



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea  
Scienze Biologiche

**THE MICROBIOME AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN INTEGRATED FISHFARM WATER:  
IMPLICATIONS OF ENVIRONMENTAL PUBLIC HEALTH**

**MICROBIOMA E ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN CAMPIONI DI ACQUA DA ALLEVAMENTI  
ITTICI INTEGRATI: IMPATTO DELL'AMBIENTE SULLA SALUTE UMANA**

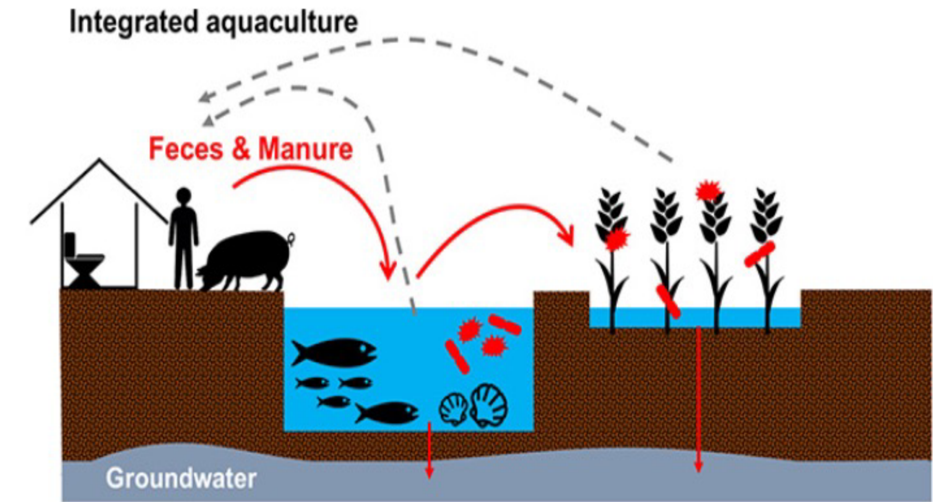
Tesi di Laurea di:  
Luigi Rinaldi

Docente Referente:  
Eleonora Giovanetti

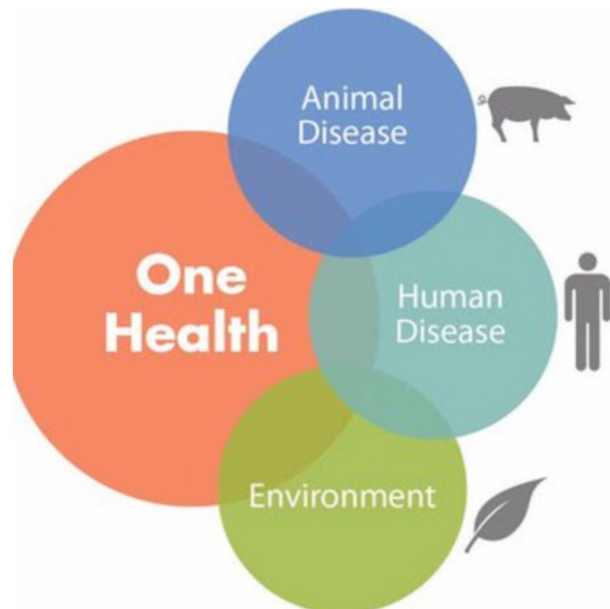
Sessione estiva  
Anno Accademico 2020/2021

# INTRODUZIONE

- In Cina l'acquacoltura è molto sviluppata e il Paese è leader mondiale nella produzione, consumazione ed esportazione di prodotti derivanti da questo settore.
- Nell'acquacoltura integrata rifiuti animali e residui vegetali sono impiegati come fonte di nutrimento.
- Potenziali rischi associati alla produzione ittica integrata riguardano lavoratori e membri della comunità a contatto con le acque delle acquaculture integrate. Tali rischi sono esacerbati dalla presenza di batteri antibiotico-resistenti (ARB).



