento di ampliconi. L'algoritmo DADA 2 utilizza un modello statistico, che consente di valutare se due sequenze sono diverse perché appartenenti a due campioni diversi, o perché generate da errori di sequenziamento. Le fasi di elaborazione dei dati da parte di DADA 2 includono: la valutazione della qualità delle sequenze, l'apprendimento del modello di errore specifico del set di dati, l'inferenza degli ASV, la rimozione delle chimere e l'assegnazione tassonomica (Callahan et al., 2019).

Al termine dell'analisi il software restituisce come output:

- ⇒ Una tabella (feature table), denominata “table.qza” che mostra sull'asse delle ordinate le sequenze e in ascissa il codice assegnato ad ogni sequenza; all'interno di ogni casella viene espresso, tramite un numero, quante volte ogni sequenza è stata rilevata all'interno di ciascun campione.
- ⇒ Un file, denominato “rep-seq.qza”, che contiene le sequenze nucleotidiche dei campioni espresse in basi (features) e il relativo codice univoco assegnato in modo automatico dal programma.

⇒ Un file contenente alcune statistiche e il riepilogo di altre operazioni eseguite dal software, come la pulizia delle sequenze e l'eliminazione delle chimere.

Dopo aver ottenuto il file rep-seq, questo è stato confrontato, sempre all'interno di QIIME 2, con un file proveniente dal database Silva, che conteneva le sequenze dei geni 16s, in modo da effettuare l'assegnazione tassonomica dei campioni sequenziati. Come output si è ottenuto il file taxonomy.qza., che assegna ad ogni feature, una specie batterica.

Infine, per le successive analisi con il software CALYPSO è stato necessario convertire il file table.qza in table.biom e il file taxonomy.qza in taxonomy.txt.

3.4.2 CALYPSO

Per le successive analisi delle sequenze del 16s rRNA è stato utilizzato il software CALYPSO, in cui sono stati inseriti come input tre file: *meta data*, table.biom e i taxonomy.txt.

Calypso è un software online di facile utilizzo che permette di interpretare e confrontare le informazioni tassonomiche ricavate da data set di dati metagenomici o 16S rRNA (www.cgenome.net). In questo studio il software CALYPSO è stato utilizzato per analizzare l'Alpha Diversity e la Beta Diversity dei campioni. L'Alpha Diversity misura la diversità microbica presente all'interno di un campione, mentre la Beta Diversity permette di valutare la diversità microbica che c'è tra campioni diversi.

Sui dati ottenuti è stato effettuato il test ANOVA e la Heatmap, che permettono lo studio dell'Alpha Diversity. L'ANOVA (Analysis of Variance) è un test statistico che permette di valutare sia la variabilità intraspecifica, sia la variabilità interspecifica di due o più gruppi di sequenze, confrontandoli tra loro, senza l'utilizzo di matrici di distanza filogenetica. La Heatmap, invece, è un grafico in cui l'abbondanza dei vari generi batterici presenti in ogni campione viene rappresentata attraverso l'utilizzo di colori diversi.

Infine, per valutare Beta-Diversity dei campioni, è stata effettuata l'analisi delle ridondanze (RDA), un'analisi statistica, che consente di confrontare le popolazioni microbiche presenti in campioni diversi.

3.4.3 KRAKEN 2

Per analizzare le sequenze dei geni *recA* e *pyrH*, non è stato possibile utilizzare QIIME 2, poiché è un software pensato e ottimizzato per l'analisi di sequenze del 16s rRNA. Si è quindi provato a costruire un database di genomi di *recA* e *pyrH* del genere *Vibrio*, ma una volta importato in QIIME 2 risultava

troppo stringente e non forniva i risultati desiderati. Per questo, si è pensato di utilizzare le sequenze ottenute da questi due geni come micro-metagenomi, da inserire come input in un software di metagenomica per effettuare uno studio tassonomico.

Il software utilizzato è KRAKEN 2, che permette l'identificazione tassonomica di brevi sequenze di DNA, attraverso uno studio metagenomico. Altri software di bioinformatica, per svolgere questa operazione, utilizzano l'allineamento delle sequenze o tecniche di machine learning, che sono però lente e a volte poco sensibili. KRAKEN mira a raggiungere un'alta sensibilità e velocità di analisi, utilizzando allineamenti esatti di k-mers e un nuovo algoritmo di classificazione.

KRAKEN classifica le sequenze e assegna loro un'identificazione tassonomica, ma non stima l'abbondanza di specie presente in ciascun campione. Per questo, per ottenere un'analisi tassonomica più accurata le sequenze classificate da KRAKEN 2 vengono ulteriormente analizzate dal software BRAKEN, che permette di ottenere una stima accurata dell'abbondanza a livello di specie e genere anche nel caso in cui in un campione si trovino due o più specie quasi identiche (www.ccb.jhu.edu).

Il software quindi confronta tra di loro le sequenze fornite, le confronta con quelle presenti nel database ed infine crea un file Excell, che indica per ogni sequenza inserita, la specie corrispondente e il numero di reads rilevate. L'identificazione è stata effettuata impostando il parametro 0,1 le reads sono state filtrate per un minimo di 10 reads.

Dal file viene poi elaborata la feature table con estensione “.biom” da inserire in CALYPSO, insieme al file *meta data*, per effettuare analisi di Alpha e Beta-Diversity.

Dalle analisi preliminari delle identificazioni fornite dal software, è stata costruita una tabella che riunisce le specie identificate da *recA* e *pyrH* nelle Mock, nei campioni depurati, in quelli non depurati e nei campioni di acqua. In base alle identificazioni ottenute è stata poi effettuata un'analisi delle ridondanze (dbRDA).

La valutazione delle specie presenti nei campioni, effettuata tramite il sequenziamento dei due geni *recA* e *pyrH*, deve essere considerata solo come qualitativa e non come una quantificazione assoluta.

4. RISULTATI

4.1 Analisi culturale dei campioni

I campioni di vongole e acqua raccolti in questo studio, sono stati seminati su due differenti terreni: MA e TCBS, per andare a studiare la popolazione di batteri coltivabile, presente nei campioni. Questo metodo coltura-dipendente sottostima la diversità microbica totale, in quanto alcuni microorganismi potrebbero essere presenti nei campioni, ma non sono in grado di crescere sui terreni utilizzati.

Dopo opportuna incubazione delle piastre, è stata eseguita la conta totale delle colonie presenti, per effettuare un'analisi quantitativa dei batteri cresciuti.

Di seguito sono mostrati i boxplot delle conte totali su Marine Agar (MA) e TCBS riferiti ai 10 campioni pre-depurazione e ai 40 campioni post-depurazione, provenienti dai quattro diversi centri di depurazione.

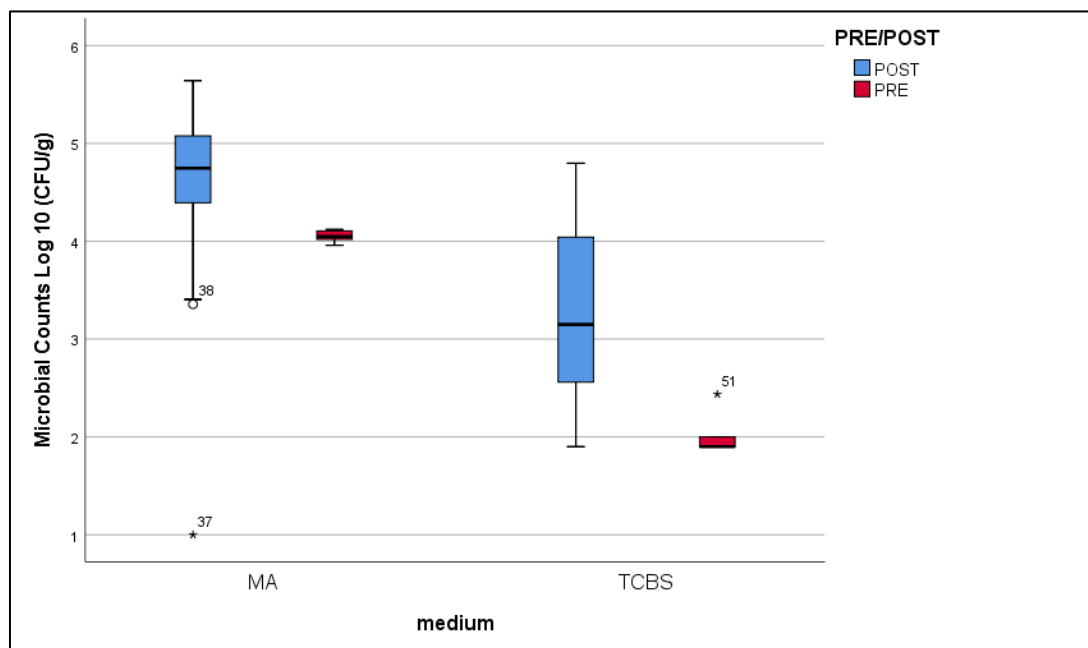


Grafico 1: Boxplot delle conte totali, eseguite su Marine Agar (MA) e TCBS, dei campioni pre-depurazione (PRE) e post-depurazione (POST). Le conte microbiche sono riportate su scala logaritmica in base 10 (Log₁₀ UFC/g), p-value (0.002).

