



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina comparata e alimentazione

Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione LM-9

Il genere *Arcobacter* nel microbiota della vongola *Ruditapes philippinarum* nella Laguna di Venezia: quantificazione, isolamento e caratterizzazione genomica

Relatrice

Prof.ssa Barbara Cardazzo

Correlatrice

Dott.ssa Hooriyeh Mohammadpourmotlafazma

Laureanda Alba Leone

Matricola n. 2036940

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Sommario

1	Introduzione	1
1.1	La vongola filippina e il suo microbiota	1
1.2	<i>Arcobacter</i> : caratteristiche generali.....	3
1.3	Ecologia del genere <i>Arcobacter</i>	4
1.4	Tassonomia del genere <i>Arcobacter</i>	4
1.4.1	Descrizione dei generi di <i>Arcobacter</i> :	5
1.5	Principali malattie causate da <i>Arcobacter</i> e meccanismi patogenetici.....	8
1.6	Antibiotico resistenza associata al genere <i>Arcobacter</i>	10
2	Scopo della tesi.....	11
3	Materiali e metodi	12
3.1	Campionamento e isolamento dei batteri	12
3.2	Whole Genome Sequencing	13
3.2.1	Estrazione del DNA.....	13
3.2.2	Valutazione qualitativa del DNA mediante elettroforesi su gel di agarosio 15	
3.2.3	Valutazione qualitativa del DNA mediante spettrofotometro NanoDrop .	15
3.2.4	Valutazione quantitativa del DNA mediante Qbit	16
3.3	Preparazione delle librerie per il sequenziamento.....	16
3.3.1	Frammentazione con enzima tagmentasi e marcatura del DNA	17
3.3.2	Amplificazione delle librerie per aggiungere gli index	18
3.3.3	Purificazione delle librerie.....	18
3.3.4	Valutazione qualitativa delle librerie mediante l'utilizzo di Bioanalyzer .	19
3.3.5	Valutazione quantitativa delle librerie con metodo fluorimetrico	21

3.3.6	Pooling e sequenziamento	23
3.4	Valutazione dell'abbondanza di <i>Arcobacter</i> in campioni di vongola mediante real-time PCR.....	23
3.5	Analisi bioinformatiche.....	26
3.5.1	Valutazione qualitativa e trimming delle reads	26
3.5.2	Assemblaggio delle reads	27
3.5.3	Caratterizzazione degli isolati mediante il programma bioinformatico BV- BRC	28
3.5.4	Relazioni evolutive tra gruppi tassonomici	30
4	Risultati	31
4.1	Isolamento di <i>Arcobacter</i> da campioni di vongola <i>Ruditapes philippinarum</i> 31	
4.2	Estrazione del DNA e valutazione quali-quantitativa del DNA estratto dai ceppi di <i>Arcobacter</i>	32
4.3	Preparazione delle librerie e sequenziamento WGS mediante piattaforma Illumina	33
4.4	Valutazione della qualità delle reads a seguito del sequenziamento e creazione di contigs	33
4.5	Caratterizzazione del genoma completo dei ceppi di <i>Arcobacter</i>	34
4.5.1	Relazioni evolutive tra gruppi tassonomici	34
4.5.2	Identificazione di fattori legati alla virulenza per la caratterizzazione degli isolati	36
4.5.3	Identificazione di fattori legati all'antibiotico resistenza per la caratterizzazione degli isolati.....	43
4.5.4	Analisi delle vie metaboliche di detossificazione	44

4.6	Valutazione dell'abbondanza del genere Arcobacter in campioni di vongole	46
5	Discussione.....	48
6	Conclusioni.....	53
	Bibliografia.....	54
	Sitografia.....	58

Abstract

In the Venice Lagoon clams have been chosen as sentinel organisms to evaluate the environmental quality as subject to strong contamination.

Analysis of the clam microbiota revealed the presence of strains belonging to the genus *Arcobacter*, in some cases indicated as pathogenic to humans.

The study conducted during the course of the thesis involved the isolation of strains of *Arcobacter* from clams on a selective agar medium enriched with antibiotics (CAT) collected in the lagoon of Venice, in a breeding site (Chioggia, VE) and a site where collection is prohibited (Porto Marghera, VE).

From some isolated strains (18) DNA was extracted, sequenced and characterized by the presence of virulence and resistance genes and for the presence of metabolic detoxification pathways.

It was also developed a real-time PCR test specific for the genus *Arcobacter* which was then used to quantify the bacterium within the microbiota of the clam samples to evaluate the possible abundance in more polluted sites.

Abstract

Nella Laguna di Venezia le vongole sono state scelte come organismi sentinella per valutare la qualità ambientale in quanto soggetta a forti contaminazioni.

Dalle analisi del microbiota delle vongole è emersa la presenza di ceppi appartenenti al genere *Arcobacter*, in alcuni casi indicato come patogeno per l'uomo.

Lo studio condotto durante lo svolgimento della tesi ha previsto l'isolamento su un terreno agar selettivo e arricchito con antibiotici (CAT) di ceppi di *Arcobacter* da vongole raccolte nella laguna di Venezia, in un sito di allevamento (Chioggia, VE) e un sito in cui la raccolta è vietata (Porto Marghera, VE).

Da alcuni ceppi isolati (18) è stato estratto il DNA che è stato sequenziato e caratterizzato per la presenza di geni di virulenza e di resistenza e per la presenza di vie metaboliche di detossificazione.

Inoltre, è stato messo a punto un saggio in PCR real-time specifico per il genere *Arcobacter* che è stato poi utilizzato per quantificare il batterio all'interno del microbiota dei campioni di vongola per valutarne l'eventuale abbondanza in siti più inquinati.

1 Introduzione

1.1 La vongola filippina e il suo microbiota

La vongola verace *Ruditapes philippinarum*, più comunemente nota come vongola verace filippina, è un mollusco bivalve appartenente alla famiglia delle *Veneridae*.

La specie ha origine in Asia, ma dato l'alto tasso di crescita e l'elevata resistenza a diverse condizioni ambientali, si è diffusa anche nel continente europeo, fino a diventare la specie di vongola più allevata sulle coste mediterranee (Leoni et al., 2017).

La capacità filtrante di questi bivalvi li rende particolarmente adatti al ruolo di "specie-sentinella" per quanto riguarda la qualità delle acque: infatti, durante il processo di alimentazione, le vongole non solo assorbono i nutrienti necessari al proprio sostentamento, ma anche metalli, batteri - tra cui *Arcobacter* - e contaminanti ambientali legati alle pressioni antropiche, in questo caso derivanti dalle attività industriali di Porto Marghera (VE). Questa la ragione per cui le vongole vengono depurate prima di essere immesse sul mercato.

Come si evince da precedenti studi (Milan et al., 2018), le comunità microbiche di *R. philippinarum* comprendono generi appartenenti al phylum Pseudomonadota (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Shewanella*), *Mycoplasmata*, (*Fusobacteriota*, *Bacteroidota*, *Spirochaetota*, *Bacillota* e *Clamidiota*).

Tra i generi predominanti sono stati identificati *Mycoplasma* appartenenti al phylum *Mycoplasmata*, *Arcobacter* e *Devosia* appartenenti al phylum *Pseudomonadota* (Milan et al., 2018).

Il genere *Arcobacter* è stato spesso isolato da acque reflue, contaminate da feci o da sostanze chimiche, pertanto associato ad ambienti molto inquinati (Milan et al., 2018).

Le acque reflue sono considerate un habitat per vari agenti patogeni batterici umani, e lo scarico di queste nelle acque ambientali (marittime, fluviali) rappresenta una minaccia per la salute pubblica (Lu et al., 2015). Generalmente, prima di essere immesse in mare, le acque reflue vengono trattate negli affluenti con sedimentazione primaria (rimozione dei solidi grossolani e dei materiali sospesi che porta alla flocculazione dei batteri presenti nelle acque reflue) e trattamento biologico secondario che vede l'impiego di fanghi attivi, costituiti da una miscela di batteri e microrganismi sia aerobi che

anaerobi, e hanno una funzione degradativa nei confronti degli inquinanti compresi i batteri patogeni.

Negli effluenti invece si attuano metodi di disinfezione come la clorazione, per abbattere del tutto le comunità microbiche patogene, ma con il rischio di avere dei sottoprodotti e induzione di antibiotico resistenza.

Nel caso specifico del genere *Arcobacter* si è visto che il trattamento biologico è inefficace in quanto non forma flocculi e non si lega ai fanghi attivi rimanendo pertanto libero nelle acque di scarico.

Universalmente i trattamenti di depurazione delle acque hanno un'efficienza del 99% rispetto alla rimozione di *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* in quanto specie batteriche facilmente isolabili su terreni di coltura e che quindi non richiedono particolari attenzioni nella preparazione del terreno, pertanto risulta più semplice indagarne l'efficienza. Se però si amplia il numero di taxa rilevabili con tecniche molecolari, questa diminuisce (Lu et al., 2015).

Infatti, negli studi mirati all'individuazione delle comunità microbiche resistenti ai trattamenti, *Arcobacter* è sempre la specie batterica più presente nelle acque di mare in cui vengono scaricate le acque reflue (Kristensen et al., 2020).

La presenza del batterio è stata ricercata anche nelle acque dolci di lago e di fiume, ma si è visto che esso rimane maggiormente diffuso nelle acque di mare e che arriva dal flusso di acqua dolce inquinata (Fisher et al., n.d.) delle acque reflue e riversate in mare (Collado et al., 2008).

Per l'identificazione di *Arcobacter*, il terreno di coltura richiede degli arricchimenti specifici con l'aggiunta di antibiotici. È necessario quindi utilizzare anche le tecniche molecolari come la real-time PCR (Lu et al., 2015).

In luce di queste nuove evidenze il batterio viene considerato un enteropatogeno e un potenziale agente zoonotico, ancora molto poco conosciuto rispetto ad altri patogeni (Ramees et al., 2017).

Per questo motivo, nel presente studio, si è proceduto con la caratterizzazione dei ceppi di *Arcobacter* isolati dalle vongole raccolte in due siti diversi, Chioggia (VE) e Porto Marghera (VE) per la presenza di fattori di virulenza e resistenza nonché per eventuali vie metaboliche di detossificazione. Si è proceduto infine alla valutazione

quantitativa del batterio all'interno dei campioni di vongola per studiarne la potenziale maggior presenza in siti più inquinati.

1.2 *Arcobacter*: caratteristiche generali

Il genere *Arcobacter*, batterio Gram negativo dalle dimensioni variabili (0,2-0,9 μm di diametro e 1-3 μm di lunghezza) era precedentemente noto come “*Campylobacter* aerotollerante”, poiché per molte caratteristiche era simile al genere *Campylobacter*, differendo per quanto riguarda la tolleranza all'ossigeno. Successivamente i due generi di batteri sono stati suddivisi, proprio per la tolleranza di *Arcobacter* alla presenza dell'ossigeno. Comunque, *Arcobacter* predilige ambienti poveri di quest'ultimo e cresce in condizioni aerobiche tra 15°C e 30°C, a differenza delle alte temperature necessarie allo sviluppo (37°C-42°C) della famiglia *Campylobacteriaceae* (VANDAMME et al., 1991).

Questo genere di batteri comprende diverse specie che sono state dimostrate essere patogene per l'uomo e per alcune specie animali: rappresentano quindi importanti agenti patogeni zoonotici di origine alimentare, che causano infezioni nell'uomo e negli animali.

Arcobacter in latino significa “batterio a forma di arco” da cui si deduce la sua forma elicoidale, curva, come una “S”. Le specie principali sono: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. mytili*, *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis*, *A. thereius*. Questi batteri sono capaci di un movimento cosiddetto a cavatappi, grazie al flagello polare che li rende capaci di oltrepassare i filtri a membrana che trattengono la quasi totalità dei batteri.

La specie *A. butzleri*, ritenuta la più patogena e per questo maggiormente approfondita in termini di studio, può crescere in un intervallo compreso tra 15° e 37°C (optimum 30°C), può resistere al congelamento fino a sei mesi a -20°C e fino a 24 mesi a -70°C, ma a 55°C l'organismo viene rapidamente inattivato. I ceppi di *Arcobacter* tollerano un'ampia gamma di pH da 5,5 a 9,5 con optimum tra pH 6,8 e 8,0. Hanno un metabolismo respiratorio e utilizzano amminoacidi come fonti di carbonio (Ramees et al., 2017)

1.3 Ecologia del genere *Arcobacter*

Il genere *Arcobacter* occupa varie e numerose nicchie ecologiche, il che ne rende particolarmente difficile l'isolamento, l'identificazione e la classificazione. Può essere riscontrato nell'acqua ambientale, nei cibi crudi, nei prodotti animali e alimentari di origine animale (carne, formaggi, molluschi, pesce), nel suolo, nell'apparato digerente di alcuni animali (bovini, suini), pertanto è in grado di sopravvivere in matrici, ambienti e condizioni ben diversi tra di loro. Questa caratteristica rende il genere *Arcobacter* persistente e ne favorisce la diffusione e trasmissione in particolar modo all'interno della catena alimentare: *A. butzleri* è stato rilevato negli animali destinati alla produzione alimentare quali pollame, prodotti lattiero-caseari, molluschi e negli impianti di produzione (Chieffi et al., 2020a).

La persistenza di *Arcobacter* è favorita anche dalla sua capacità di formare biofilm, ovvero di creare comunità batteriche complesse in cui le cellule crescono attaccate l'una all'altra su una superficie abiotica, tenute insieme da proteine e matrice extracellulare di polisaccaridi (Girbau et al., 2017). Negli ambienti naturali la formazione di biofilm è una forma di sopravvivenza del batterio stesso ma a livello di produzioni alimentari risulta essere un problema critico, perché la presenza di biofilm permette ai batteri di scampare alle disinfezioni delle superfici delle aziende alimentari e quindi può contaminare gli alimenti destinati all'uomo, elevando così il rischio di infezione.

1.4 Tassonomia del genere *Arcobacter*

Il genere *Arcobacter* è stato identificato e classificato da (Vandamme et al., 1991), includendo batteri Gram negativi dalla forma curva appartenenti a due specie *Campylobacter cryaerophila* (ora *Arcobacter cryaerophilus*) e *Campylobacter nitrofigilis* (ora *Arcobacter nitrofigilis*).

A partire dal 1991 sono state descritte sempre più specie di *Arcobacter*, la cui assegnazione al genere era stabilita in base alla somiglianza del gene 16S rRNA, fino a identificare oggi circa 30 specie.

L'avanzamento delle tecniche di sequenziamento del genoma, l'identificazione, la caratterizzazione e l'assegnazione ad un taxa ha portato una vera e propria rivoluzione nell'ambito della tassonomia: in questo contesto moderno è stata rivalutata la tassonomia delle specie *Arcobacter* utilizzando un approccio basato su MLSA (Multilocus Sequence

Analysis) di 13 geni housekeeping (*atpA*, *atpD*, *dnaA*, *dnaJ*, *dnaK*, *ftsZ*, *gyrA*, *hsp60*, *radA*, *recA*, *rpoB*, *rpoD*, *tsf*), sul genoma core (286 geni), sugli indici genomici di ANI (identità nucleotidica media), DDH (ibridazione DNA-DNA in silico), AAI (identità amminoacidica media), percentuale di proteine, utilizzo dei codoni e sull'analisi filogenetiche basate sui geni 16S rRNA e 23S (Pérez-Cataluña et al., 2018).

