



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI MILANO

LA STATALE



divas

DIPARTIMENTO DI MEDICINA  
VETERINARIA E SCIENZE ANIMALI

MöLab

Laboratorio di Malattie Infettive degli animali  
Università degli Studi di Milano



# IMPATTO DEI TANNINI CONDENSATI SUL MICROBIOTA RUMINALE E FECALE DELLA CAPRA DA LATTE

***M. Filippa Addis***

*Laboratorio di Malattie Infettive, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali,  
Università degli Studi di Milano – Sede di Lodi  
filippa.addis@unimi.it*



**CONVEGNO FINALE DEL PROGETTO CASCO**  
*27 Febbraio 2023 - Palazzo Verbania, Luino*

# Scopo dell'attività di progetto



**PSR**  
2014 2020  
LOMBARDIA  
L'INNOVAZIONE  
METTERADICI

**Regione  
Lombardia**



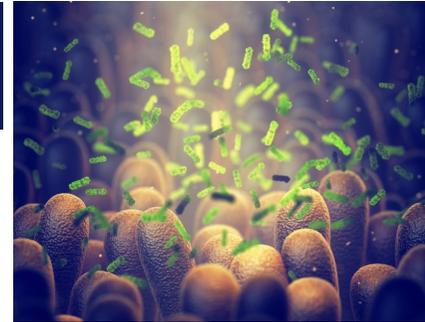
Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali



- Valutare l'impatto dell'integrazione con tannini concentrati sulla composizione del **microbiota ruminale e fecale** della capra
- Comprendere l'influenza dei tannini nella digestione dei **substrati** alimentari e nella generazione dei **cataboliti**

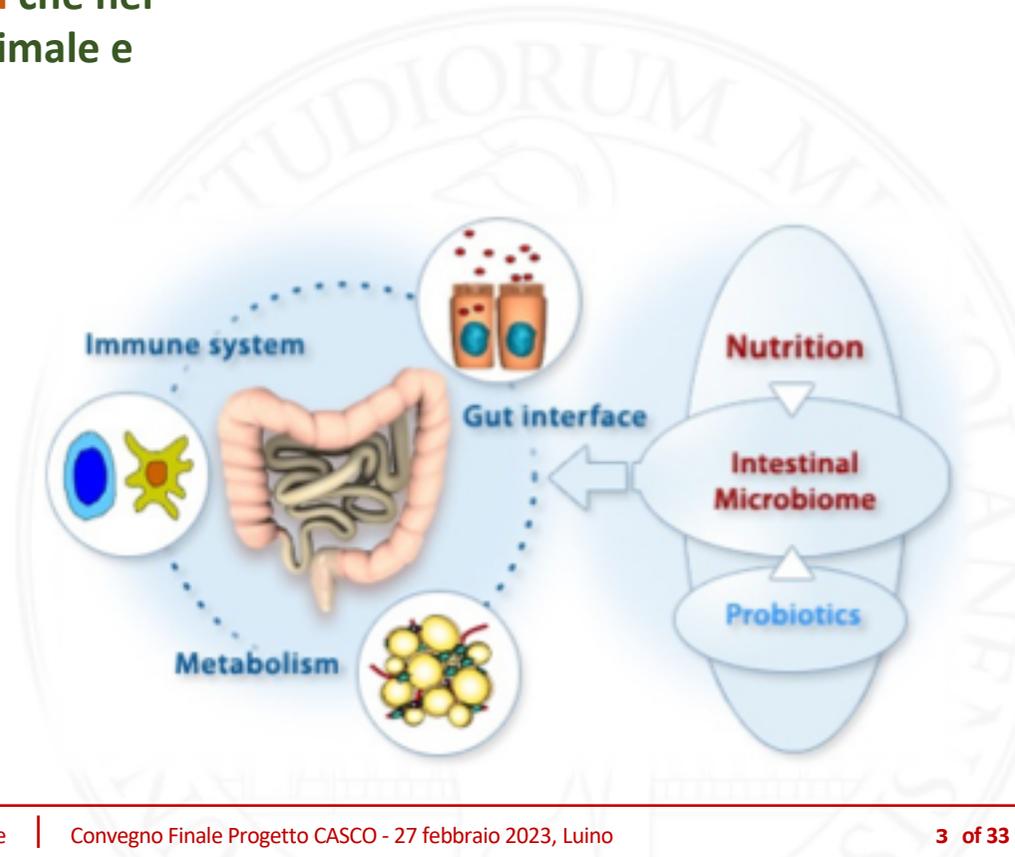
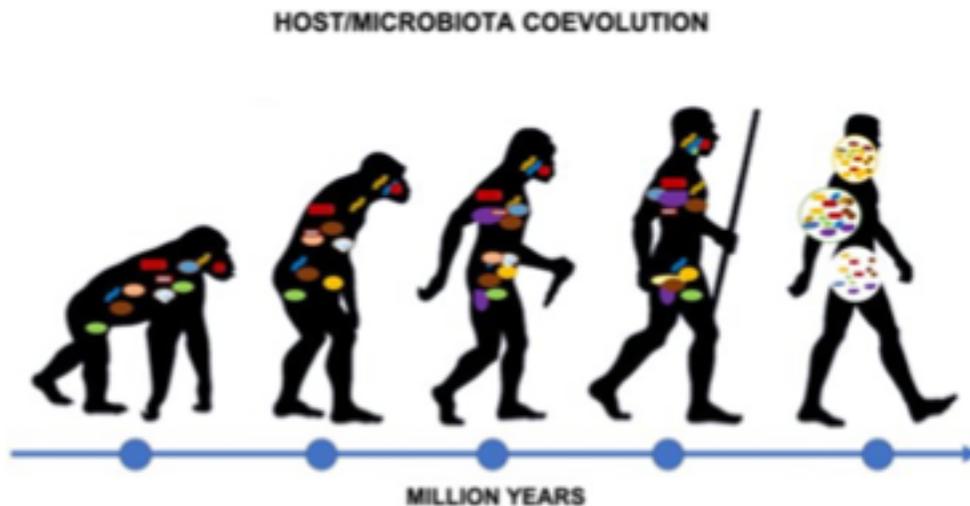


# Il microbiota

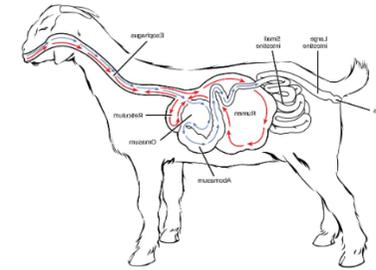


Ma... cosa intendiamo con il termine “**microbiota**”?