Gary Klase, Seungjun Lee, Song Liang, Jinnam Kim, Young-Gun Zo, Jiyoung Lee, 2018  
«The microbiome and antibiotic resistance in integrated fishfarm water: Implications of environmental public health»



## OBIETTIVO

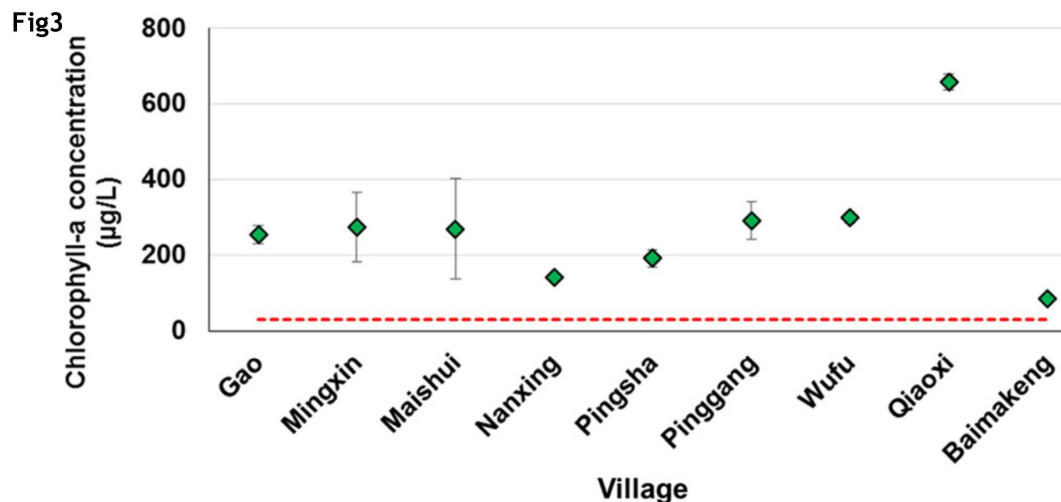
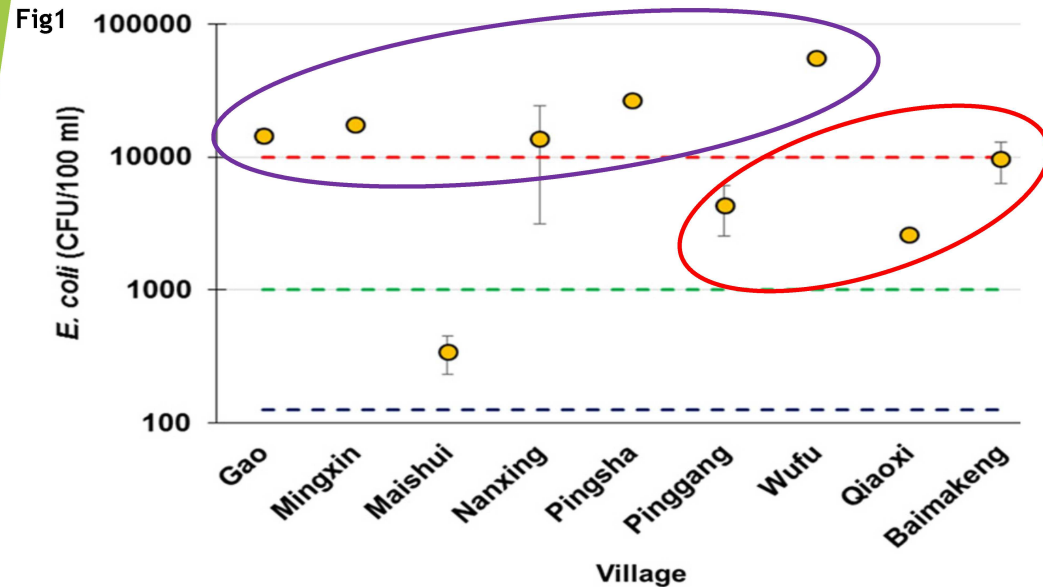
- Esaminare potenziali rischi per la salute associati alle attività di acquacoltura integrata attraverso un approccio «One Health».