I risultati di tale rivalutazione hanno consentito la divisione del genere *Arcobacter* in sei generi diversi: *Aliiarcobacter* (*cryaerophilus*, *butzleri*), *Pseudoarcobacter* (*aquimarinus*), *Haloarcobacter* (*bivalviorum*), *Malacobacter* (*halophilus*, *mytili*, *molluscorum*), *Poseidonibacter*, *Arcomarinus*.

1.4.1 Descrizione dei generi di *Arcobacter*:

	<i>Arcobacter</i>	<i>Aliiarcobacter</i>	<i>Pseudoarcobacter</i>
Diametro	0,2-0,9 µm	0,2-0,5 µm	0,2-0,9 µm
Lunghezza	1-3 µm	1-3 µm	0,4-2,2 µm
G+C	28,1-28,4%	26,4-29,4%	26,3-28%
Movimento	Con flagello polare	Con flagello polare	Si
T° di crescita	10°C-35°C	15°C-35°C	15°C-37°C
%NaCl di crescita	Si se NaCl <4%	Si se NaCl <4%	Si se NaCl <4%
Chemioorganotrofi	Si	Si	/
Glicina 1% peso/vol	Crescita inibita	Crescita inibita	Crescita inibita
Safrina 0,05% peso/vol	Crescita inibita	Crescita favorita	/
Oxgall 1% peso/vol	Crescita inibita	Crescita favorita	/

Cloruro 2,3,4-trifenitetrazolio 0,004% peso/vol	Crescita inibita	Crescita inibita	Crescita inibita
Catalasi	+	+	+
Ossidasi	+	+	+
Idrolisi indoxil acetato	-	+	+
Ureasi	+	-	+/-
Fosfatasi	-	/	
Solfatasi	-	/	
Specie di riferimento	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	<i>Aliiarcobacter cryaerophilus</i>	<i>Pseudoarcobacter defluvii</i>

	<i>Malacobacter</i>	<i>Haloarcobacter</i>	<i>Poseidoarcobacter</i>
Diametro	0,1-0,6 µm	0,1-0,5 µm	/
Lunghezza	0,6-3,6 µm	0,9-2,5 µm	/
G+C	26,1-27,3%	27,3-29,9%	28,7%
Movimento	Si	Si	Si
T° di crescita	15°C-37°C	15°C-42°C	15°C-25°C
%NaCl di crescita	Si se NaCl <4%	Si se NaCl è tra 0,5-4%	Alofilo

Glicina 1% peso/vol	Crescita favorita	Crescita favorita	Crescita inibita
Safrina 0,05% peso/vol	/	Crescita favorita	Crescita favorita
Oxgall 1% peso/vol	/	/	
Cloruro 2,3,4- trifenitetrozolio 0,004% peso/vol	Crescita inibita	Crescita inibita	Crescita favorita
Catalasi	+	+	+
Ossidasi	+	+	+
Idrolisi indoxil acetato	+/-	+/-	-
Ureasi	-	-	-
Specie di riferimento	<i>Malacobacter halophilus</i>	<i>Haloarcobacter bivalviorum</i>	<i>Poseidonibacter lekithochrous</i>

Si evince da questi dati la presenza di differenze rilevanti, che possono giustificare questi sei generi diversi secondo lo studio condotto da (Pérez-Cataluña et al., 2018).

Tuttavia, ampliando il numero di geni del genoma core a 342, come è stato fatto da On et al., 2020, cioè attraverso l'estensione della rappresentanza di taxa possibili e ripetendo le stesse analisi, queste differenze di genere risultano meno visibili. Inoltre, utilizzando più geni, la specie generalmente identificata come *A. butzleri*, considerata la più patogena, risulta invece classificata come *Pseudoarcobacter*.

L'attuale confusione tassonomica derivante dalle diverse interpretazioni dei dati da parte di vari gruppi di ricercatori rende maggiormente difficoltoso identificare correttamente le specie patogene per l'uomo.

In conclusione, essendo la tassonomia del genere *Arcobacter* ancora molto discussa dai ricercatori e non esistendo allo stato attuale una risposta univoca alla domanda, nel presente studio ci si riferirà al batterio utilizzando il termine *Arcobacter* secondo la nomenclatura antecedente al 2018.

1.5 Principali malattie causate da *Arcobacter* e meccanismi patogenetici

Tra le specie considerate patogene per l'uomo e che colonizzano l'intestino risaltano *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, con particolare attenzione verso *A. butzleri* in quanto associato a gravi diarree, enteriti e batteriemie nell'uomo (Chieffi et al., 2020b).

Le principali malattie causate da *Arcobacter* nell'uomo sono le seguenti:

- Batteriemie;
- Crampi addominali;
- Epidemie di malattie diarroiche e non diarroiche;
- Gastroenterite;
- Disturbi gastrointestinali generali.

Le vie di trasmissione più probabili sono oro-fecali, fognarie, idriche e alimentari, spesso associate a malattie umane gastroenteriche in quanto il sito di maggiore colonizzazione è l'intestino (Chieffi et al., 2020b).

I meccanismi patogenicità e di virulenza non sono ancora stati chiariti ma è stato evidenziato che la capacità infettiva di *A. butzleri* è dovuta ad aderenza e citotossicità alle cellule ospiti. Questo comporta un'induzione di infiammazione (mediata dall'interleuchina-8, IL-8) cui consegue una diminuzione dell'espressione nelle claudine nelle giunzioni strette (TJ) e di conseguenza un aumento del trasporto paracellulare che causa una diarrea acquosa (Collado & Figueras, 2011)(figura 1).

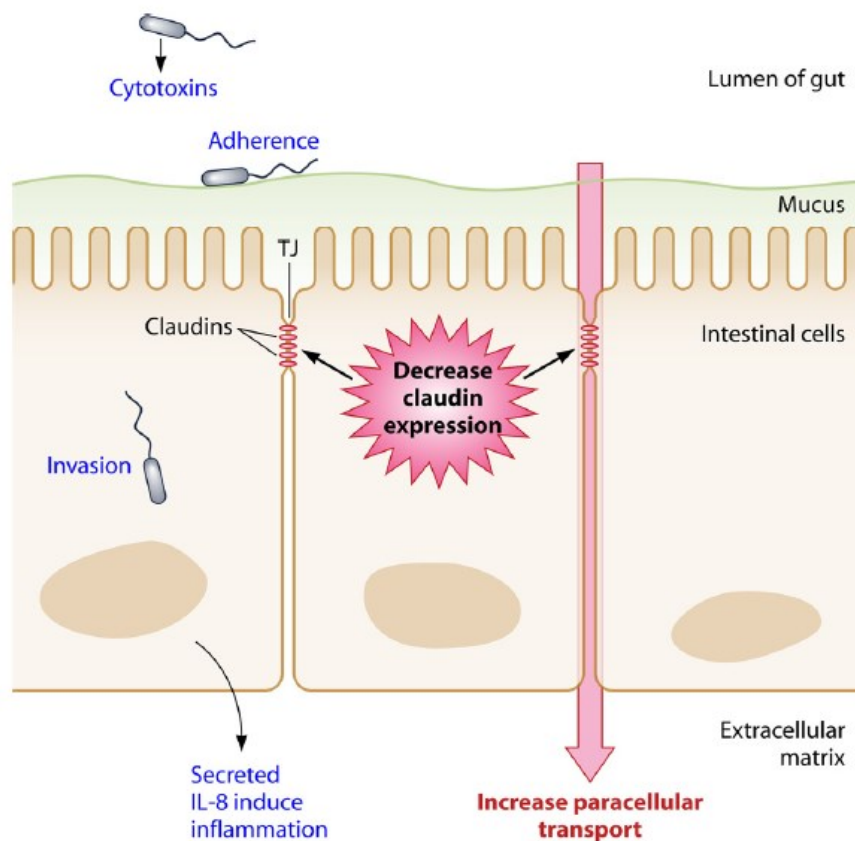


Figura 1: Meccanismo di virulenza di *Arcobacter* su cellule epiteliali intestinali (Collado & Figueras, 2011)

È stato visto che questo batterio causa una risposta infiammatoria nei macrofagi derivati da cellule umane monocitiche (THP-1) ed è stata evidenziata la limitata capacità di sopravvivere all'interno della cellula ospite (Collado & Figueras, 2011).

Uno studio successivo (Chieffi et al., 2020b) su cellule epiteliali umane (CaCo2) ha indicato ancora una volta la capacità di adesione e invasione delle cellule da parte del batterio e una lieve sopravvivenza a livello intracellulare, seppur senza meccanismo di replicazione.

Per studiare la virulenza di *Arcobacter* è stata esaminata la presenza di 10 presunti geni di virulenza (*irgA*, *iroE*, *cadF*, *cj1349*, *pldA*, *mviN*, *hecA*, *hecB*, *ciaB*, *tlyA*), omologhi dei determinanti di virulenza in *Campylobacter jejuni* (Buzzanca et al., 2023).

Arcobacter possiede capacità di movimento grazie a un flagello polare, il quale è stato riconosciuto come tratto di virulenza. Nel presente studio sono stati esaminati i geni che codificano per proteine flagellari (*flaA*, *motA*, *motB*).

1.6 Antibiotico resistenza associata al genere *Arcobacter*

Nel caso in cui i sintomi di infezione si protraggano a lungo è necessario intervenire con un trattamento antibiotico e determinare l'esatta matrice alimentare, fondamentale per la somministrazione della terapia più idonea.

Analizzando vari studi recenti (Chieffi et al., 2020b) si evince una multipla resistenza agli antibiotici dei ceppi della specie *Arcobacter*, ma studi condotti sulla vongola mostrano risultati diversi (Collado et al., 2014)

Infatti, seguendo le linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008)(CLSI, 2009) (CLSI, 2011) la sensibilità è stata testata seguendo il metodo di diluizione in agar (Collado et al., 2014), esaminando i seguenti antibiotici:

- Ampicillina $\geq 32 \mu\text{g/ml}$;
- Ciprofloxacina $\geq 4 \mu\text{g/ml}$;
- Eritromicina $\geq 32 \mu\text{g/ml}$;
- Gentamicina $\geq 16 \mu\text{g/ml}$;
- Levofloxacina $\geq 8 \mu\text{g/ml}$;
- Acido nalidixico $\geq 32 \mu\text{g/ml}$.

Da tale studio (Collado et al., 2014) è emerso che *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* sono sensibili a ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina e levofloxacina mentre è stata riscontrata una notevole resistenza (83,4% e 76,2% rispettivamente) all'acido nalidixico e una resistenza inferiore all'ampicillina (45,2%) per *A. butzleri* mentre sensibilità per *A. cryaerophilus* (4,8%).

In conclusione, la gestione della malattia causata dai ceppi di *Arcobacter* richiede un'accurata valutazione, in quanto la sensibilità o resistenza al trattamento antibiotico è strettamente dipendente dalla matrice alimentare da cui esso viene a contatto con la cellula ospite. I dati appena citati sono riferiti solo al genere *Arcobacter* estratto da bivalvi e in particolare da vongole, il cambiamento della matrice comporta una modifica anche della resistenza al trattamento (Buzzanca et al., 2023).

2 Scopo della tesi

La presenza del genere *Arcobacter* nelle vongole veraci filippine (*Ruditapes philippinarum*) raccolte nella Laguna di Venezia potrebbe rappresentare una minaccia per la salute umana e fungere anche da indicatore di un elevato tasso di inquinamento delle acque.

Il presente studio si colloca in un contesto caratterizzato da una conoscenza limitata di questo batterio; pertanto, il primo obiettivo è stato ampliare le conoscenze su questo genere batterico emergente, caratterizzandolo per la presenza di geni di virulenza, resistenza e analizzandone le vie metaboliche di detossificazione. Lo studio è stato condotto sui ceppi isolati di *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter mytili* e *Arcobacter aquimarinus*.

Il secondo obiettivo è stato valutare quantitativamente la presenza di ceppi di *Arcobacter* nei due diversi siti di campionamento, Chioggia (VE) e Porto Marghera (VE), al fine di determinare se, crescendo in zone più inquinate, si riscontrasse una differenza significativa in termini di abbondanza.

3 Materiali e metodi

Nel presente capitolo sono descritte le procedure di estrazione, le analisi di caratterizzazione effettuate per la ricerca di *Arcobacter spp.*, la procedura di sequenziamento e i tool bioinformatici utilizzati nell'analisi dei genomi di *Arcobacter spp.*

3.1 Campionamento e isolamento dei batteri

I campioni batterici analizzati nel presente studio sono stati isolati a partire da vongole non depurate raccolte nei siti di Chioggia (VE) e Porto Marghera (VE) in periodi diversi. Il campionamento è stato eseguito nell'estate del 2018 e del 2019, nell'inverno del 2019 e del 2020.

La procedura di isolamento dei batteri ha previsto l'utilizzo di terreni di coltura arricchiti con antibiotici (CAT ovvero cefoperazone 8 mg/ml, anfotericina B 10 mg/ml e teicoplanina 4 mg/ml), in quanto permettono di inibire la crescita di altri microrganismi non bersaglio dell'analisi (arricchimento selettivo) (Houf et al., 2001).

Il protocollo per l'isolamento del genere *Arcobacter* è stato così sviluppato:

- Sono stati lavati i molluschi con H₂O e la conchiglia lavata con etanolo;
- Sono stati pesanti 10g di prodotto (vongole + liquido intervalvare);
- Sono stati aggiunti 90 ml di *Arcobacter broth* (brodo di crescita specifico per il genere *Arcobacter*) e sono stati inseriti all'interno di un sacchetto stomacher;
- Il sacchetto è stato posto all'interno dello strumento Stomacher per 1 min e 30 sec;
- Il prodotto risultante è stato incubato a 30°C per 48 h in doppio in condizioni di microaerofila e aerobiosi;
- Al termine del tempo di incubazione sono stati prelevati 200 µl di brodocoltura;
- Il brodo è stato filtrato con filtri *Millipore filters* con pori di 0,45 µm e piastrato su terreno TSA 5% sheep blood;
- In parallelo, la stessa quantità di brodocoltura (200 µl) è stata filtrata con filtri *Millipore filters* con pori di 0,45 µm e piastrato su terreno di agar selettivo contenente gli antibiotici CAT;

- Le piastre, arricchite e non, sono state lasciate ad incubare a 37°C per 30-45 min;
- È stato poi rimosso il filtro e il liquido filtrato è stato posto ad incubare.

Per avere la conferma che i batteri isolati appartengono al genere *Arcobacter* sono stati effettuati i test di catalasi, ossidasi e motilità.

La dimensione di 0,45 µm dei pori del filtro può ridurre la sensibilità rispetto a dei pori più grandi ma agevola l'eliminazione di contaminanti che altrimenti attraverserebbero la membrana riducendo la selettività del terreno scelto.

Un metodo standard per l'isolamento degli *Arcobacteria* non è ancora stato sviluppato, di conseguenza la rilevazione di questo emergente patogeno risulta essere un fattore limitante che comporta una sottostima della presenza e dello stato epidemiologico.

