



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea  
Scienze Biologiche**

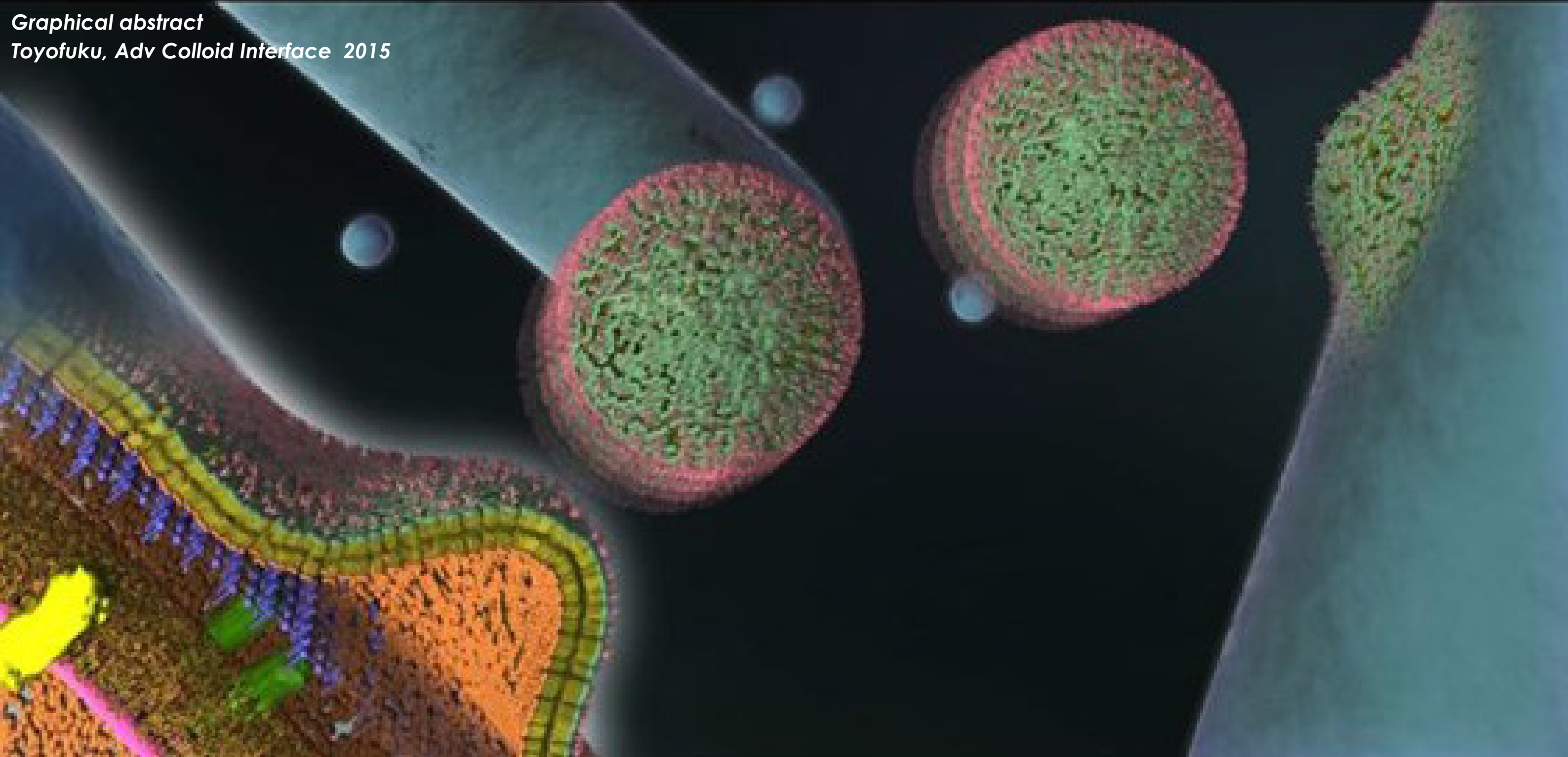
I Biofilm come *hot spot* di trasferimento genico orizzontale in ambiente acquatico e considerazioni su un nuovo meccanismo di HGT.

Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism.

**Tesi di Laurea di:  
Arianna Baldassari**

**Docente referente:  
Chiar.mo Prof.  
Francesca Biavasco**

**Sessione Estiva - Luglio 2021  
a.a. 2020/2021**



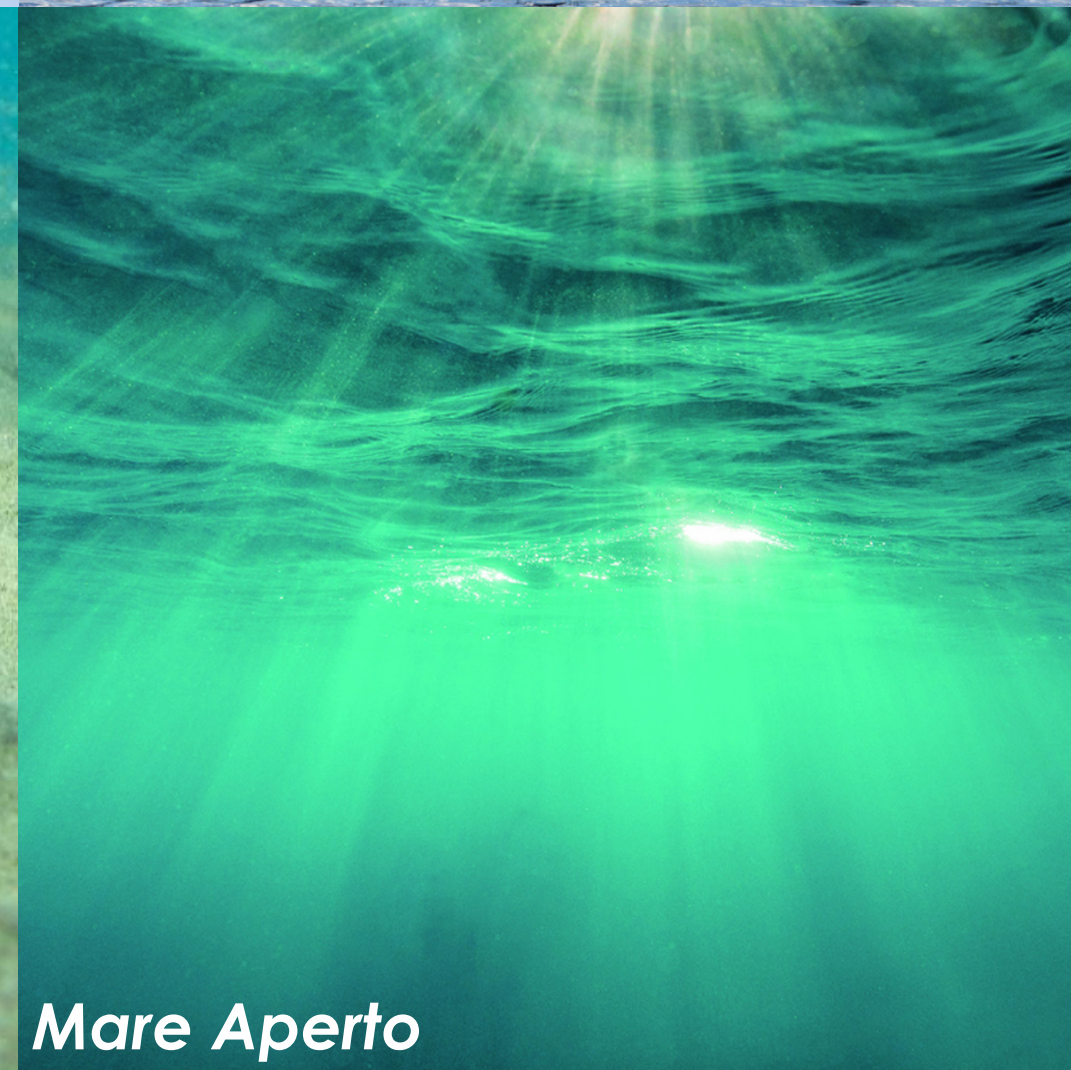
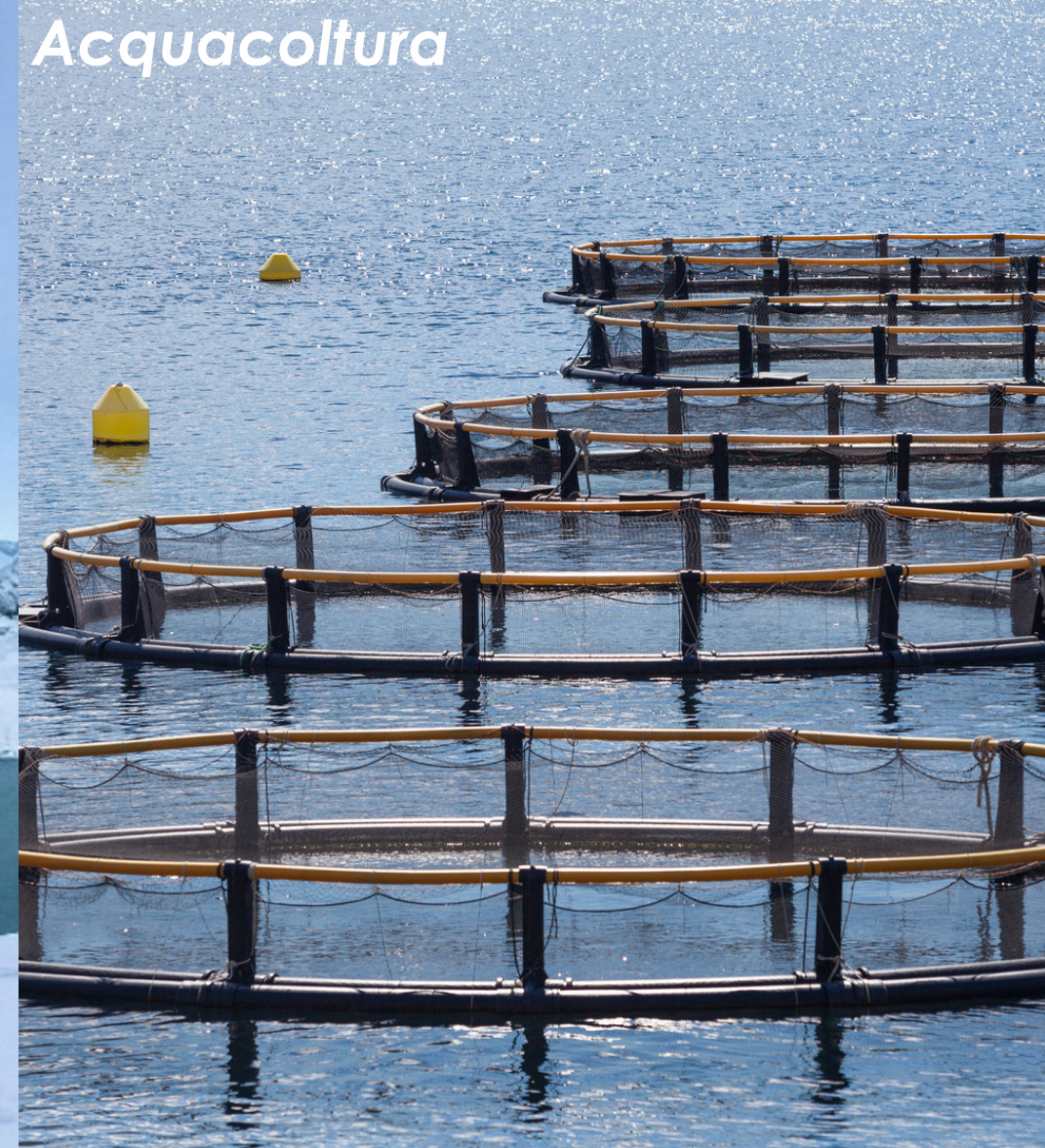
**I BIOFILM COME *HOT SPOT* DI  
TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE  
IN AMBIENTE ACQUATICO e  
CONSIDERAZIONI SU UN NUOVO MECCANISMO DI HGT**



