

VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DELLA FERTILIZZAZIONE CON POL-LINA DI ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE SULLE COMUNITÀ MI-CROBICHE E SU GENI DI RESISTENZA DI TERRENI AGRICOLI

Laconi A.¹, Tolosi R. ¹, Grilli G.², Trocino A.¹, Carraro L.¹, Di Cesare F.³, Cagnardi P.², Piccirillo A.¹

¹*Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università degli Studi di Padova - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD);*

²*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano;*

³*Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano.*

Summary

Antimicrobials are commonly used in conventional livestock production, and live-stock waste in the form of manure is widely applied to agricultural lands as fertilizer. This practice raises questions regarding the effects of fertilization on (i) soil mi-crobiota composition and (ii) spread of antimicrobials and antimicrobial resistance (AMR) in the environment. This study aimed at assessing the impact of poultry manure application on soil microbiome, antimicrobial concentrations and AMR gene abundance. We found the microbial community composition in manure to be differ-ent and less diverse than in soil, with manure application altering only marginally the soil microbiome. Exceptions were the phyla Firmicutes and Tenericutes, which en-riched in fertilized soil. Of the antimicrobials investigated, flumequine was the most abundant in both manure and soil, while no antimicrobials increased after manure application. AMR genes were more abundant in manure, with *ermB* and *bla*_{TEM-1} being enriched after fertilization, while *mcr-1* was significantly more abundant in the soil. Positive correlation between *oqxA* abundance and flumequine concentrations was observed, together with the co-occurrence of some AMR genes and microbial taxa (e.g. *ermB* correlated with Firmicutes and Actinobacteria). This study showed that manure application has little effect on soil microbiome but may contribute to the dissemination of specific AMR genes into the environment. Moreover, flumequine residues seem to enhance the emergence of *oqxA* in soil.

INTRODUZIONE

Il letame derivato dall'allevamento intensivo è comunemente impiegato in agricoltu-ra come fertilizzante per migliorare la qualità del suolo (Das et al., 2017) the role of different livestock composts [composted cattle manure (CCM). Tuttavia, le comunità microbiche del letame possono influenzare il microbioma del suolo, direttamente attraverso la competizione o indirettamente contribuendo alla diffusione della resi-stenza ai farmaci antimicrobici (AMR). La misura in cui il microbioma del letame influenza la comunità microbica del suolo rimane poco chiara. Infatti, sebbene alcuni studi indichino che l'applicazione del letame alteri in modo significativo il micro-bioma del suolo (Stocker et al., 2015; Zhang et al., 2020), altri hanno riportato cam-biamenti nella composizione microbica limitati a pochi taxa (Lopatto et al., 2019).

I farmaci antimicrobici sono stati ampiamente utilizzati per diversi decenni nell'allevamento intensivo, venendo eliminati come tali o come metaboliti attivi o inattivi dagli animali, mediante feci ed urine (Wei et al., 2011; Xia et al., 2019). A seguito di fertilizzazione del suolo, gli antimicrobici possono diffondersi nell'ambiente circostante, causando l'eventuale comparsa di batteri resistenti e di geni di resistenza (ARG) (Hou et al., 2015; Munk et al., 2018; Qiao et al., 2018; Rovira et al., 2019; Xia et al., 2019). La diffusione di ARG nell'ambiente rappresenta una grande preoccupazione per la salute pubblica poiché possono trasferirsi all'uomo a seguito di dispersione nei corsi d'acqua, attraverso il deflusso e il drenaggio dal suolo, o entrando nella catena alimentare (Barendonk et al., 2015; Hruby et al., 2016; Marti et al., 2014; Pruden et al., 2012). Nel presente studio, abbiamo valutato l'impatto dell'applicazione di pollina proveniente da allevamenti avicoli sulla concentrazione di antimicrobici, sulla composizione delle microbioma e sull'abbondanza dei ARG nel suolo agricolo.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato in 10 allevamenti di polli da carne situati in Lombardia (n = 8) e Veneto (n = 2) tra ottobre 2017 e marzo 2019. In ogni azienda sono stati raccolti 3 campioni : 1) pollina (1 campione), 2) suolo (1 campione prima della fertilizzazione e 1 campione un mese circa dopo la fertilizzazione), per un totale di 30 campioni. I campioni di pollina sono stati raccolti secondo quanto descritto da Kumari et al. (2015), mentre i campioni di terreno sono stati raccolti seguendo il protocollo di Dong et al. (2014).