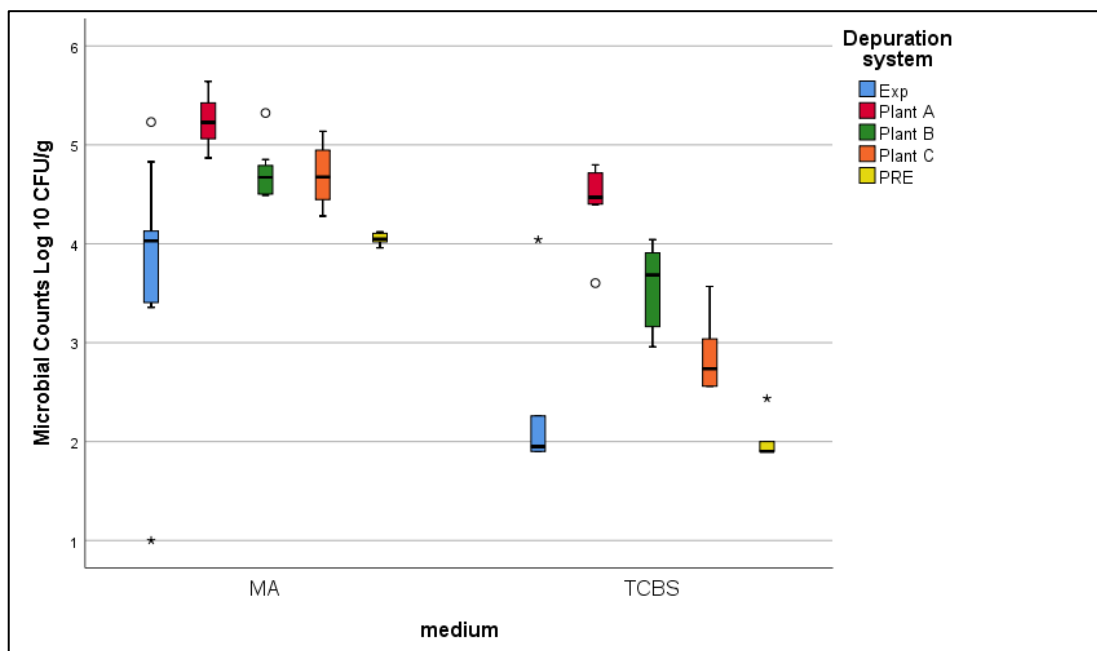


Grafico 2: Boxplot delle conte mesofile dei campioni pre-depurazione (PRE) e post-depurazione (suddivise per impianto: EXP, PLANT A, PLANT B, PLANT C) eseguite sui terreni Marine Agar (MA) e TCBS. Le conte microbiche sono riportate su scala logaritmica in base 10 (Log_{10} UFC/g), p-value (0.002).

Il **Grafico 1** mostra i risultati (in scala logaritmica) delle conte mesofile, eseguite sui terreni Marine Agar (MA) e TCBS, in cui erano stati seminati i campioni pre-depurazione e post-depurazione. Risulta evidente che nel terreno di coltura Marine Agar si registra sempre una maggiore crescita di microorganismi, sia nei campioni post-depurazione, sia nei campioni pre-depurazione, rispetto al terreno TCBS. Questo è riconducibile alla tipologia di terreno, infatti questo terreno è selettivo per i batteri marini del genere *Vibrio*, mentre il Marine Agar è un terreno generico, in cui crescono tutti i batteri marini.

Inoltre, è possibile osservare come, in entrambi i terreni, i campioni post-depurazione presentino in modo statisticamente significativo (p-value <0,05) una carica microbica più elevata rispetto a quelli pre-depurazione.

Il **Grafico 2** mostra invece le conte, effettuate sui due terreni, ma in questo caso i campioni post-depurazione sono suddivisi per impianto di depurazione (EXP, PLANT A, PLANT B, PLANT C). Per quanto riguarda il terreno Marine Agar si può notare come le vongole provenienti dall'impianto PLANT A siano quelle che mostrano la più alta carica microbica, superiore ai 5 Logaritmi UFC/g. Tale carica risulta essere la più alta, anche se confrontata con quelle ottenute sul terreno TCBS. Il valore di carica più basso è invece quello dei campioni di post-depurazione provenienti dall'impianto sperimentale EXP; tale valore è simile a quello dei campioni di pre-depurazione, coltivati sullo stesso

terreno. Infine, si può notare come la crescita microbica sia simile, tra i 4 e i 5 Logaritmi UFC/g, nei campioni provenienti dai due impianti PLANT B e PLANT C.

Anche nel caso del terreno TCBS, i campioni post-depurazione provenienti dal PLANT A sono quelli che registrano la maggiore crescita di microorganismi, che in questo caso appartengono al genere *Vibrio*. Su TCBS, le vongole depurate dall'impianto sperimentale (EXP) mostrano invece la minor carica di *Vibrio* tra i campioni depurati, che risulta però essere leggermente superiore a quella registrata nei campioni pre-depurazione (PRE).

Analizzando la distribuzione dei dati rispetto alla mediana, si osserva come i campioni dell'impianto sperimentale EXP coltivati su Marine Agar e quelli dell'impianto PLANT B coltivati su TCBS mostrino una maggiore dispersione dei dati, rispetto ad esempio ai campioni pre-depurazione coltivati su MA e TCBS.

In generale si può dedurre che le vongole depurate con il metodo utilizzato dall'impianto sperimentale (EXP), presentano una carica batterica (sia di batteri marini totali, sia di *Vibrio*) molto simile a quella rilevata nelle vongole non depurate, provenienti dall'allevamento (campioni PRE).

4.2 Metodo coltura-indipendente

Per valutare la composizione totale del microbiota associato alle vongole si è applicato il metodo coltura indipendente che permettono di identificare in modo più accurato tutti i batteri, sia vivi, sia morti, presenti all'interno dei campioni.

Il DNA è stato estratto da tutti i campioni di vongole, di acqua e dalle Mock (come descritto nel paragrafo), poi sono state costruite le librerie per il sequenziamento NGS Illumina dei geni 16s rRNA, *recA*, *pyrH* (come descritto nel paragrafo). I dati e i grafici relativi alle analisi statistiche svolte sulle sequenze sono stati di seguito riportati.

4.2.2 Analisi delle sequenze 16s

Le sequenze grezze del gene 16s rRNA ottenute dal sequenziamento MiSeq (Illumina) sono state analizzate qualitativamente tramite FASTQC. Successivamente gli output di sequenziamento sono stati inseriti nel software QIIME2 che ci ha restituito i tre file da imputare poi al software CALYPSO.

4.2.2.1 Curva di rarefazione

Per prima cosa è stata valutata la curva di rarefazione per verificare se il numero di sequenze ottenute dal sequenziamento (reads) è sufficiente per descrivere la biodiversità presente all'interno dei campioni.