3.2 Whole Genome Sequencing

Il sequenziamento completo del genoma (WGS) rappresenta una delle tecniche più avanzate per la determinazione delle sequenze complete del DNA contenuto nel genoma di un organismo e permette di ottenere delle informazioni genomiche fondamentali per l'identificazione e la caratterizzazione di microrganismi patogeni, per prevenire e studiare le patologie da essi insidiate.

Questo è possibile grazie alle sofisticate tecniche di sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing) tramite cui vengono analizzati più frammenti di DNA simultaneamente conoscendo l'ordine e le basi azotate che compongono il DNA.

Questo permette di conoscere base per base il genoma, catturare varianti che potrebbero sfuggire con approcci mirati e avere grandi volumi di dati in molto poco tempo.

Per poter caratterizzare i campioni di *Arcobacter* nel presente studio grazie alle tecniche WGS si è proceduto con l'estrazione e il sequenziamento del DNA batterico.

3.2.1 Estrazione del DNA

Per condurre l'estrazione del DNA dalle colonie pure di *Arcobacter* è stato utilizzato il protocollo fornito dal kit *Invisorb® Spin Tissue mini kit (Invitek diagnostics)* (Instructions for Use InviSorb® Spin Tissue Mini Kit, 2023). La lisi dei campioni è stata così eseguita:

- sono stati aggiunti 400 μ l di Buffer di Lisi G e 40 μ l di Proteinasi S (forniti dal kit stesso);
- si miscela al vortex accuratamente;
- i campioni sono stati incubati a 52°C agitando costantemente fino alla lisi (20-30 min circa);
- sono stati centrifugati per 2 min a 13.500 giri;
- i campioni lisati sono trasferiti in una nuova provetta da 1,5 ml a cui sono stati aggiunti 40 μ l di RNase A (10 mg/ml);
- sono stati infine miscelati brevemente al vortex e incubati per 5 min a RT (room temperature).

Per legare il DNA alle membrane:

- sono stati aggiunti 200 μ l di Buffer A miscelando il tutto con il vortex per 10 sec.;
- si è trasferito il miscelato in una provetta da 2 ml Receiver tube (fornita dal kit) a cui è stata posizionata una Spin Filter
- è stata posta in incubazione per 1 min per poi essere centrifugata a 13.500 giri per 3 min.

Al termine della centrifugazione il filtrato è stato scartato e la Spin Filter è stata posta in un nuovo Receiver Tube.

Infine, si è proceduto a una serie di lavaggi:

- sono stati aggiunti 550 μ l di Wash Buffer (alla quale è stato aggiunto precedentemente l'etanolo) alla Spin Filter ed è stata eseguita una centrifugazione a 13.500 giri per 1 min;
- il filtrato è stato scartato e la Spin Filter riposizionata su un nuovo Receiver Tube.
- Il procedimento di lavaggio è stato effettuato due volte.
- Si è centrifugato alla massima velocità per 4 min per eliminare i residui di etanolo;
- Per concludere, la Spin Filter è stata posizionata su un nuovo Receiver Tube da 1,5 ml a cui è stato aggiunto l'Elution Buffer preriscaldato a 52°C;
- è stata incubata per 3 min a RT ed è stata centrifugata a 13.500 giri per 1 min;
- la Spin Filter è stata scartata.

Si è ottenuta così l'estrazione del DNA partendo dalla matrice delle vongole campionate nei mari di Porto Marghera e Chioggia. I campioni di DNA sono stati conservati a -20°C.

3.2.2 Valutazione qualitativa del DNA mediante elettroforesi su gel di agarosio

Per poter utilizzare il DNA estratto è necessario valutarne la qualità in termini di integrità e peso molecolare. La metodica utilizzata per raggiungere questo scopo è l'elettroforesi su gel di agarosio che prevede l'utilizzo di:

- un gel di agarosio all'1%;
- un intercalante del DNA (*Sybersafe®*, *Invitrogen*, *Life technologies*);
- un marcatore di peso molecolare (1Kb).

Per condurre l'analisi sono stati utilizzati 5 µl di estratto di DNA e 5 µl di Loading Dye 2x, il quale permette di visualizzare la migrazione del DNA durante la corsa elettroforetica e agevola la precipitazione del campione. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 120V.

3.2.3 Valutazione qualitativa del DNA mediante spettrofotometro NanoDrop

Per poter utilizzare il DNA estratto è necessario valutarne la qualità in termini di contenuto di acidi nucleici e purezza.

Il DNA batterico viene quindi sottoposto ad analisi spettrofotometrica impiegando lo strumento NanoDrop ND 100 (NanoDrop technologies).

Questo strumento misura con elevata precisione e riproducibilità il contenuto di acidi nucleici nell'eluito. Lo spettro completo rilevabile dello spettrofotometro è nell'intervallo tra 220nm-750nm e permette di rilevare acidi nucleici e proteine. La particolarità dello strumento sta nel fatto che utilizza la sola tensione superficiale per tenere il campione in posizione eliminando la necessità di cuvette ingombranti o altri dispositivi che potrebbero contaminare i campioni.

Permette inoltre di misurare campioni altamente concentrati senza richiedere diluizioni (50X superiore alla concentrazione massima rilevata da uno spettrofotometro standard).

Il risultato dell'analisi è espresso in ng/ml e corrisponde alla concentrazione di acidi nucleici rilevata e a due rapporti di assorbanza, 260/280nm e 260/230nm, riferiti rispettivamente all'assorbanza di proteine e acidi nucleici: più i rapporti sono vicini a 2 più il DNA estratto è pulito e quindi di buona qualità.

La minima richiesta di campione (1-1,5 µl) e l'eliminazione di cuvette per posizionare il campione sullo strumento rendono il NanoDrop adatto all'analisi qualitativa del DNA, in quanto si riduce notevolmente la possibilità di contaminazioni.

3.2.4 Valutazione quantitativa del DNA mediante Qbit

A seguito della valutazione qualitativa del DNA estratto è necessario conoscere anche la quantità di DNA contenuto nei campioni per poter determinare la concentrazione esclusivamente del DNA integro: il fluorimetro Qbit® (Invitrogen, Life technologies) permette di raggiungere questo obiettivo in quanto richiede l'utilizzo di un intercalante fluorescente che lega solo e soltanto la doppia elica di DNA intatta.

3.3 Preparazione delle librerie per il sequenziamento

Valutata la qualità e la quantità di DNA contenuto all'interno dei campioni si è proceduto con la preparazione delle librerie per il sequenziamento NGS (next generation sequencing) adoperando il sistema Illumina.

La metodica di sequenziamento NGS richiede delle reads (frammenti di DNA sequenziati) molto corte, attribuendo una notevole importanza alla fase di frammentazione del DNA stesso.

È stato utilizzato il *Nextera DNA Library Preparation Kit* che, a differenza di altri, vede l'introduzione della chimica di tagmentazione ovvero l'unione delle fasi di frammentazione del DNA e di ligazione degli adattatori riducendo notevolmente la durata della preparazione delle librerie.

La preparazione delle librerie si sviluppa in quattro fasi:

1. Frammentazione con tagmentasi e marcatura del DNA;
2. Amplificazione con PCR per aggiungere gli index;
3. Purificazione delle librerie;
4. Pooling ovvero l'unione delle librerie e sequenziamento.

3.3.1 Frammentazione con enzima tagmentasi e marcatura del DNA

In un unico passaggio viene frammentato e marcato il DNA grazie all'utilizzo dell'enzima tagmentasi e con una successiva amplificazione tramite PCR vengono aggiunti gli index (indici utili a identificare i campioni durante il sequenziamento) per il sequenziamento su piattaforma Illumina.

La tagmentasi del presente kit Nextera è caratterizzata da due subunità, due trasposomi, che si localizzano a circa 200-300pb, frammentando il DNA e inserendo gli adattatori alle estremità 5' e 3' permettendo l'ancoraggio delle librerie alle flow cell Illumina, (figura 2).

Nextera Library Preparation Biochemistry

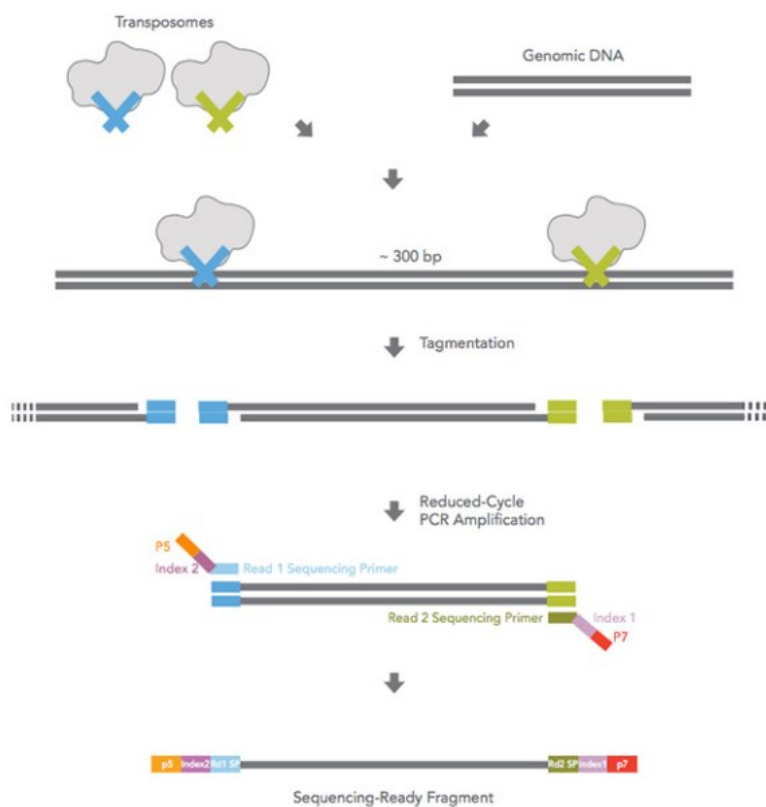


Figura 2: Biochimica di tagmentazione ad opera dell'enzima tagmentasi

Per la frammentazione del DNA sono stati utilizzati:

- 2,5 µl di DNA ad una concentrazione di 0,2 ng/ µl;
- 5 µl di TD buffer (Tagment DNA buffer).
- 2,5 µl di ATM (Amplicon Tagment mix);
- 2,5 µl di NT (Nutralize Tagment buffer).

Al DNA sono stati aggiunti il TD buffer e l'ATM, inseriti poi all'interno di una eppendorf da 0,5 ml e incubati a 55°C per 5 min, raffreddati infine a 10°C.

Le due subunità di trasposomi, responsabili del taglio del DNA, vengono inattivate istantaneamente aggiungendo l'NT buffer e incubando per 5 min a RT.

All'interno dell'eppendorf da 0,5 ml avviene la tagmentazione.

3.3.2 Amplificazione delle librerie per aggiungere gli index

Per l'amplificazione sono stati utilizzati:

- 7,5 µl di NPM (Nextera PCR master mix) scongelato in ghiaccio per 20 min;
- 5 µl di index IDT UDI¹ scongelato a RT.

Questi due reagenti sono stati aggiunti alla precedente reazione all'interno dell'eppendorf da 0,5 ml.

Le librerie sono state quindi sviluppate con un programma di PCR così definito:

- 72°C per 3 min;
- 95°C per 30 sec;
- 12 cicli¹⁶ suddivisi in:
 - 95°C per 10 sec;
 - 55°C per 30 sec;
 - 72°C per 30 sec;
- 72°C per 5 min;
- Vengono infine portate a 10°C ∞.

3.3.3 Purificazione delle librerie

La purificazione delle librerie avviene grazie all'impiego di biglie magnetiche (AMPure XP beads), che permettono inoltre di rimuovere brevi frammenti di DNA.

Per la procedura di purificazione:

- sono stati prelevati 25 μ l di prodotto di PCR;
- sono stati trasferiti su un'altra piastra a cui sono stati aggiunti 15 μ l di biglie magnetiche;
- sono stati centrifugati a 1800 giri per 2 min;
- sono stati incubati per 5 min a RT;
- la piastra è stata posta su un supporto magnetico per permettere la migrazione delle biglie;
- il surnatante è stato eliminato;
- le biglie sono state lavate due volte con 200 μ l di etanolo diluito all'80% (con una breve incubazione di 30 sec);
- l'etanolo è stato eliminato così come il surnatante;
- le biglie sono state fatte asciugare per 15 min a RT;
- sono state poi risospese con 27,5 μ l di RSB (Resuspension Buffer) e incubate per 2 min a RT;
- sono state poste su un supporto magnetico e al termine della migrazione delle biglie sono stati prelevati 25 μ l di surnatante e trasferiti in una nuova eppendorf.

3.3.4 Valutazione qualitativa delle librerie mediante l'utilizzo di Bioanalyzer

Le librerie sono state valutate dal punto di vista qualitativo mediante lo strumento Bioanalyzer (Agilent Bioanalyzer, Agilent Technologies 2100), il cui principio è la separazione dei campioni in base al peso molecolare, simile quindi ad una corsa elettroforetica su gel di Agarosio ma con diversi vantaggi: tempi di analisi ridotti, sensibilità superiore, rilevazione dei frammenti mediante un intercalante del DNA fluorescente e chiede un minor volume di campione (1 μ l).

Si considerano di buona qualità le librerie che si distribuiscono in un range di 250-1000 pb. (*figura 3*)

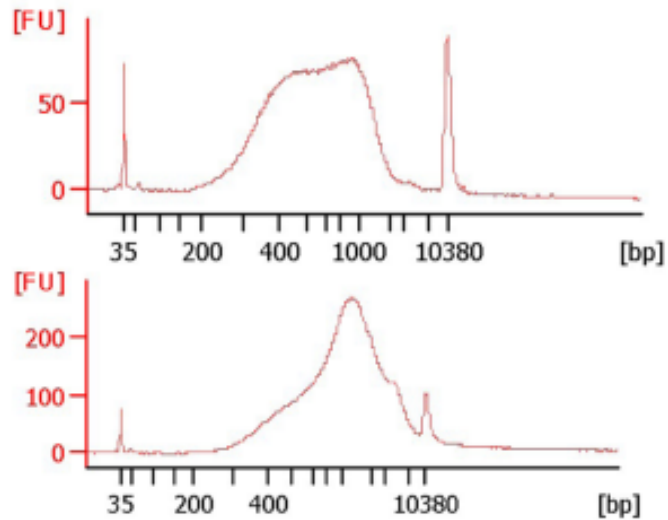


Figura 3: esempio di tracciato ottenuto con Bioanalyzer con librerie comprese nel range 250-1000

Lo strumento presenta un chip (*High Sensitivity DNA kit, Agilent Technologies*) miniaturizzato contenente un gel con 16 pozzetti di cui 12 sono collegati tra di loro da dei micro-canali, sono destinati ai campioni da valutare e contengono il *Gel-Dye* che permette la separazione dei campioni.

Sono stati aggiunti 9 μl di *Gel-Dye* nel pozzetto “G” e mediante una pressione esercitata da una siringa sono stati distribuiti omogeneamente in tutti i pozzetti grazie ai microcanali. Altri 9 μl di *Gel-Dye* sono stati aggiunti nei pozzetti segnati con la lettera “G”.