Quantificazione degli antimicrobici

Il metodo analitico è stato messo a punto per rilevare e quantificare 14 diversi antimicrobici: amoxicillina, ampicillina, cefquinome, ceftiofur, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacin, flumechina, marbofloxacina, eritromicina, spiramicina, tilmicosina, tilososina e colistina. La purificazione dei campioni è stata eseguita come descritto in precedenza (Chiesa et al., 2018). L'analisi in spettrometria di massa (MS) è stata eseguita su un TSQ Quantum MS a triplo quadrupolo (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) dotato di un'interfaccia elettrospray (ESI) impostata nella modalità di ionizzazione elettrospray positiva (ESI+) (Chiesa et al., 2018) ed il metodo è stato validato secondo i criteri della Decisione 2002/657/CE (European commission, 2002). Per ogni analita, le prestazioni del metodo sono state valutate mediante la determinazione del tempo di ritenzione (RT). I rapporti degli ioni di transizione, il recupero, l'accuratezza (esattezza), la precisione (espressa come ripetibilità intra- e inter-giornaliera), la linearità, nonché il limite di decisione ($CC\alpha$) e la capacità di rilevamento ($CC\beta$) sono stati calcolati come descritto nel documento SANCO / 2004/2726 rev. 4 (European Union, 2008).

Estrazione degli acidi nucleici

Venticinque grammi di campione (pollina o terreno) sono stati posti in una sacca filtrante sterile (dimensione dei pori di 280 μ m), a cui sono stati aggiunti 25 ml di PBS e miscelati a mano per 1 min. Il liquido filtrato è stato centrifugato a 4,000 rpm per 10 min a 4 °C; il DNA è stato estratto da 250 mg del pellet risultante, utilizzando il kit DNeasyPowerSoil (Qiagen, Hilden, Germania) seguendo le istruzioni del produttore.

La qualità e la quantità del DNA sono state valutate utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis NanoDropND-1000 (NanodropTechnologies, Wilmington, DE, Stati Uniti).

Amplificazione, sequenziamento ed analisi delle comunità microbiche

Per valutare le differenze nelle comunità batteriche tra pollina, suoli fertilizzati e non, le regioni V3-V4 del gene ribosomiale 16S sono state amplificate utilizzando l'enzima Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) ed i primer 341F / R806 (Takahashi et al., 2014) modificati con *overhangs* per aggiungere gli adattatori per gli indici. I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit SPRIselect (Beckman Coulter, Brea, CA) e i codici a barre specifici sono stati introdotti tramite una seconda PCR (Milan et al., 2018). A seguito di uno *step* di purificazione, le librerie sono state quantificate mediante Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, Monza, Italia) e poolate. La concentrazione e l'integrità del DNA nel pool sono state valutate tramite Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Stati Uniti), quindi sequenziate utilizzando la piattaforma MiSeq Illumina (San Diego, California, USA) che genera sequenze *paired-end* da 2×300 bp. Il pacchetto DADA2 all'interno del software *Quantitative Insights into Microbial Ecology 2* (QIIME2 versione 2019.4) è stato utilizzato per l'analisi dei dati dell'rRNA 16S (Bolyen et al., 2019; Callahan et al., 2016), mentre il *software* Calypso (<http://cgenome.net/wiki/index.php/Calypso>) è stato utilizzato per la caratterizzazione delle comunità microbiche e la α - e β -diversity (Zakrzewski et al., 2017). La composizione delle comunità microbiche è stata visualizzata utilizzando *heatmap* con il *software* *pHeatmap* v. 1.0.12 in R v. 3.6.3 (<https://www.r-project.org/>). Per quantificare la diversità del microbioma all'interno di ciascuna tipologia di campione (α -diversity), sono stati utilizzati l'indice di Shannon ed il metodo Chao1. Per valutare le differenze complessive nella composizione delle comunità microbiche delle 3 tipologie di campione (β -diversity) è stata effettuata l'analisi della varianza multivariabile permutazionale (PERMANOVA), mentre per la visualizzazione sono stati utilizzati i grafici dell'analisi delle coordinate principali (PCoA) e il ridimensionamento multidimensionale non metrico (NMDS).

Analisi dei geni di resistenza agli antimicrobici mediante PCR quantitativa (qPCR)

Per rilevare la presenza e l'abbondanza relativa di 20 geni di resistenza sono stati utilizzati saggi di qPCR gene-specifici. Gli ARG analizzati erano i seguenti: *ermA*, *ermB*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M-1like}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM-2}* and *bla_{NDM}*. Tutti i saggi sono stati eseguiti in un volume finale di 10 μ l utilizzando il kit PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) con concentrazione ottimale di ciascun *primer* (600 / 600nM), la piattaforma LightCycler®480 Roche (Roche, Basilea, Svizzera) ed applicando il seguente ciclo di amplificazione: incubazione iniziale a 50 °C per 2 min, seguita da 2 min a 95 °C e da 45 cicli a 95 °C per 10 sec e 50-60 °C per 40 sec. Le curve di *melting* (tra 40 ° e 95 ° C) sono state determinate aggiungendo una fase di dissociazione dopo l'ultimo ciclo di amplificazione a una velocità di transizione della temperatura di 4,4 °C / sec. I *primer* sono riportati in tabella 1. L'abbondanza assoluta dei geni di resistenza è stata calcolata sulla base di curve *standard* ottenute utilizzando quantità note di DNA *target*. Tuttavia, l'abbondanza assoluta in un dato campione non è un valore significativo, poiché è proporzionale al DNA totale presente nel campione; quindi, l'abbondanza relativa degli ARG è stata calcolata normalizzando il numero di

copie degli ARG sul numero di copie del gene 16S rRNA.