# MATERIALI E METODI

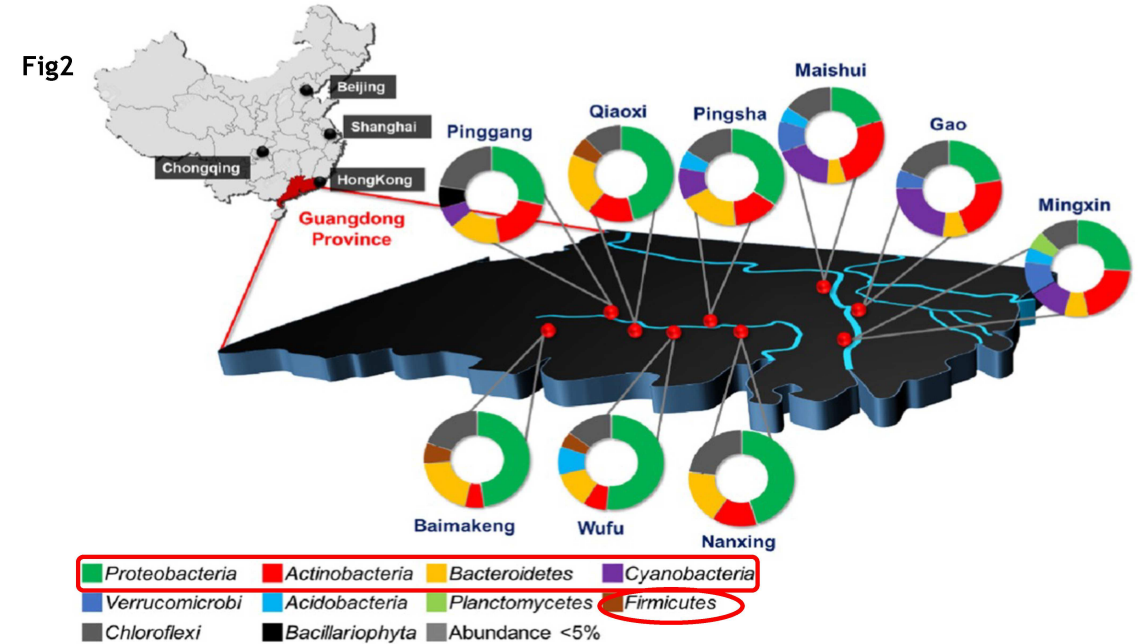
- Determinazione mediante ColiPlate dei batteri indicatori di contaminazione fecale (FIB): coliformi ed *Escherichia coli*
- qPCR:
  - stabilire l'origine dei microrganismi (*microbial source tracking*, MST): ricerca marker specifici per uomo e suino;
  - valutare la presenza di ARB: ricerca dei geni *tetQ* (resistenza alla tetraciclina), *sul1* (resistenza alle sulfonamidi) e *blaKPC* (per rilevare batteri produttori di carbapenemasi);
  - determinare la presenza di potenziali patogeni come *Salmonella* spp., *Arcobacter* spp. e *Microcystis*.
- Studio della comunità batterica attraverso l'analisi degli rRNA16S
- Determinazione della concentrazione di Clorofilla (indicatore del livello di eutrofizzazione dell'acqua).
- Analisi dei parametri fisici (Temperatura, pH, O<sub>2</sub> e profondità) e dei nutrienti (Nitrato e Fosfato).

# RISULTATI

1) FIB: *E. coli* valori compresi tra  $1.2 \times 10^2$  e  $9.3 \times 10^4$  CFU/100 ml