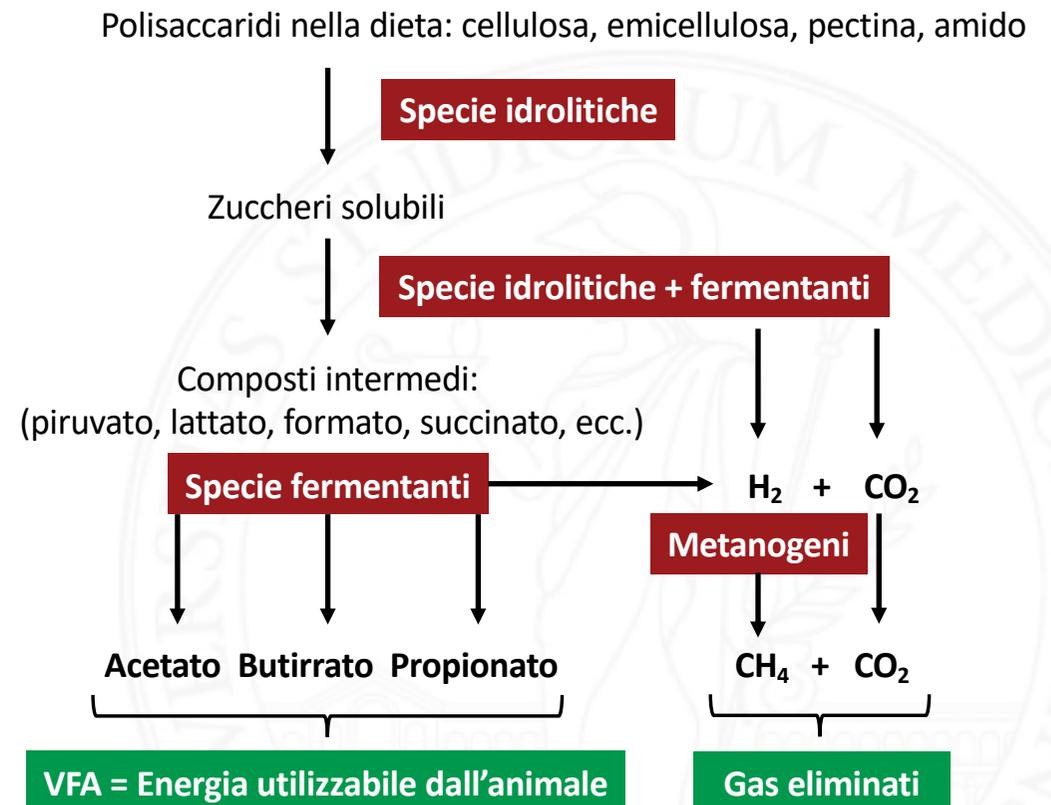
Possiamo definirlo come la **popolazione di microrganismi** che nel corso dell’evoluzione ha sviluppato una **simbiosi** con l’animale e che è divenuta parte integrante del suo **metabolismo**