Analisi statistica

Le differenze nella prevalenza di ARG (presenza / assenza) tra i tipi di campioni (pollina, terreno prima e un mese dopo la fertilizzazione) sono state valutate utilizzando modelli lineari generalizzati (GLM), mentre le differenze nell'abbondanza dei geni sono state confrontate utilizzando il test di Kruskal-Wallis con il test di Dunn per confronti multipli. Le differenze nei residui di antimicrobici rispetto ai tipi di campioni sono state testate utilizzando la regressione di Tobit sulle concentrazioni di residui trasformate in log. Per valutare l'associazione tra l'abbondanza relativa dei ARG con la concentrazione di residui di antimicrobici e con l'abbondanza relativa di taxa microbici a livello di phylum è stata utilizzata l'analisi di correlazione di Spearman. L'analisi statistica e la visualizzazione dei dati sono state eseguite in R (versione 3.6.3) (<https://www.r-project.org/>).

RISULTATI

Dei 30 campioni analizzati, 16 sono risultati positivi ad almeno un antimicrobico, mentre dei 14 antimicrobici ricercati solo 5 sono stati identificati in almeno un campione. L'antimicrobico caratterizzato dalla prevalenza maggiore è risultato essere la flumechina (16/30; 53,33% sul totale dei campioni), seguita da enrofloxacin (3/30; 10%), tilosina (2/30; 6,67%), ampicillina e ciprofloxacina (1/30; 3,33%). Flumechina ed enrofloxacin sono state identificate sia nella pollina che nel terreno, mentre i restanti farmaci antimicrobici sono stati riscontrati solo nella pollina. La concentrazione di antimicrobici era compresa tra valori al di sotto del limite di decisione ($CC\alpha$) e 379,29 ng / g (flumechina). La concentrazione media di flumechina nella pollina era di 22,34 ng / g, mentre nel suolo prima e dopo la fertilizzazione era rispettivamente di 51,72 ng / g e 53,46 ng / g e la differenza tra le diverse tipologie di campione non era significativa ($p > 0.05$). Utilizzando il sequenziamento del gene 16S rRNA, è stata caratterizzata la struttura delle comunità microbiche dei campioni. A livello tassonomico di phylum, membri dei phyla Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, dominavano la composizione del microbioma della pollina; mentre i primi erano dominanti in entrambe le tipologie di terreno, si osservava un aumento significativo ($p < 0.05$) di batteri appartenenti al phylum Firmicutes nel terreno dopo la fertilizzazione. Diversi phyla (Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimatodes, Patescibacteria e Chloroflexi) erano più abbondanti nel terreno. A conferma della netta separazione tra le comunità microbiche di suolo e pollina, la *heatmap* prodotta a livello di phylum mostrava la presenza di due *cluster* distinti, contenenti rispettivamente la maggioranza dei campioni di terreno e tutti i campioni di pollina (Figura 1). Oltre al phylum Firmicutes, solo per Tenericutes si osservava un aumento significativo ($p < 0.05$) dell'abbondanza nel suolo a seguito di fertilizzazione. Entrambe le misurazioni (indice di Shannon e Chao1) hanno mostrato una α -diversity significativamente ($p < 0.05$) inferiore nei campioni di pollina rispetto ai campioni di terreno, sia prima che dopo la fertilizzazione (Figura 2A). Al contrario, l' α -diversity era simile tra i campioni di suolo prima e dopo l'applicazione della pollina (Figura 2B). L'analisi della β -diversity ha evidenziato come la comunità microbica nella pollina era significativamente diversa ($p < 0.001$) da quella del suolo prima e dopo la fertilizzazione, mentre non vi era alcuna differenza significativa tra terreno fertilizzato e non fertilizzato, dato supportato dai grafici PCoA e NMDS (Figura 3A, B).