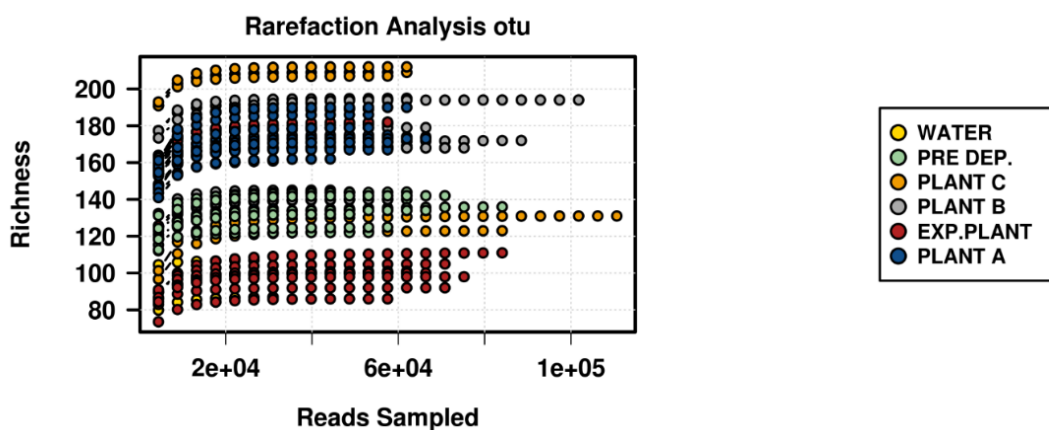


Grafico 3: Curva di rarefazione di tutti i campioni analizzati

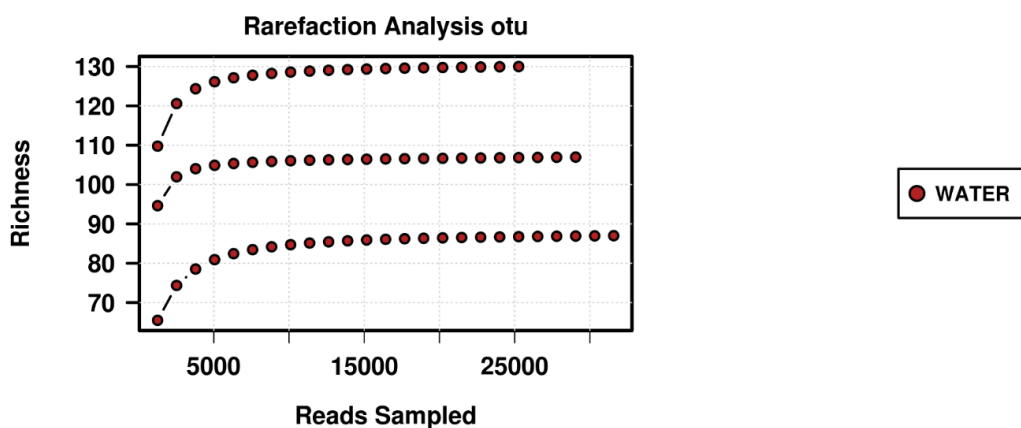


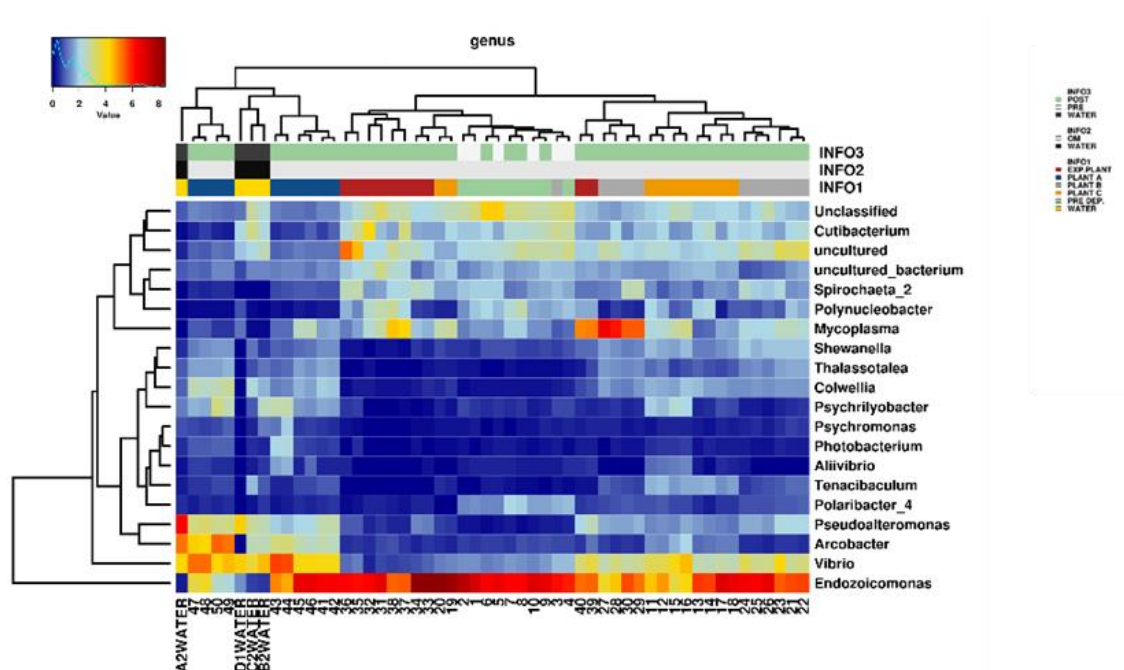
Grafico 4: Curva di rarefazione dei campioni di acqua

Nel **Grafico 3** viene mostrata la curva di rarefazione di tutti i campioni analizzati, mentre nel **Grafico 4** viene mostrata la curva di rarefazione solamente dei campioni di acqua.

In generale quasi tutti i pool di sequenze mostrano un andamento simile: le curve di rarefazione tendono ad un plateau. Questo significa che il numero di reads ottenute è sufficiente per descrivere in modo adeguato la biodiversità presente nei vari campioni.

Nel **Grafico 4** non viene riportato il quarto campione di acqua, quello prelevato dalle vasche di depurazione dell'impianto sperimentale. Infatti, questo campione presentava un numero troppo basso di reads (inferiore a 1000), per cui è stato eliminato dalle analisi, in quanto poco informativo. Probabilmente questo campione presentava una minore biodiversità perché al suo interno vi era una bassa carica microbica.

La biodiversità presente nei campioni e la similarità nelle comunità microbiche dei campioni sono presentate nel **Grafico 5**.



INFO 1, INFO 2 e INFO 3, permettono di distinguere, in base al colore, il nome dell'impianto di depurazione, il tipo di campione (omogenato o acqua) e la sua origine (pre o post depurazione).

59

invece viene riportato un dendrogramma, che descrive la similarità dei vari generi in base alla distribuzione nei diversi campioni. Per ogni campione è quindi possibile stabilire i generi microbici contenuti al suo interno e la loro abbondanza relativa. Quest'ultima viene misurata tramite una scala di colori, la cui legenda è posta in alto a sinistra; ai generi meno abbondanti viene assegnato il colore blu, mentre a quelli più abbondanti il colore rosso.

È necessario però ricordare che l'abbondanza visualizzata in questo grafico è relativa, ciò significa che non è assoluta, quindi indica la prevalenza di un certo genere rispetto ad un altro. Per cui, per dire che un genere è molto abbondante in due campioni diversi, non è necessario che questo presenti una carica microbica assoluta simile nei due campioni.

Il genere batterico più rappresentato nella maggior parte dei campioni (esclusi quelli di acqua) è *Endozoicomonas*, un batterio simbiote degli animali marini.

I *Vibrio* risultano abbondanti nei campioni di acqua e nei campioni provenienti dall'impianto PLANT A, mentre sono presenti, ma in misura minore, nei campioni provenienti dagli impianti PLANT C e PLANT B. I campioni pre-depurazioni (PRE.DEP) e quelli prelevati dall'impianto sperimentale (EXP.PLANT) sono, tra tutti i campioni, quelli che presentano la minor abbondanza di batteri del genere *Vibrio*.

Inoltre, è possibile osservare come i batteri del genere *Arcobacter* siano più abbondanti nei campioni depurati dall'impianto A (PLANT A), rispetto a quelli depurati dagli altri impianti. Il genere *Mycoplasma* è invece molto abbondante solamente nei campioni prelevati dall'impianto sperimentale (EXP.PLANT) e nell'impianto (PLANT B).

Nel grafico viene riportata la dicitura Unclassified, poiché non è stato possibile attribuire un genere batterico ad alcune sequenze presenti all'interno dei campioni.

4.2.2.3 Analisi dell'Alpha Diversity: test ANOVA

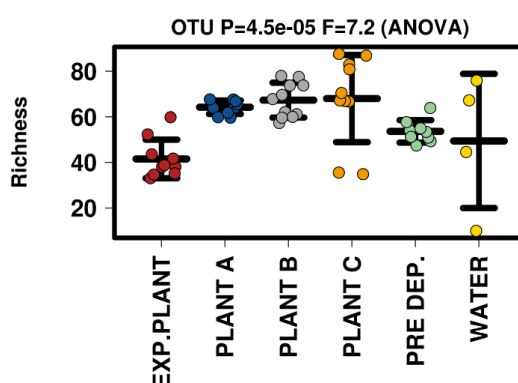


Grafico 6. Stripchart a una dimensione che mostra la biodiversità esistente tra: i campioni prelevati dai 4 diversi impianti di depurazione (PLANT A, PLANT B, PLANT C, EXPERIMENTAL PLANT), i campion pre-depurazione (PRE DEP.) e i campioni di acqua (WATER), p-value < 0.05

Nel **Grafico 6** viene mostrata l'analisi statistica ANOVA, che mostra la ricchezza delle OTU presente all'interno dei campioni degli omogenati provenienti dai diversi impianti di depurazione e nei campioni di acqua. Tale ricchezza viene definita Richness e permette di valutare l'Alfa Diversity presente all'interno dei vari campioni.