Nei restanti 12 pozzetti sono stati aggiunti 5 μl di marker (controllo interno utile a delineare la corsa) e 1 μl di DNA; nel pozzetto indicato con una scala invece è stato aggiunto 1 μl di *Ladder* (un marcatore di peso molecolare utile ad identificare la lunghezza dei frammenti). (figura 4)

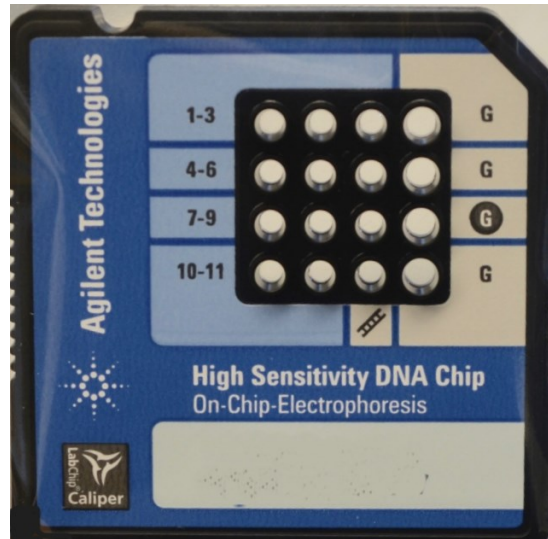


Figura 4: Esempio di chip High Sensitivity DNA

3.3.5 Valutazione quantitativa delle librerie con metodo fluorimetrico

Un sequenziamento ben riuscito si basa anche sul concetto di equimolarità secondo cui i campioni sequenziati devono essere ugualmente rappresentati e di conseguenza devono essere di pari quantità per evitare che un campione venga sequenziato con più probabilità rispetto ad un altro perché più abbondante in numero di reads.

La quantificazione risulta quindi essenziale per ottenere un pool di campioni preciso ed equimolare.

Nel presente studio la quantificazione delle librerie è stata effettuata con fluorimetro, utilizzando 2 μl di campione derivante dalla precedente purificazione.

Il protocollo di quantificazione prevede:

- la preparazione della *Working solution* ovvero la mix che contiene il fluoroforo (1 μl di Qbit® reagent) e il buffer di reazione (199 μl di Qbit® buffer) in un rapporto di 1:200;
- la preparazione degli *Assay tubes* (le provette di analisi) in due eppendorf a cui sono stati aggiunti 190 μl di *Working solution* in ognuna, 10 μl di standard 1 (concentrato 0ng/ μl) nella prima e 10 μl di standard 2 (concentrato 100 ng/ μl) nella seconda;

- la preparazione dei campioni in triplicato, con l'aggiunta di 2 μl di DNA e di 198 μl di *Working solution* in tre eppendorf diverse;
- la calibrazione dello strumento tramite inserimento dello standard 1 per primo e successivamente lo standard 2. (*figura 5*)

Terminate le preparazioni e calibrato lo strumento, si è proceduto con l'analisi dei campioni che una volta quantificati sono stati spediti per il sequenziamento *Novaseq* Illumina®.

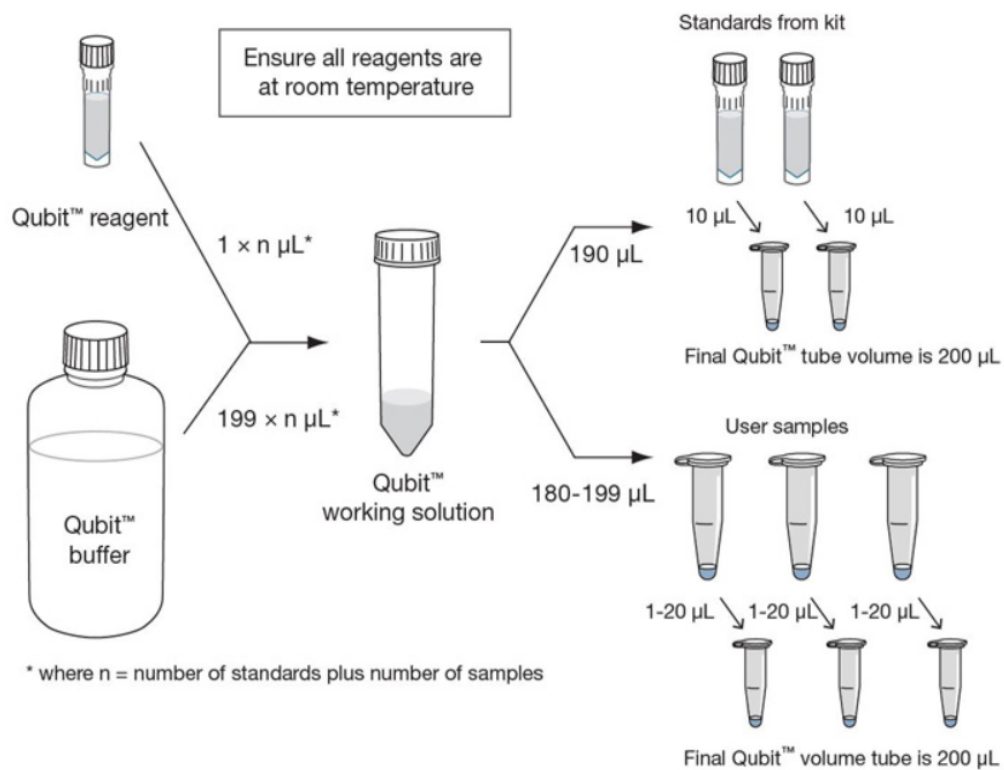


Figura 5: Procedimento schematico della preparazione dei campioni per la valutazione quantitativa con metodo fluorimetrico.

3.3.6 Pooling e sequenziamento

Con il termine pooling si fa riferimento all'unione delle librerie in un singolo tubo in uguali volumi.

Al termine delle valutazioni quali-quantitative le librerie sono state normalizzate manualmente e, tenendo conto della dimensione media dei frammenti ottenuta grazie alla valutazione qualitativa al Bioanalyzer, conoscendo la concentrazione delle librerie ottenuta al Qbit, è stato possibile distribuire le librerie in maniera equimolare.

Il pool finale è stato inviato al centro di sequenziamento *DNA Technologies Core Genome and Biomedical Science of University of California Davis (GBSF)* in cui è stato effettuato un sequenziamento *Novaseq Sp500 Illumina*.

Il centro ha poi restituito le sequenze in formato *fastq demultiplexate*.

3.4 Valutazione dell'abbondanza di *Arcobacter* in campioni di vongola mediante real-time PCR

Per conoscere l'abbondanza di *Arcobacter* all'interno dei campioni di vongola è stato eseguito un saggio di real-time PCR (qPCR) sugli stessi estratti di DNA presentati nel lavoro di (Zampieri et al., 2020). Il DNA era stato estratto da 2 ml di omogenato (25g di vongola + 225 ml di acqua peptonata) con metodica coltura-indipendente utilizzando il kit *DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen, Hilden, Germany)*.

Inizialmente sono stati testati i primer *Arco I e II* (forward e reverse) ma si sono rivelati incapaci di amplificare la specie *Arcobacter Mytili*.

Si è proceduto quindi con l'utilizzo del primer *ARCO23S* forward (23SF 5'-AACATATAAGCGCGATGTGGGGAC-3') e primer *ARCO23S* reverse (23SR 5'-ACGGTACGGGCAACATATAATA-3') (Salas-Massó et al., 2019) i quali sono risultati efficienti nell'amplificare tutte le specie di *Arcobacter*.

Questa coppia di primer è stata utilizzata per la successiva analisi quantitativa: sono stati utilizzati dei campioni omogenati prelevati da due aree di Porto Marghera (VE) e Chioggia (VE) in due stagioni diverse, estate e inverno. Le differenti stagioni e i siti di campionamento sono state le variabili considerate per questa analisi.

È stata prelevata una quantità pari a 3µl di DNA e diluita in 12µl di H₂O

I primer sono stati diluiti con acqua DNase RNase free poiché conservati in forma liofilizzata ottenendo una madre concentrata 500 μM che a sua volta è stata diluita per ottenere delle aliquote da lavoro concentrate 10 μM .

Successivamente è stata preparata la *Master Mix* per la reazione di amplificazione così composta:

Reagenti	1X
PowerUp SYBR Green Master Mix	5 μl
Primer forward (10 μM)	0,25 μl
Primer reverse (10 μM)	0,25 μl
H ₂ O	2 μl
DNA	2,5 μl

Tabella 1: reagenti necessari alla preparazione della Master Mix per la real-time PCR

Sono stati inseriti all'interno della piastra da real-time PCR 2,5 μl di DNA e 7,5 μl di *Master Mix* in duplicato ed è stata eseguita l'analisi utilizzando il termociclatore LightCycler ®480 (Roche) che prevede:

- primo ciclo a 50°C per 2 min (attivazione dell'enzima UNG contenuto nella *Master Mix*);
- secondo ciclo a 95°C per 2 min (denaturazione iniziale);
- 45 cicli divisi in 10 sec a 95°C (denaturazione) e 40 sec a 60°C (annealing ed estensione);
- Ultimi tre cicli a 95°C per 5 sec, 60°C per 1 min, 95°C continuativo (costruzione curva di Melting);
- Ultimo ciclo a 40°C per 30 sec (raffreddamento).

È stata eseguita una real-time PCR anche per il gene 16S per poter fare una quantificazione relativa della quantità di *Arcobacter* all'interno della comunità batterica. Tutte le diluizioni sono state eseguite come per il primer 23S.

I dati ottenuti sono stati elaborati su un foglio di lavoro Excel per ottenere una quantificazione relativa:

- è stata calcolata la media dei valori CP (crossing point) sia del gene 16S che del gene Arco23S;
- è stato calcolato il ΔCT : *CP del gene target (Arco23S) – CP del gene di riferimento (16S)*;
- si è scelto un valore ΔCT come calibratore ed è stata calcolato il valore $\Delta\Delta Ct$: *ΔCt del campione – ΔCt del calibratore*;
- infine, è stata applicata la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per ottenere il valore corrispondente alla quantificazione relativa.

I risultati così ottenuti stati analizzati con il software Rstudio specifico per il calcolo statistico. (figura 6)

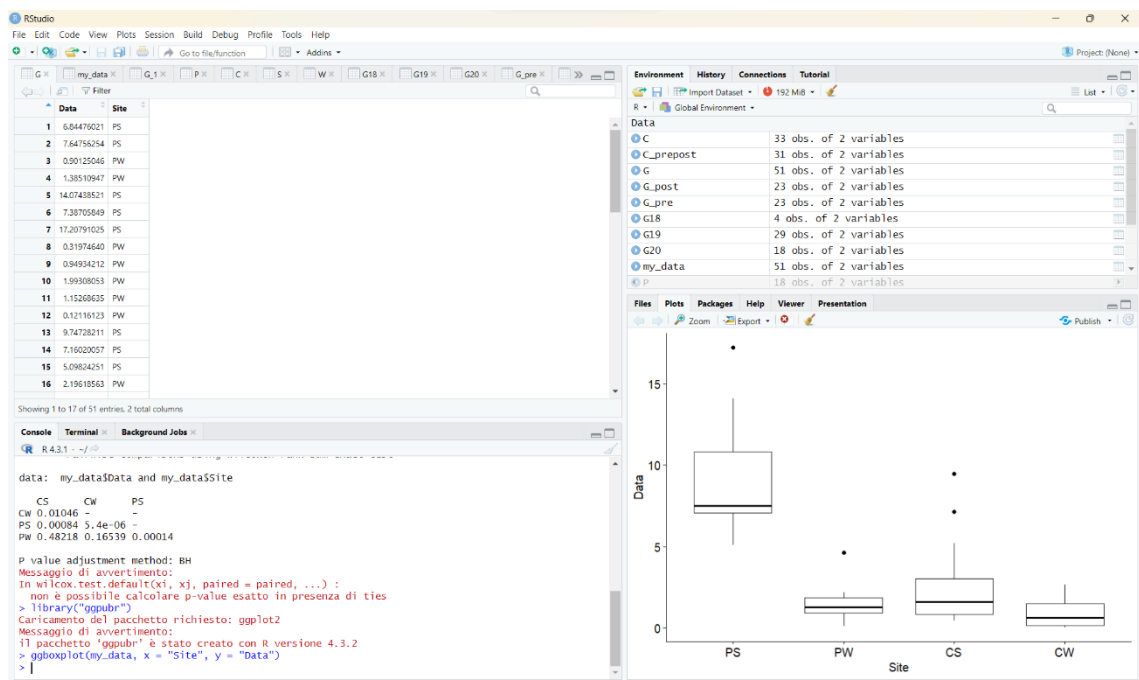


Figura 6: Esempio di analisi statistica effettuata con il software Rstudio

3.5 Analisi bioinformatiche

Le reads sequenziate dal centro sono state analizzate dal punto di vista qualitativo, assemblate e i file in formato. fasta sono stati analizzati con vari software bioinformatici per studiarne le caratteristiche.

3.5.1 Valutazione qualitativa e trimming delle reads

Per valutare la qualità delle reads dopo il sequenziamento è stato utilizzato il software FastQC, il quale riceve i file in formato. fasta ed elabora le sequenze descrivendole con 4 righe:

- Prima riga: ID della sequenza
- Seconda riga: sequenza nucleotidica
- Terza riga: contrassegnata dal simbolo “+”
- Quarta riga: simboli che rappresentano il punteggio di qualità per ogni nucleotide.