Dei 20 geni di resistenza analizzati, 16 sono stati identificati in almeno un campione, con l'eccezione di *qnrA*, *mcr-2*, *mcr-4* e *bla_{NDM}*. Considerando i 30 campioni analizzati, *ermB* (93,33%), *bla_{TEM-1}* e *bla_{CMY-2}* (83,33%) erano gli ARG più diffusi, seguiti da *ermA* (73,33%), mentre la prevalenza degli altri geni era più bassa e variava dal 33,33% (*bla_{CTX-M-1/like}*) al 3,33% (*oqxB*, *bla_{VIM-2}* e *mcr-5*). *OqxB*, *bla_{VIM-2}* e *mcr-2* sono stati riscontrati solo nel suolo, mentre *mcr-5* era presente unicamente nella pollina. Per il solo gene *bla_{SHV}* è stato osservato un aumento significativo ($p < 0.05$) del numero di campioni di terreno positivi dopo la fertilizzazione. Considerando l'abbondanza relativa complessiva dei geni di resistenza nelle 3 tipologie di campione, i campioni di terreno prima dell'applicazione della pollina presentavano un'abbondanza inferiore rispetto al suolo dopo la fertilizzazione; tale incremento sembra essere dovuto all'applicazione della pollina, in quanto in questa è stata rilevata l'abbondanza maggiore di geni di resistenza (Figura 4A). Dei 20 geni presi in considerazione, la maggior parte presentava un'abbondanza relativa simile nelle diverse tipologie di campione; tuttavia *ermB* e *bla_{TEM-1}* non solo erano significativamente più abbondanti nella pollina rispetto al suolo prima ($p < 0.01$) e dopo ($p < 0.05$) la fertilizzazione, ma la loro abbondanza relativa aumentava a seguito della fertilizzazione ($p < 0.05$). Inoltre *mcr-1* era significativamente più abbondante sia nel suolo che nella pollina ($p < 0.05$). Sono state individuate diverse correlazioni positive tra ARG e specifici phyla. In dettaglio, sono state individuate correlazioni positive tra *ermA* e Actinobacteria (Spearman $r = 0.453$, $p < 0.05$), *ermB* e Actinobacteria (Spearman $r = 0.439$, $p < 0.05$) e Firmicutes (Spearman $r = 0.548$, $p < 0.01$), *oqxA* e Hydrogenedentes (Spearman $r = 0.4282$, $p < 0.05$), *qnrS* e Proteobacteria (Spearman $r = 0.454$, $p < 0.05$) e *bla_{TEM-1}* e Tenericutes (Spearman $r = 0.449$, $p < 0.05$). L'analisi di correlazione tra la concentrazione di antimicrobici e l'abbondanza relativa di ARG è stata eseguita considerando solo la flumechina, poiché il basso numero di osservazioni per i rimanenti antimicrobici ha reso impossibile l'analisi. L'analisi ha rivelato una correlazione positiva tra la concentrazione di flumechina e l'abbondanza di *oqxA* (Spearman $r = 0,380$ $p = 0.05$), mentre non è stata osservata alcuna correlazione né con gli altri geni che conferiscono resistenza ai (fluoro)chinoloni, né con altri geni di resistenza.

DISCUSSIONE

Nello studio è stata riscontrata una percentuale di campioni positivi a farmaci antimicrobici pari al 53,33%, e solo 5 dei 14 antimicrobici ricercati è stato identificato. Sebbene la flumechina sia un (fluoro)chinolone di vecchia generazione è stata la molecola più rilevata, in particolare nel suolo. Ciò è in accordo con la sua capacità di persistere a lungo nel letame, dove può rimanere fino ad un anno (Berendsen et al., 2018). La composizione microbica, sia per i campioni di pollina che di suolo, è in accordo con studi precedenti; i phyla più abbondanti identificati sono quelli tipici del letame e dei microbiomi del suolo e si conferma che il microbioma della pollina è meno diversificato rispetto a quello del suolo (Chen et al., 2007; Fierer, 2017; Hamm et al., 2016; Looft et al., 2012). In accordo con osservazioni precedenti (Riber et al., 2014; Xie et al., 2018), l'applicazione della pollina ha mostrato un'influenza limitata sulla comunità microbica del suolo e non ha aumentato la sua diversità, ma piuttosto ha causato cambiamenti significativi solo in alcuni phyla. Firmicutes, che rappresenta il phylum più abbondante nella pollina, è stato arricchito nel suolo dopo la fertilizzazione come precedentemente riportato (Rieke et al., 2018). Il numero più alto di copie totali di