# Geni di Resistenza agli Antibiotici

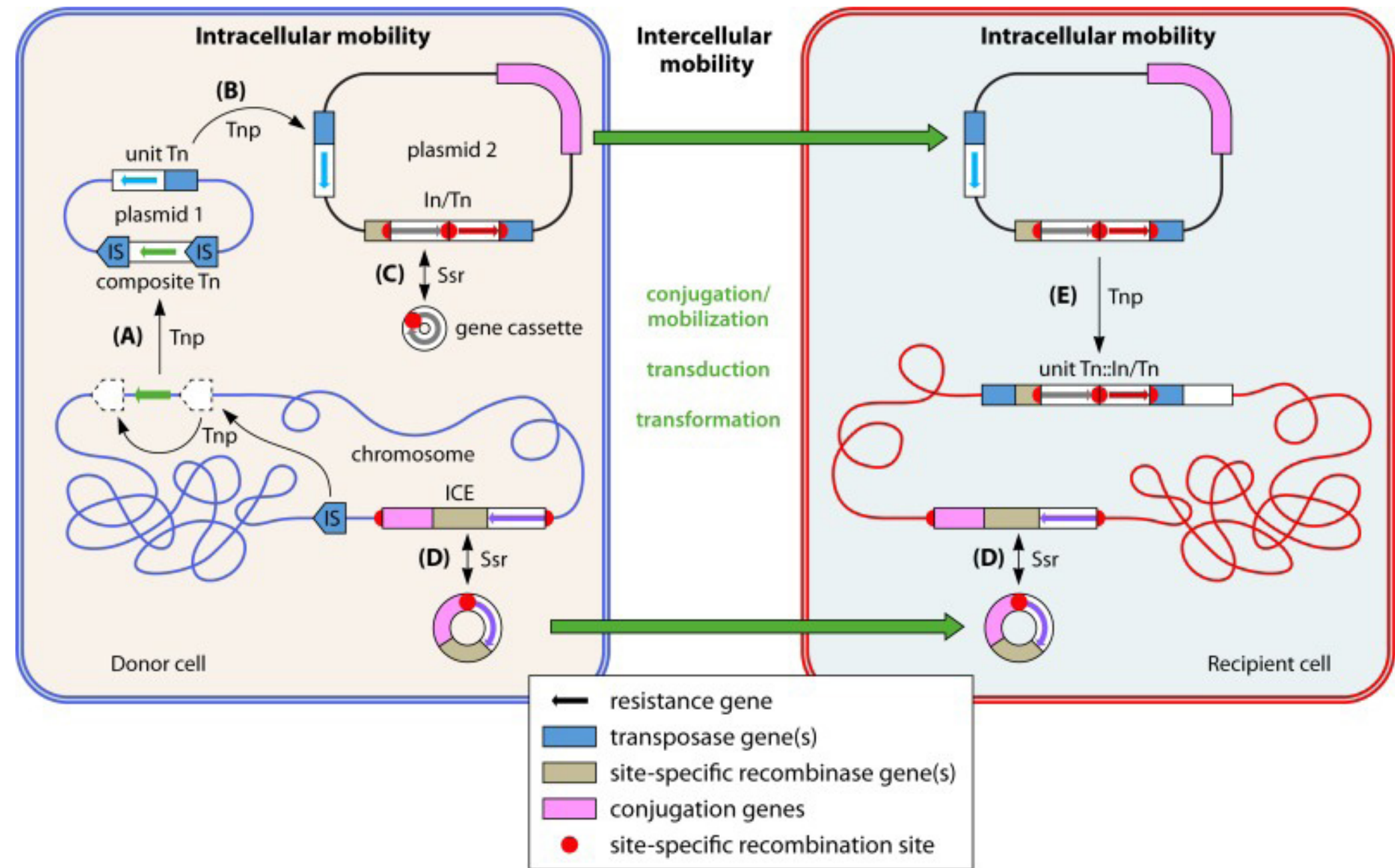
Gli ARG (*Geni di Resistenza agli Antibiotici*) persistono anche in assenza pressione selettiva. Sono ampiamente diffusi nella maggior parte degli ambienti acquatici.

**Gli ambienti acquatici rappresentano serbatoi di ARG.**





A differenza degli inquinanti chimici, gli ARG possono moltiplicarsi all'interno di microrganismi autoctoni → l'acquisizione di geni di resistenza da parte di patogeni ambientali è destinata ad aumentare.



Gli ARG sono presenti in elementi genici mobili (MGE) come plasmidi coniugativi e non, trasposoni, elementi coniugativi integrati (ICE), batteriofagi.

► Possono essere trasmessi tramite meccanismi di Trasferimento Genico Orizzontale (HGT)

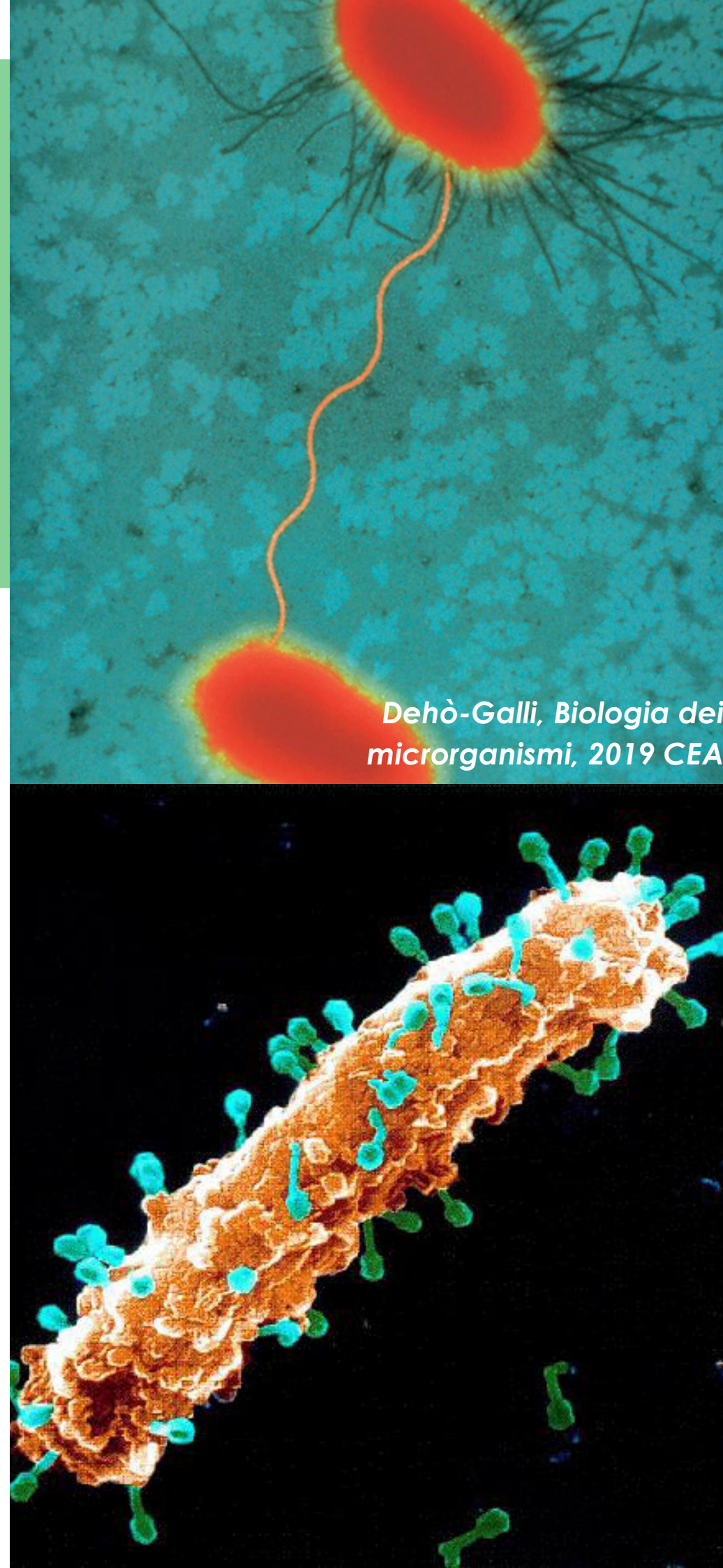
**Come l'ambiente clinico, anche l'ambiente naturale deve essere monitorato.**



# Meccanismi di Trasferimento Genico Orizzontale

## ▪ TRASFORMAZIONE

Assorbimento di DNA esogeno da parte di una cellula competente (presenza di pilo e di trasportatore di DNA) e sua integrazione nel cromosoma batterico per ricombinazione omologa, oppure, se si tratta di un plasmide, come episoma. Esclusivo di specie con la capacità di sviluppare la competenza. Non richiede contatto tra donatore e ricevente. Le cellule competenti acquisiscono DNA libero rilasciato dalle cellule donatrici che vanno incontro a lisi.