# Il microbiota ruminale

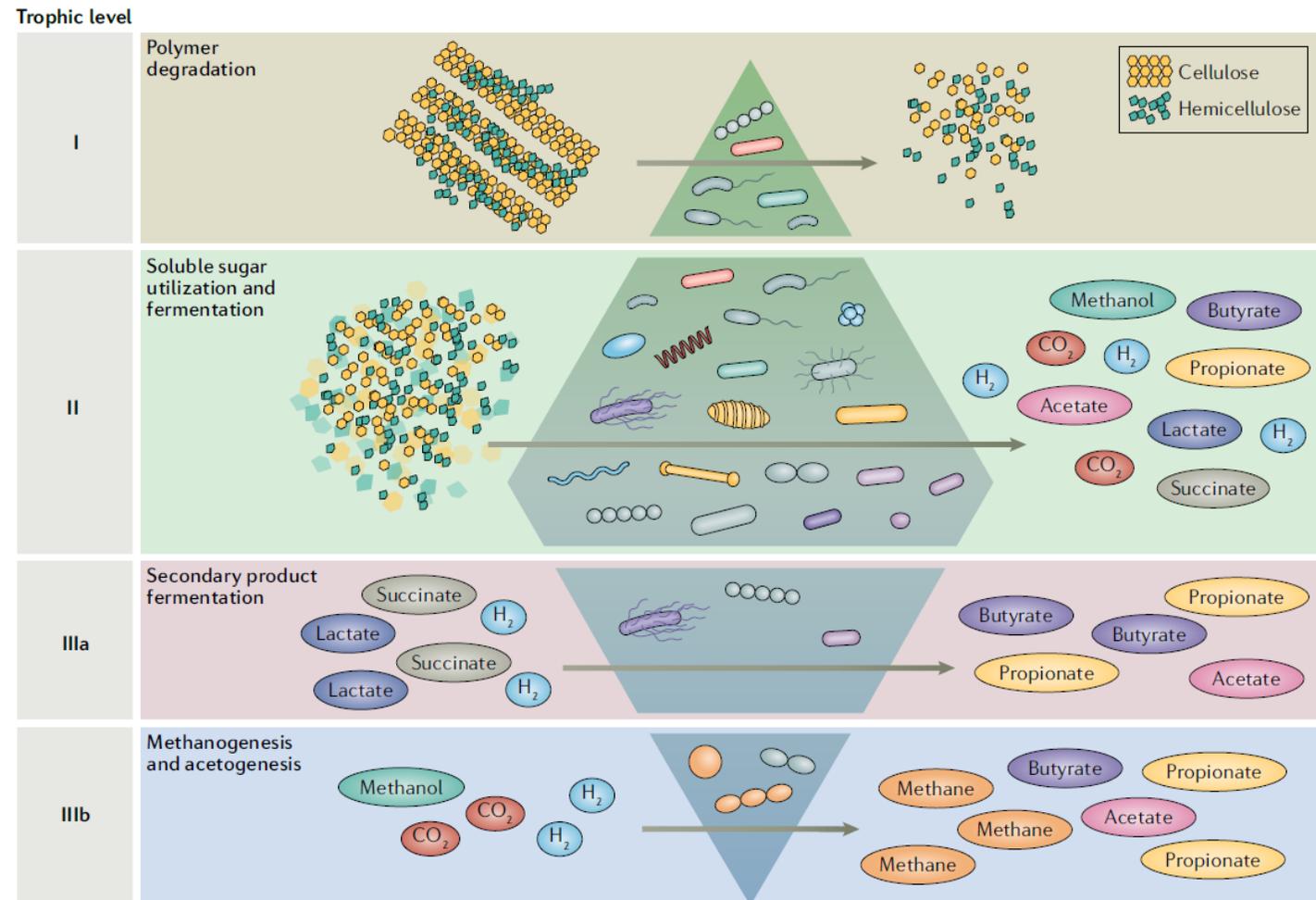


Sono i microrganismi a rendere possibile per i ruminanti ciò che è impossibile per molti altri mammiferi: **estrarre energia dalle fibre!**



# I microrganismi del rumine: substrati e prodotti

I processi sono portati avanti da **complesse reti microbiche** che si occupano delle diverse fasi della **trasformazione delle fibre in sostanze utilizzabili dall'animale** e nei prodotti di scarto anidride carbonica e **metano**



Mizrahi, I., Wallace, R.J. & Morais, 2021



# I microrganismi del rumine: substrati e prodotti

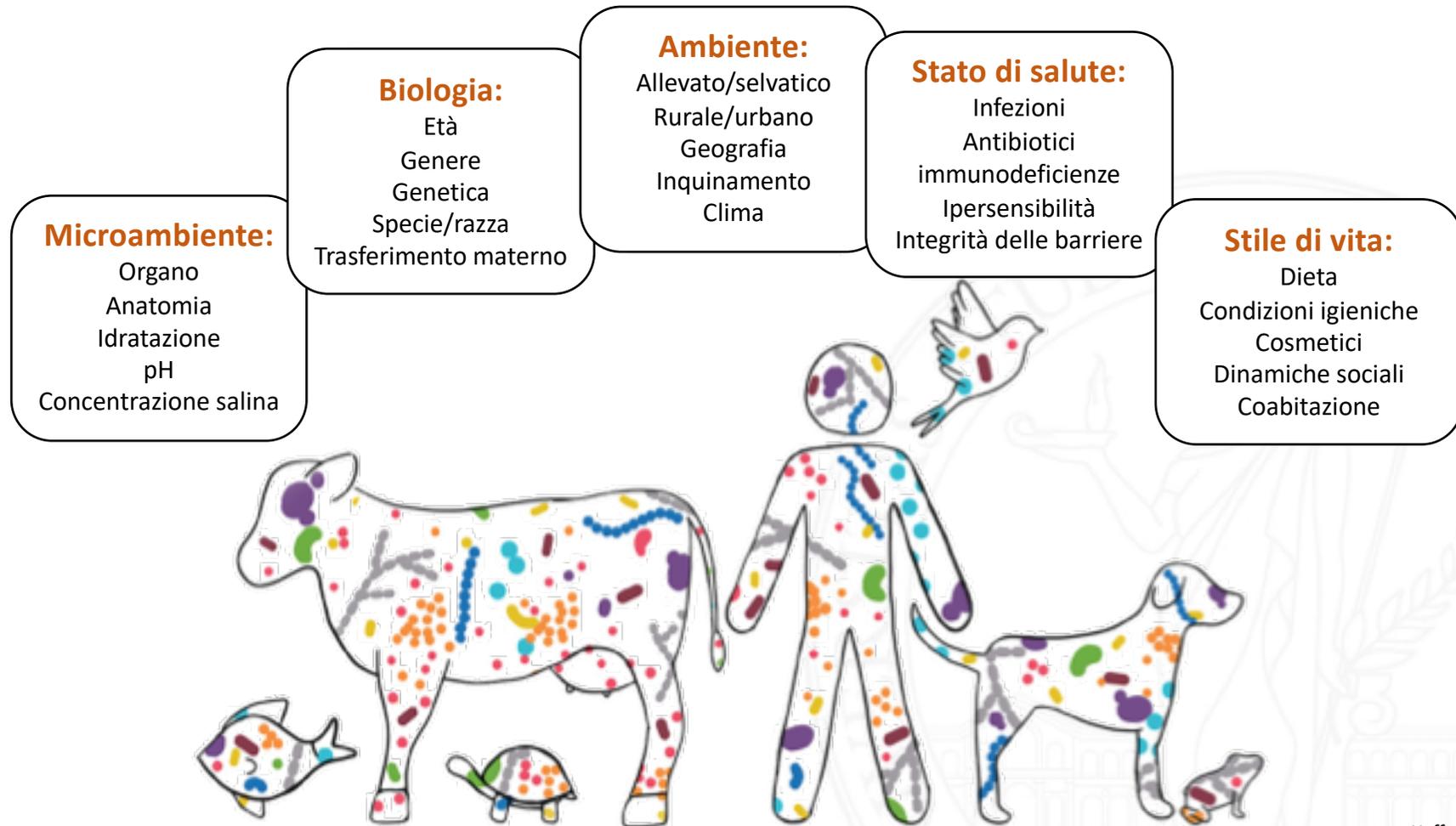
Il rumine contiene migliaia di specie microbiche responsabili della degradazione della materia vegetale e del rilascio di energia