(figura 7)

```
@SEQ_ID  
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT  
+  
!''*(((((***+))%%$++)(%%$$.1***-+*)) **55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

Figura 7: esempio di reads analizzata con fastqc

Grazie ai punteggi assegnati ad ogni nucleotide, che rappresentano la probabilità di errore, è possibile determinare la qualità complessiva della sequenza:

$$Q = -10 \log_{10} p$$

Q= qualità della sequenza;

p=probabilità di errore;

La quarta riga è scritta con caratteri ASCII che permettono di esprimere il valore numerico corrispondente al valore calcolato dalla formula precedente con un simbolo per far coincidere un nucleotide ad un simbolo di qualità semplificando la lettura.

Questo tipo di linguaggio informatico prende il nome di Phred33 in quanto i primi 32 caratteri nella tabella ASCII non sono stampabili e di conseguenza per assegnare un carattere stampabile ad un valore di qualità si inizierà dal 33° elemento.

L'analisi con FastQC fornisce informazioni qualitative e il rapporto HTML che ne deriva permette di migliorare la qualità dei dati di sequenziamento in quanto, essendo un rapporto molto dettagliato, fornisce tutte le informazioni necessarie per ripulire le sequenze.

La fase successiva di pulizia prende il nome di trimming e consiste nello scartare le reads di bassa qualità e/o troppo corte oppure eliminare gli adattatori aggiunti in precedenza per la preparazione delle librerie da sequenziare.

Per effettuare questo tipo di pulizia è stato utilizzato il software TrimGalore.

3.5.2 Assemblaggio delle reads

Le sequenze nucleotidiche sono state assemblate utilizzando il software SPAdes 3.13.0, il quale riesce a rilevare le sovrapposizioni tra le reads assemblandole e creando dei contig ovvero delle mappe genetiche allineate sulla base del concetto di sovrapponibilità.

La veridicità dei contig è stata valutata grazie all'algoritmo QUAST (Gurevich et al., 2013) che sulla base di parametri, metodi e metriche di qualità di riferimento fornisce un'indicazione circa la correttezza di sovrapponibilità.

I parametri maggiormente valutati senza l'utilizzo di genomi di riferimento sono:

- Numero di contig: numero totale di sequenze continue assemblate;
- Contig più grande: la lunghezza del contig più grande nell'assemblaggio;
- Lunghezza totale: numero totale di basi azotate assemblate;
- N50 (o N25 o N75): lunghezza del contig che rappresenta il 50% della distribuzione delle lunghezze totali. Fornisce indicazioni circa la dimensione media dei contig: più è alto il valore N50 più le lunghezze dei contig hanno

dimensione maggiore e quindi le sequenze che le compongono sono poco frammentate.

Si ordinano le contig dal più lungo al più corto e si somma la lunghezza di tutti. Per trovare il valore N50 si identifica il punto in cui la somma delle lunghezze supera la metà della somma totale.

Se viene calcolato il parametro N25 o N75 il ragionamento è lo stesso ma la lunghezza deve rappresentare rispettivamente il 25 o il 75%.

- L50 (o L25 o L75): numero minimo di contig per raggiungere e/o superare la lunghezza totale.

Si ordinano le contig dal più lungo al più corto e si somma la lunghezza di tutti fin quando non si raggiunge la metà della lunghezza totale. Più è alto il valore L50 più le lunghezze dei contig non sono frammentate.

Se viene calcolato il parametro L25 o L75 il ragionamento è lo stesso ma la lunghezza deve rappresentare rispettivamente il 25 o il 75%.

- GC (%): la percentuale di citosina e guanina nell'assemblaggio viene calcolata sommando tutte le basi G e C e dividendo questa somma per la lunghezza totale
- Numero di mismatches per ogni 100 Kb allineate: QUAST fornisce un report sulle posizioni di mismatches ma non riesce a distinguerne SNP.

3.5.3 Caratterizzazione degli isolati mediante il programma bioinformatico BV-BRC

La caratterizzazione del genere *Arcobacter spp.* è stata condotta utilizzando dei tool bioinformatici con lo scopo di verificare la presenza di geni e pathway metabolici presenti nei genomi.

Il principale programma bioinformatico online utilizzato è stato BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center). È un sistema informativo progettato per supportare la ricerca sulle malattie infettive batteriche e virali, combinando i dati e gli strumenti delle risorse Legacy BRC: PATRICK, BRC batterici e BRC virali.

È stato utilizzato principalmente per la ricerca di fattori di virulenza, di geni deputati all'antibiotico resistenza, di pathway metabolici e per la costruzione di alberi filogenetici.

La presenza di alcuni fattori di virulenza nel genere *Arcobacter* è stata studiata da Buzzanca et al., 2023 identificando dieci fattori di virulenza (irgA, iroE, hecB, hecA, ciaB, cadF, cj1349, pldA, mviN, tlyA), trentaquattro geni flagellari, nove geni del sistema di chemiotassi *cheA-cheY* e il cluster di ureasi ure D, (AB), C, E, F, G (Isidro et al., 2020).

Questi fattori sono stati cercati nei campioni analizzati nel presente studio grazie al tool “Features” di BV-BRC.

Sono state cercate le sequenze nucleotidiche dei fattori di virulenza nel National Center for Biotechnology Information (NCBI) e grazie al tool BLAST di BV-BRC, sono state trovate le sequenze omologhe. (figura 8)

Query ID	Subject ID	Genome	BRC ID	RefSeq Locus Tag	Product	Length (NT)	Length (AA)	Identity (%)	Query cover (%)	Subject cover (%)	Score
LMG10828:fig 2819	Allarcobacter butzleri LMG 10828		fig 28197.313.peg.1655		TonB-dependent receptor, Outer membrane rece	2091	696	99	100.00	15.80	233

Figura 8: esempio di risultato BLAST

In seguito, la resistenza all’acido nalidixico, principale antibiotico a cui i batteri del genere *Arcobacter* isolati da bivalvi sono resistenti, è stata valutata consultando il database CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) e individuando i geni che codificano l’antibiotico. Tra questi sono stati indagati i geni *gyrA*, *gyrB*, *tolC*, *lamB*, *mdeA* e ricercati utilizzando sempre il tool “Features” di BV-BRC.

Il tool “Comparative pathway” di BV-BRC è stato utilizzato per rinvenire le vie metaboliche di detossificazione, poiché la matrice alimentare cresce in aree geografiche molto inquinate e quindi l’analisi delle vie di detossificazione è utile al fine comprendere i meccanismi di resistenza di queste specie batteriche.

Il software è stato inoltre utilizzato per creare un albero filogenetico che mostra le relazioni evolutive e di discendenza comune tra gruppi tassonomici. In particolare, il tool “Codon Tree” seleziona le famiglie di cross-geni a singola copia, analizza le proteine allineate e il DNA codificante utilizzando il programma RAxML. Il servizio restituisce un’immagine in formato Newick e SVG.

3.5.4 Relazioni evolutive tra gruppi tassonomici

In seguito, è stato scaricato l'albero filogenetico in formato newick, è stato caricato sul software online iTOL (Interactive Tree Of Life).

È un tool per la visualizzazione, l'annotazione e la gestione degli alberi filogenetici, grazie al quale è stato possibile annotare i risultati ottenuti con BV-BRC sull'albero stesso.

4 Risultati

4.1 Isolamento di Arcobacter da campioni di vongola *Ruditapes philippinarum*

Seguendo il protocollo descritto al §3.1 in laboratorio erano stati isolati dai campioni di vongola *Ruditapes philippinarum* i ceppi riportati in Tabella 2. I ceppi sono stati identificati prima fenotipicamente e poi genotipicamente a livello di genere e specie grazie all'amplificazione e il sequenziamento del gene 16S come presentato in tabella 2.

Tabella 2. Ceppi di Arcobacter isolati dai campioni di vongola e identificazione genotipica e fenotipica.

Isolato	Identificazione 16S	Sito di raccolta vongole	Catalasi	Ossidasi
S36	<i>A. mytili</i>	Chioggia	+	+
S42	<i>A. aquimarinus</i>	Chioggia	+	+
DEP2	<i>A. butzleri</i>	Chioggia	-	+
DEP3	<i>A. butzleri</i>	Chioggia	-	+
DEP4	<i>A. butzleri</i>	Chioggia	-	+
DEP12	<i>A. butzleri</i>	Chioggia	-	+
DEP13	<i>A. butzleri</i>	Chioggia	-	+
DEP25	<i>A. butzleri</i>	Chioggia	-	+
W65	<i>A. butzleri</i>	Porto Marghera	+	+
W66	<i>A. butzleri</i>	Porto Marghera	+	+
W71	<i>A. cryaerophilus</i>	Porto Marghera	-	+
W74	<i>A. cryaerophilus</i>	Porto Marghera	+	+
W75	<i>A. cryaerophilus</i>	Porto Marghera	+	+
W92	<i>A. cryaerophilus</i>	Chioggia	+	+
W94	<i>A. cryaerophilus</i>	Chioggia	+	+
W98	<i>A. cryaerophilus</i>	Chioggia	+	+
W103	<i>A. cryaerophilus</i>	Chioggia	+	+
W104	<i>A. cryaerophilus</i>	Chioggia	+	+

4.2 Estrazione del DNA e valutazione quali-quantitativa del DNA estratto dai ceppi di *Arcobacter*

I ceppi presentati in Tabella 2 sono stati quindi strisciati in un terreno Agar arricchito con antibiotici CAT e da una colonia isolata è stato estratto il DNA. La resa di estrazione del DNA di *Arcobacter* si è rivelata minima a causa della dimensione ridotta delle colonie.

I risultati ottenuti al Nanodrop e al Qbit hanno fornito dei valori bassi, molti dei quali al di sotto della soglia minima di rilevabilità e sono indicati nella tabella 3 con la sigla ND (not detected).

Tabella 3: valori ottenuti al Nanodrop e al Qbit per valutare qualitativamente e quantitativamente il DNA

Isolato	Identificazione 16S	Nanodrop (ng/μl)	Qbit (ng/μl)
S36	<i>A. mytili</i>	9,4	2,78-2,74
S42	<i>A. aquimarinus</i>	ND	ND
DEP2	<i>A. butzleri</i>	41,6	9,25-8,93
DEP3	<i>A. butzleri</i>	21,8	4,51-5,33
DEP4	<i>A. butzleri</i>	40,7	7,12-7,06
DEP12	<i>A. butzleri</i>	58,1	12,5-11,5
DEP13	<i>A. butzleri</i>	24	15,5-15,4
DEP25	<i>A. butzleri</i>	45,3	10,9-10,7
W65	<i>A. butzleri</i>	50,1	16,4-16,2
W66	<i>A. butzleri</i>	69,2	9,79-9,61
W71	<i>A. cryaerophilus</i>	5,4	2,73-2,69
W74	<i>A. cryaerophilus</i>	2,8	ND
W75	<i>A. cryaerophilus</i>	ND	ND
W92	<i>A. cryaerophilus</i>	ND	ND
W94	<i>A. cryaerophilus</i>	2,4	ND
W98	<i>A. cryaerophilus</i>	ND	ND
W103	<i>A. cryaerophilus</i>	5,4	1,51-1,46
W104	<i>A. cryaerophilus</i>	14,3	9,09-8,96

4.3 Preparazione delle librerie e sequenziamento WGS mediante piattaforma Illumina

Per gli isolati dai quali si è estratto il DNA si è quindi proceduto con la costruzione della libreria per il sequenziamento del genoma completo. La metodica di preparazione delle librerie per il sequenziamento NGS, come descritto al §3.3 è suddivisa in quattro step: frammentazione del DNA tramite tagmentasi, amplificazione con PCR, purificazione e pooling.

Prima dello step finale di pooling, le librerie sono state valutate quantitativamente mediante lo strumento Bioanalyzer, il quale ha confermato che le librerie destinate al sequenziamento erano di buona qualità in quanto mostravano un'ampia distribuzione compresa tra 250-1000 pb.