Dehò-Galli, *Biologia dei microrganismi*, 2019 CEA

## ▪ CONIUGAZIONE

Trasferimento di plasmidi coniugativi o ICE tramite pilo sessuale (struttura proteica)

**E' necessario stretto contatto tra donatore e ricevente.**

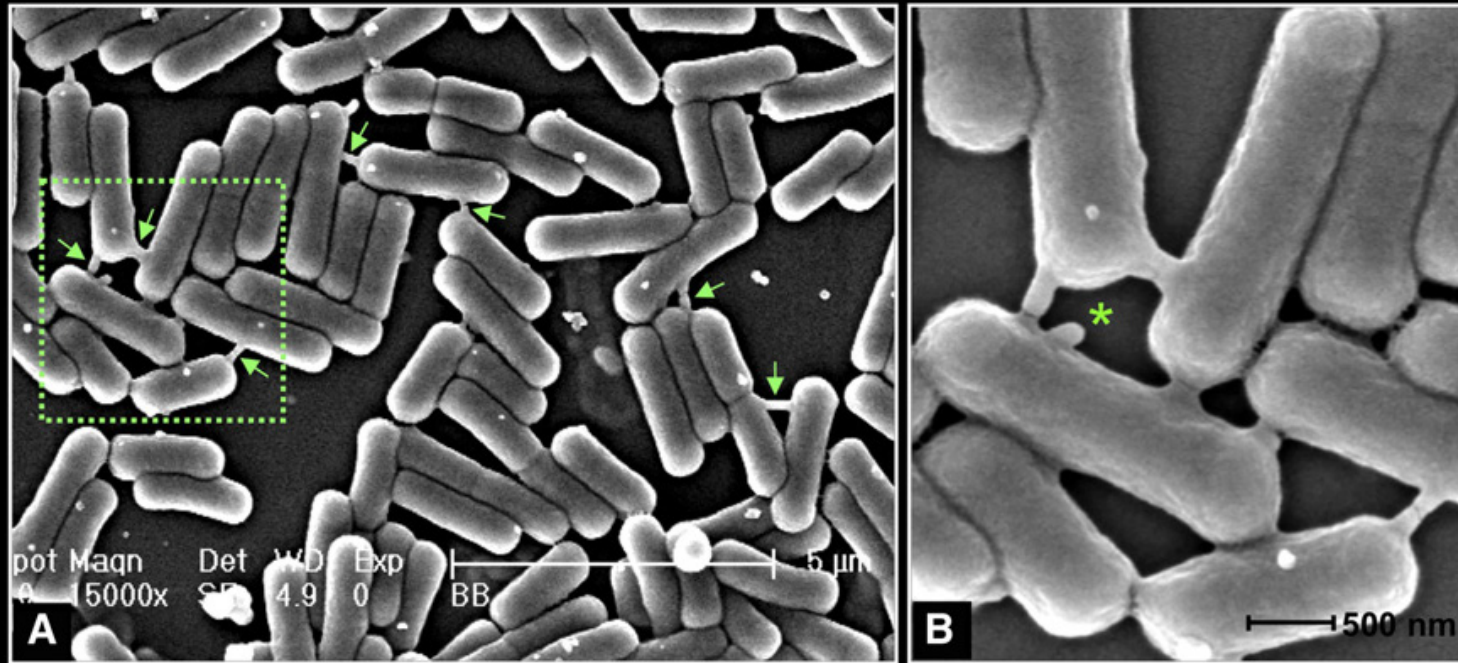
Spesso elementi coniugativi portano più ARG es. plasmide coniugativo pAQU1, isolato da un impianto costiero di acquacoltura in Giappone (Nonaka et al. 2012) e pB10, isolato da un impianto di trattamento delle acque reflue (Schluter et al. 2003).

## ▪ TRASDUZIONE ► BATTERIOFAGI

Virus che iniettano il proprio DNA e si replicano nei batteri. Oltre al DNA virale, possono inoculare anche frammenti di DNA cromosomico e di plasmidi di origine batterica.

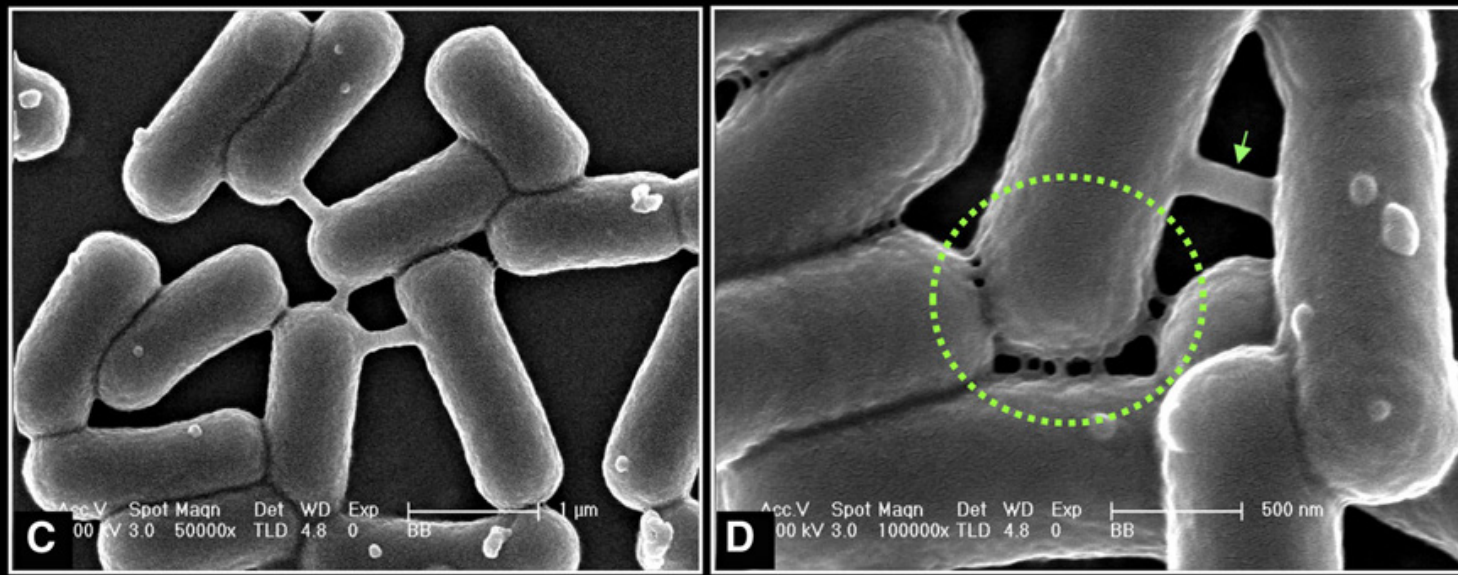
I fagi temperati tramite il processo di lisogenizzazione e la successiva formazione di particelle trasducenti possono trasferire all'ospite caratteri batterici come la resistenza ad antibiotici. Es. fago SP $\beta$ , *Acinetobacter baumannii*.





▪ **NANOTUBULO**

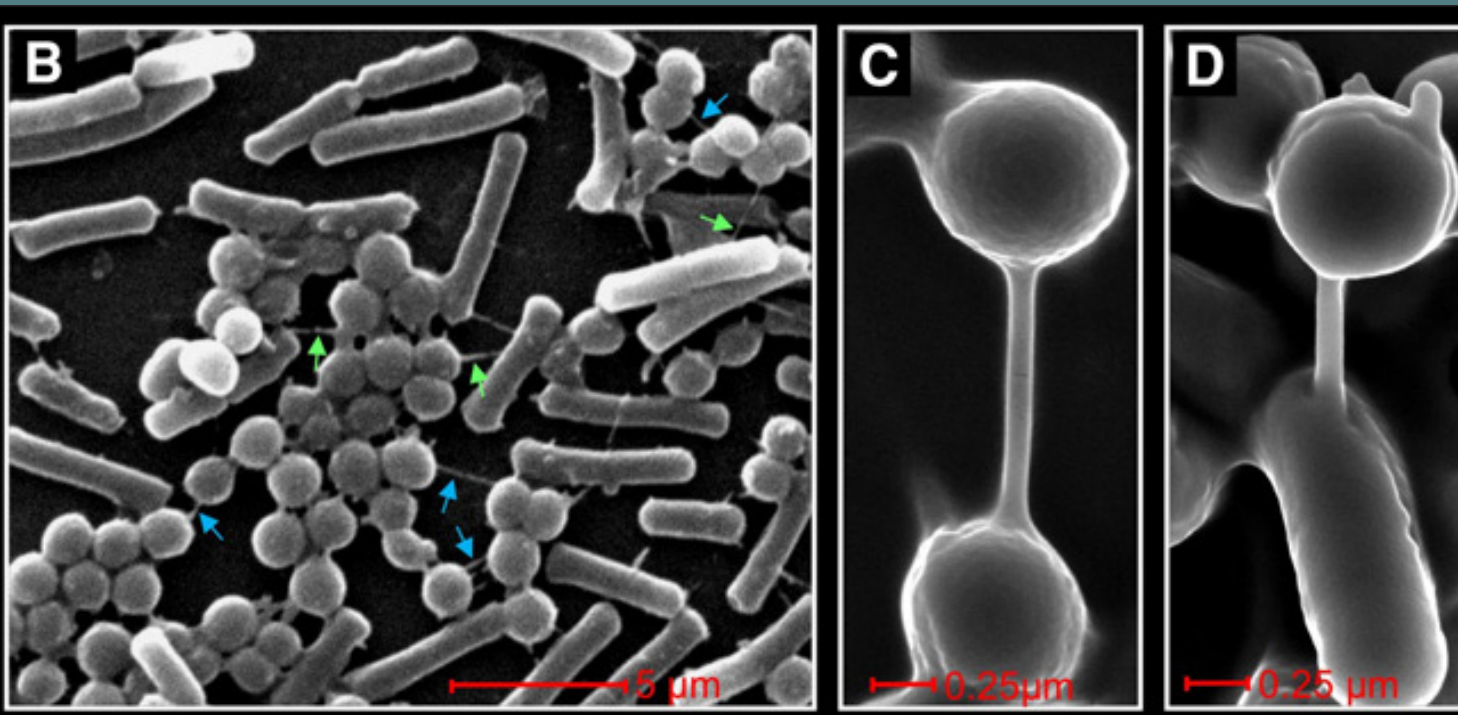
Struttura extracellulare membranosa allungata che, tramite contatto diretto tra donatore e ricevente, permette il trasporto non solo di DNA, ma anche di componenti citoplasmatiche e nutrienti.