In generale dall'analisi si può osservare un incremento della Richness nei campioni depurati rispetto a quelli non depurati. I campioni con la maggior Richness, che hanno quindi la maggiore biodiversità, sono i campioni di vongole prelevate dall'impianto C (PLANT C). I campioni con la minor Richness sono quelli provenienti dall'impianto sperimentale (EXP. PLANT), che presentano un valore più basso rispetto a quello dei campioni non depurati (PRE DEP) e a quello dei campioni di acqua (WATER). I campioni prelevati dagli impianti di depurazione A e B (PLANT A, PLANT B) hanno invece valori molto simili di biodiversità.

Si può osservare, inoltre, come le repliche biologiche prelevate dall'impianto C (PLANT C), differiscano molto tra loro, mostrando un alto livello di dispersione dei dati. Anche nel caso dell'acqua (WATER), si nota un'elevata biodiversità. I campioni provenienti dagli altri impianti e i non depurati mostrano invece una maggiore omogeneità dei dati.

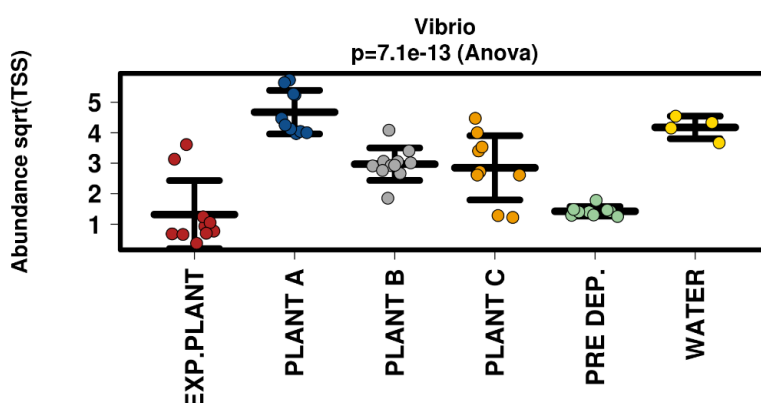


Grafico 7. Stripchart a una dimensione che mostra l'abbondanza del genere *Vibrio* presente nei campioni provenienti dai vari impianti (PLANT A, PLANT B, PLANT C, EXPERIMENTAL PLANT) e nei campioni di acqua (WATER), p-value < 0.05.

Nel **Grafico 7** viene riportata l'abbondanza del genere *Vibrio* nei campioni provenienti dai quattro impianti di depurazione e nei campioni di acqua. In particolare, si può osservare come i campioni di vongole depurate nell'impianto sperimentale (EXP.PLANT) presentino la minor abbondanza di batteri del genere *Vibrio*, rispetto a quelle depurate negli altri tre impianti (PLANT A, PLANT B, PLANT C). Tale abbondanza risulta essere molto simile a quella dei campioni non depurati (PRE.DEP.) Le vongole

depurate dall'impianto A (PLANT A) presentano invece la maggior abbondanza di *Vibrio*, che risulta essere leggermente superiore a quella registrata nei campioni di acqua (WATER).

4.2.2.4 Analisi della Beta Diversity: RDA

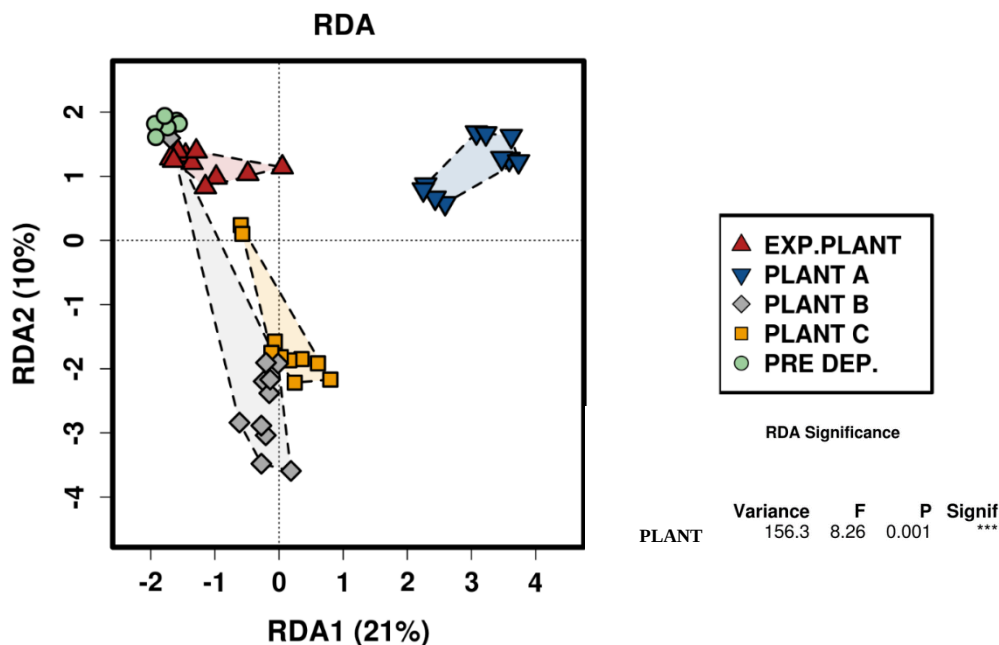


Grafico 8: Grafico RDA dei campioni di omogenato e di acqua prelevati dai quattro diversi impianti di depurazione, p-value < 0.05.

Nel **Grafico 8** viene visualizzata l'analisi delle ridondanze, per valutare la Beta Diversity dei campioni, ovvero per confrontare la diversità microbica tra campioni diversi. Viene quindi effettuata un'analisi statistica dei dati, che, attraverso l'analisi del p-value, permette di confrontare i campioni e raggruppare quelli che presentano una diversità microbica simile.

In generale, si può osservare come i diversi campioni provenienti da uno stesso impianto siano vicini tra loro. Ciò significa che campioni prelevati dallo stesso impianto presentano al loro interno una composizione microbica molto simile, ma diversa da quelli prelevati da un impianto differente.

In particolare, nel grafico si nota come i campioni di vongole e acqua provenienti dall'impianto A (PLANT A) mostrino una popolazione microbica statisticamente diversa rispetto a quelli provenienti dagli altri impianti (p-value < 0,05).

Inoltre, si può osservare come i campioni provenienti dall'impianto sperimentale (EXP.PLANT) e quelli non depurati presentino una composizione microbica molto simile. Questo è evidente anche per i campioni provenienti dall'impianto C (PLANT C) e (PLANT B).

4.2.3 Analisi delle comunità di *Vibrio* nelle vongole pre e post depurazione e nei campioni di acqua

Le specie di *Vibrio* presenti all'interno dei campioni di vongole pre e post depurazione sono state identificate analizzando le sequenze ottenute dal sequenziamento dei due geni *recA* e *pyrH*. I risultati relativi ai due geni sono stati riuniti in un'unica tabella e in un unico grafico dbRDA di seguito riportati.

