



CIRCLES

CITY TOUR - BOLOGNA

REPORT EUC119

Wellmicro Srl - Lab NGS:

Barbara Santacroce, Dr, Biologa
Andrea Marcante, Dr, Biotecnologo
Antonella Padella, PhD, Biotecnologa
Alena Velichevskaia, Dr, Biologa

Wellmicro Srl - Analisi NGS:

Elisa Viciani, PhD, Biologa molecolare

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elisa Viciani'.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 818290.

Introduzione

Piante, animali e esseri umani vivono in un reciproco vantaggio (simbiosi) con centinaia di miliardi di microbi. Questa popolazione di microrganismi simbiotici fatta di batteri, virus, funghi, alghe e protisti che vive dentro e intorno agli esseri viventi è chiamato **microbiota**. Il materiale genetico presente in tutte queste forme di microrganismi è il **microbioma**. In altre parole, i microbiomi sono utilizzati per dedurre la composizione e la funzione del microbiota.

Migliorare la nostra comprensione dei microbiomi per sviluppare nuovi strumenti e applicazioni per alimenti e mangimi più sostenibili che migliorino la nostra salute e quella dell'ambiente.

Questa sfida scientifica può ora essere affrontata grazie a recenti scoperte nella mappatura genomica, nella robotica e nella chimica.

Per divulgare al grande pubblico l'importanza di questi ecosistemi, CIRCLES ha organizzato delle campagne di campionamento cittadino in diverse località dei paesi europei coinvolti nel progetto, denominati "City Tours".

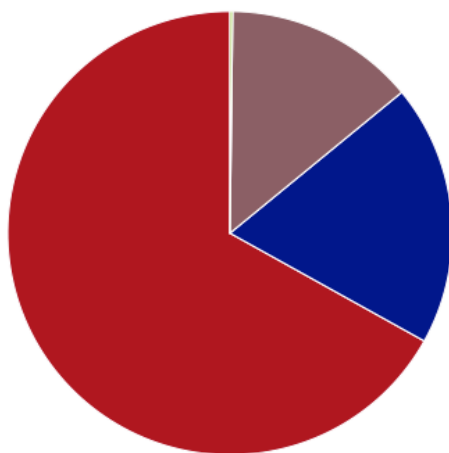
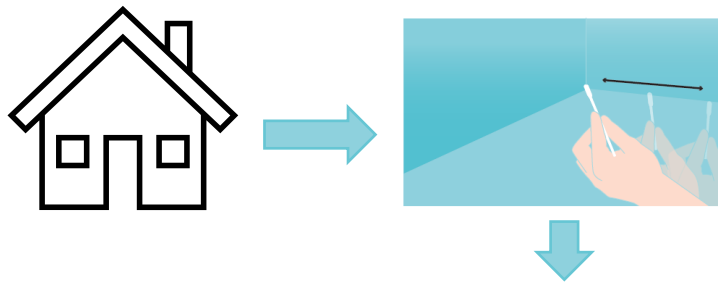
Come leggere i risultati

Il presente documento restituisce la composizione batterica del campione analizzato espresso in termini percentuali di **Abbondanza Relativa** (%) ai livelli tassonomici di **Phylum** e **Famiglia** (vedi Materiali e Metodi per dettagli). Il primo costituisce una classificazione generale per una lettura più semplice (meno gruppi) mentre la famiglia permette una valutazione più dettagliata (più gruppi). Pertanto, i due livelli tassonomici sono due punti di osservazione diversi dello stato dato.