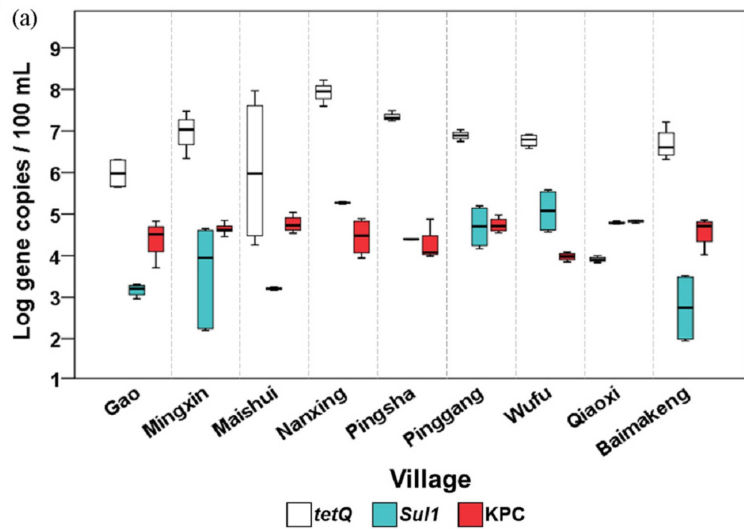
2) Comunità batteriche predominanti



3) Stato eutrofico: concentrazione media di clorofilla-*a* 273 µg/L

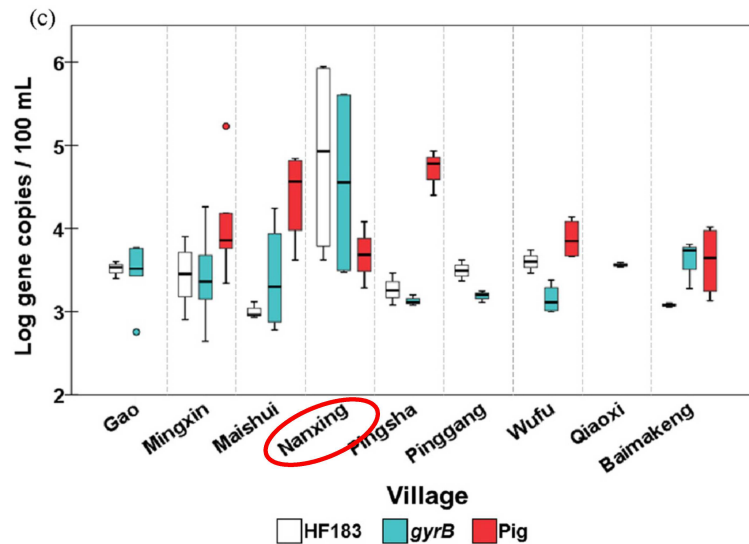
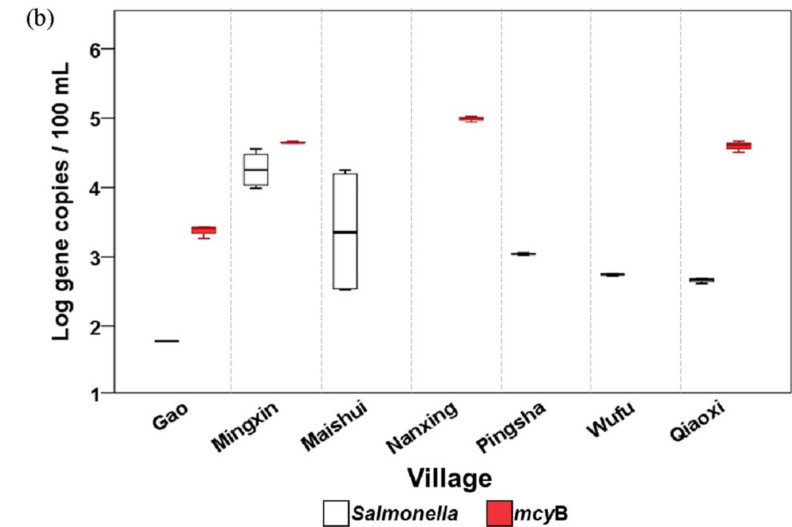
Uno stagno è considerato «altamente eutrofico» quando la concentrazione di clorofilla-*a* > 30 µg/L (in tutti gli stagni campionati questo valore è stato superato)





4) **ARB**: rilevati in tutti gli stagni.  
 Ad eccezione degli stagni del villaggio di QiaoxiLa, il determinante di resistenza *tetQ* era complessivamente prevalente rispetto a *sul1* e *blaKPC*

5) Sono stati riscontrati potenziali patogeni come *Salmonella* spp. (37% degli stagni) e *Microcystis aeruginosa* (15% degli stagni).



6) **MST**: nella maggior parte degli stagni era rilevata una contaminazione fecale di **origine umana** (56% positività per HF183, 84% positività per *gyrB*) mentre nel 41% degli stagni è stata rilevata una contaminazione di **origine suina**

# DISCUSSIONE

- Gli elevati livelli di contaminazione fecale (*E. coli*) evidenziati implicano un rischio elevato, sia per i lavoratori che per i membri della comunità, di acquisire infezioni sostenute da microrganismi eliminati con le feci.
- Le linee guida per l'acquacoltura integrata dell'OMS indicano che le concentrazioni di *E. coli* dovrebbero essere < **10.000 UFC/100 ml** (per la tutela dei consumatori) e < **1.000 UFC/100 ml** (per la sicurezza dei lavoratori). In tutti gli stagni esaminati è stato registrato un superamento dei limiti imposti dall'OMS per salvaguardare la salute dei lavoratori, il 67% dei campioni di acqua superava entrambi i valori.