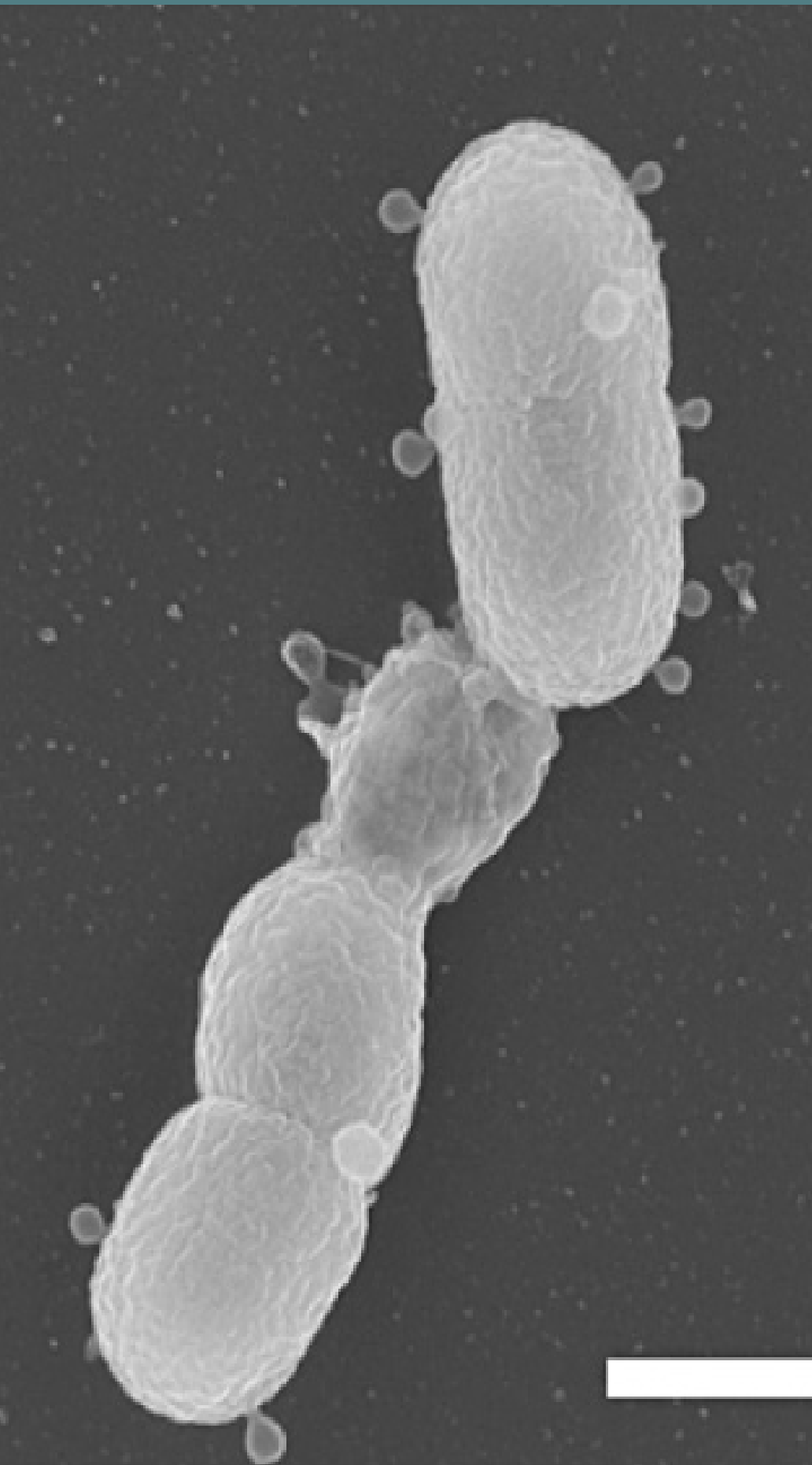
**RUOLO DI DISTRIBUZIONE DI BIOMATERIALE NELLE  
COMUNITA' BATTERICHE**

Es. pHB201

Attualmente, non ci sono evidenze di HGT mediato da nanotubi in ambienti acquatici.







Tashiro, Environ Microbiol 2012

## ▪ VESCICOLE DI MEMBRANA (MV)

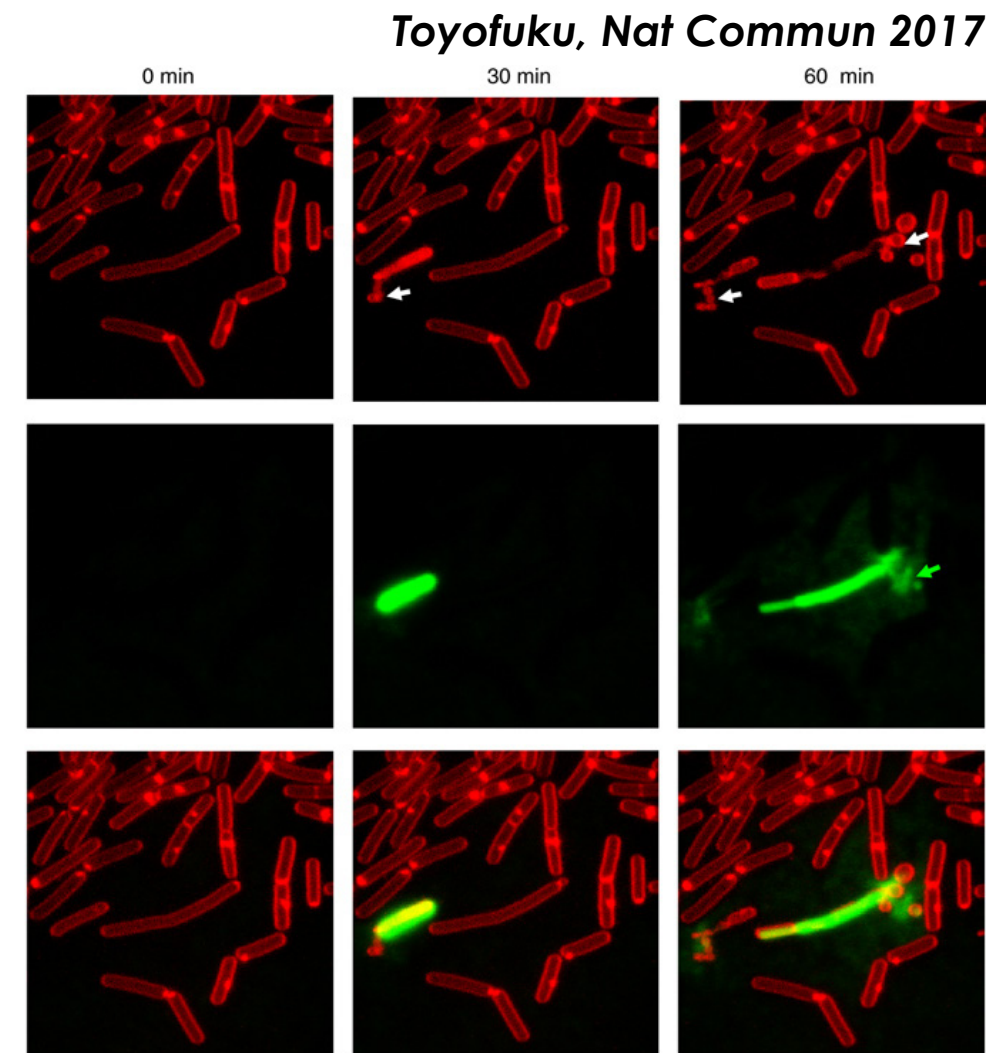
Sono particelle rilasciate dai batteri costituite da un bilayer lipidico contenenti DNA o altre molecole.

Segnalate negli anni 60', quando è stato osservato il loro rilascio a seguito di *blebbign* della membrana esterna dei batteri Gram -; recentemente è stata dimostrata la loro presenza anche nei Gram +.

Ubiquitarie e molto abbondanti in ambiente acquatico:  $6 \times 10^6$  particelle/ml in campione di acqua costiera superficiale, contenenti un pool eterogeneo di DNA con omologia significativa a membri appartenenti a 33 Phyla compresi *Proteobacteria*, *cianobatteri*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Biller et al . 2014)

In laboratorio, è stato dimostrato che possono mediare il trasferimento genico orizzontale, anche interspecie.

Es plasmide R, pLC291



Resistenti a nucleasi e proteasi  
Possono trasportare anche segnali  
di **quorum sensing**

**Possono essere coinvolte nella  
regolazione dell'HGT**

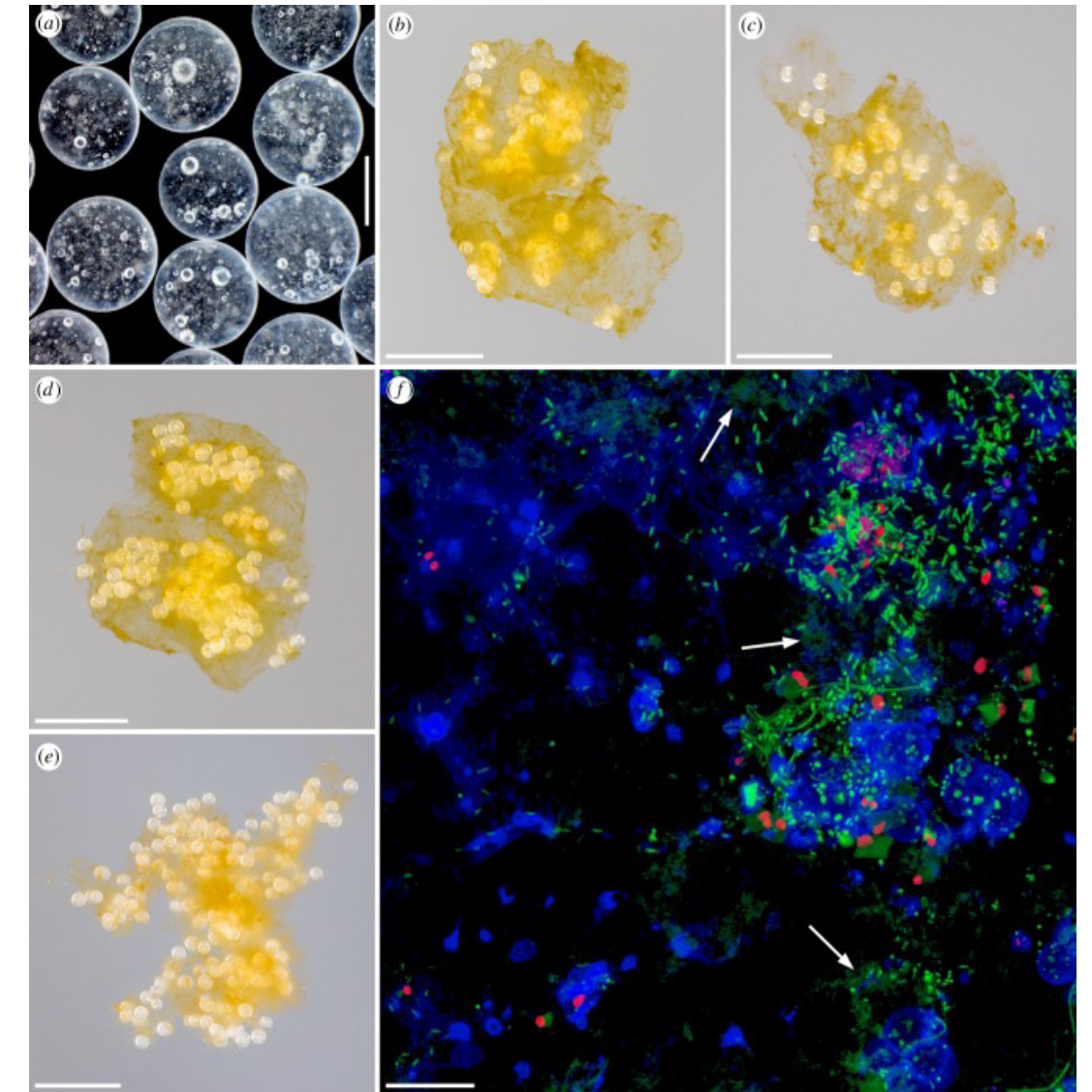
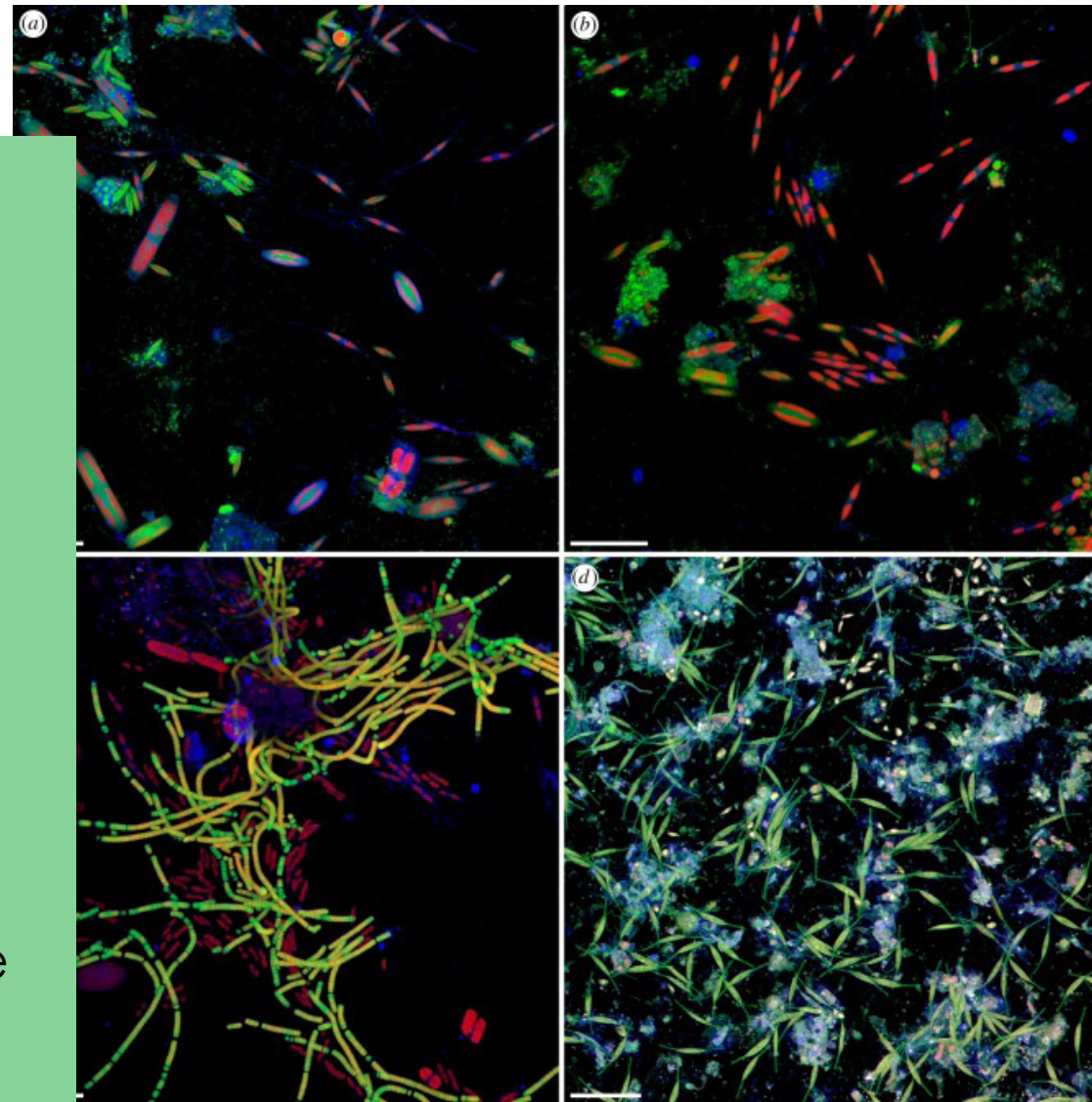
**TUTTAVIA IN AMBIENTE NATURALE  
NON E' ANCORA STATO VERIFICATO  
HGT MEDIATO DA MV**