ARG è stato rilevato nella pollina e un aumento dell'abbondanza totale è stato osservato nel terreno dopo la fertilizzazione, in accordo con studi precedenti (Marti et al., 2014; Xia et al., 2019; Xiong et al., 2015; Zhao et al., 2017). A dispetto di un aumento globale nell'abbondanza di geni di resistenza, solo i geni *ermB* e *bla*_{TEM-1} hanno mostrato un significativo aumento nel numero di copie nel terreno dopo la fertilizzazione. In precedenza è stato osservato come entrambi questi geni siano in grado di persistere a lungo nel suolo dopo la fertilizzazione (Graham et al., 2016; Lopatto et al., 2019). L'applicazione del letame è stata storicamente riconosciuta come la principale fonte di diffusione nell'ambiente dei geni *mcr*, che conferiscono resistenza alla colistina, un antimicrobico di importanza critica e di ultima scelta contro le infezioni umane causate da batteri Gram-negativi multi-resistenti (Xia et al., 2019). Tuttavia, nessuno dei tre geni *mcr* identificati risulta più abbondante nel terreno dopo la fertilizzazione e il gene *mcr-1* non è stato rilevato nella pollina, suggerendo che l'applicazione di quest'ultima potrebbe non essere una delle cause principali della loro diffusione nell'ambiente. Nonostante la bassa prevalenza e nonostante non si osservi un arricchimento dopo la fertilizzazione, la presenza sia nel letame che nel suolo del gene *bla*_{OXA-48} in grado di conferire resistenza a carbapenemi, è di preoccupazione per la salute pubblica a causa dell'importanza clinica di questi farmaci come trattamento di ultima scelta in medicina umana (Nordmann et al., 2011). L'aumento della concentrazione di flumechina è stato correlato a un aumento dell'abbondanza relativa del gene *oqxA* che conferisce resistenza ai (fluoro)chinoloni, suggerendo che essa potrebbe aumentare l'accumulo di questo gene nel suolo dopo la fertilizzazione o rallentare la dispersione, come precedentemente riportato per altri (fluoro)chinoloni (Xiong et al., 2015). Anche questo dato rappresenta una preoccupazione per la salute pubblica e dovrebbe portare a riconsiderare l'uso della flumechina negli animali; infatti, *oqxA* conferisce resistenza non solo alla flumechina, che è un (fluoro)chinolone di prima generazione con uno spettro di attività limitato (Daly & Silverstein, 2009), ma anche ad altri (fluoro)chinoloni (ad esempio ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e acido nalidixico) ampiamente usati per trattare le infezioni batteriche umane (Jacoby et al., 2014; Kim et al., 2009). Infine, è interessante notare come i geni *ermB* e *bla*_{TEM-1}, di cui si osserva un aumento del numero di copie nel suolo dopo la fertilizzazione, presentino correlazioni positive rispettivamente con i phyla Firmicutes e Tenericutes, a loro volta arricchiti a seguito dell'applicazione della pollina, suggerendo che l'aumento dell'abbondanza di questi geni nel suolo possa essere dovuta alla proliferazione di tali phyla, piuttosto che a trasferimento genico orizzontale.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha dimostrato che la maggior parte dei batteri derivanti dalla pollina non sopravvivono a lungo nel suolo e l'applicazione di questa non influisce drasticamente sul suo microbioma, poiché a 30 giorni dalla fertilizzazione solo due phyla (Firmicutes e Tenericutes) sono stati significativamente arricchiti. A fronte di un aumento globale del numero di geni di resistenza a seguito della fertilizzazione, l'abbondanza relativa di solo due geni (*ermB* e *bla*_{TEM-1}) è aumentata significativamente e tali geni sono positivamente correlati agli unici due phyla arricchiti dopo l'applicazione della pollina. Infine, la flumechina sembra esercitare una pressione selettiva per l'accumulo di *oqxA* nel terreno fertilizzato, suggerendo che il suo uso in campo veterinario debba essere riconsiderato.

Tabella 1. Elenco dei *primer* utilizzati nei saggi qPCR per il rilievo dei geni di resistenza selezionati.

Name	Sequence (5'-->3')	Annealing temperature	Target gene
mcr1-qf	AAAGACGCGGTACAAGCAAC	60°C	<i>mcr-1</i>
mcr1-qr	GCTGAACATACACGGCACAG		
mcr2-qf	CGACCAAGCCGAGTCTAAGG	60°C	<i>mcr-2</i>
mcr2-qr	CAACTGCGACCAACACACTT		
mcr3-qf	ACCTCCAGCGTGAGATTGTTCCA	60°C	<i>mcr-3</i>
mcr3-qr	GCGGTTTCACCAACGACCAGAA		
mcr4-qf	AGAATGCCAGTCGTAACCCG	60°C	<i>mcr-4</i>
mcr4-qr	GCGAGGATCATAGTCTGCCC		
mer5-qf	CTGTGGCCAGTCATGGATGT	60°C	<i>mcr-5</i>
mer5-qr	CGAATGCCCGAGATGACGTA		
ermAF	CCTTCTCAACGATAAGATAGC	56°C	<i>ermA</i>
ermAR	ATGGAGGCTTATGTCAAGTG		
ermB1	CCGAACACTAGGGTTGCTC	56°C	<i>ermB</i>
ermB2	ATCTGGAACATCTGTGGTATG		
blaTEM1F	CATTTTCGTGTCGCCCTTAT	56°C	<i>bla_{TEM-1}</i>
blaTEM1R	GGCGGAAAACCTCTCAAGGAT		
blaSHVF	CGTGTCCCATGATGACACCTTT	60°C	<i>bla_{SHV}</i>
blaSHVR	TCCTGTGGCGATAGTGGATCTTT		
RTCTX-M-F	CTATGGCACCACCAACGATA	58°C	<i>bla_{CTX-M-1}</i>
RTCTX-M-R	ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT		
FW3_CMY-2_Lahey	AGACGTTTAACGGCGTGTTG	58°C	<i>bla_{CMY-2}</i>
RV4_CMY-2_Lahey	TAAGTGCAGCAGGCGGATAC		
blaOXA1F	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	56°C	<i>bla_{OXA-1}</i>
blaOXA1R	CGCATCAAATGCCATAAGTG		
OXA-rtF	AGGCACGTATGAGCAAGATG	56°C	<i>bla_{OXA-48}</i>
OXA-rtR	TGGCTTGTGGACAATACGC		
VIM-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	58	<i>bla_{VIM-2}</i>
VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG		
Ndm-rtF	GATTGCGACTTATGCCAATG	56°C	<i>bla_{NDM}</i>
Ndm-rtR	TCGATCCCAACGGTGATATT		
qnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	56°C	<i>qnrA</i>
qnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
qnrBF	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	56°C	<i>qnrB</i>
qnrBF	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
qnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	60°C	<i>qnrS</i>
qnrSm-F	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
oqxAF	CTCGGCGCGATGATGCT	60°C	<i>oqxA</i>
oqxAR	CCACTCTTACGGGAGACGA		
oqxBKF	TCCTGATCTCCATTAACGCCCA	60°C	<i>oqxB</i>
oqxBKR	ACCGGAACCCATCTCGATGC		
16S-qF	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	60°C	<i>16S</i>
16S-qR	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		