4.2.3.1 Specie batteriche identificate

		SAMPLES		
MOCK COMPOSITION		MOCK	PRE	POST WATER
1	<i>P. damsela</i>			1
2	<i>Vibrio aestuarianus</i>			
3	<i>Vibrio alginolyticus</i>			2
4	<i>Vibrio anguillarum</i>			1
5	<i>Vibrio campbelli</i>			
6	<i>Vibrio chagasii</i>			
7	<i>Vibrio cholerae</i>			12
8	<i>Vibrio diabolicus</i>			1
9	<i>Vibrio fluvialis</i>			8
10	<i>Vibrio furnissi</i>			4
11	<i>Vibrio harveyi</i>			
12	<i>Vibrio mediterranei</i>			
13	<i>Vibrio orientalis</i>			
14	<i>Vibrio owensii</i>			
15	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			1
16	<i>Vibrio rotiferianus</i>			2
17	<i>Vibrio shilonii</i>			1
18	<i>Vibrio splendidus</i>		ALL	
19	<i>Vibrio tapetis</i>		2	28
20	<i>Vibrio vulnificus</i>			1
ADDITIONAL SPECIES IDENTIFIED				
1	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>			2
2	<i>Aliivibrio fischeri</i>			11
3	<i>Aliivibrio wodanis</i>			3
4	<i>Alteromonas australica</i>			1
5	<i>Alteromonas mediterranea</i>			3
6	<i>Alteromonas naphthalenivorans</i>			1
7	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		1	1
8	<i>Natrialba magadii</i>			1
9	<i>Pseudoalteromonas donghaensis</i>			1
10	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>			1
11	<i>Psychrobacter alimentarius</i>		1	1
12	<i>Psychrobacter</i> sp. AntiMn-1			1
13	<i>Psychrobacter</i> sp. P11F6			1
14	<i>Shewanella baltica</i>			1
15	<i>Shewanella japonica</i>		1	2
16	<i>Vibrio breoganii</i>		1	3
17	<i>Vibrio scopthalmi</i>			3
18	<i>Vibrio tubiashii</i>			1

Tabella 14. Specie batteriche identificate dall'analisi delle sequenze dei geni *recA* e *pyrH*.

Nella **Tabella 14** sono riportate le specie batteriche identificate dall'analisi delle sequenze ottenute dal sequenziamento dei geni *recA* e *pyrH*. I risultati riportati nella tabella sono relativi a tutti i campioni pre-depurazione, post-depurazione, ai campioni di acqua e alle Mock. Le caselle in verde indicano le specie identificate dai geni marcatori nei corrispondenti campioni. Inoltre, nelle caselle verdi viene riportato il numero di campioni positivi per quella specie.

Le caselle appartenenti alle specie, che sono state inserite all'interno della Mock (quindi a identità nota), ma che non sono state identificate dai due marcatori sono evidenziate in rosso. Per ciascuna tipologia di campione è stato inoltre riportato il numero di campioni risultati positivi per quella determinata specie.

Inoltre, sono riportate anche delle ADDITIONAL SPECIES, ovvero 18 specie identificate dai marcatori, ma che non erano tra quelle inserite all'interno Mock. Tra queste, alcune appartengono al genere *Vibrio*.

In generale, nei campioni sono state ritrovate molte specie di *Vibrio*, tra cui: *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. furnissi*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Queste sono potenzialmente patogene per l'uomo, ma la loro patogenicità deve essere confermata tramite la ricerca di specifici geni di virulenza. Inoltre, sono state identificate le specie *V. splendidus*, *V. alginolyticus* e *V. tapetis* che causano malattia nei molluschi.

In particolare, si può notare come tutte le specie potenzialmente patogene per l'uomo siano state ritrovate nei campioni post-depurazione, ma risultano assenti nei campioni pre-depurazione. Inoltre, *V. cholerae*, *V. fluvialis* e *V. parahaemolyticus* erano presenti sia nei campioni post-depurazione, sia nei campioni di acqua.

Le specie maggiormente ritrovate nei campioni post depurazione sono state *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. tapetis* e *Aliivibrio fischeri*. Inoltre, le specie *V. splendidus*, *V. tapetis*, *S. japonica* e *V. breoganii* sono state identificate in tutte e tre le tipologie di campioni: pre-depurazione, post-depurazione e acqua. La specie ritrovata più volte in questi tre tipi di campioni è *V. tapetis*.

Infine, si può notare come nei campioni di acqua siano state identificate molte più specie batteriche rispetto a quelle identificate nei campioni pre e post depurazione.

4.2.3.2 Analisi della Beta Diversity: dbRDA

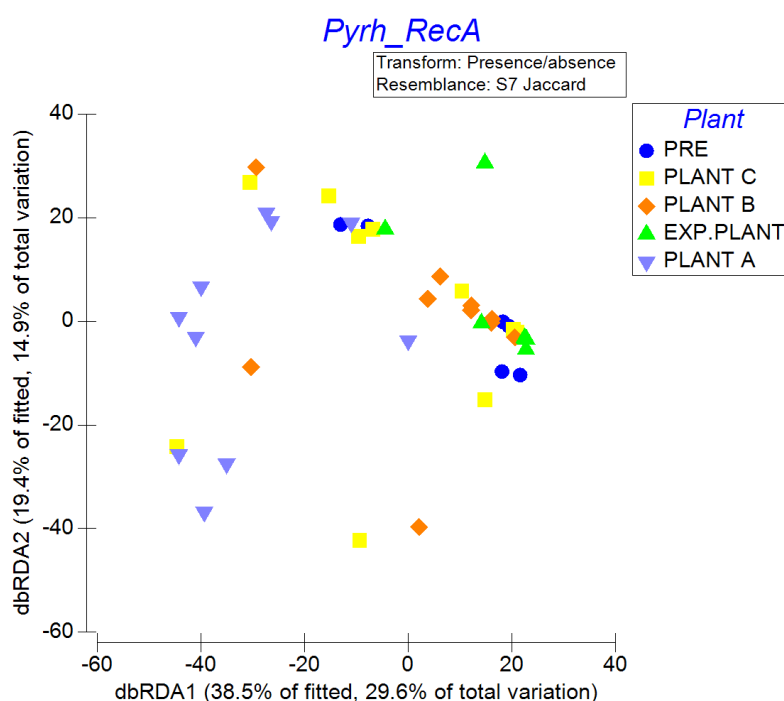


Grafico 9. Analisi dbRDA delle specie di *Vibrio* presenti nei campioni pre-depurazione (PRE) e nei campioni provenienti dai quattro centri di depurazione (PLANT C, PLANT B, EXP.PLANT, PLANT A). PERMANOVA p-values 0.0001.

Per confrontare le specie di *Vibrio* presenti nei campioni pre e post depurazione è stata eseguita un'analisi delle ridondanze (dbRDA). In questo modo è stato possibile analizzare la Beta diversity, ovvero la diversità delle comunità di *Vibrio* presente tra campioni diversi. È stata effettuata un'analisi statistica, in cui è stato calcolato l'indice di Jaccard, un coefficiente di similarità qualitativo, che permette di definire il grado di similarità o diversità esistente tra due insiemi di campioni.

Nel **Grafico 9** sono riportati i risultati. Si nota come i campioni provenienti dall'impianto di depurazione A differiscano maggiormente e in modo statisticamente significativo (p-value 0,0001) nella composizione in specie di *Vibrio* rispetto ai campioni prelevati dagli altri tre impianti e rispetto ai campioni non depurati.

Inoltre, la maggior parte dei campioni non depurati (PRE) e dei campioni prelevati dagli impianti di depurazione B (PLANT B) e dall'impianto sperimentale (EXP.PLANT) presentano una diversità di specie di *Vibrio* molto simile. Anche in alcuni campioni provenienti dall'impianto C (PLANT C), dall'impianto A (PLANT A), dall'impianto sperimentale (EXP.PLANT) e in alcuni non depurati, la diversità dei *Vibrio* è simile.

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi è stato studiato l'effetto della depurazione sulla comunità batterica ed in particolare sulle comunità di *Vibrio* presenti nel microbiota della vongola *Ruditapes philippinarum*. Per questo scopo, sono stati applicati metodi coltura dipendenti e coltura indipendenti, che hanno permesso di quantificare e identificare le specie di *Vibrio* presenti nei bivalvi, sia prima della depurazione, sia dopo la depurazione.

È importante una corretta identificazione delle specie di *Vibrio* presenti nei molluschi bivalvi destinati al consumo umano, in quanto alcune specie, come *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*, *V. vulnificus* sono in grado di causare infezioni intestinali e non intestinali nell'uomo (Ryder *et al.*, 2014; Butt *et al.*, 2004). Per tutelare la salute del consumatore il Ministero della salute ha emanato delle linee guida che prevedono la ricerca della presenza e dei geni di virulenza di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 e *Vibrio parahaemolyticus* nei molluschi.

In questo studio è stato analizzato un lotto di vongole della specie *Ruditapes philippinarum* prelevato da un allevamento di Chioggia. Lo stesso lotto è stato poi suddiviso in 4 aliquote destinate a 4 centri di depurazione denominati PLANT A, PLANT B, PLANT C, EXPERIMENTAL PLANT, che utilizzano diversi metodi di depurazione e disinfezione delle acque. Questo ha permesso di confrontare l'efficacia dei diversi metodi nel ridurre la carica microbica iniziale.