# BIOFILM

I batteri colonizzano varie superfici di substrato formando comunità microbiche multispecie.

I biofilm si possono formare su qualunque superficie a contatto con un liquido, in particolare, in ambiente acquatico su superfici rocciose, sistemi di trattamento dell'acqua, sorgenti termali e microplastiche.



I microrganismi nel biofilm assumono caratteristiche peculiari che non si riscontrano nella corrispondente forma planctonica.

Le cellule sono incorporate in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) che supporta l'adesione e l'aggregazione delle cellule fungendo da scaffold. La produzione di EPS è controllata da una complessa regolazione genica influenzata da fattori ambientali. Componenti cellulari delle cellule morte sono utilizzati per stabilizzare la struttura del biofilm, in particolare, l'eDNA, presente in abbondanza all'interno della matrice.



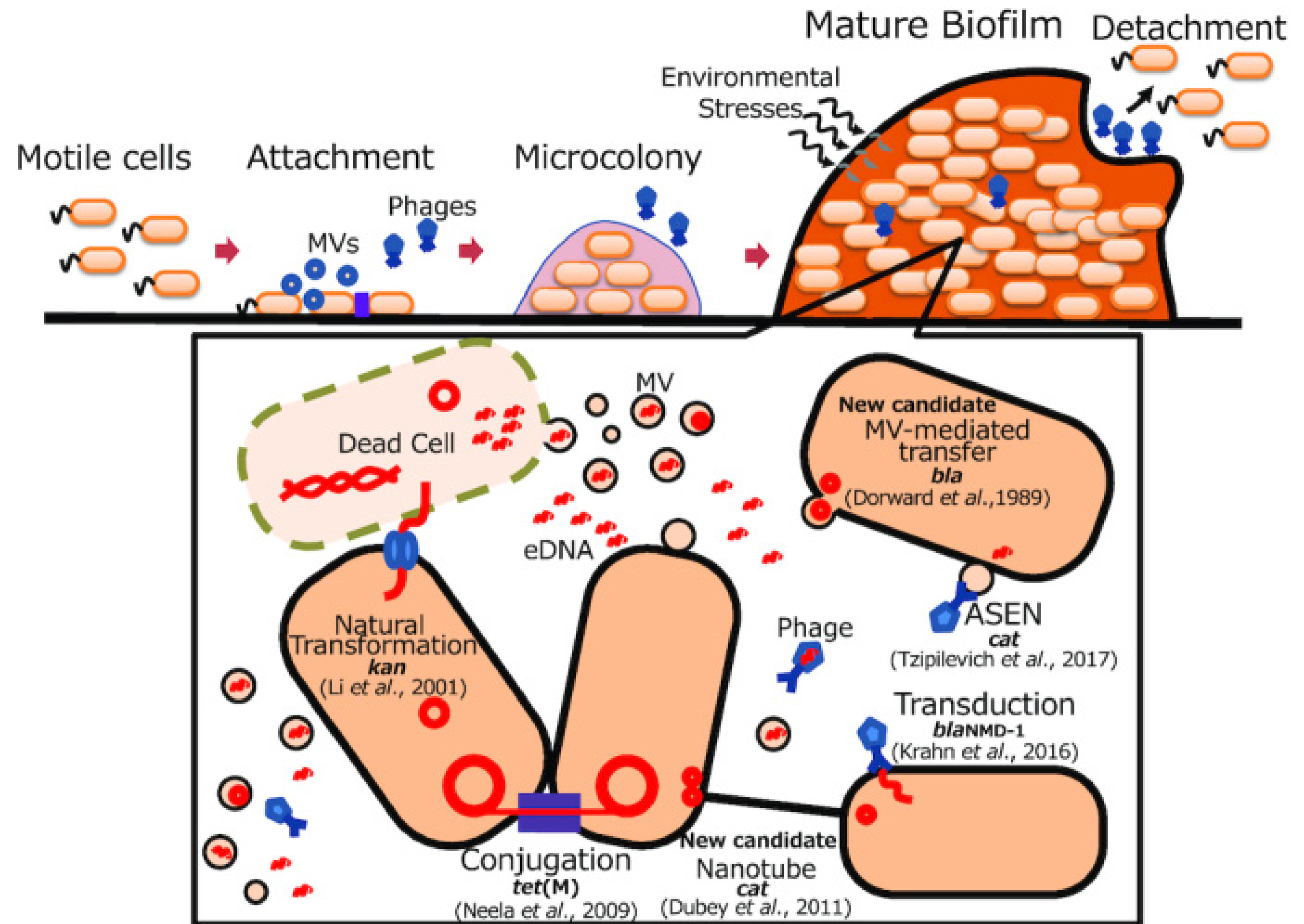
## Fasi di formazione del biofilm

- ADESIONE
- FORMAZIONE MICROCOLONIA
- MATURAZIONE
- DISTACCO

Alcuni plasmidi coniugativi promuovono lo sviluppo del biofilm codificando per proteine che promuovono l'adesione nelle prime fasi.