- I phyla predominanti negli stagni sono:

Proteobatteri, coinvolti in vari processi biogeochimici negli ecosistemi acquatici.

Actinobatteri, in grado di biodegradare composti organici.



In acquacoltura la composizione della comunità batterica è importante. I batteri, infatti, possono causare infezioni nei pesci influenzando la produzione ittica

- Le feci dei suini venivano utilizzate direttamente negli stagni.
- Gli stagni erano spesso adiacenti a campi coltivati con conseguente deflusso di fertilizzanti vegetali



Questi fattori, aumentando le concentrazioni di nutrienti, concorrono e favoriscono il **processo di eutrofizzazione**

## Processo di eutrofizzazione

- Uno dei principali problemi di salute pubblica legati all'eutrofizzazione dell'acqua dolce è il verificarsi della fioritura di cianobatteri tossici;
- La presenza di *M. aeruginosa* nelle diverse aree di campionamento e l'elevata eutrofizzazione causano fioriture che provocano ipossia dell'acqua e la presenza di tossine epatotossiche.

Villages	Nutrients	
	NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	PO <sub>4</sub> -P (mg/L)
Gao	11.2 ± 7.0	0.6 ± 0.2
Mingxin	3.0 ± 1.8	6.5 ± 2.4
Maishui	7.7 ± 4.2	17.9 ± 6.6
Nanxing	0.5 ± 0.1	8.8 ± 0.1
Pingsha	3.7 ± 0.9	10.7 ± 2.1
Pinggang	0.1 ± 0.0	3.8 ± 1.7
Wufu	0.1 ± 0.0	5.0 ± 1.0
Qiaoxi	0.3 ± 0.1	3.7 ± 1.9
Baimakeng	8.0 ± 2.9	14.4 ± 0.3

Gary Klase, Seungjun Lee, Song Liang, Jinnam Kim, Young-Gun Zo, Jiyoung Lee, 2018 «*The microbiome and antibiotic resistance in integrated fishfarm water: Implications of environmental public health*»



<https://www.usgs.gov/media/images/microcystis-aeruginosa-bloom>

- La presenza di salmonelle impone cautele nel consumo di pesce. Lavoratori e membri della comunità, a contatto con queste acque, sono esposti a **potenziali rischi per la salute**.

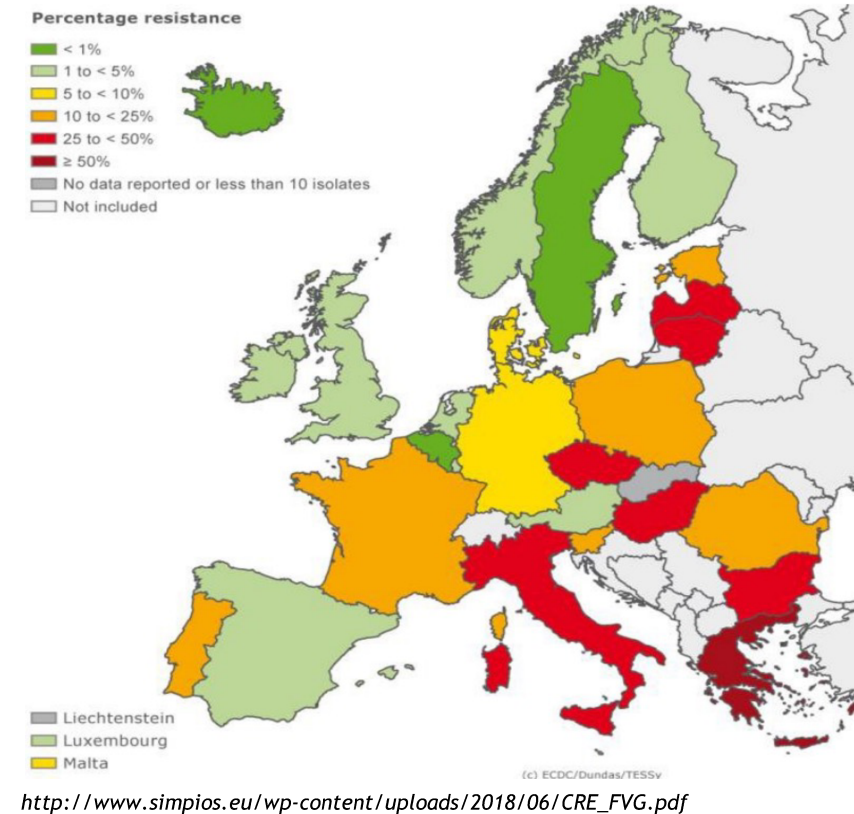
- Geni AR sono stati rilevati in tutti gli stagni: acqua e sedimenti potrebbero rappresentare un **serbatoio ambientale** di AR. ARB non patogeni isolati da alimenti possono trasferire geni di resistenza a patogeni umani.