Le librerie sono state infine inviate al centro di sequenziamento *DNA Technologies Core Genome and Biomedical Science of University of California Davis (GBSF)*.

4.4 Valutazione della qualità delle reads a seguito del sequenziamento e creazione di contigs

Il centro di sequenziamento ha poi restituito le librerie sequenziate (reads) in formato. fasta e, come descritto al §3.5.1 e §3.5.2, si è proceduto con la valutazione delle reads mediante il software FastQC e TrimGalore per scartare le reads di bassa qualità.

Grazie al software SPAdes le reads sono state assemblate creando i contigs valutati mediante l'algoritmo QUAST.

4.5 Caratterizzazione del genoma completo dei ceppi di *Arcobacter*

La disponibilità della sequenza del genoma permette, grazie all'utilizzo di diversi software (vedi materiali e metodi, §3.5) di caratterizzare il contenuto genico di un ceppo.

In queste analisi compiute sui genomi degli isolati di *Arcobacter* sono stati ricercati geni coinvolti nella virulenza, nell'antibiotico resistenza e, considerando che parte dei ceppi originavano da vongole raccolte in un sito inquinato della Laguna di Venezia (Porto Marghera) nelle vie di detossificazione da inquinanti.

4.5.1 Relazioni evolutive tra gruppi tassonomici

Per valutare le relazioni filogenetiche tra i ceppi isolati, i genomi in formato fasta sono stati caricati sul software BV-BRC e utilizzando il tool "bacterial tree" è stato creato un albero filogenetico, elaborato poi con il software online iTOL, comprensivo dei genomi presi in esame in questo studio (in rosa e azzurro nella Figura 10) e dei genomi di riferimento utilizzati nello studio di Buzzanca et al., 2023 (in nero in figura 10). Come output è stata utilizzata la specie *Campylobacter jejuni* ATCC700819 (§1.2). (in rosso nella Figura 9).

Colored ranges

CH

PM

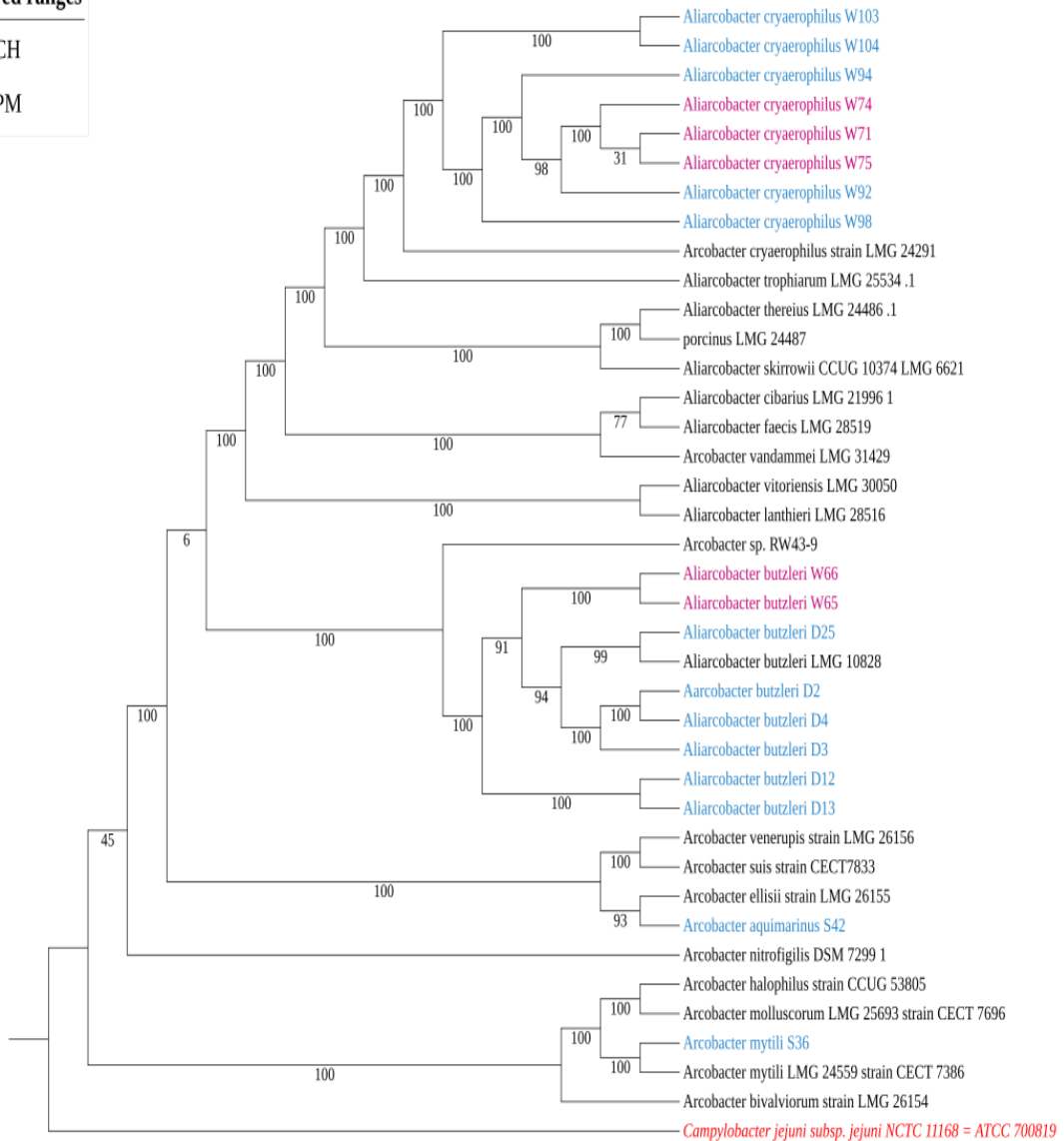


Figura9: Rappresentazione grafica delle relazioni filogenetiche che intercorrono tra i ceppi di *Arcobacter*.

4.5.2 Identificazione di fattori legati alla virulenza per la caratterizzazione degli isolati

Utilizzando il software BV-BRC è stato possibile indagare la presenza dei dieci fattori di virulenza putativi (irgA, iroE, hecB, hecA, mviN, cj1349, pldA, tlyA, cadF, ciaB) assegnati al genere *Arcobacter*. Inizialmente si è presentata una incongruenza di nomenclatura che è stata risolta utilizzando il tool BLAST il quale ha identificato le sequenze omologhe. I risultati sono indicati nella tabella 3.

Tabella 3: nomenclatura NCBI a confronto con la nomenclatura del software BV-BRC

Nome NCBI	Nome BV-BRC
irgA	tonB
hecB	hemolysin activator protein precursor
hecA	hemolysin
mviN	murJ
cj1349	fibronectin/fibrinogen binding protein
pldA	phospholipase A1
tlyA	ftsJ

Eseguendo la ricerca dei fattori di virulenza con i nomi corrispondenti nel database di BV-BRC è stata confermata la presenza di questi nei campioni (figura 10)

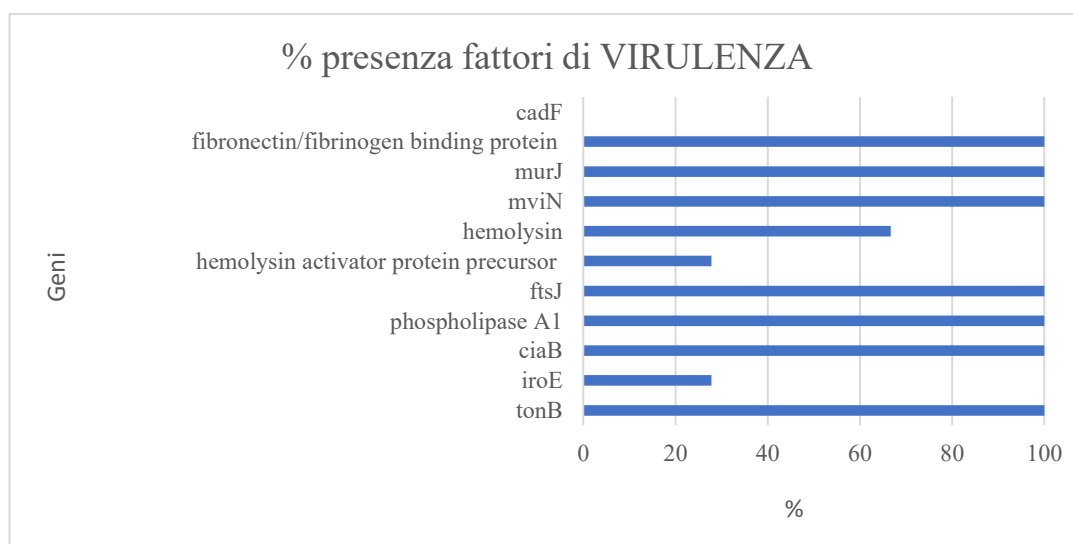


Figura 10: Rappresentazione grafica della percentuale di presenza dei fattori di virulenza nei campioni

Nel grafico, in ascisse è indicata la percentuale di presenza del gene, in ordinate il gene preso in considerazione.

Fatta eccezione per il gene *cadF*, i fattori di virulenza sono molto presenti all'interno dei diciotto isolati di *Arcobacter*.

La funzione dei singoli geni è indicata nella tabella 4.

Tabella 4: sono riportate le funzioni dei geni di virulenza (Chieffi et al., 2020b)

Gene	Funzione
tonB	Omologo della proteina di membrana esterna regolata dal ferro
iroE	Enterobactina idrolasi presente nell' <i>E.coli</i> uropatogeno
ciaB	Proteina di invasione
Phospholipase A1	Fosfolipasi
ftsJ	Omologo di <i>tlyA</i> , una emolisina
Hemolysin activator protein precursor	Omologo di <i>hecB</i> che codifica per una proteina di attivazione dell'emolisina correlata
Hemolysin	Omologo di <i>hecA</i> , un membro della famiglia delle emoagglutinine
mviN	Fattore di virulenza
murJ	Fattore di virulenza
Fibronectin/fibrinogen binding protein	Proteina legante la fibronectina
cadF	Proteina legante la fibronectina

Come visto in precedenza, i batteri appartenenti al genere *Arcobacter* sono mobili grazie a un flagello polare riconosciuto come tratto di virulenza.

Dallo studio di Isidro et al., 2020 è stato possibile individuare i geni flagellari i quali sono suddivisi in due regioni genomiche di 20 e 8 geni rispettivamente. Sei ulteriori geni si trovano al di fuori di queste regioni. (figura 11).

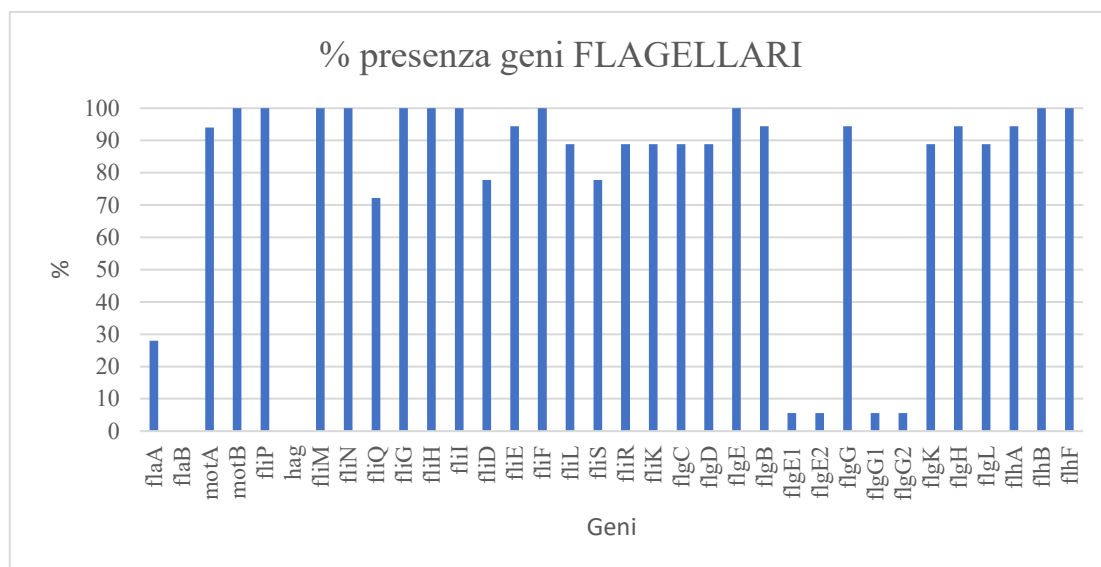


Figura 11: Rappresentazione grafica della percentuale di presenza di geni flagellari nei campioni

Nel grafico, in ascisse sono indicati i geni presi in considerazione, in ordinate la percentuale di presenza del gene. Fatta eccezione per alcuni geni, la percentuale di presenza di geni flagellari negli isolati di *Arcobacter* è alta.

La funzione dei geni è indicata nella tabella 5.

Tabella 5: sono riportate le funzioni dei geni flagellari come tratti di virulenza (Isidro et al., 2020)

Gene	Funzione
flaA - flaB	Codificano per la subunità superiore e inferiore della flagellina
motA – motB- fliP	Proteine del motore flagellare
hag	Codifica per la flagellina
fliM- fliN- fliG	Proteina di switch del motore flagellare
fliQ- flhB- flhF fliD- flhA	Proteina di biosintesi flagellare
fliH	Proteina di assemblaggio flagellare
fliI	ATPsintasi del flagello
fliE	Proteina del complesso gancio-corpo basale del flagello
fliF	Proteina dell'anello M flagellare
fliS	Chaperone di esportazione del flagello

fliR	Componente del pathway di biosintesi del flagello
fliK	Proteina di controllo della lunghezza del gancio del flagello
flgC- flgB- fliL- flgG- flgG1-flgG2	Proteina del corpo basale del flagello
flgD	Proteina di modifica del corpo basale
flgE- flgE1- flgE2- flgK	Proteina del gancio flagellare
flgH- flgL	Proteina dell'anello L flagellare

Tra gli altri potenziali fattori di virulenza sono stati individuati i geni del sistema di chemiotassi *cheA-cheY* (figura 12) e il cluster di ureasi ure D(AB)CEFG (figura 13)

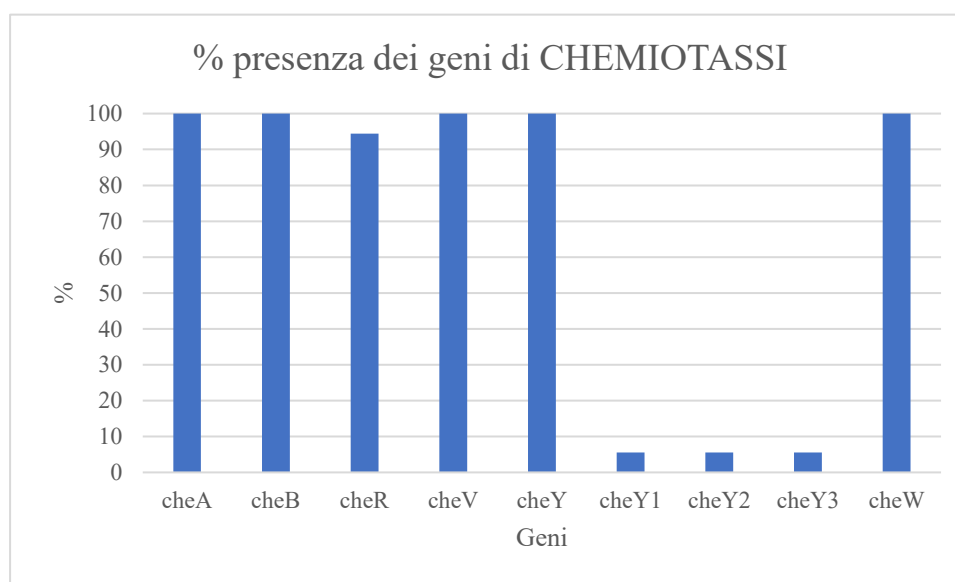


Figura 12: Rappresentazione grafica della percentuale di presenza dei geni di chemiotassi nei campioni

Nel grafico, in ascisse sono indicati i geni presi in considerazione, in ordinate la percentuale di presenza del gene. Anche i geni di chemiotassi sono alquanto presenti negli isolati. Le varianti della proteina cheY invece sono poco presenti.

La funzione dei geni di chemiotassi è indicata nella tabella 6.

Tabella 6: sono riportate le funzioni dei geni flagellari come tratti di virulenza (Isidro et al., 2020)

Gene	Funzione
cheA-cheB- cheV- cheW	Proteina di chemiotassi
cheR	Proteina glutammato O-metiltransferasi
cheY-cheY1-cheY2-cheY3	Regolatore di risposta ai segnali chimici ambientali, trasduce il segnale

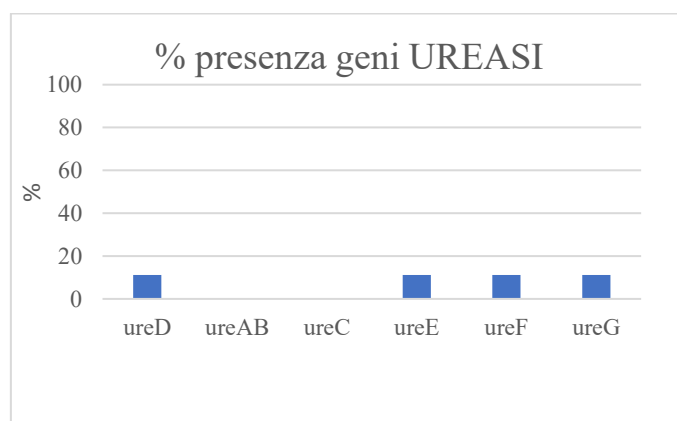


Figura 13: Rappresentazione grafica della percentuale di presenza dei geni di ureasi nei campioni

La funzione dei geni dei cluster di ureasi è indicata nella tabella 7.

Tabella 7: sono riportate le funzioni dei geni del cluster ureasi come tratti di virulenza (NCBI). Il complesso ure DEFG è implicato nella maturazione dell'enzima ureasi.

Gene	Funzione
ureA	Codifica per la subunità gamma di ureasi
ureB	Codifica per la subunità beta di ureasi
ureC	Codifica per la subunità alfa di ureasi
ureD- ureF	Proteine leganti il nickel
ureE	Proteine leganti lo zinco
ureG	GTPasi

Nei ceppi analizzati, il cluster di ureasi è poco presente.

Mettendo insieme i risultati ottenuti con BV-BRC sulla presenza/assenza dei geni di virulenza e le relazioni filogenetiche che intercorrono tra i campioni utilizzando il software iTOL è possibile visionare nella totalità queste informazioni. I campioni sono stati suddivisi sulla base del sito di campionamento (in blu Chioggia, in rosso Porto Marghera) e le quattro diverse classi di geni di virulenza sono indicati con colori diversi.
(figura 14)



Figura 14: Analisi di presenza-assenza di geni associati alla virulenza nelle specie di *Arcobacter*.

4.5.3 Identificazione di fattori legati all'antibiotico resistenza per la caratterizzazione degli isolati

Come visto in precedenza al §1.6, il principale antibiotico a cui il genere *Arcobacter* (isolato da bivalvi) è resistente, è l'acido nalidixico, appartenente alla classe degli antibiotici chinolonici che agisce inibendo la DNA girasi batterica. Consultando il database CARD sono stati individuati i geni che conferiscono resistenza all'antibiotico, i risultati sono riportati in figura 15.

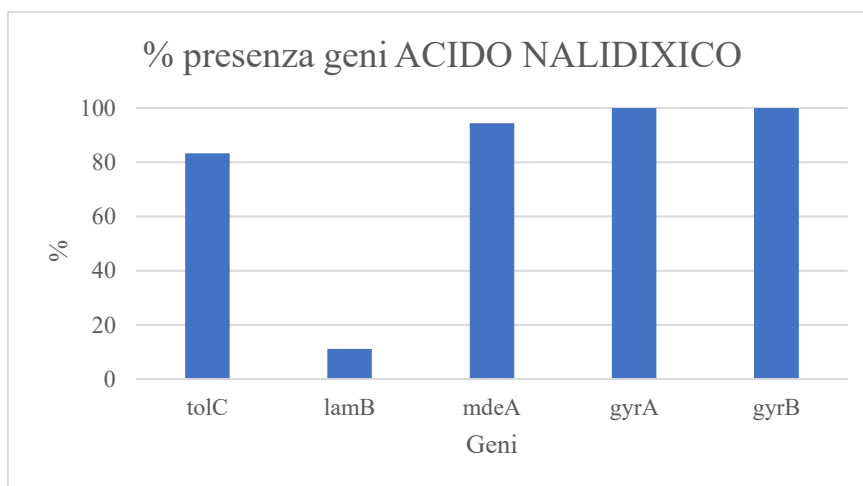


Figura 15: Rappresentazione grafica della percentuale di presenza dei geni di resistenza all'acido nalidixico

Nel grafico, nelle ascisse sono indicati i geni presi in considerazione, nelle ordinate le percentuali di presenza del gene nei campioni.

La funzione dei geni è indicata nella tabella 7.

Tabella 7: sono riportate le funzioni dei geni che conferiscono resistenza all'acido nalidixico

Gene	Funzione
tolC	Proteina di membrana
lamB	Proteina di membrana
mdeA	Trasportatore multi-farmaco
gyrA	DNA girasi-subA
gyrB	DNA girasi-subB

4.5.4 Analisi delle vie metaboliche di detossificazione

Per conoscere le vie metaboliche di detossificazione dei diciotto isolati è stato utilizzato il tool “comparative pathway” di BV-BRC il quale mette a confronto le famiglie proteiche e le vie metaboliche per i genomi selezionati.

In particolare, sono state analizzate le vie di biodegradazione e metabolismo degli xenobiotici. I risultati sono riportati in tabella 8.

Tabella 8: vie metaboliche trovate e funzione (fonte Metacyc)

Via metabolica	Funzione
Degradazione dell'atrazina	Erbicida
Degradazione del geraniolo	È presente negli oli essenziali (es. olio di palma)
Degradazione del gamma-Hexaclorocicloesano	Insetticida
Degradazione del caprolattame	Utilizzato per la sintesi del nylon, altamente solubile e presente nelle acque reflue
Degradazione dello stirene	Composto tossico presente nelle acque reflue
Degradazione del 2,4-Dichlorobenzoate	Erbicida
Degradazione del tetracloroetene	Contaminante delle acque reflue
Degradazione del trinitrotoluene	Inquinante organico persistente
Degradazione del bifenile	Composto aromatico
Degradazione 1,2 metilnaftalene	Idrocarburo aromatico
Degradazione del 1,4-diclorobenzene	Contaminante dell'aria usato nella naftalina
Degradazione del toluene e xylene	Idrocarburi aromatici
Degradazione del fluorobenzene	Composto aromatico
Degradazione del benzoato via idrolasi	Composto aromatico
Degradazione dell'etilbenzene	Composto aromatico