IL BIOFILM è UN HOT SPOT PER L'HGT DI ARG

Abe, *FEMS Microbiol Ecol* 2020



Fasi di Formazione e HGT nel Biofilm



# HGT nel Biofilm

## ▪ CONIUGAZIONE IN BIOFILM

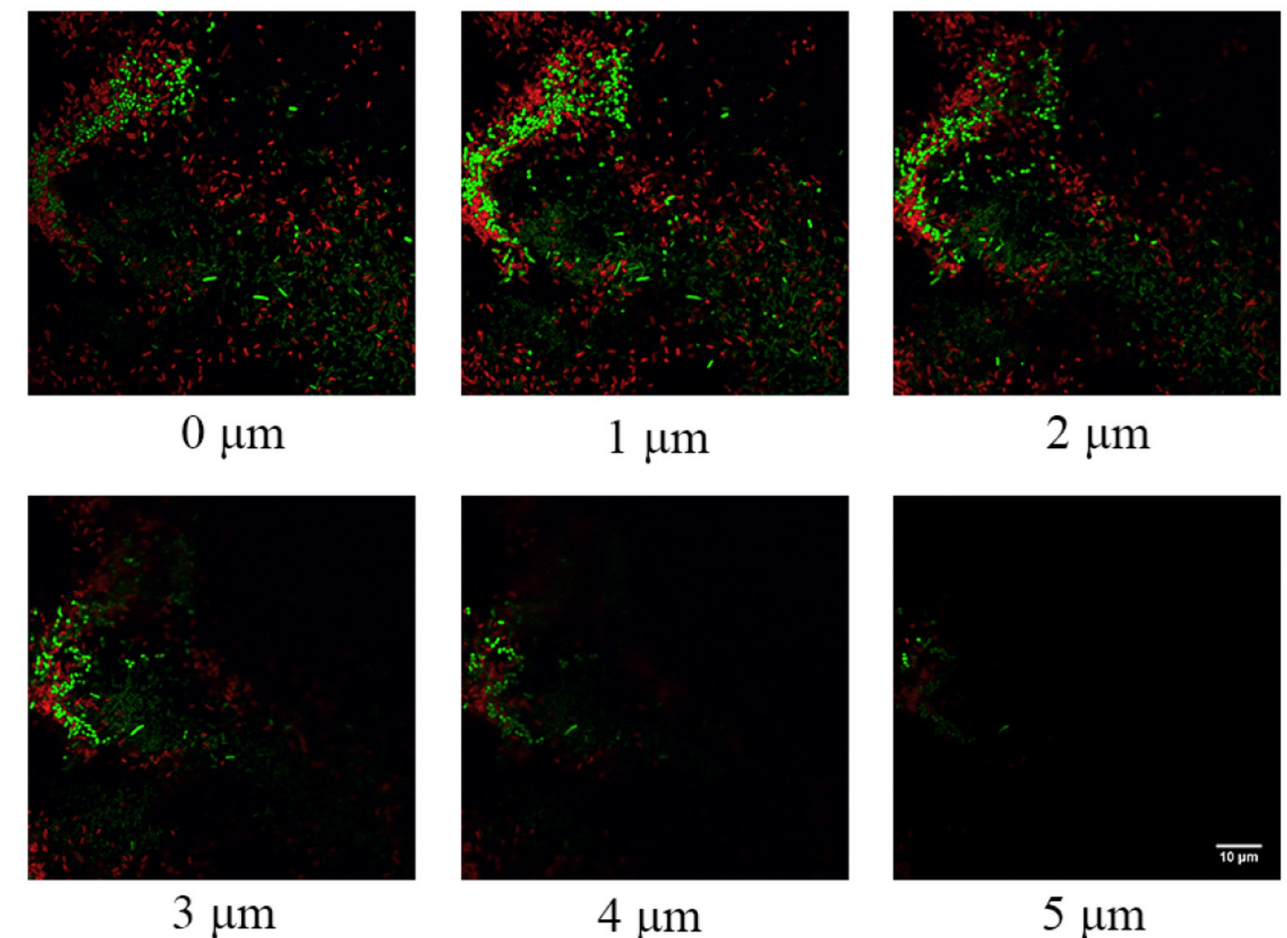
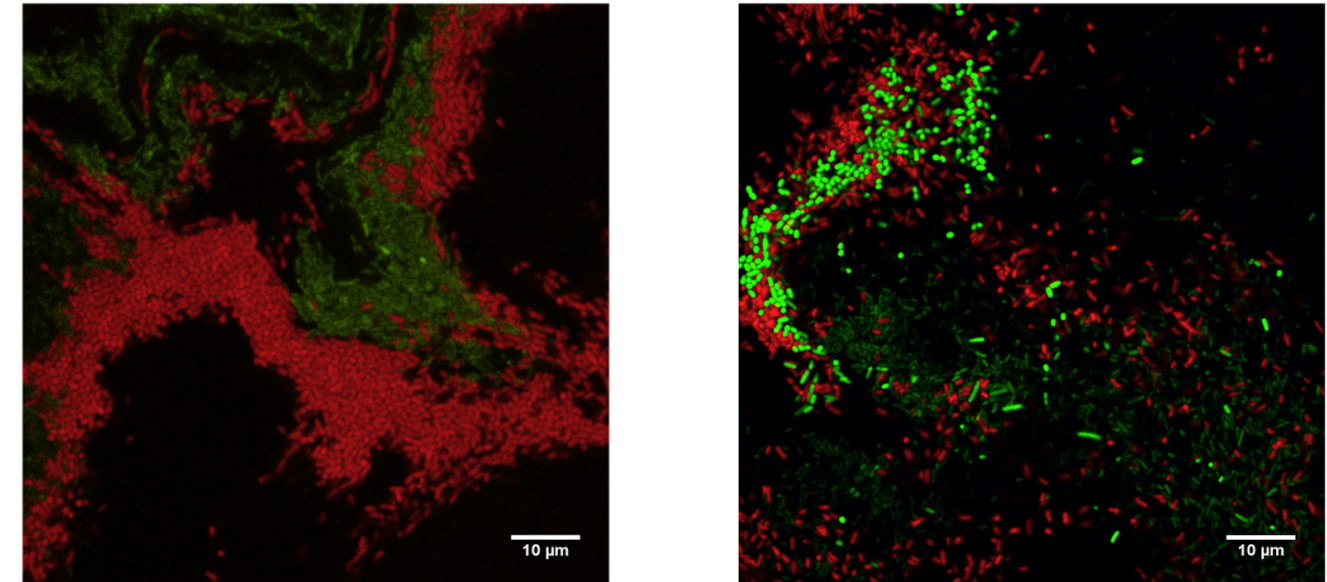
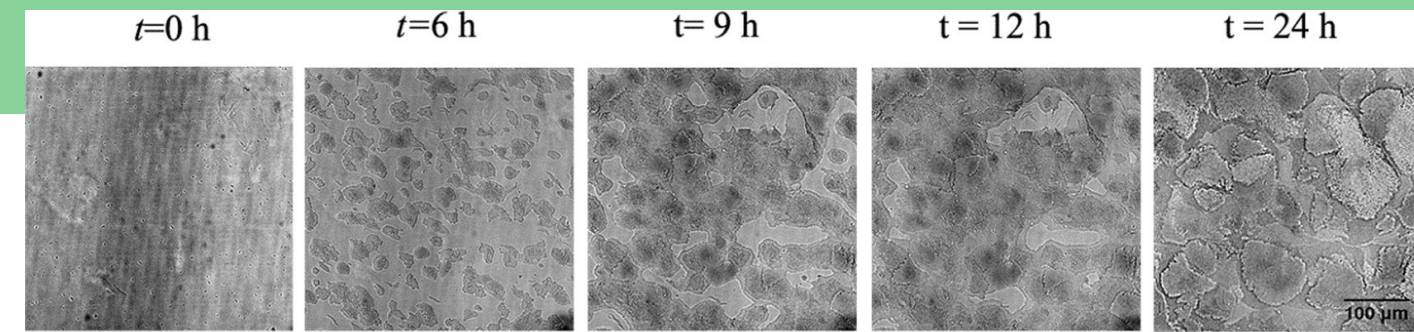
Frequenza e velocità della coniugazione aumentano perché le cellule nel biofilm sono a stretto contatto per un lungo intervallo di tempo. Es. pGO1 e pKJK5

## ▪ TRASFORMAZIONE IN BIOFILM

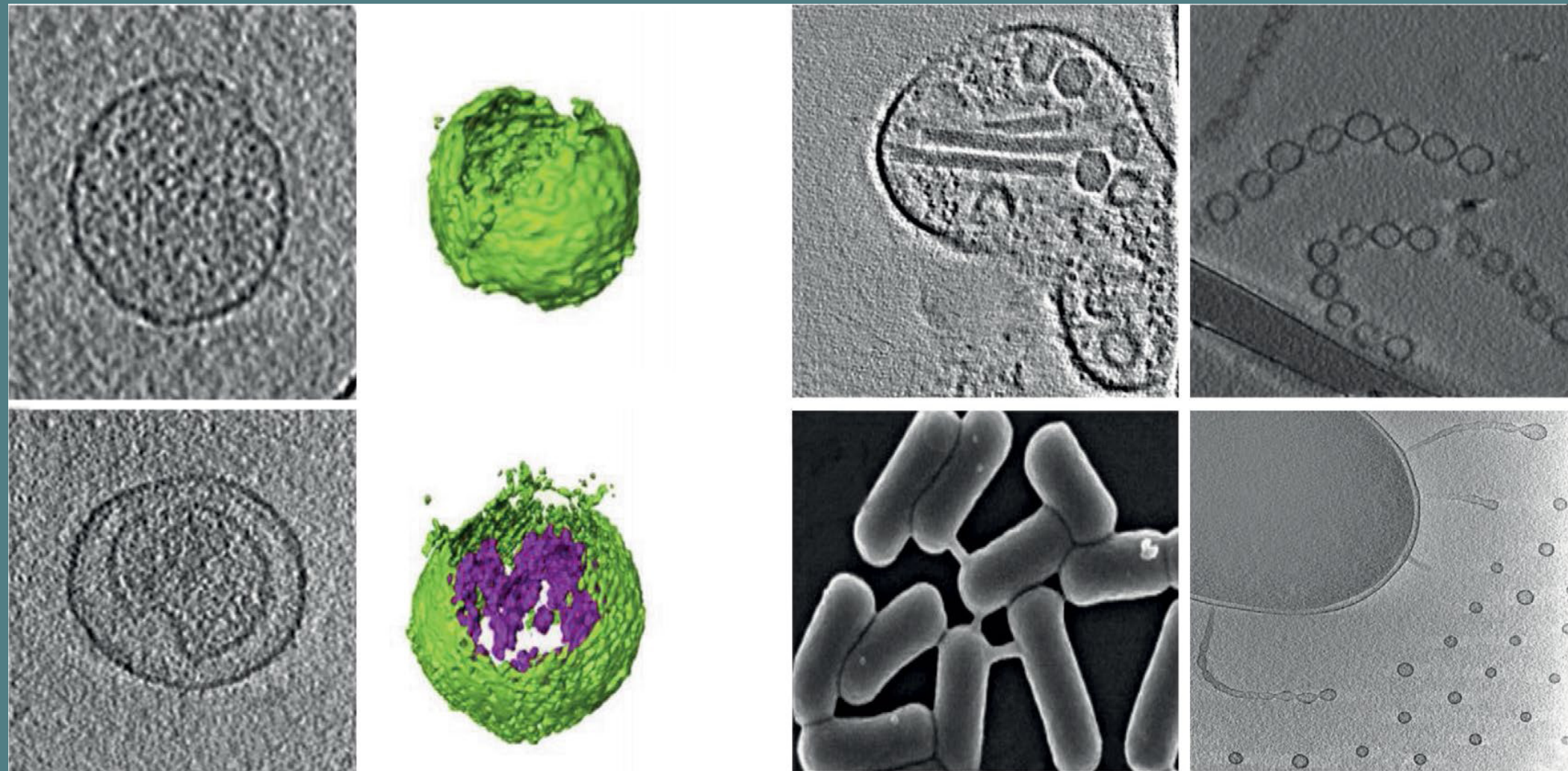
Fenomeno del fratricidio: le cellule competenti aumentano la produzione di enzimi e batteriocine che degradano la parete cellulare ed extracellulare, provocando la lisi delle cellule vicine e il rilascio di eDNA.

## ▪ TRASDUZIONE IN BIOFILM

Analisi metagenomiche hanno rilevato vari ARG in frazioni fagiche isolate da campioni di acqua ambientale (liquami, acqua di fiume, acqua di mare e impianti di trattamento delle acque reflue WWTP). Anche se in teoria la presenza di biofilm e fagi sembrano escludersi a vicenda, in quanto i fagi rompono la matrice del biofilm e ne uccidono le cellule, in realtà i fagi contribuiscono alla maturazione del biofilm promuovendo la liberazione di eDNA e il distacco di piccole porzioni che andranno a colonizzare altri siti; inoltre all'interno di biofilm è stato dimostrato il trasferimento di ARG fago-mediato. Es. biofilm di *Escherichia coli*.







## • MV NEL BIOFILM

Le MV non vengono rilasciate solo da cellule planctoniche, ma anche da cellule sessili all'interno dei biofilm.

Osservate ad esempio in biofilm di *Helicobacter Pylori*, *Vibrio Cholerae* e *Pseudomonas Putida*.

Contribuiscono allo sviluppo del biofilm promuovendo l'aggregazione delle cellule e la loro adesione, probabilmente aumentando l'idrofobicità della superficie di adesione.

Contengono e trasportano non solo DNA, ma anche RNA, proteine, metaboliti e segnali di quorum sensing partecipando a molti processi fisiologici quali virulenza, acquisizione di nutrienti, difesa, comunicazione.