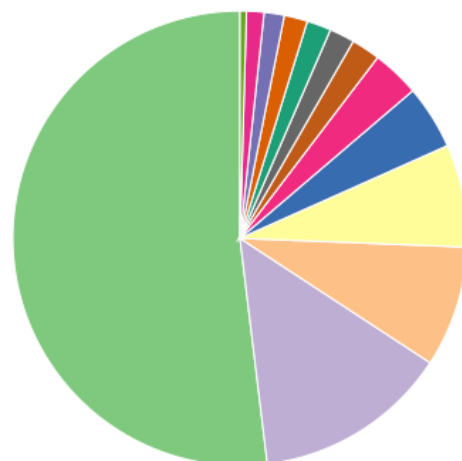


Risultati

Di seguito le abbondanze relative (%) dei gruppi batterici identificati nel campione a livello tassonomico di phylum (sinistra) e famiglia (destra):



Phylum	Abundance (%)
Proteobacteria	66.92%
Firmicutes	19.04%
Actinobacteria	13.85%
Bacteroidetes	0.20%



Famiglia	Abundance (%)
Moraxellaceae	51.92%
Micrococcaceae	13.85%
Pseudoalteromonadaceae	8.60%
Listeriaceae	7.30%
Streptococcaceae	4.56%
Carnobacteriaceae	3.39%
Pseudomonadaceae	2.05%
Enterococcaceae	1.79%
Lactobacillaceae	1.73%
Rhizobiaceae	1.66%
Xanthomonadaceae	1.43%
Enterobacteriaceae	1.24%
Microorganismi sotto all'1%	0.46%



Conclusione

I risultati non sono da intendersi come indagine di agenti patogeni o di contaminazione microbiologica e non riportano alcuna interpretazione del dato ma hanno solo uno scopo informativo e di sensibilizzazione alla tematica.

Se hai ricevuto questo report vuol dire che hai partecipato alle nostre iniziative e per questo ti ringraziamo enormemente invitandoti a seguirci sui nostri canali web e social! I risultati completi del progetto per la mappatura dell'ecosistema ambientale di Bologna saranno resi fruibili in una pubblicazione scientifica (dati anonimi e in forma aggregata).

Materiali e metodi

Sequenziamento NGS

Il DNA è stato estratto e purificato utilizzando il kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen); la quantificazione è avvenuta utilizzando lo strumento QIAxpert System e a questo ha fatto seguito la preparazione delle library NGS utilizzando il set di primer S-D-Bact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-21¹ secondo il protocollo Illumina per l'amplificazione della regione V3-V4 del gene rRNA 16S del kit Nextera XT. Le library sono state diluite alla concentrazione di 4 nM, denaturate e diluite a 5 pM prima di addizionarle a 20% di PhiX e caricate sulla piattaforma MiSeq per essere sequenziate con kit Illumina MiSeq V2 2 X 250 bp (paired-end). Per eliminare il rischio di considerare nelle analisi downstream microrganismi appartenenti ai kit utilizzati (contaminanti ambientali), dei controlli negativi (no sample) sono stati processati in contemporanea ai campioni dell'esperimento.

Analisi dei dati

Le sequenze sono state analizzate con QIIME2² versione 2020.6. Il plugin DADA2³ (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) è stato utilizzato per rimuovere rumore, chimere e per generare ASVs (Amplicon Sequence Variants). Il filtraggio di qualità e il clustering sono stati eseguiti con VSEARCH⁴. La classificazione tassonomica è stata effettuata sul database SILVA versione 132. Le analisi a valle sono state effettuate utilizzando R versione 4.0.3 e Rstudio v1.4.1103 con i pacchetti R *phyloseq*^{5,6}, *ggplot2*⁷, *tidyverse*, *tidyr*, *ape*, *ggpubr* e *dplyr*. I contaminanti ambientali presenti nei controlli negativi di processo sono stati esclusi utilizzando il pacchetto R *decontam*⁸.

Bibliografia

1. Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e1–e1 (2013).





2. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 2019 37:8 **37**, 852–857 (2019).
3. Hall, M. & Beiko, R. G. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1849 113–129 (Humana Press Inc., 2018).
4. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, e2584 (2016).
5. McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **8**, e61217 (2013).
6. Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* **5**, 1492 (2016).
7. Wickham, Hadley. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. (Springer, 2009).
8. Davis, N. M., Proctor, Di. M., Holmes, S. P., Relman, D. A. & Callahan, B. J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* **6**, 226 (2018).
9. CRAN - Package vegan. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>.
10. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**, R60 (2011).