La depurazione è un processo utilizzato in molti paesi per rimuovere i microorganismi contaminanti da molluschi bivalvi lievemente o moderatamente contaminati. In Europa viene da tempo applicato per ridurre la contaminazione fecale proveniente dalle aree di raccolta. Infatti, spesso gli allevamenti sono situati in zone costiere, dove le acque possono essere facilmente contaminate da batteri fecali provenienti da scarichi non depurati di centri abitati o acque reflue di allevamenti.

La depurazione è una tecnica che consiste nel posizionare i molluschi in vasche contenenti acqua di mare pulita, in modo che possano riprendere la loro attività di filtrazione e depurarsi (Lee *et al.*, 2008). In Europa e in Italia è un processo obbligatorio per tutti quei molluschi raccolti o allevati in zone B, come previsto dal Reg. (CE) 853/2004.

Negli impianti PLANT A, PLANT B, PLANT C viene utilizzato un sistema di depurazione semichiuso a ricircolo, mentre l'impianto sperimentale (EXPERIMENTAL PLANT) utilizza un sistema chiuso. Nel sistema chiuso i bivalvi sono posti sopra ad una griglia, all'interno di bins dotati di doppio fondo. L'acqua viene aggiunta dall'alto, tramite delle docce, va poi nei bins ed infine l'acqua di depurazione, contenente il sedimento raccolto, viene convogliata nella vasca di raccolta. Alla fine del processo di depurazione le vongole vengono raccolte e il fondo di ciascun bins viene sanificato con acqua trattata con UV. L'acqua presente nella vasca di raccolta passa attraverso filtri meccanici (a base di sabbia o

biologici), viene trattata con UV e poi una volta refrigerata può confluire nuovamente nella vasca di depurazione, attraverso la doccia. Quindi alla fine di ogni ciclo tutto il volume d'acqua presente nella vasca subisce i trattamenti di sanificazione.

Nel sistema di depurazione semichiuso a ricircolo, invece, nuova acqua viene aggiunta per sostituire quella persa durante lo svuotamento dei bins e la pulizia dei filtri. Per il ricambio di tutta l'acqua presente nell'impianto di depurazione è necessaria circa una settimana. I bins sono posti in verticale, uno sopra l'altro e l'acqua passa dal bin superiore a quello inferiore attraverso un tubo. In tutti gli impianti ciascun ciclo ha una durata di 20 ore.

Tutti i centri di depurazione utilizzano UV per la disinfezione dell'acqua in entrata che viene poi immessa nelle vasche di depurazione. L'acqua in uscita viene invece trattata con schiumatore (per rimuovere le particelle organiche), filtri meccanici, ozono (100 ppm) e UV, tranne l'impianto PLANT A, che non utilizza l'ozono.

Inoltre, per quanto riguarda gli impianti PLANT A e PLANT B, l'acqua di mare in entrata viene prelevata da una zona B, mentre l'impianto PLANT C preleva l'acqua in entrata da una zona A.

Per controllare l'efficienza dei metodi di sanificazione dell'acqua utilizzati dai vari impianti, sono stati prelevati dei campioni di acqua. Per quanto riguarda i tre impianti PLANT A, PLANT B e PLANT C l'acqua è stata prelevata dalle docce, mentre nell'impianto sperimentale è stata prelevata direttamente dalle vasche di depurazione.

Le conte microbiche su terreno Marine Agar (Grafico 2) dei campioni di vongole indicano che quelli post-depurazione, provenienti dagli impianti PLANT A, PLANT B e PLANT C, hanno una maggiore carica microbica rispetto a quelli non depurati. Invece, i campioni provenienti dall'impianto sperimentale (EXPERIMENTAL PLANT) presentano una carica microbica comparabile con quella dei campioni non depurati. Inoltre, si registrano risultati molto simili anche su terreno TCBS, che è specifico per i batteri del genere *Vibrio*. Quindi in generale si nota un aumento della carica dei *Vibrio* in vongole depurate negli impianti PLANT A, PLANT B e PLANT C. Secondo quanto descritto da Lee *et al* (2008), un aumento della temperatura di depurazione può portare ad un aumento della proliferazione dei batteri del genere *Vibrio*, ma in questo caso la temperatura di depurazione è stata monitorata durante il processo e mantenuta sempre al di sotto dei 15°C (vedi Tabella 15), per cui non può essere stata la causa dell'aumento dei *Vibrio* nei campioni post-depurazione.

Osservando le conte microbiche si nota che l'impianto in cui è stata registrata la maggior carica di *Vibrio* è l'impianto A (PLANT A); ciò potrebbe essere dovuto al fatto che in questo impianto l'acqua in entrata non viene trattata con ozono (Tabella 15).

Nei campioni depurati nell'impianto sperimentale (EXPERIMENTAL PLANT) si osserva una carica di *Vibrio* minore, probabilmente perché è un impianto di dimensioni ridotte, in cui è stata introdotta

una quantità di vongole inferiore rispetto agli altri (Tabella 15). Per cui non è possibile concludere che tale impianto utilizzi le migliori condizioni di depurazione, in quanto la carica batterica iniziale molto probabilmente era più bassa rispetto a quella degli altri impianti.

INFORMAZIONI TECNICHE	PLANT			
	A	B	C	EXP.
Filtro meccanico	X	X	X	X
Filtro biologico	X	X	X	X
Trattamento dell'acqua con UV	X	X	X	X
Ozono (O ₃)	NO	X	X	X
Carico totale dell'impianto	1800 kg	2000 kg	5000 kg	3 kg
Provenienza dell'acqua	Zona B	Zona A	Zona B	Zona B
PARAMETRI DI DEPURAZIONE				
T(°C)	13,5	14	12	13,5
pH	7-8	7-9	7-9	7-8,5
Salinità (‰)	22-30‰			
OD (%)	100%			
NH ₃ (ppm)	< 1 ppm			
NO ₃ (ppm)	< 50 ppm			
NO ₂ (ppm)	< 0,50 ppm			

Tabella 15. Informazioni tecniche e condizioni di depurazione dei quattro impianti di depurazione presi in esame.

Sono stati poi utilizzati metodi coltura indipendenti per analizzare la comunità microbica coltivabile e non coltivabile presente nel microbiota dei bivalvi. In particolare, è stato estratto il DNA da tutti i campioni e sono stati sequenziati i geni 16s, *recA* e *pyrH*. Il 16s rRNA ha permesso di identificare i batteri presenti nei campioni a livello di genere, mentre i geni *recA* e *pyrH* sono stati utilizzati come marcatori molecolari per l'identificazione di specie dei *Vibrio* presenti. Gli stessi geni sono stati analizzati anche in due Mock Community, contenenti specie note e utilizzate come controllo positivo. Come mostrato dalla curva di rarefazione, il numero di reads ottenute dal sequenziamento del 16s rRNA risulta sufficiente a descrivere la biodiversità microbica dei campioni.

Inoltre, il test ANOVA (Grafico 7) eseguito sulle sequenze del 16s, che valuta l'abbondanza relativa dei *Vibrio*, conferma i dati ottenuti dalle conte microbiche su TCBS. Infatti, i campioni di vongole

depurate nell'impianto sperimentale (EXP.PLANT) presentano un'abbondanza relativa di batteri del genere *Vibrio* inferiore rispetto ai campioni provenienti dagli altri tre impianti (PLANT A, PLANT B, PLANT C), ma simile a quella dei non depurati (PRE.DEP.).

Nella Heatmap (Grafico 5), costruita a partire dall'analisi delle sequenze 16s, si può osservare come il genere batterico presente nella maggior parte dei campioni sia *Endozoicomonas*. Inoltre, si osserva come batteri del genere *Vibrio* siano più predominanti nei campioni di acqua e in quelli provenienti dall'impianto PLANT A, mentre i campioni pre-depurazione (PRE.DEP) e quelli prelevati dall'impianto sperimentale (EXP.PLANT) sono quelli che presentano la minor abbondanza relativa di questi batteri. Quindi anche i dati ricavati dall'Heatmap concordano con l'analisi colturale dei *Vibrio*; un'ulteriore conferma è data dai dati ottenuti dall'analisi RDA (Grafico 8), infatti si vede come i campioni provenienti dall'impianto sperimentale e quelli non depurati mostrino una comunità microbica simile.

Dall'analisi preliminare dei dati del sequenziamento dei geni *recA* e *pyrH* è stato possibile identificare alcune specie di *Vibrio* presenti nei campioni (Tabella 14). Anche in questo caso è possibile osservare come nei campioni depurati si registrino un numero maggiore di positività per *Vibrio*. In particolare, in molti campioni depurati sono stati identificati batteri patogeni per l'uomo, come *V. cholerae* (ritrovato in 12 campioni depurati su 40) e batteri in grado di causare malattie nelle vongole, come *V. tapetis* (ritrovati in 28 campioni depurati su 40).