Sono quindi potenziali agenti di HGT e, inoltre, modulano l'interazione tra batteri e fagi → **FENOMENO ASEN**

Acquisizione di sensibilità: le cellule di *Bacillus subtilis* resistenti ai fagi, prive del recettore SPP1, sono diventate sensibili al fago quando hanno catturato le MV contenenti il recettore, portando alla trasduzione di pBT163, plasmide codificante la resistenza al cloramfenicolo. Questo fenomeno può causare l'espansione dell'infezione fagica nelle comunità batteriche ed è probabile che contribuisca all'HGT mediato dal fago ampliando il range dell'ospite.

Inoltre, la lisi cellulare causata da enzimi litici dei fagi rilascia MV.



# Metodi di Studio di HGT e Biofilm

## RILEVAZIONE DI ARG E ARB

- PCR quantitativa
- NGS ad alto rendimento e database pubblici es. Database ARG completo, CARD
- software MetaCHIP e LEMON
- saggi di trasformazione e trasduzione tramite filter mating.

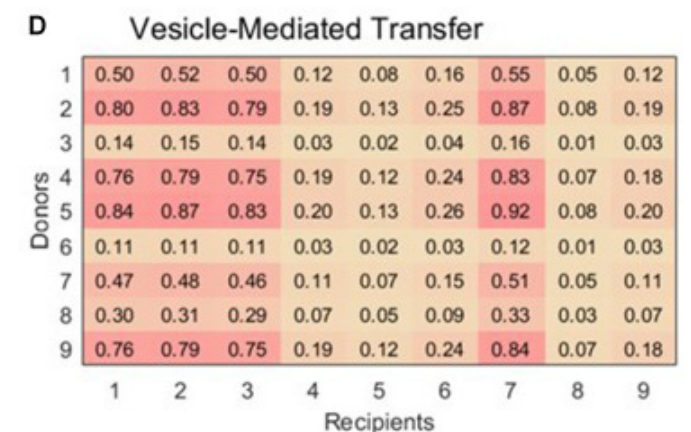
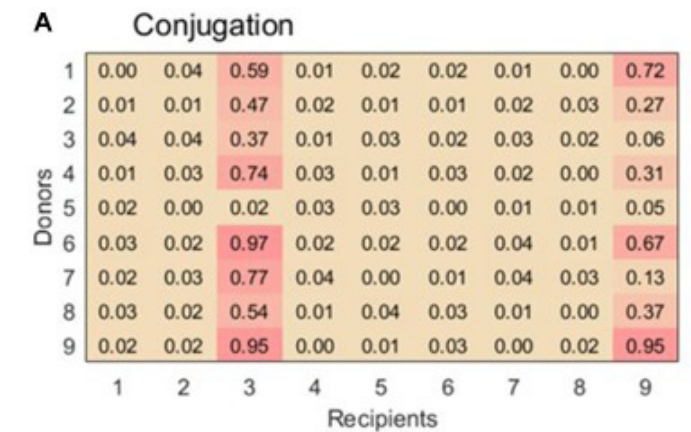
## SIMULAZIONE DI DIFFUSIONE DEGLI ARG

- modello computazionale per HGT in comunità batteriche multispecie (Nazarian, Tran e Boedicker, 2018)

Combinazioni di metodologie sperimentali e bioinformatiche contribuiscono alla scoperta di nuove vie e meccanismi HGT, oltre che al rilevamento degli ARG.

**L'approccio basato sulla coltivazione è ancora necessario per studiare le proprietà di resistenza agli antibiotici e la mobilizzazione di nuovi MGE, le cui informazioni non possono essere ottenute solo dai dati di sequenziamento.**

**Le simulazioni computazionali sono importanti per prevedere la diffusione degli ARG.**



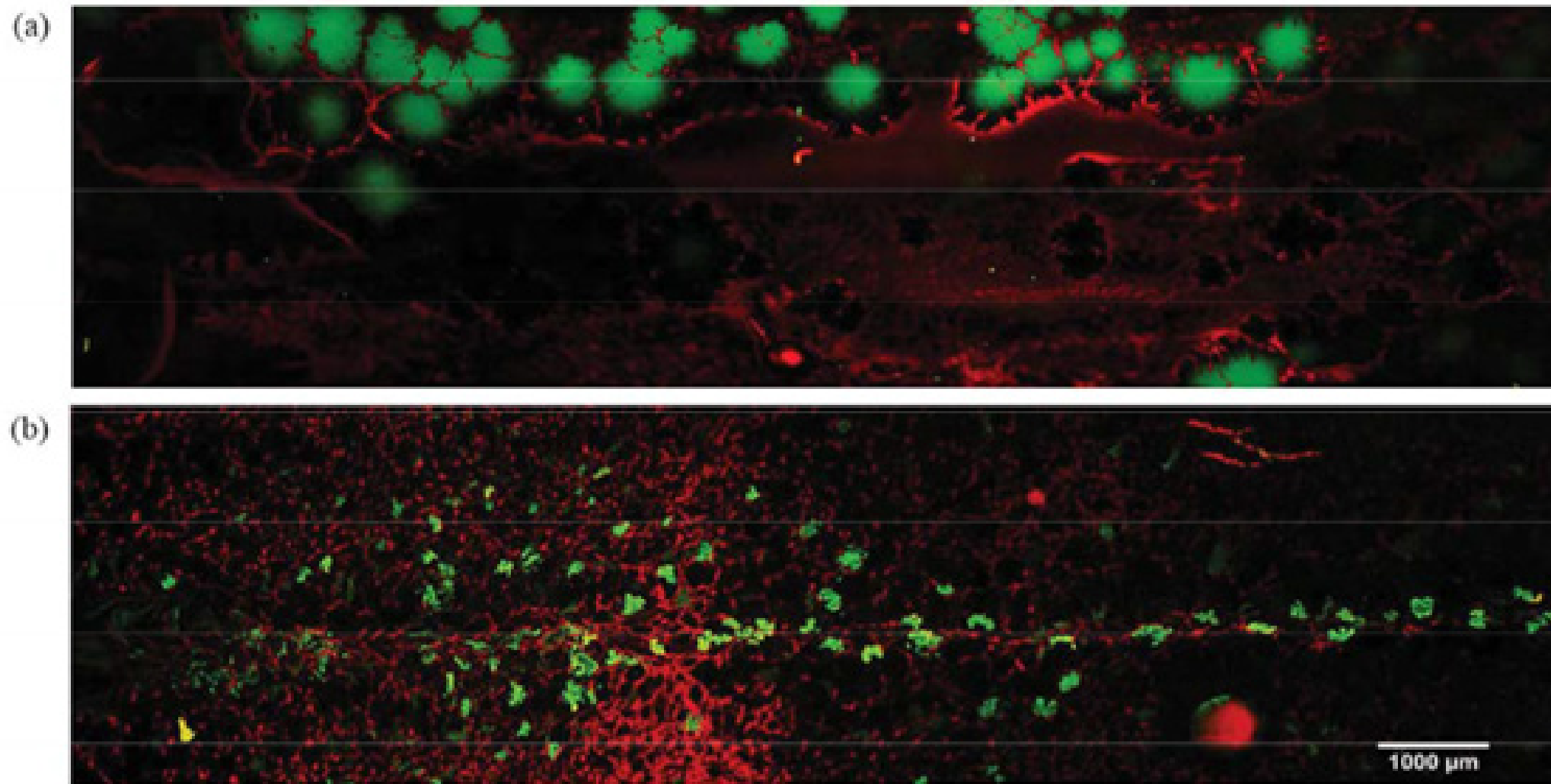


## VISUALIZZAZIONE DEL BIOFILM

- SEM e TEM
- ASEM (microscopia elettronica a scansione atmosferica)
- Sistemi di Microfluidi integrati con Microscopia Confocale e Citometria a Flusso.

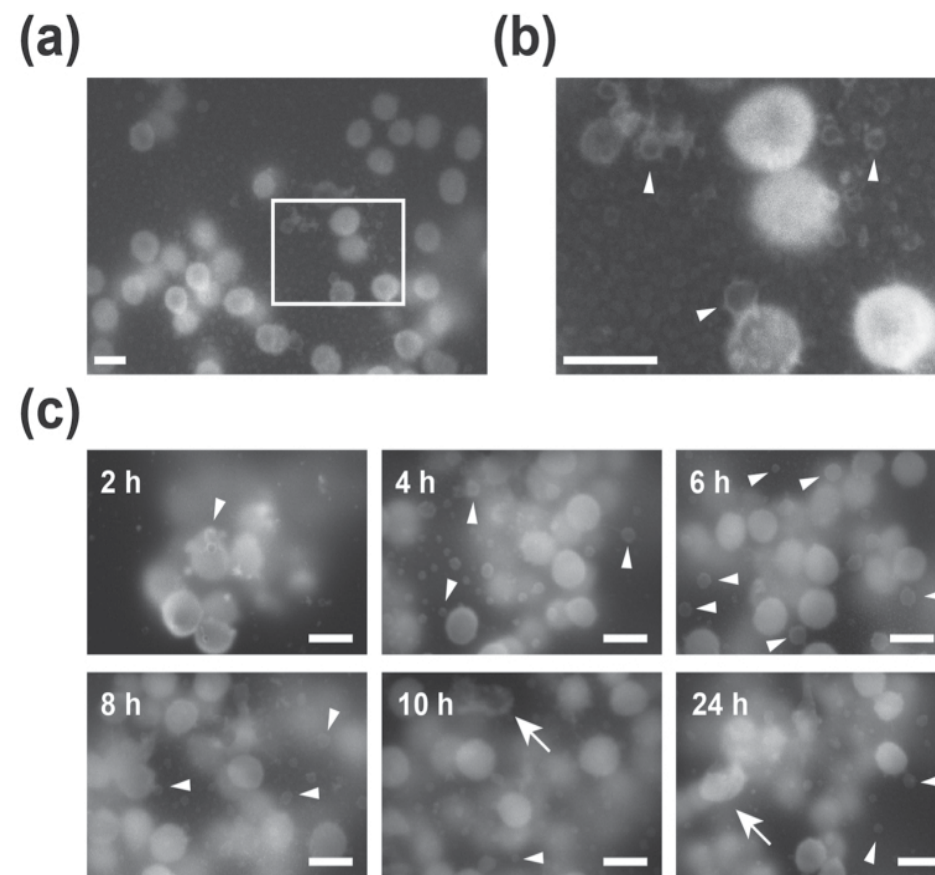
Es Li e Qiu hanno sviluppato sistemi applicabili per la determinazione dei tassi di HGT nei biofilm raccolti da vari ambienti, utilizzando plasmidi coniugativi e non coniugativi, fagi e MV come donatori.

Oltre all'osservazione in laboratorio, Grzegorzczuk et al. (2018) hanno anche sviluppato una strategia di osservazione in situ per i biofilm in ambienti marini.