Queste includono i microrganismi (archea) che producono metano

Known core rumen isolates and their morphology	Utilization						Production								
	Crystalline cellulose	Hemicellulose	Soluble sugars	Lactate	Succinate	Methanol	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	Succinate	Lactate	Acetate	Propionate	Butyrate	Formate	Methane
<i>Treponema bryantii</i>			✓						✓	✓					
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	✓	✓	✓						✓	✓				✓	
<i>Methanosphaera stadtmaniae</i>							✓	✓							✓
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>							✓	✓							✓
<i>Olsenella umbonata</i>			✓						✓	✓					
<i>Bifidobacterium ruminale</i>			✓						✓	✓					
<i>Pseudoscardovia suis</i>			✓						✓	✓					
<i>Succinimonas amylolytica</i>			✓						✓	✓				✓	
<i>Ruminobacter amylophilus</i>			✓						✓	✓				✓	
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>			✓						✓	✓				✓	
<i>Prevotella ruminicola</i>		✓	✓						✓	✓	✓			✓	
<i>Selenomonas ruminantium</i>			✓	✓					✓	✓	✓			✓	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓			✓	
<i>Oribacterium</i> sp. strain C9			✓						✓	✓					
<i>Lachnospira multiparus</i>			✓						✓	✓				✓	
<i>Coprococcus</i> sp. Pe15			✓	✓				✓	✓	✓	✓				
<i>Lachnoclostridium clostridioforme</i>			✓						✓	✓					
<i>Acetitomaculum ruminis</i>			✓					✓	✓	✓	✓			✓	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>B. hungateii</i> , <i>B. proteoclasticus</i>		✓	✓					✓	✓	✓	✓			✓	
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>		✓	✓						✓	✓				✓	
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>			✓						✓	✓					
<i>Succiniclasticum ruminis</i>				✓					✓	✓	✓				
<i>Christensenella minuta</i>									✓	✓		✓			
<i>Anaeroplasma abactoclasticum</i>			✓						✓	✓		✓		✓	

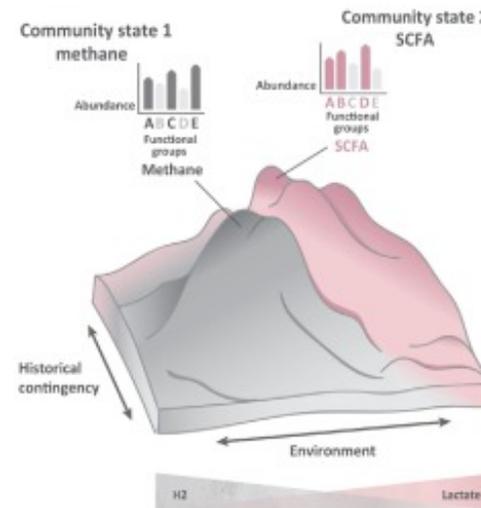
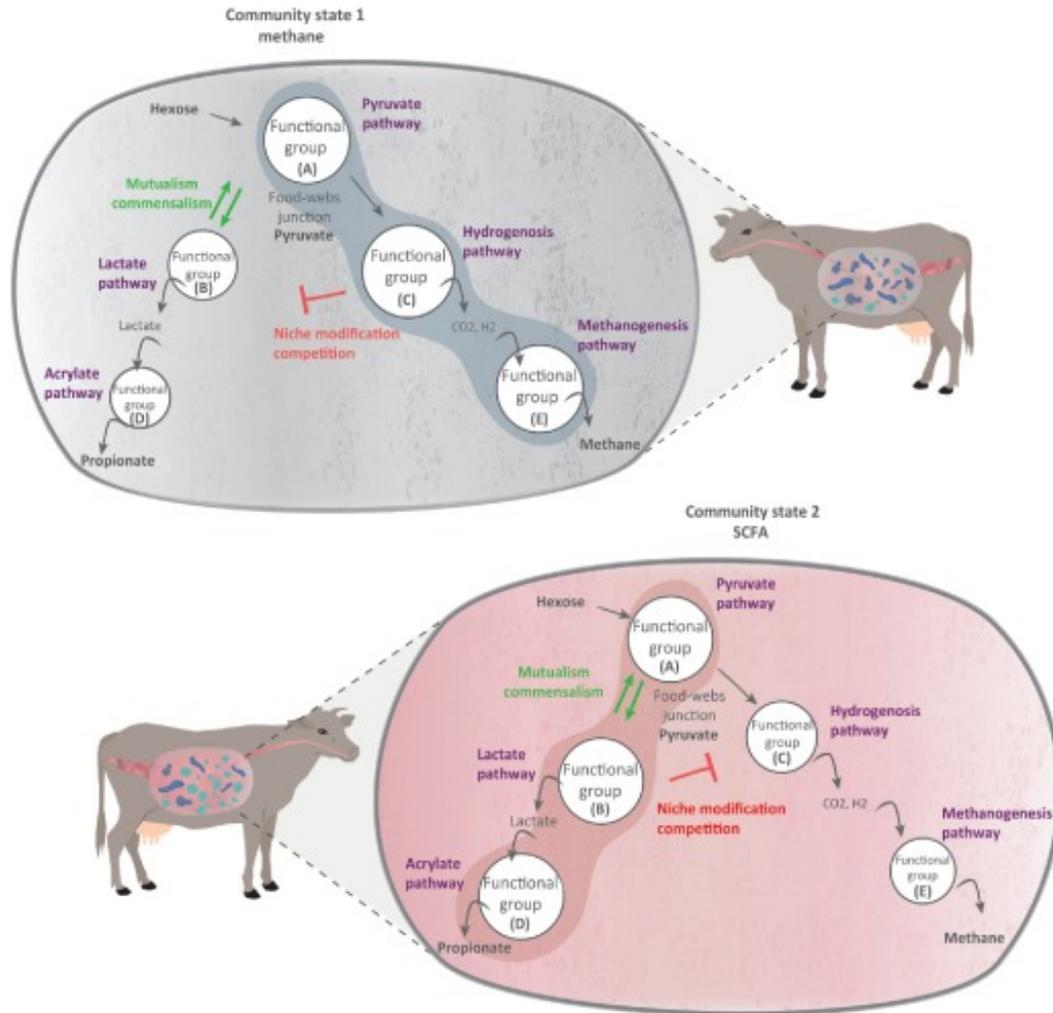
Mizrahi, I., Wallace, R.J. & Morais, 2021