- Da sottolineare la presenza di *Klebsiella pneumoniae* produttrice di carbapenemasi e l'incremento rilevato negli ultimi anni di *Enterobacteriaceae* che producono KPC

- Due potenziali **fonti di AR** rilevate negli stagni:

1) Impiego in acquacoltura di antibiotici a scopo preventivo ( $\beta$ -lattamici, florfenicolo, macrolidi, ossitetraciclina, sulfamidici e trimetoprim) per scongiurare lo sviluppo di focolai infettivi;

2) Profilassi antibiotica negli allevamenti animali e fertilizzazione degli stagni con feci animali (in linea con i dati MST)



# CONCLUSIONI

- Dall'insieme di questi dati emerge che, sia i lavoratori che dei membri della comunità che entrano in contatto con l'acqua di questi stagni, sono esposti a gravi rischi per la salute.
- Potenziale rischio anche per i consumatori di prodotti ittici. ARB non patogeni isolati da alimenti possono trasferire le loro resistenze a patogeni umani.
- Questo approccio sperimentale consentirà in futuro di monitorare sistemi di acquacoltura integrata in altri Paesi al fine di ottimizzare la gestione degli stagni salvaguardando la salute di lavoratori, consumatori ed ecosistemi.



# RIASSUNTO

- ▶ L'acquacoltura integrata consiste nell'allevamento di pesce utilizzando rifiuti animali e vegetali come fonte di nutrimento. Questa attività ha un grande impatto economico per milioni di persone in tutto il mondo ma, al contempo, rappresenta una minaccia emergente per la salute pubblica.
- ▶ Questo studio, attraverso un approccio «One Health», esamina i potenziali rischi per la salute legati alle attività di acquacoltura integrata.
- ▶ Sono stati raccolti campioni di acqua da 27 stagni situati nei pressi di 9 villaggi della regione di Jiangmen in Cina. L'impiego di una gamma di strumenti ha consentito lo studio di: MST, patogeni (*Salmonella* spp.), ARB (a tetraciclina, sulfamidici, carbapenemi) e composizione delle comunità batteriche. E' stata, inoltre, valutata la concentrazione di clorofilla attraverso spettrofotometria. Tutti i campioni di acqua hanno superato uno o entrambi i valori soglia indicati nelle linee guida dell'OMS per quanto concerne l'acquacoltura integrata. In considerazione dell'elevata concentrazione di clorofilla, tutti gli stagni sono risultati altamente eutrofici e pertanto ottimali per la fioritura di cianobatteri tossici. Nella maggioranza degli stagni era rilevabile una contaminazione fecale di origine umana (84%) e suina (41%). *Salmonella* spp. e microcisti da *Microcystis* sono stati rilevati rispettivamente nel 37% e nel 15% degli stagni. ARB sono risultati essere molto diffusi in tutti gli stagni. L'acqua e i sedimenti potrebbero rappresentare un importante serbatoio ambientale di AR. Proteobatteri e actinobatteri erano i principali phyla rappresentati.
- ▶ Dallo studio emergono importanti fattori di rischio per la salute legati alla pratica dell'acquacoltura integrata. Questo approccio sperimentale consentirà una migliore gestione degli allevamenti ittici nella Cina rurale, con potenziale applicabilità anche ad altri Paesi in via di sviluppo la cui economia dipendente dall'acquacoltura.