## VISUALIZZAZIONE DELLE MV

- SEM e TEM
- Microscopia Confocale ad Alta Risoluzione



Sugimoto, Sci Rep 2018



## Conclusioni e Sfide Future

Le prove che l'ambiente acquatico sia un enorme serbatoio di ARG sono in aumento.


Per la valutazione del rischio dell'emergenza di ARB negli ambienti acquatici, è richiesto urgentemente lo studio dei meccanismi di trasferimento di ARG, per conoscerne velocità e pathway.

Sarà necessaria una maggiore integrazione degli approcci sperimentali e computazionali: l'analisi metagenomica degli ambienti

acquatici fornisce informazioni sullo stato attuale degli ARG e sulla diffusione degli ARB nell'ambiente, i software per il rilevamento di eventi di HGT sono utili per comprendere la storia del trasferimento di ARG. I più recenti sistemi di microfluidi combinati con microscopia confocale laser, marcatura fluorescente di batteri e citometria a flusso possono fornirci le informazioni in situ dei tassi quantitativi degli eventi di HGT in corso in biofilm vitali raccolti dagli ambienti naturali. Tale metodologia sperimentale sistematica fornirà dati accurati e quantitativi sufficienti per costruire modelli matematici affidabili e simulazioni computazionali, che ci consentiranno di prevedere la diffusione di ARG in ambienti naturali.

Gli ambienti acquatici sono ambienti molto complessi, in cui i biofilm sono il micro-hot spot più probabile di HGT di ARG e rappresentano enormi serbatoi di ARG in cui fluiscono batteri di origine clinica e terrestre e in cui prosperano diversi batteri commensali umani; questa situazione è stata descritta metaforicamente come un "bazar" nel quale gli esseri umani e gli animali sono ampiamente esposti a ARB e ARGs.

Il focus sulle MV come importanti e potenziali agenti di HGT, suscita una domanda ancora aperta molto importante e interessante e cioè se gli ARG siano scambiati attraverso le MV tra biofilm spazialmente separati in ambienti acquatici. Se ciò venisse verificato, l'oceano sarà considerato il più grande serbatoio genetico, dove gli ARG possono essere scambiati a livello globale.



**ANTIBIOTIC RESISTANCE**

**ANTIBIOTIC RESISTANCE  
EVERYWHERE**



# Bibliografia

*Abe K, Nomura N and Suzuki S Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. FEMS Microbiology Ecology, 2020*

*Dehò-Galli, Biologia dei microrganismi, terza edizione CEA*

*Dubey GP, Ben-Yehuda S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. Cell. 2011*

*Li B, Qiu Y, Zhang J et al. Real-time study of rapid spread of antibiotic resistance plasmid in biofilm using microfluidics. Environ Sci Technol. 2018*

*Michels J, Stippkugel A, Lenz M et al. Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with marine biogenic particles. Proc Royal Soc B. 2018*

*Nazarian P, Tran F, Boedicker JQ. Modeling multispecies gene flow dynamics reveals the unique roles of different horizontal gene transfer mechanisms. Front Microbiol. 2018*

*Partridge SR, Kwong SM, Firth N et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2018*

*Qiu Y, Zhang J, Li B et al. A novel microfluidic system enables visualization and analysis of antibiotic resistance gene transfer to activated sludge bacteria in biofilm. Sci Total Environ. 2018*

*Sugimoto S, Okuda K, Miyakawa R et al. Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. Sci Rep. 2016*

*Tashiro Y, Uchiyama H, Nomura N. Multifunctional membrane vesicles in Pseudomonas aeruginosa. Environ Microbiol. 2012*

*Toyofuku M, Tashiro Y, Hasegawa Y et al. Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: biology, environmental perspectives and applications. Adv Colloid Interface Sci. 2015*

*Toyofuku M, Carcamo-Oyarce G, Yamamoto T et al. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in Bacillus subtilis. Nat Commun. 2017*

*Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. Nat Rev Microbiol. 2019*



# Riassunto Esteso

L'acquisizione di geni di resistenza agli antibiotici (ARG) da parte di patogeni in ambienti naturali è destinata ad aumentare sempre di più. Come l'ambiente clinico, anche l'ambiente naturale dovrebbe essere al centro dell'attenzione mirando al controllo dei batteri resistenti agli antibiotici (ARB) e degli ARG.

Gli ambienti acquatici rappresentano enormi serbatoi di ARG in cui fluiscono batteri clinici e terrestri e in cui prosperano diversi batteri commensali umani. Gli esseri umani e gli animali sono ampiamente esposti ai batteri che possiedono ARG nell'ambiente acquatico.

I batteri sono considerati, classicamente, come organismi unicellulari a vita indipendente, ma in natura preferiscono formare comunità multicellulari altamente strutturate, i biofilm, per sopravvivere agli stress ambientali.

Si ritiene che i biofilm negli ambienti acquatici siano cruciali per il trasferimento genico orizzontale (HGT) di geni di resistenza agli antibiotici (ARG). Nel biofilm l'HGT è favorito, di conseguenza esso risulta un «hot spot» per la diffusione di ARG in ambiente acquatico.

Gli ARG possono essere diffusi tramite i meccanismi di HGT che includono:

**Coniugazione:** la coniugazione è il trasferimento di elementi coniugativi integrati e plasmidici coniugativi attraverso un apparato proteico, il pilo coniugativo. La coniugazione si verifica raramente tra cellule planctoniche mobili perché il trasferimento richiede un contatto diretto tra la cellula del donatore e quella del ricevente. Nei biofilm invece, dal momento che le cellule si trovano all'interno di una matrice e posizionate vicine tra loro per un intervallo di tempo più esteso, aumenta la velocità di coniugazione.

**Trasformazione:** il meccanismo di trasformazione prevede l'assorbimento di DNA esogeno da parte di una cellula competente, tramite l'intervento di un pilo e di un trasportatore di DNA. Il DNA esogeno viene integrato nel cromosoma batterico per ricombinazione omologa, oppure, se si tratta di un plasmide, come episoma. È esclusiva di specie con la capacità di sviluppare la competenza. Non richiede un contatto fisico tra donatore e ricevente. Le cellule competenti acquisiscono DNA libero rilasciato dalle cellule donatrici che vanno incontro a lisi. In alcune specie, si assiste nel biofilm ad un fenomeno chiamato fratricidio: le cellule competenti aumentano la produzione di enzimi e batteriocine che degradano la parete cellulare ed extracellulare, oppure uccidono le cellule vicine mediante iniezione di proteine effettrici attraverso un pilo di tipo VI, provocando la lisi delle cellule vicine e il rilascio di eDNA.

**Trasduzione:** avviene tramite batteriofagi, cioè virus che iniettano il proprio DNA e si replicano nei batteri. Oltre al DNA virale, possono inoculare nella cellula batterica ospite anche frammenti di DNA cromosomico e di plasmidi di origine batterica. In particolare, i fagi temperati tramite il processo di lisogenizzazione e la successiva formazione di particelle trasducenti possono trasferire caratteri batterici nel genoma dell'ospite che può quindi acquisire geni di resistenza. I fagi contribuiscono alla maturazione del biofilm perché promuovono la liberazione di eDNA e il distacco di piccole porzioni che andranno a colonizzare altri siti.

Più recentemente, sono stati segnalati i nanotubi e le vescicole di membrana (MV) come potenziali nuovi meccanismi di HGT. I nanotubi sono strutture extracellulari allungate tubulari che mettono in contatto due cellule adiacenti. A differenza del pilo coniugativo che ha struttura proteica, i nanotubi sono strutture membranose e permettono il passaggio non solo di DNA, ma anche di componenti citoplasmatiche, nutrienti e altre molecole.

Probabilmente, svolgono un ruolo significativo nella distribuzione dei biomateriali all'interno delle comunità batteriche. Attualmente, non ci sono ancora prove di HGT mediato da nanotubi in ambienti acquatici.

Le MV costituiscono serbatoi di DNA e hanno un ruolo nell'HGT interspecie. Sono strutture extracellulari formate da un bilayer lipidico, rilasciate dai batteri, di diametro da 20 a 400 nm. Le MV sono ubiquitarie e abbondanti in ambiente acquatico. Sono resistenti a proteasi e nucleasi e possono contenere diversi tipi di molecole, tra cui segnali di quorum sensing (QS) e DNA. I segnali di QS sono noti per regolare coniugazione, trasformazione e induzione dell'infezione fagica. Pertanto, le MV possono essere coinvolte nella regolazione dell'HGT, così come nel trasporto diretto del DNA. L'HGT mediato dalle MV in ambienti naturali deve ancora essere dimostrato.

È noto che contribuiscono allo sviluppo del biofilm perché promuovono l'adesione delle cellule alle superfici e l'aggregazione cellulare nelle prime fasi, probabilmente aumentando l'idrofobicità della superficie di adesione.

Diversi metodi vengono utilizzati per lo studio dei meccanismi di HGT e dei biofilm, in particolare per rilevare la presenza di ARG e ARB, per prevederne la diffusione, per visualizzare il biofilm e le vescicole di membrana:

- PCR quantitative tramite l'utilizzo di DNA estratto direttamente da campioni ambientali e analisi genomica dei ARB;
- sequenziatori di DNA di nuova generazione (NGS) ad alto rendimento che consentono di ottenere dati genomici multispecie. I dati vengono depositati in database pubblici;
- i software MetaCHIP e LEMON che permettono di prevedere gli eventi di HGT nelle comunità batteriche, in base a dati di metagenomica. Possono anche fornire informazioni su come gli ARG sono stati trasferiti in passato;
- saggi tramite filter mating, spesso utilizzati per verificare il trasferimento di ARG in laboratorio;
- modelli computazionali per HGT in comunità batteriche multispecie, che tengono conto del trasferimento genico mediato da MV, oltre che dai meccanismi tradizionali. Le simulazioni computazionali sono importanti per prevedere la diffusione degli ARG negli ambienti;
- microscopia elettronica a scansione atmosferica per osservare nanostrutture all'interno di biofilm in ambiente liquido;
- sistemi di microfluidi integrati con microscopia confocale e citometria a flusso, costituiscono un potente strumento per osservare le dinamiche di biofilm vitali e in via di sviluppo, in condizioni non invasive.

Combinazioni di metodologie sperimentali e bioinformatiche contribuiscono alla scoperta di nuove vie e meccanismi HGT, oltre che al rilevamento degli ARG.

L'approccio basato sulla coltivazione è ancora necessario per studiare le proprietà di resistenza agli antibiotici e la trasferibilità di nuovi MGE, che non possono essere ottenute solo dai dati di sequenziamento.

Lo scopo di questa presentazione, sviluppata sulla base dell'articolo di riferimento di Abe K, Nomura N and Suzuki S Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. (FEMS Microbiology Ecology, 2020) è quello di fornire una panoramica dell'attuale situazione dei ARG e ARB in ambiente acquatico, suggerendo l'importanza dello studio dei pathway di HGT per poter prevedere la potenziale diffusione globale di resistenze: come l'ambiente clinico, anche l'ambiente naturale dovrebbe essere al centro dell'attenzione mirando al controllo dei batteri resistenti agli antibiotici (ARB) e degli ARG.



*Grazie  
per l'attenzione*