# La composizione fisiologica del microbiota può cambiare



Hoffman, Older, Faccin, 2022

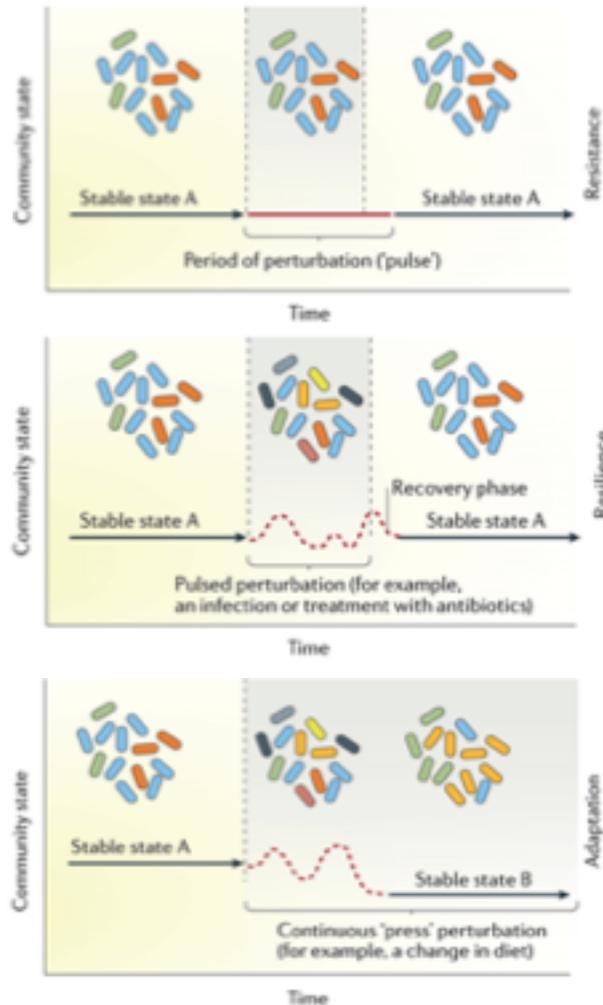
# Diverse comunità e stati funzionali



Fattori come la dieta possono favorire l'instaurarsi di comunità microbiche con **percorsi metabolici differenti**, favorendo o sfavorendo:

- La produzione di **metano**
- La produzione di **SCFA**

# Resistenza, resilienza e adattamento del microbiota



**Resistenza.** La comunità microbica resiste ad una perturbazione esterna di **breve durata (impulso)** e **non subisce alterazioni evidenti di composizione o funzione**. In questo caso estremo la comunità è perfettamente "resistente".

**Resilienza.** Una perturbazione di **breve durata (impulso)** altera la composizione della comunità microbica. Dopo una fase di recupero, una comunità resiliente **ritorna alla normale funzione e composizione (stato stabile A)**.

**Adattamento.** Una perturbazione di **lunga durata (pressione)** impone un cambiamento di funzioni nella comunità, portandola ad adottare **uno stato alternativo stabile e benefico (stato stabile B)**.

*Sommer et al., Nature Reviews Microbiology, 2017*

## Carenza di informazioni nella **capra** rispetto al bovino

- Capacità di **detossificazione**
- Maggiore **tolleranza**
- **Maggiore resistenza?**
- **Maggiore resilienza?**

## Valutazione dell'attendibilità dei dati ottenuti sul campione di **feci**

- **semplicità** di campionamento e analisi



# Obiettivi del lavoro

Valutare l'impatto dell'integrazione con tannini concentrati di quebracho sulla composizione del **microbiota ruminale e fecale** della capra

Comprendere l'influenza dei tannini nella digestione dei **substrati** alimentari e nella generazione dei **cataboliti**

Valutare l'attendibilità dei dati ottenuti sulle **feci come indicatori** dei cambiamenti in corso nel rumine ed ottenere un quadro più completo

Espandere le nostre **conoscenze** sul microbiota ruminale e fecale della capra da latte



# Metodi – feeding trial

## Quattro diete sperimentali

- C (controllo)
- Q2 (2% di estratto di quebracho)
- Q4 (4% di estratto di quebracho)
- Q6 (6% di estratto di quebracho)

## Otto capre pluripare in lattazione

Quadrato latino ( 2 quadrati x 4 capre x 4 diete)

28 gg di alimentazione, a fine ciclo:

- 8 animali per ciascuna dieta:
- 8 campioni di rumine (sonda esofagea)
- 8 campioni di feci (tampone rettale)



# Metodi – analisi microbiota

**Estrazione DNA da 28 campioni di ruminante liofilizzato  
e 29 tamponi rettali (anziché 32)**

**PCR sulle regioni ipervariabili V3-V4 del gene per il  
16S rRNA  
25 cicli di PCR  
Sequenziamento delle library su MiSeq Illumina**