Degradazione del bifenolo A	Plasticante utilizzato per le lattine per alimenti

Degradazione del naftalene e antrace	Idrocarburo policiclico aromatico
Degradazione 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4clorophenyl) etane (DDT)	Pesticida

Esaminando le vie metaboliche di detossificazione negli isolati si evince una generale presenza di queste negli isolati. (figura 16)

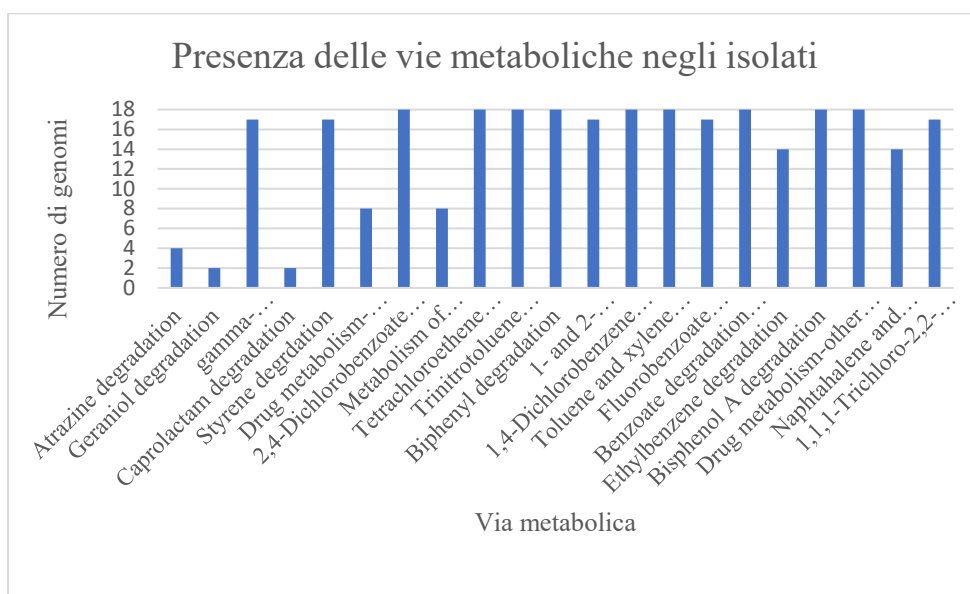


Figura 16: rappresentazione grafica della presenza delle vie metaboliche negli isolati

I risultati ottenuti sono stati clusterizzati utilizzando il software Rstudio. (figura 17)

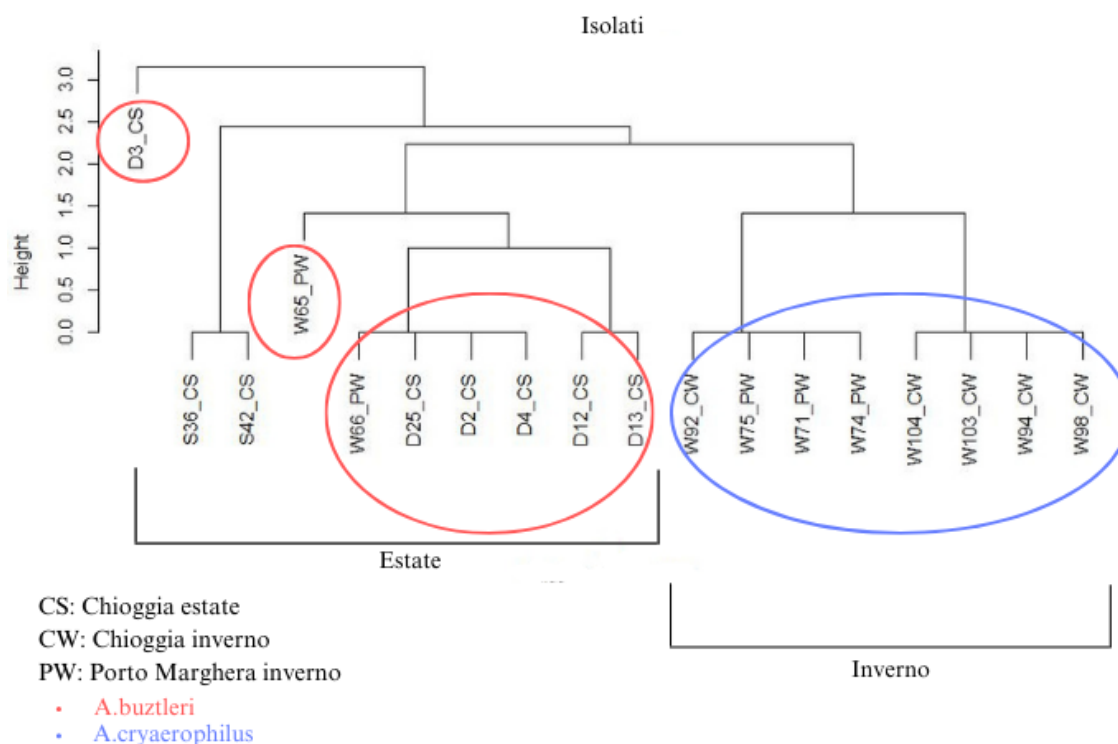


Figura 17: Clusterizzazione dei campioni di *Arcobacter* sulla base della presenza delle vie di detossificazione

Dal grafico si possono vedere due diversi raggruppamenti: il primo riguarda la stagione di campionamento, estate e inverno, fatta eccezione per tre campioni, sono stati clusterizzati separatamente. Il secondo raggruppamento invece coinvolge i ceppi. Infatti, a destra si distinguono molto bene gli isolati di *A. cryaerophilus* mentre a sinistra i ceppi di *A. butzleri*. I ceppi di *A. mytili* (S36) e *A. aquimarinus* (S42) rientrano nel primo raggruppamento.

4.6 Valutazione dell'abbondanza del genere *Arcobacter* in campioni di vongole

È stata condotta un'analisi quantitativa sui DNA estratti da campioni omogenati mediante real-time PCR, come descritto nel §3.4, per valutare l'abbondanza del genere *Arcobacter* nella comunità batterica della vongola.

I dati ottenuti dall'analisi di real-time PCR sono stati elaborati su un foglio di lavoro Excel e i valori di $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, corrispondente alla quantità relativa di *Arcobacter* presente del campione, sono stati analizzati con il software Rstudio al fine di studiarne la variabilità statistica, in relazione alla stagione e alla posizione da cui sono stati campionati (figura 18).

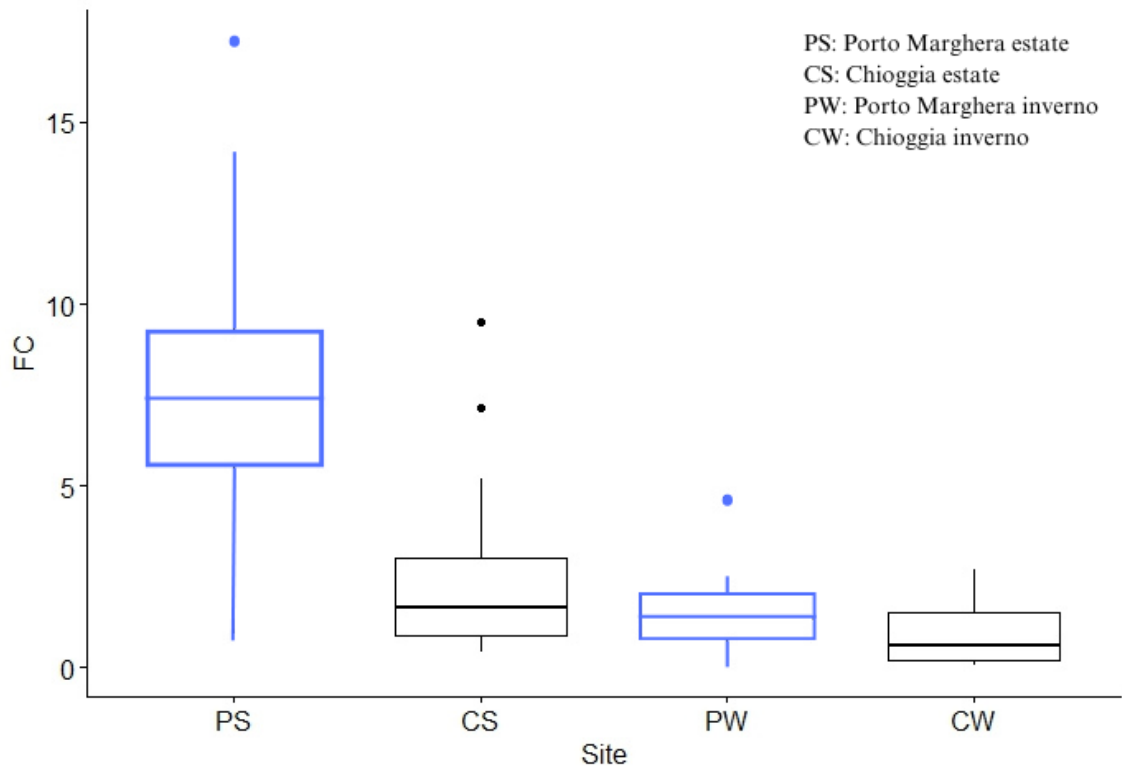


Figura 18: Rappresentazione grafica della distribuzione di *Arcobacter* in relazione alla stagione e al sito di campionamento

In blu sono indicati i campioni raccolti nel sito di Porto Marghera, in nero i campioni raccolti nel sito di Chioggia.

In ascisse del grafico è indicato il sito di campionamento, in ordinata è indicato il fold change (FC) ovvero la variazione nella quantità relativa di *Arcobacter* all'interno dei campioni. Come si evince la quantità di *Arcobacter* è significativamente maggiore nel microbiota di vongole provenienti da Porto Marghera nella stagione estiva.

5 Discussione

Il genere *Arcobacter* ha acquisito maggiore interesse presso la comunità scientifica in quanto patogeno alimentare emergente che causa malattie gastrointestinali nell'uomo. Spesso è isolato da acque reflue, inquinate e da regioni in cui è presente un elevato impatto antropico (Milan et al., 2018), ma anche da cibi crudi di origine animale e da prodotti alimentari di origine animale quali carni, formaggi e molluschi (Chieffi et al., 2020b). Questa capacità adattiva favorisce la trasmissione e la diffusione del batterio all'interno della catena alimentare e costituisce un rischio per la salute umana.

Le conoscenze sono ancora limitate pertanto, essendo stato isolato il batterio anche da vongole in zone di produzione della Laguna di Venezia (Chioggia), oltre che da zone inquinate (Porto Marghera), si è deciso di approfondirne lo studio caratterizzandolo per la presenza di geni di virulenza, di antibiotico resistenza e per le vie di detossificazione degli xenobiotici.

Per fare ciò, partendo da un omogenato contenente *Arcobacter* broth, si è proceduto con la messa a punto di colture su un terreno agar arricchito con antibiotici CAT (cefoperazone 8 mg/ml, anfotericina B 10 mg/ml e teicoplanina 4 mg/ml) da cui, al termine del tempo di incubazione, sono state prelevate delle colonie di *Arcobacter* ed è stato estratto il DNA.

Si è proceduto alla valutazione quali-quantitativa del DNA estratto mediante Nanodrop e Qbit. Le colonie formatesi sul terreno però erano molto piccole, tonde e di colore bianco/trasparente.

Queste caratteristiche hanno reso la procedura di prelevamento delle colonie stesse, per l'estrazione del DNA, uno svolgimento delicato che non ha portato a risultati ottimali: la resa di estrazione è stata molto bassa, tantoché per alcuni isolati la concentrazione di DNA non è stata riscontrata poiché al di sotto della soglia minima di rilevamento degli strumenti utilizzati. Ancora, non tutte le colonie sono cresciute o erano eccessivamente piccole per essere prelevate. Gli isolati rappresentanti le vongole raccolte a Porto Marghera sono dunque cinque perché le colonie non sono cresciute sul terreno.

Il DNA estratto è stato poi sequenziato e le sequenze genomiche ottenute mediante WGS sono state elaborate e analizzate utilizzando vari software e tool bioinformatici per caratterizzare i ceppi di *Arcobacter spp.* In particolar modo, la caratterizzazione è stata basata sulla ricerca di geni di virulenza, resistenza e sulla presenza di vie metaboliche di detossificazione.

Finora sono state depositate su NCBI 42 sequenze di *Arcobacter* e questo ha consentito l'identificazione di dieci geni associati alla virulenza (VAG), omologhi dei determinanti della virulenza in *Campylobacter jejuni* (Chieffi et al., 2020b), i quali sono stati cercati utilizzando il software BV-BRC. È emersa la presenza di quasi tutti i geni associati alla virulenza ad eccezione della proteina cadF, una proteina legante la fibronectina, del precursore della proteina attivatrice dell'emolisina e dell'enterobactina iroE associata ad *E. coli* uropatogeno. In particolar modo, iroE è assente in tutti i ceppi di *A. butzleri*, nel ceppo di *A. mytili* e nel ceppo di *A. aquimarinus* mentre è assente in soli due ceppi di *A. cryaerophilus*.

I ceppi di *A. cryaerophilus* sono privi dell'omologo di hecA, una emoagglutinina

Il vasto arsenale di fattori di virulenza di *Arcobacter* è formato anche da geni flagellari, geni responsabili di chemiotassi e geni codificanti l'enzima ureasi. I primi, i geni flagellari, sono conservati in due regioni genomiche rispettivamente costituite da venti e otto geni. Altri sei geni flagellari si trovano al di fuori di questi due cluster (flaA, flaB, motA, motB, fliP, hag) per un totale di 34 geni del flagello (Isidro et al., 2020).

La presenza di questi geni nei diciotto isolati è alta. I geni assenti sono flaA -presente in sei ceppi di *A. butzleri*- e flaB che codificano rispettivamente per la subunità superiore e inferiore della flagellina, il gene hag associato sempre alla sintesi della flagellina, i geni flgE1 e flgE2 -presenti in due ceppi di *A. butzleri*- associati a una proteina del gancio flagellare, i geni flgG1 e flgG2 -presenti in due ceppi di *A. butzleri*- associato a una proteina del corpo basale del flagello.

Il ceppo di *A. mytili* non possiede il gene flgK associato a una proteina del gancio del flagello, i geni flgH e flgL associati alla proteina dell'anello L flagellare.

Invece il ceppo *A. aquimarinus* non possiede i geni flgK e flgL.

Il sistema di chemiotassi cheA-cheY consente la trasduzione del segnale in risposta a gradienti chimici ambientali permettendo il movimento del batterio. È considerato un fattore di virulenza poiché permette al batterio di adattarsi meglio all'interno dell'ospite. I geni associati al sistema di chemiotassi cheA- cheY sono anch'essi ben presenti nei campioni analizzati. Si nota l'assenza però delle varianti del gene cheY (cheY1, cheY2, cheY3) presenti però in tre ceppi diversi di *A. butzleri*.

Infine, il cluster di ureasi è considerato un tratto di virulenza, in quanto la conversione dell'urea in ammoniaca permette di neutralizzare gli ambienti acidi, come quello dello stomaco, e di conseguenza permette una migliore sopravvivenza del batterio all'interno dell'ospite. Dall'analisi del cluster di ureasi al quale si iscrivono sei geni (ureAB, C, D, E, F, G) però non si evidenzia nessuna se non scarsa presenza di questi negli isolati di *Arcobacter* a partire da vongole. Sono presenti in soli due ceppi di *A. butzleri* i geni ureD, ureE, ureF e ureG i quali sono implicati nel legame con il nichel e lo zinco e nella maturazione dell'enzima ureasi.

Possiamo affermare che il contenuto genico associato alla virulenza è indicativo di una forte capacità patogena e di adattamento, ed emerge l'importanza di studiare più approfonditamente il genere *Arcobacter* -ed in particolar modo il ceppo di *A. butzleri* - per comprenderne i meccanismi di patogenicità e preservare la salute umana.

Nonostante questa attitudine patogena, avvalorandoci del database CARD per la ricerca dei geni implicati nell'ambito dell'antibiotico resistenza, è stato creato il profilo di resistenza a determinati antibiotici. Nei diciotto isolati, a livello genico, l'unico antibiotico a cui *Arcobacter* sembra resistente è l'acido nalidixico, appartenente alla classe dei chinoloni, derivato della naftiridina ed è attivo contro molti enterobatteri. Possiamo confermare che i batteri appartenenti al genere *Arcobacter*, isolati a partire da vongole (molluschi), presentano un basso spettro di resistenza alle principali classi di antibiotico prese in esame in quanto i geni codificanti sono assenti in tutti gli isolati fatta eccezione per l'acido nalidixico.

Le vongole da cui sono stati isolati i batteri analizzati in questo studio sono allevate nella Laguna di Venezia, in particolare nei siti di Chioggia (VE) e Porto Marghera (VE). Le acque di questi mari sono molto inquinate a causa delle forti pressioni antropiche. Per

questo motivo sono state analizzate le vie metaboliche di detossificazione dagli xenobiotici e ne sono state identificate diciannove.

I dati sono stati analizzati con Rstudio creando un cluster basato sulla somiglianza dei profili genetici degli isolati rispetto alla presenza o assenza dei pathway. Delle diciannove vie metaboliche identificate, tre (degradazione dell'atrazina, degradazione del geraniolo e degradazione del caprolattame) sono assenti negli isolati del ceppo *A. cryaerophilus*. Se si analizza il cluster suddividendolo in base alla stagione di raccolta (estate, inverno) le stesse tre vie sono assenti negli isolati campionati in inverno che coincidono con i ceppi di *A. cryaerophilus*.

Quindi la presenza delle vie di detossificazione non sembra distinguere i ceppi provenienti dalle due aree nonostante la differenza in tasso di inquinamento.

L'atrazina è un erbicida e la sua degradazione prevede la scissione in CO₂ e ammoniacca (Shapir et al., 2007).