Inoltre, dai risultati ottenuti dal sequenziamento dei geni *recA* e *pyrH*, si osserva che il numero di specie di *Vibrio* identificate nei campioni di acqua è superiore a quello ritrovato nelle vongole non depurate; ciò concorda con l'alto numero di batteri del genere *Vibrio* ritrovati nei campioni di acqua tramite l'analisi del 16s (Grafico 7). Questi dati suggeriscono che un inadeguato trattamento dell'acqua di mare immessa nelle vasche di depurazione potrebbe aver contaminato le vongole durante il processo di depurazione. Tuttavia, sono necessarie ulteriori analisi dei dati di sequenziamento dei geni *pyrH* e *recA*, per vedere da quali impianti provengono i campioni di acqua positivi e quindi capire quali centri di depurazione utilizzano metodi di disinfezione dell'acqua efficienti e quali no. È in ogni caso consigliabile utilizzare una combinazione di più trattamenti di disinfezione delle acque per aumentare l'efficienza di depurazione (Barile *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008).

I marcatori utilizzati per l'identificazione di specie mostrano però un limite, ovvero quello di non essere riusciti a identificare in modo corretto tutte le specie note che erano state inserite all'interno della Mock. Queste specie fungono da controllo positivo e servono a valutare l'attendibilità del metodo d'identificazione e l'efficacia del sequenziamento. Il sequenziamento dei geni *pyrH* e *recA* ha permesso di identificare correttamente 14 specie su 20, per cui il metodo può essere considerato abbastanza affidabile, ma migliorabile.

In generale, dalle analisi effettuate sui campioni di vongole pre e post depurazione e sui campioni di acqua, è possibile concludere che nessuno dei quattro centri di depurazione è risultato efficiente nel ridurre in modo significativo la carica di *Vibrio*, presente nelle vongole provenienti dall'allevamento. Addirittura, nei campioni di vongole depurate (tranne quelli provenienti dall'impianto sperimentale), si registra un aumento dei *Vibrio*.

Questo potrebbe essere dovuto alla proliferazione dei *Vibrio* inizialmente presenti all'interno del microbiota della vongola, in quanto alcuni batteri appartenenti a questo genere, interagiscono con l'emolinfa del mollusco stesso, risultando più difficili da eliminare tramite filtrazione (Cattaneo and Bernardi 2010). I *Vibrio* fanno parte, in modo permanente, del microbiota dei molluschi bivalvi, per cui probabilmente hanno una lunga storia co-evolutiva con i loro ospiti invertebrati e questo potrebbe essere il motivo per cui mostrano maggiore resistenza (persistenza) alla depurazione.

Inoltre, l'effetto della depurazione è quello di diminuire la diversità microbica all'interno del microbiota dei bivalvi, di conseguenza i *Vibrio*, essendo microorganismi opportunisti, vanno probabilmente ad occupare le nicchie ecologiche che erano prima occupate da altre specie, causando un loro aumento di carica nei campioni depurati (Vezzulli *et al.*, 2018).

Il tipo e la quantità di contaminazione iniziale influiscono sull'efficienza di depurazione, poiché bivalvi maggiormente contaminati richiedono tempi più lunghi di depurazione (Son e Fleet, 1980). Per cui il tempo di depurazione applicato negli impianti presi in esame (20 ore) potrebbe non essere stato sufficiente per la diminuzione della carica dei *Vibrio*.

Nello studio condotto da Cardak *et al.* (2013), ad esempio, per ridurre a zero la carica iniziale di *V.parahaemolyticus* (6,7 log₁₀ CFU/g) in vongole della specie *R.philippinarum*, sono state necessarie 60 ore di depurazione.

Lunghi periodi di depurazione sono efficaci nel ridurre la carica di *Vibrio*, ma diminuiscono la qualità dei molluschi e ne aumentano il costo, a causa dell'uso prolungato degli impianti di depurazione. Dunque, i tempi devono essere sufficienti ad abbattere la carica microbica, ma allo stesso tempo devono garantire la qualità organolettica del prodotto (Lopez-Joven *et al.*, 2013).

Per aumentare l'efficacia della depurazione una soluzione potrebbe essere quella di utilizzare prodotti innovativi per la disinfezione dell'acqua di mare utilizzata negli impianti, come quelli a base di potassio perossimonosolfato (MPS). Nello studio di Ciulli *et al.* (2017), tale prodotto (ad una concentrazione di 1000 ppm e dopo 3 ore) è risultato efficace nell'abbattimento della carica dei *Vibrio* durante la depurazione di vongole della specie *Ruditapes philippinarum* a 15°C. Inoltre, questo prodotto risulta sicuro, in quanto non influenza la salute delle vongole e non rilascia residui di surfattanti al loro interno (Ciulli *et al.*, 2017).

Nonostante sia generalmente accettata l'efficacia delle pratiche di depurazione nella rimozione di batteri alloctoni (ad esempio microrganismi enterici), queste tecniche sono generalmente considerate solo parzialmente efficaci, o inefficaci, nella rimozione di altri contaminanti microbici come i *Vibrio* naturalmente presenti nell'ambiente marino (Vezzulli *et al.*, 2018). Inoltre, nei paesi europei la frequenza di *Vibrio* patogeni nei prodotti della pesca è minore rispetto a quella delle aree più calde, ma negli ultimi anni a causa del surriscaldamento globale si è registrato un aumento della loro presenza anche nei mari europei. Per cui, si consiglia di consumare molluschi bivalvi solo previa cottura, in modo da inattivare in modo efficace i *Vibrio* patogeni eventualmente presenti al loro interno (Cattaneo e Bernardi, 2010; Le Roux *et al.*, 2015).

6. CONCLUSIONI

I molluschi bivalvi come le vongole sono un prodotto molto importante per l'economia di molti paesi, in particolare il Veneto rappresenta uno dei principali produttori europei della specie *Ruditapes philippinarum*, per cui la presenza in questi molluschi di *Vibrio* patogeni costituisce un problema emergente per la salute umana (Rahman *et al.*, 2014).

Per tutelare la salute del consumatore il ministero della salute ha emesso delle linee guida, che integrano il Reg. (CE) 2073/2005 e specificano l'obbligo di ricerca di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 e *Vibrio parahaemolyticus*. Dunque, è importante avere a disposizione dei metodi efficaci per lo studio delle specie di *Vibrio* presenti nelle vongole.

In questo studio è stato messo in evidenza come si possano ritrovare specie potenzialmente patogene per l'uomo in campioni di vongole allevate a Chioggia e depurate.

Tuttavia, i metodi biomolecolari utilizzati non sono riusciti a identificare tutte le specie note inserite nei campioni di controllo. Per questo è necessario mettere a punto tecniche più precise, basate sul sequenziamento di un numero maggiore di marcatori molecolari, o direttamente con un approccio metagenomico, per identificare in modo corretto le specie di *Vibrio* nei molluschi bivalvi.

Inoltre, nei centri di depurazione è importante effettuare un attento monitoraggio dei parametri di processo e utilizzare metodi efficaci di sanificazione delle acque, per evitare un aumento della presenza di *Vibrio* patogeni nei bivalvi depurati.

7. BIBLIOGRAFIA

Barile, N.B., Scopa M., Nerone, E., Mascilongo, G., Recchi, S., Cappabianca, S., Antonetti, L., (2009) “Studio sull’efficacia di un sistema di depurazione a ciclo chiuso su molluschi bivalvi” 45 (4):541–553.

Bean N.H., Goulding J.S., Lao C., Angulo F.J. (1996) “Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988-1992” *MMWR CDC Surveill Summ.* 45(5):1-66.

Besnard V., Federighi M., Cappellet J.M. (2000) “Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*” *Letters in Applied Microbiology*, 31:77-81.

Bhunja A.K. (2018) “Foodborne microbial pathogens”. Capitolo 6: 136-140, Capitolo 14:249, Capitolo 15:249-271, Capitolo 18:315-325.

Bidegain G., Juanes J. A. (2013) “Does expansion of the introduced Manila clam *Ruditapes philippinarum* cause competitive displacement of the European native clam *Ruditapes decussatus*” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 445:44-52

Boscolo Brusà R., Ponis E., Cacciatore F., (2011) “Dalla pesca all’allevamento della vongola filippina in laguna di Venezia: “il preingrasso”” *ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina* n. 2.

Bottone E.J. (1999) “Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates” *Microbes and Infection*, 1:323-333.

Brusca R. C., Brusca G. J. (1996) “Invertebrati” *Zanichelli*. Capitolo 20:759-829.