**Processazione dati con Qiime  
SILVA database per le zOTU  
R + Matlab per bioinformatica e biostatistica**



**silva**  
High quality ribosomal RNA databases

**qiime**  
Quantitative Insights Into Microbial Ecology



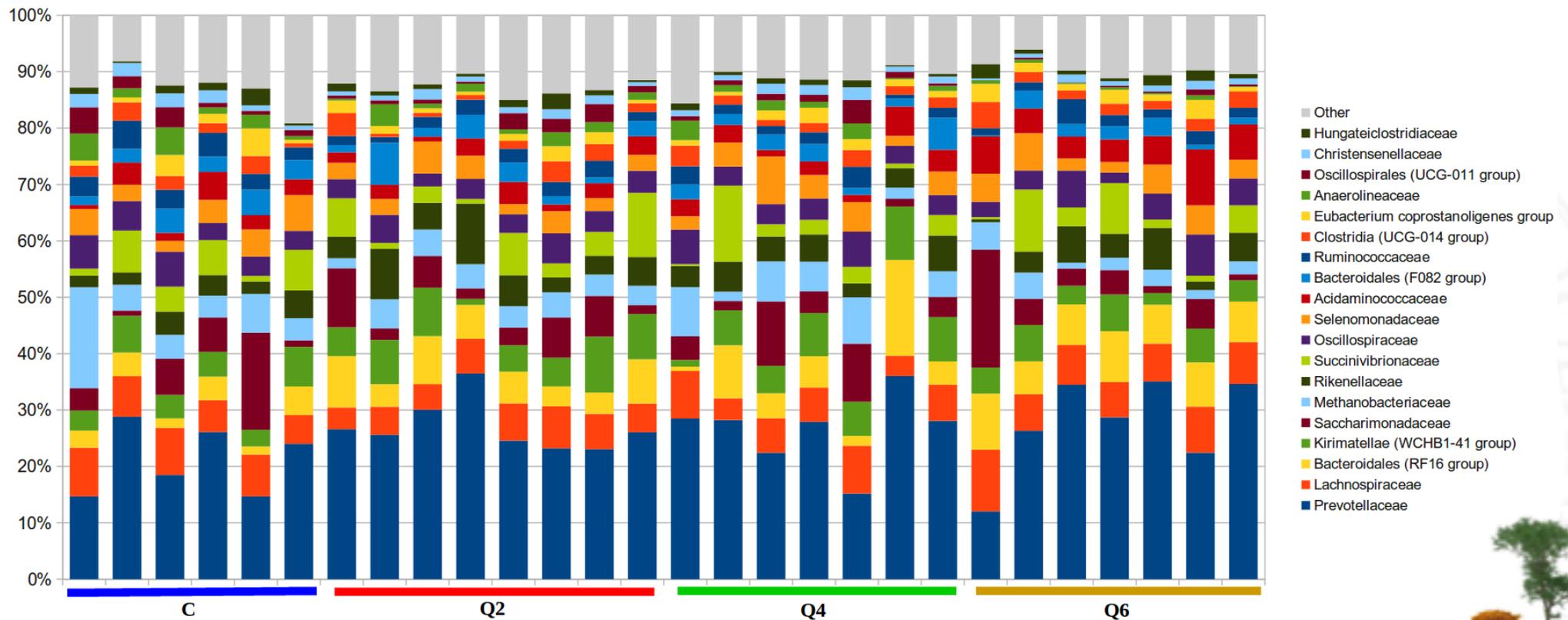
Consiglio Nazionale  
delle Ricerche

# Risultati - rumine

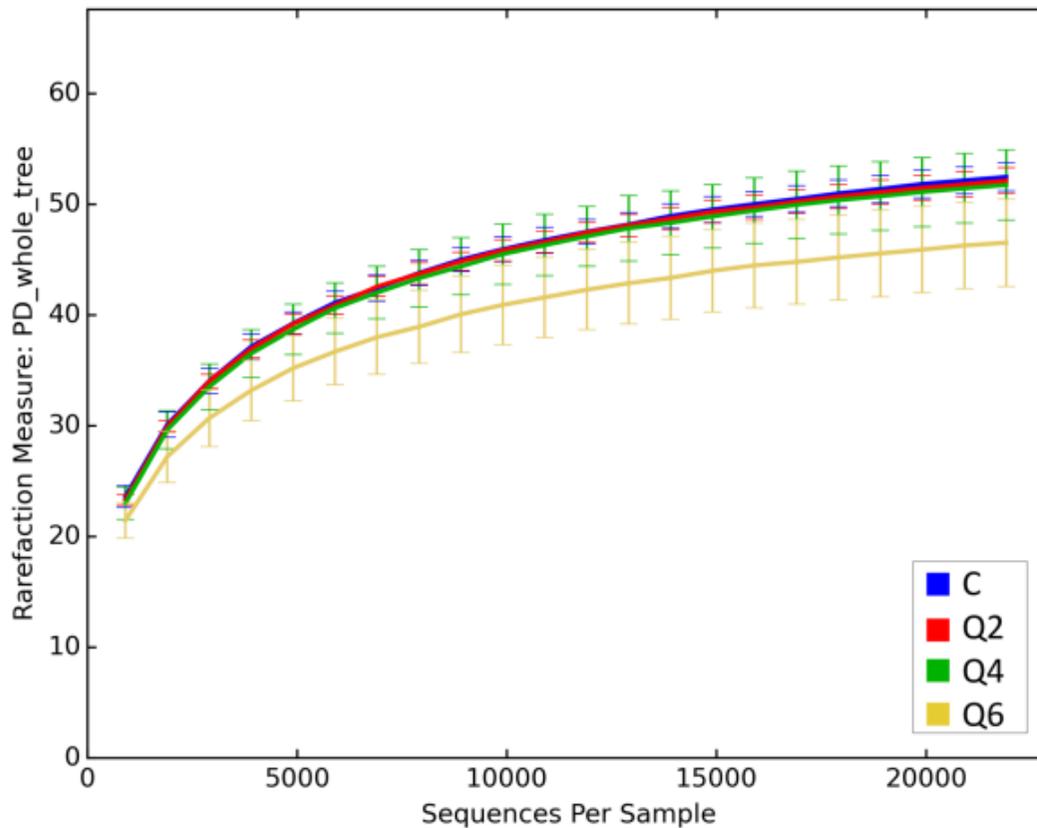


# Rumine – composizione tassonomica

## Risoluzione a livello di famiglie di batteri ed archea



# Rumine – alfa diversità e dieta



L'integrazione dei mangimi con tannini di quebracho **ha ridotto la biodiversità del microbiota ruminale** delle capre