Il geraniolo è presente negli oli essenziali delle piante (come, ad esempio, nell'olio di palma) e viene degradato in sulcatone e acetaldeide da funghi o batteri (Van der Werf & Wolken, 2001).

Il caprolattame è un composto chimico utilizzato per la sintesi del 6-nylon, è altamente solubile e lo si trova nelle acque reflue. È estremamente tossico per l'uomo e per i batteri sopra una certa concentrazione. Viene eliminato dalle acque reflue con i fanghi attivi (Iizuka, n.d.).

Il genere *Arcobacter* è stato dimostrato predominante nella comunità microbica della vongola *R. philippinarum* (Milan et al., 2018) soprattutto da campioni provenienti da Porto Marghera. Per confermare questo risultato è stato eseguito un saggio di real-time PCR su campioni omogenati da cui è stato estratto il DNA della comunità batterica (coltura indipendente). È stato amplificato il gene 23S di *Arcobacter* poiché capace di identificare tutte le specie presenti nei campioni (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. mytili*, *A. aquimarinus*) e il gene 16S rRNA come gene di riferimento per effettuare una quantificazione relativa. Questa analisi ha evidenziato una maggiore abbondanza di *Arcobacter* nei campioni di vongole raccolte nel mare di Porto Marghera in estate mentre la quantità presente nelle vongole raccolte nel mare di Chioggia, sia in inverno che in estate e la quantità presente nelle vongole raccolte a Porto Marghera in inverno sono

paragonabili tra di loro, non si evince alcuna differenza sostanziale in termini di abbondanza.

Non avendo rilevato differenze nelle vie di detossificazione tra i ceppi isolati da Porto Marghera e Chioggia si può ipotizzare che la maggior abbondanza a Porto Marghera durante la stagione estiva non sia dovuta ad una miglior sopravvivenza in ambiente inquinato quanto ad un miglior adattamento ad altre condizioni ambientali che potrebbero distinguere Porto Marghera da Chioggia, per esempio maggior presenza di specifici nutrienti, che associati alla temperatura estiva potrebbero favorire la proliferazione di questo batterio..

6 Conclusioni

Questo lavoro si propone di ampliare la conoscenza del genere *Arcobacter*, in seguito al rilevamento di questo in vongole allevate nella Laguna di Venezia, attraverso una approfondita analisi dei genomi.

Una difficoltà incontrata durante lo studio di questo genere batterico è consistita nella complessità di trovare un metodo di coltivazione che permetta ai batteri di crescere. Invece, come avvenuto in questa analisi, le colonie non si sono ben formate nonostante la scelta di un terreno selettivo e arricchito. È necessario quindi esaminare altre formulazioni di terreni per permettere una corretta coltivazione *in vitro*.

I risultati ottenuti dalla caratterizzazione genomica hanno dimostrato che i ceppi isolati possiedono la maggior parte dei fattori di virulenza evidenziati dalla letteratura e documentano un ampio spettro di virulenza e una capacità patogena rilevante che può mettere a rischio la salute umana sottolineando l'importanza di studiare sempre più approfonditamente il batterio, specialmente il ceppo di *A. butzleri*, rivelatosi maggiormente patogeno per la presenza dei fattori di virulenza.

Lo studio condotto sulla resistenza agli antibiotici ha portato a dei risultati peculiari evidenziando l'importanza della matrice alimentare da cui il batterio viene isolato. Infatti, se per la maggior parte dei batteri *Arcobacter* isolati da prodotti animali (pollame, manzo, latte vaccino) la multi-resistenza agli antibiotici è una caratteristica comune, nel caso di batteri isolati da bivalvi si nota una marcata sensibilità agli antibiotici principali (ampicillina, eritromicina, gentamicina) data dall'assenza dei geni di resistenza, fatta eccezione per l'acido nalidixico.

Per confermare questa ipotesi sarà necessario effettuare dei test di antibiogramma e valutare l'effettiva reazione a questi antibiotici.

Per concludere, analizzando il profilo genetico estrapolato dalle analisi condotte in questo studio e i dati relativi alla quantità di *Arcobacter* nei campioni di vongola studiati, si nota una apprezzabile abbondanza del batterio durante la stagione estiva che coincide con una maggiore presenza di geni di virulenza e di detossificazione.

Pertanto occorrerà capire i motivi che si celano dietro questa maggior presenza per tutelare la salute umana.

Bibliografia

- Buzzanca, D., Kerkhof, P.-J., Alessandria, V., Rantsiou, K., & Houf, K. (2023). Arcobacteraceae comparative genome analysis demonstrates genome heterogeneity and reduction in species isolated from animals and associated with human illness. *Heliyon*, 9(7), e17652. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17652>
- Chieffi, D., Fanelli, F., & Fusco, V. (2020a). *Arcobacter butzleri* : Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2071–2109. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12577>
- Chieffi, D., Fanelli, F., & Fusco, V. (2020b). *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2071–2109. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12577>
- CLSI. (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard. *Approved Standard*, 28(8), 27–32.
- CLSI. (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Approved Standard*, 29(2), 1–15.
- CLSI. (2011). *erformance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 31(1) and (15).
- Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–192. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1635–1640. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01555.x>

- Collado, L., Jara, R., Vásquez, N., & Telsaint, C. (2014). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve molluscs. *Food Control*, *46*, 508–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.013>
- Fisher, J. C., Newton, R. J., Dila, D. K., Mclellan, S. L., & Edu, M. (n.d.). *Urban microbial ecology of a freshwater estuary of Lake Michigan*. <https://doi.org/10.12952/journal.elementa.000064.s001>
- Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Muruaga, G., Carmona, S., Alonso, R., & Fernandez-Astorga, A. (2017). Study of biofilm formation ability of foodborne *Arcobacter butzleri* under different conditions. *Journal of Food Protection*, *80*(5), 758–762. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-505>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Houf, K., Devriese, L. A., De Zutter, L., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2001). Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(4), 1654–1656. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1654-1656.2001>
- Iizuka, H., T. I., F. T., K. K. (n.d.). Taxonomic study on the ϵ -caprolactam-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol*, *13*, 125–137.
- Instructions for use InviSorb® Spin Tissue Mini Kit*. (2023). www.invitex.com
- Isidro, J., Ferreira, S., Pinto, M., Domingues, F., Oleastro, M., Gomes, J. P., & Borges, V. (2020). Virulence and antibiotic resistance plasticity of *Arcobacter butzleri*: Insights on the genomic diversity of an emerging human pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, *80*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104213>
- Kristensen, J. M., Nierychlo, M., Albertsen, M., & Nielsen, P. H. (2020). *Bacteria from the Genus Arcobacter Are Abundant in Effluent from Wastewater Treatment Plants*. <http://aem.asm.org/>

- Leoni, F., Chierichetti, S., Santarelli, S., Talevi, G., Masini, L., Bartolini, C., Rocchegiani, E., Naceur Haouet, M., & Ottaviani, D. (2017). Occurrence of *Arcobacter* spp. and correlation with the bacterial indicator of faecal contamination *Escherichia coli* in bivalve molluscs from the Central Adriatic, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, *245*, 6–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.006>
- Lu, X., Zhang, X. X., Wang, Z., Huang, K., Wang, Y., Liang, W., Tan, Y., Liu, B., & Tang, J. (2015). Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, *10*(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125549>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.019>
- On, S. L. W., Miller, W. G., Biggs, P. J., Cornelius, A. J., & Vandamme, P. (2020). A critical rebuttal of the proposed division of the genus *Arcobacter* into six genera using comparative genomic, phylogenetic, and phenotypic criteria. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(5). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126108>
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2018). Revisiting the taxonomy of the genus *arcobacter*: Getting order from the chaos. *Frontiers in Microbiology*, *9*(SEP).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02077>
- Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S., & Singh, R. K. (2017). *Arcobacter*: An emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control - A comprehensive review. In *Veterinary Quarterly* (Vol. 37, Issue 1, pp. 136–161). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>

- Salas-Massó, N., Linh, Q. T., Chin, W. H., Wolff, A., Andree, K. B., Furones, M. D., Figueras, M. J., & Bang, D. D. (2019). The use of a DNA-intercalating dye for quantitative detection of viable *Arcobacter* spp. cells (v-qPCR) in shellfish. *Frontiers in Microbiology*, *10*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00368>
- Shapir, N., Mongodin, E. F., Sadowsky, M. J., Daugherty, S. C., Nelson, K. E., & Wackett, L. P. (2007). Evolution of catabolic pathways: Genomic insights into microbial s-triazine metabolism. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 189, Issue 3, pp. 674–682). <https://doi.org/10.1128/JB.01257-06>
- van der Werf, M., & Wolken, W. (2001). Geraniol biotransformation-pathway in spores of *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57*(5–6), 731–737. <https://doi.org/10.1007/s002530100821>
- VANDAMME, P., FALSEN, E., ROSSAU, R., HOSTE, B., SEGERS, P., TYTGAT, R., & DE LEY, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *41*(1), 88–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-88>
- Zampieri, A., Carraro, L., Cardazzo, B., Milan, M., Babbucci, M., Smits, M., Boffo, L., & Fasolato, L. (2020). Depuration processes affect the *Vibrio* community in the microbiota of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Microbiology*, *22*(10), 4456–4472. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15196>

Sitografia:

- BV-BRC: bv-brc.org
- MetaCyc: <https://metacyc.org/>
- CARD: <https://card.mcmaster.ca/>
- iTOL: <https://itol.embl.de/>