Butt, A. A., Aldridge, K. E., & Sanders, C. V. (2004) “Infections related to the ingestion of seafood part I: viral and bacterial infections”. *The Lancet Infectious Diseases*, 4 (4):201-212.

Callahan B.J., Wong J., Heiner C., Oh S., Theriot C. M., Gulati A.S., McGill S.K., and Dougherty M.K. (2019) “High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution” *Nucleic Acids Research*, 47(18):1-12.

Cardak M., Colakoglu F. A., Künili E., and Colakoglu S. (2013) “Effect of depuration on manila clam (*Ruditapes philippinarum*) contaminated with *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus*” *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 40:474.

Carraro L., Maifreni M., Bartolomeoli I., Martino M.E., Novelli E., Frigo F., Marino M., Cardazzo B. (2011) “Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing” *Research in Microbiology* 162:231-239.

Cao Y., Fanning S., Proos S., Jordan K., Srikumar B., (2017) “A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies” *Front. Microbiol.* **8**:1829.

Cattaneo, P., Bernardi, C., 2010. “Collezione di studi sull’ispezione degli alimenti di origine animale”. *Food in*, **1**:1-100.

Chakravorty D. H., Burday M., Connell N., Alland D., (2007) “A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria” *Journal of Microbiological Methods*, **69**:330–339.

Ciulli S., Volpe E., Pagliarani A., Zavatta E., Brunetti B., Gazzotti T., Parmeggiani A., Govoni N., Nesci S., Fabbri M., Mordenti O., Serratore P. (2017) “A preliminary study on a novel sea water disinfection process by a peroxy-acid compound to complement and improve the microbial depuration of clams (*Ruditapes philippinarum*)” *Food Control* **80**:226-235.

Clarridge J. E. (2004) “Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases” *Clinical Microbiology Reviews*, **17**(4):17840–862.

Cocolin L., Alessandria V., Dolci P., Gorra R., Rantsiou K., (2013) “Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation” *International Journal of Food Microbiology*, **167**:29–43.

Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L. (2002) “Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*” *Journal of Applied Microbiology*, **92**:460-465

Crovato S., Mascarello G., Marcolin S., Pinto A., Ravarotto L. (2019) “From purchase to consumption of bivalve molluscs: A qualitative study on consumers’ practices and risk perceptions”. *Food Control* **96**:410-420.

FAO (2018) “The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals”. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*. Part1: 2-75.

Hirt, R. P., Logsdon, J. M., Jr, Healy, B., Dorey, M. W., Doolittle, W. F., & Embley, T. M. (1999). “Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(2):580–585.

Gu W., Miller S., Chiu C.Y., (2019) “Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection” *Annu Rev Pathol.* **14**: 319–338.

Hodkinson B. P., Grice E. A. (2014) “Next-Generation Sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research” *Advances In Wound Care.* **4**:50-58.

Jany J.L., Barbier G., (2008) “Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese” *Food Microbiology*, **25**:839– 848.

Justè A., Thomma B.P.H.J., Lievens B. (2008) “Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes” *Food Microbiology*, **25**:745–761.

Lee R., Lovatelli A., Ababouch L. (2008) “Bivalve depuration: fundamental and practical aspects” *FAO Fisheries Technical Paper*. **511**:1-139.

Leite L., Jude-Lemeilleur F., Raymond N., Henriques I., Garabetian F., Alves A., (2017) “Phylogenetic diversity and functional characterization of the Manila clam microbiota: a culture-based approach” *Environ Sci Pollut Res*, **24**:21721–21732.

Le Roux F., Wegner K.M., Baker-Austin C., Vezzulli L., Osorio C.R., Amaro C., Ritchie J. M., Defoirdt T., Destoumieux-Garzón D., Blokesch M., Mazel D., Jacq A., Cava F., Gram L., Wendling C.C., Strauch E., Kirschner A., Huehn S., (2015) “The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015)” *Frontiers in Microbiology*, **830**(6):1-8.

Lopez-Joven C., Ruiz-Zarzuela I., de Blas I., Furones M.D., Roque A., (2013) “Persistence of sucrose fermenting and non fermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures” *Food Microbiology*, **28**:951-956.

Losasso C., Bille L., Patuzzi I., Lorenzetto M., Binato G., Dalla Pozza M., Ferrè N., Ricci A. (2015) “Possible Influence of Natural Events on Heavy Metals Exposure from Shellfish Consumption: A Case Study in the North-East of Italy”. *Frontiers in Public Health* **3**:21.

Mardis E. R. (2013) “Next-Generation Sequencing Platforms” *Annual Review of Analytical Chemistry*. **6**:287-303.

Meisterhans G., Raymond N., Girault E., Lambert C., Bourrasseau L., Montaudouin X., Garabetian F., Jude-Lemeilleur F., (2016) “Structure of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) Microbiota at the Organ Scale in Contrasting Sets of Individuals” *Microb. Ecol.*, **71**:194–206.

Milan M., Carraro L., Fariselli P., Martino M.E., Cavalieri D., Vitali F., Boffo L., Patarnello T., Bargelloni L., Cardazzo B., (2018) “Microbiota and environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams” *Aquatic Toxicology*, **194**:195–207.

Milan M., Coppe A., Reinhardt R., Cancela L. M., Leite R. B., Saavedra C., Ciofi C., Chelazzi G., Patarnello T., Bortoluzzi S., Bargelloni L. (2011) “Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring” *BMC Genomics*. **12**:234-251.

Ministero della Salute, n.d. “Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei Regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004”.pdf.

Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. (2008). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry* **55**(5):856-866.

Rahman M.S., Martino M.E., Cardazzo B., Facco P., Bordin P., Mioni R., Novelli E., Fasolato L., (2014) “*Vibrio* Trends in the Ecology of the Venice Lagoon” *Applied and Environmental Microbiology*, **80**:2372–2380.

Reg. (CE) n. 853/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. Gazzetta ufficiale dell’Unione europea, L 139/55.

Ripabelli G., Grasso G.M., Sammarco M.L. e Luzzi I. (1997) “Procedure di isolamento e caratterizzazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica” *Rapporti ISTISAN* 97/31, ISSN-1123-3117.

Robinson C.J., Bohannon B.J.M., Vincent B. Young V.B., (2010) “From Structure to Function: the Ecology of Host-Associated Microbial Communities” *Microbiology and molecular biology reviews*, **74**(3):453–476.

Romalde J.L., Diéguez A.L., Lasa A., Balboa S., (2014) “New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review” *Frontiers in microbiology*, **4**(13): 1-11.

Ryder J., Iddya K., Ababouch L. (2014) “Assessment and management of seafood safety and quality” *FAO Fisheries and aquaculture technical paper*. **574**:1-432.

Sekirov I., Russell S. L., Antunes L. C. M., Finlay B. B. (2010) “Gut microbiota in health and disease” *Physiological Reviews*, **90**:859-904.

Schneider K.R., Cevallos J., Rodrick G.E. (2009) “20 - Molluscan shellfish depuration” *Shellfish Safety and Quality*. Capitolo 20:509-541.

Son, N. T., Fleet, G. H. (1980). “Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, re-laying, and storage” *Applied and Environmental Microbiology*, **40**(6) 994:1002.

Sun F., Wang Y., Wang C., Zhang L., Tu K., Zheng Z., (2019) “Insights into the intestinal microbiota of several aquatic organisms and association with the surrounding environment” *Aquaculture*, **507**:196–202.

Thompson F.L., Iida T., Swings J., (2004) “Biodiversity of *Vibrios*” *Microbiology and molecular biology reviews*, **68**(3):403–431

Thompson F.L., Swing J., (2006) “Taxonomy of the *Vibrios*” ASM press, Washington, D.C., Capitolo **30**:29-30.

Thompson C.C., Thompson F.L., Vicente A.C.P., (2008)” Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA)” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**:617–621.

Trevisan G. (2011) “Le vongole dell’Alto Adriatico tra ambiente e mercato” *Franco Angeli*. Capitolo 1:9-17, Capitolo 1:33.

Turolla E. (2008) “*La Venericoltura in Italia*”. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura* **12**:177–188.

Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J.L., and Pereira, M.J. (2011) Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. *Food Control* **22**: 805–816.

World Health Organization, (1999). “Food safety issues associated with products from Aquaculture”. *WHO technical report series* **883**: 1-56.

Veneto Agricoltura (2014) “Osservatorio Socio-Economico della Pesca e dell’Acquacoltura”. *La Mitilicoltura Veneta-Focus sull’Off-Shore*.