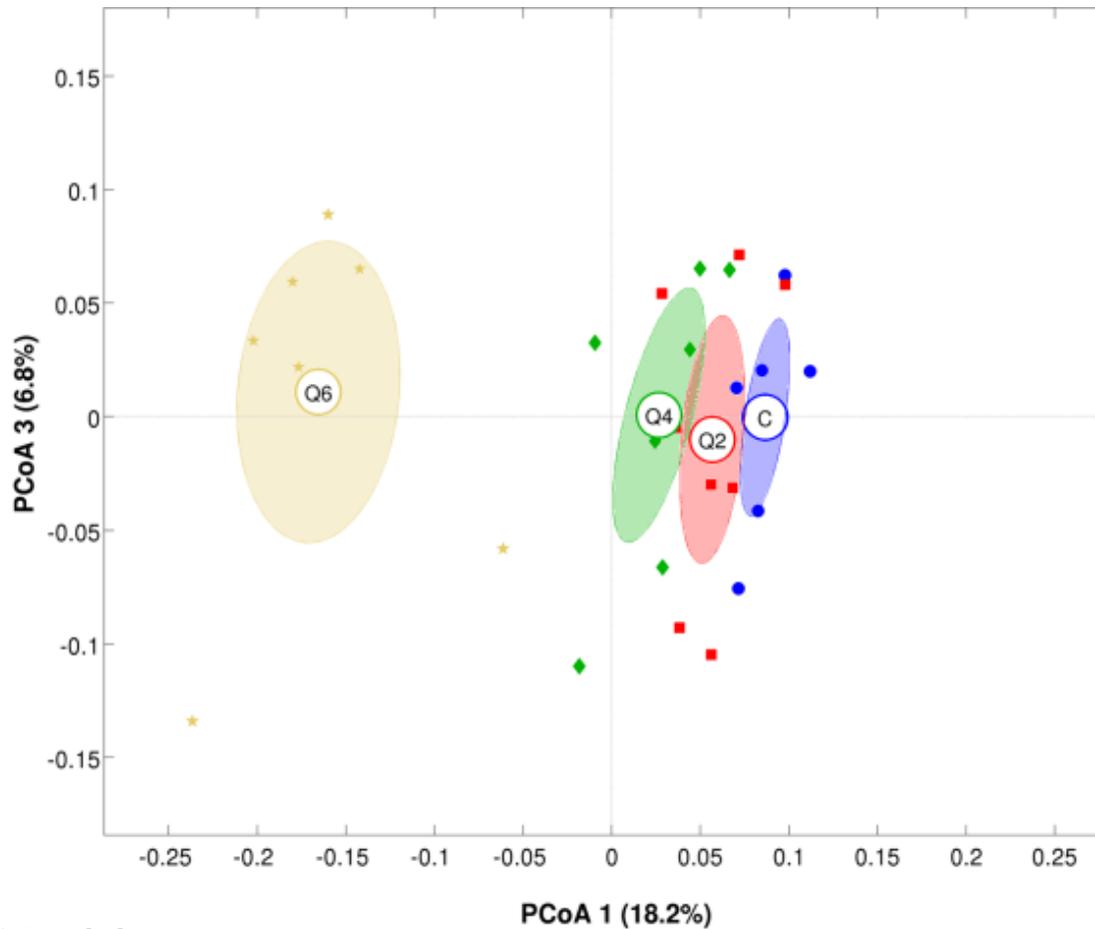
la biodiversità è stata **inversamente proporzionale alla concentrazione di tannini** nella dieta

La riduzione è stata **statisticamente significativa alla concentrazione più alta (Q6)** rispetto a C e a Q2

\*  $P < 0.05$



# Rumine – beta diversità e dieta



\*  $P < 0.05$

I campioni corrispondenti alla stessa dieta:

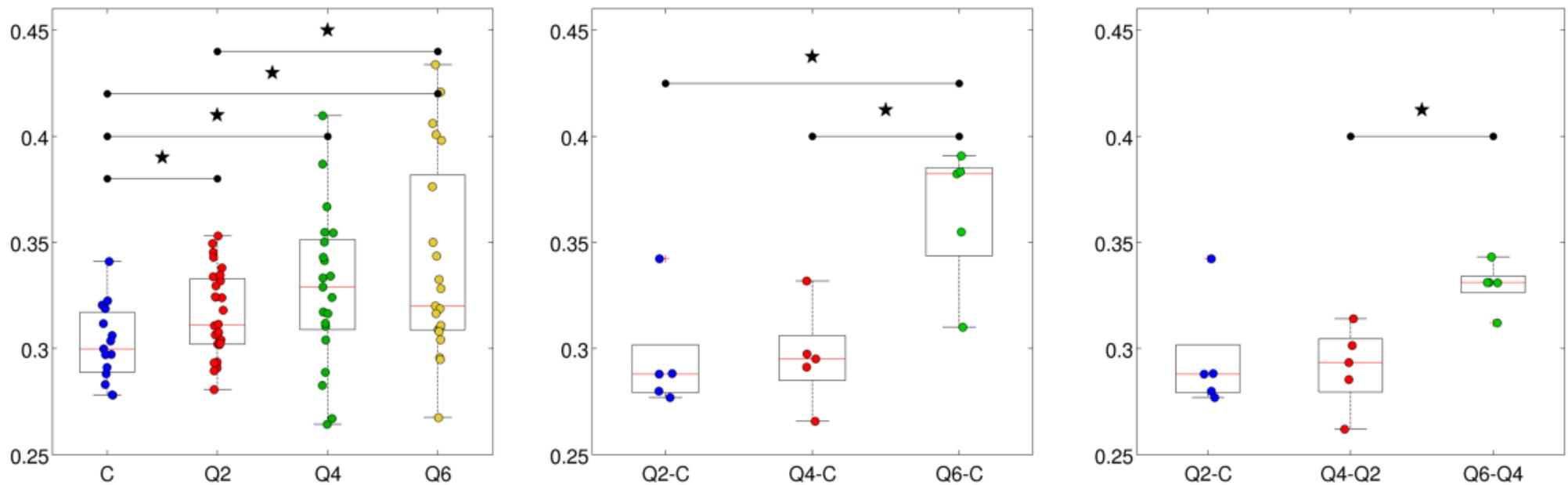
- **clusterizzano** fra loro
- mostrano una **tendenza** lungo la prima coordinata principale in **funzione della concentrazione di tannini**