Figura 1. Heatmap riportante la composizione della comunità microbica dei campioni di pollina e suolo a livello di phylum

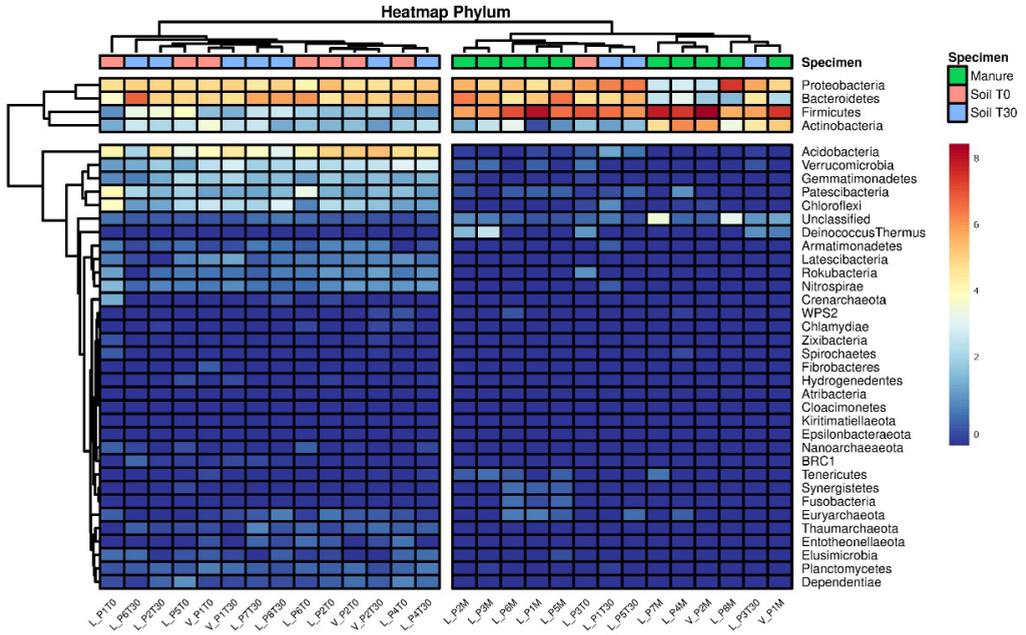


Figura 2. α -diversity dei campioni di pollina e suolo calcolate con i metodi dell'indice di Shannon e Chao1.

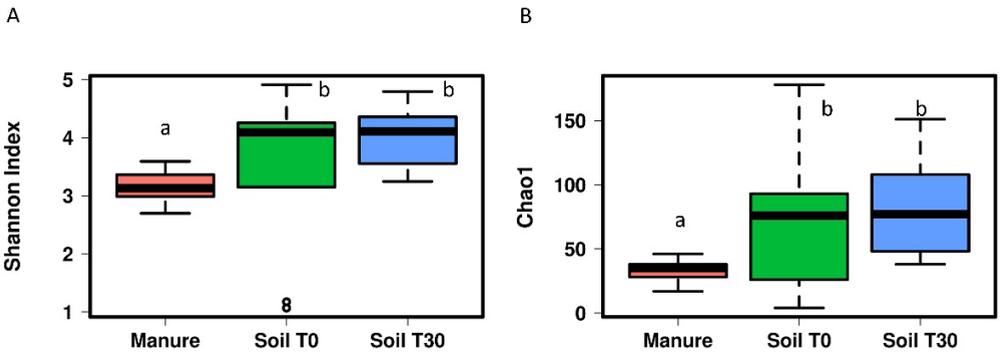


Figura 3. β -diversity dei campioni di pollina e suolo.

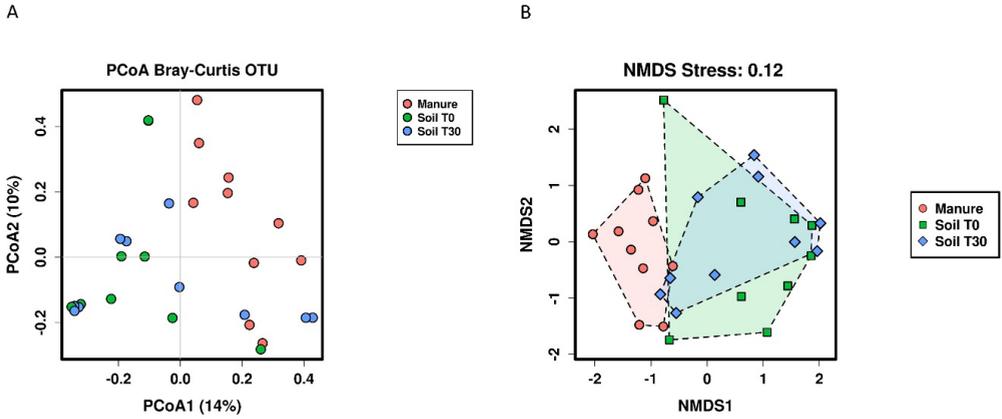
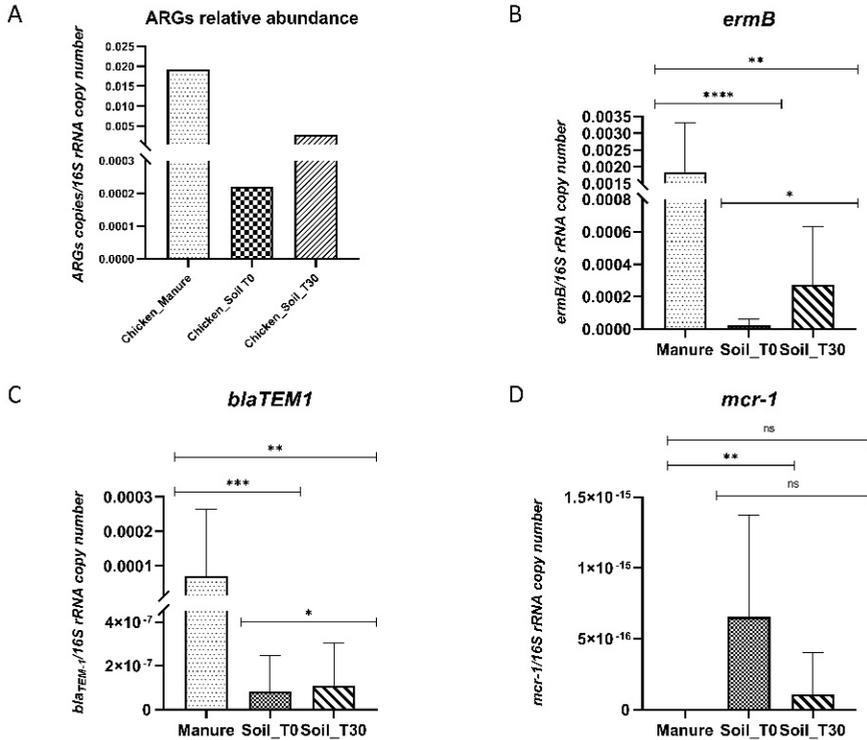


Figura 4. Abbondanza relativa di ARG rispetto al numero di copie di 16S rRNA in campioni di pollina e suolo. $p < 0.05$ mostrato come *, $p < 0.01$ come **, $p < 0.001$ come *** e $p < 0.0001$ come ****. Le differenze non significative sono indicate dai ns.



BIBLIOGRAFIA

1. Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
2. Berendsen, B. J. A., Lahr, J., Nibbeling, C., Jansen, L. J. M., Bongers, I. E. A., Wipfler, E. L., & van de Schans, M. G. M. (2018). The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere*, *204*, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.042>
3. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
4. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
5. Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(14), 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>
6. Chiesa, L. M., Nobile, M., Malandra, R., Panseri, S., & Arioli, F. (2018). Occurrence of antibiotics in mussels and clams from various FAO areas. *Food Chemistry*, *240*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.072>
7. Daly, M. L., & Silverstein, D. C. (2009). Chapter 197 - Fluoroquinolones. In *Small Animal Critical Care Medicine* (pp. 835–839). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2591-7.10197-3>
8. Das, S., Jeong, S. T., Das, S., & Kim, P. J. (2017). Composted cattle manure increases microbial activity and soil fertility more than composted swine manure in a submerged rice paddy. *Frontiers in Microbiology*, *8*(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01702>
9. Dong, W. Y., Zhang, X. Y., Dai, X. Q., Fu, X. L., Yang, F. T., Liu, X. Y., Sun, X. M., Wen, X. F., & Schaeffer, S. (2014). Changes in soil microbial community composition in response to fertilization of paddy soils in subtropical China. *Applied Soil Ecology*, *84*, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.06.007>
10. European commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union*.
11. European Union. (2008). *European Commission, Health and Consumer Protection, Directorate General, Directorate E, Safety of the Food Chain, Document SANCO/2004/2726-revision 4, December 2008, Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC* (Issue December).

12. Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(10), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
13. Graham, D. W., Knapp, C. W., Christensen, B. T., McCluskey, S., & Dolfing, J. (2016). Appearance of β -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20 th Century. *Scientific Reports*, *6*(February), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep21550>
14. Hamm, A. C., Tenuta, M., Krause, D. O., Ominski, K. H., Tkachuk, V. L., & Flaten, D. N. (2016). Bacterial communities of an agricultural soil amended with solid pig and dairy manures, and urea fertilizer. *Applied Soil Ecology*, *103*, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.015>
15. Hou, J., Wan, W., Mao, D., Wang, C., Mu, Q., Qin, S., & Luo, Y. (2015). Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(6), 4545–4554. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3632-y>
16. Hruby, C. E., Soupir, M. L., Moorman, T. B., Shelley, M., & Kanwar, R. S. (2016). Effects of tillage and poultry manure application rates on Salmonella and fecal indicator bacteria concentrations in tiles draining Des Moines Lobe soils. *Journal of Environmental Management*, *171*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.01.040>
17. Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*, *2*(5), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006–2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>
18. Kim, B. H., Wang, M., Chi, H. P., Kim, E. C., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2009). oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(8), 3582–3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08>
19. Kumari, P., Choi, H. L., & Sudiarto, S. I. A. (2015). Assessment of bacterial community assembly patterns and processes in pig manure slurry. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139437>
20. Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., & Stanton, T. B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(5), 1691–1696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109>
21. Lopatto, E., Choi, J., Colina, A., Ma, L., Howe, A., & Hinsla-Leasure, S. (2019). Characterizing the soil microbiome and quantifying antibiotic resistance gene dynamics in agricultural soil following swine CAFO manure application. *Plos One*, *14*(8), e0220770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220770>
22. Marti, R., Tien, Y. C., Murray, R., Scott, A., Sabourin, L., & Topp, E. (2014). Safely coupling livestock and crop production systems: How rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(10), 3258–3265. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-14>
23. 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(July 2017), 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.019>
24. Munk, P., Knudsen, B. E., Lukjacenko, O., Duarte, A. S. R., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Smit, L. A. M., Schmitt, H., Garcia, A. D., Hansen, R. B., Petersen, T. N., Bossers, A., Ruppé, E., Graveland, H., van Essen, A., Gonzalez-Zorn, B., Moyano, G., Sanders, P., Chauvin, C., ... Aarestrup, F. M. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microbiology*, 3(8), 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9>
 25. Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
 26. Pruden, A., Arabi, M., & Storteboom, H. N. (2012). Correlation Between Upstream Human Activities and Riverine Antibiotic Resistance Genes. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 11541–11549. <https://doi.org/10.1021/es302657r>
 27. Qiao, M., Ying, G. G., Singer, A. C., & Zhu, Y. G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, 110(July 2017), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.016>
 28. Riber, L., Poulsen, P. H. B., Al-Soud, W. A., Skov Hansen, L. B., Bergmark, L., Brejnrod, A., Norman, A., Hansen, L. H., Magid, J., & Sørensen, S. J. (2014). Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12403>
 29. Rieke, E. L., Soupir, M. L., Moorman, T. B., Yang, F., & Howe, A. C. (2018). Temporal Dynamics of Bacterial Communities in Soil and Leachate Water After Swine Manure Application. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03197>
 30. Rovira, P., McAllister, T., Lakin, S. M., Cook, S. R., Doster, E., Noyes, N. R., Weinroth, M. D., Yang, X., Parker, J. K., Boucher, C., Booker, C. W., Woerner, D. R., Belk, K. E., & Morley, P. S. (2019). Characterization of the Microbial Resistome in Conventional and “Raised Without Antibiotics” Beef and Dairy Production Systems. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01980>
 31. Stocker, M. D., Pachepsky, Y. A., Hill, R. L., & Shelton, D. R. (2015). Depth-dependent survival of *Escherichia coli* and enterococci in soil after manure application and simulated rainfall. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4801–4808. <https://doi.org/10.1128/AEM.00705-15>
 32. Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
 33. Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., & Wang, R. (2011). Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere*, 82(10), 1408–1414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.044>

chemosphere.2010.11.067

34. Xia, X., Wang, Z., Fu, Y., Du, X. dang, Gao, B., Zhou, Y., He, J., Wang, Y., Shen, J., Jiang, H., & Wu, Y. (2019). Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of *mcr-1* gene in swine feedlots. *Environment International*, 127(March), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.061>
35. Xie, W. Y., Yuan, S. T., Xu, M. G., Yang, X. P., Shen, Q. R., Zhang, W. W., Su, J. Q., & Zhao, F. J. (2018). Long-term effects of manure and chemical fertilizers on soil antibiotic resistance. *Soil Biology and Biochemistry*, 122(November 2017), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.009>
36. Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., Zhong, X., Liang, W., & Zeng, Z. (2015). Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro)quinolones-containing manure in arable soil. *Chemosphere*, 119, 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.040>
37. Zakrzewski, M., Proietti, C., Ellis, J. J., Hasan, S., Brion, M. J., Berger, B., & Krause, L. (2017). Calypso: A user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions. *Bioinformatics*, 33(5), 782–783. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw725>
38. Zhang, S., Sun, L., Wang, Y., Fan, K., Xu, Q., Li, Y., Ma, Q., & Wang, J. (2020). *Cow manure application effectively regulates the soil bacterial community in tea plantation*. 1–11.
39. Zhao, X., Wang, J., Zhu, L., Ge, W., & Wang, J. (2017). Environmental analysis of typical antibiotic-resistant bacteria and ARGs in farmland soil chronically fertilized with chicken manure. *Science of the Total Environment*, 593–594, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.062>