**Q6 sono nettamente separati da tutti gli altri**

**Q2 e Q6 sono significativamente diversi da C secondo la metrica Unifrac ponderata\***



# Rumine – distanze e dieta



La distanza fra i campioni dello stesso gruppo alimentare aumenta all'aumentare della concentrazione di tannini

\*  $P < 0.05$



# Rumine – gruppi microbici modificati dalla dieta

	Phylum	Aumento / diminuzione	Dieta			
			C	Q2	Q4	Q6
	<b>Bacteroidota</b>	↑	32.81	<b>43.01*</b>	<b>41.85*</b>	<b>42.04*</b>
	Firmicutes	↓	34.75	<b>27.50*</b>	29.86	34.59
Metanogeni →	Euryarchaeota	↓	6.91	<b>3.92*</b>	5.36	<b>2.78*</b>
	Chloroflexi	↓	2.58	1.60	1.63	<b>0.43*</b>
Fibrolitici →	<b>Fibrobacterota</b>	↑	<b>0.63</b>	<b>1.24*</b>	<b>0.71</b>	<b>0.78</b>
	Synergistota	↓	1.91	0.94	<b>0.57*</b>	<b>0.06*</b>
Fermentazione dei carboidrati; Da acetato/propionato a butirato →	Firmicutes / Bacteroidota ratio	↓	1.06	0.63	0.71	0.82

\* P < 0.05



# Rumine – gruppi microbici modificati dalla dieta

Famiglie		Aumento / diminuzione	Dieta			
			C	Q2	Q4	Q6
Fibrolitici e proteolitici →	Prevotellaceae	↑	21.13	26.96*	26.62	27.66*
	Lachnospiraceae	↓	7.05	5.61*	6.14	7.57*
	Bacteroidales RF16 group	↑	3.26	6.05	6.14	7.71*
Metano →	Methanobacteriaceae	↓	6.91	3.92*	5.36	2.78*
	Rikenellaceae	↑	3.18	5.60*	4.36	4.14
	Acidaminococcaceae	↑	2.72	2.43	2.87	5.75*
	Bacteroidales F082	↓	3.15	2.89	2.67	1.86*
Cellulosa →	Ruminococcaceae	↓	3.52	2.10*	2.09*	2.13*
	Anaerolineaceae	↓	2.58	1.60	1.63	0.43*
	Oscillospirales UCG-011 group	↓	2.17	1.51	1.41	0.35*
	Christensenellaceae	↓	1.84	1.16*	1.41	0.98*
	Fibrobacteraceae	↑	0.63	1.24*	0.71	0.78
Cellulosa →	Synergistaceae	↓	1.91	0.94	0.57*	0.06*
	Muribaculaceae	↓	1.28	0.56*	1.27	0.14*

\* P < 0.05



# Rumine – gruppi microbici modificati dalla dieta

Generi		Aumento / diminuzione	Dieta			
			C	Q2	Q4	Q6
Metano	Methanobrevibacter	↓	6.66	3.83	5.13	2.66*
	Rikenellaceae RC9 gut group	↑	3.12	5.56*	4.34	4.07
SCFA	Succiniclasticum	↑	2.72	2.43	2.87	5.75*
	Prevotellaceae UCG-001	↑	1.33	1.89	2.63*	4.27*
	Uncl. Bacteroidales RF16 group	↑	0.72	1.27	1.11	3.50*
	Uncl. Prevotellaceae	↑	1.29	1.88	1.42	1.93*
	Flexilinea	↓	2.58	1.60	1.63	0.43*
	Oscillospirales UCG-011 group	↓	2.17	1.51	1.41	0.35*
	Christensenellaceae R-7 group	↓	1.75	1.12*	1.33	0.92*
	Bacteroidales F082	↓	1.75	1.07*	1.28	0.96*
	Uncl. Ruminococcaceae	↓	1.65	0.59*	0.78*	0.74*
	Fibrobacter	↑	0.63	1.24*	0.71	0.78
Fretibacterium	↓	1.87	0.89	0.54*	0.01*	
	uncultured Muribaculaceae	↓	1.18	0.50*	1.07	0.13*

\* P < 0.05



# Rumine – un sunto

In termini di **diversità** del microbiota procariotico:

- Il microbiota ruminale è ben definibile a livello di **famiglie** – **Prevotellacee** è la più abbondante
- la biodiversità del microbiota **diminuisce proporzionalmente all'aggiunta di tannini** alla dieta
- I campioni corrispondenti alla stessa dieta **clusterizzano** fra loro e mostrano una **tendenza a raggrupparsi seguendo la concentrazione di tannini**

Quindi: I tannini inducono differenze statisticamente significative nella **diversità** del microbiota

# Rumine – un sunto

In termini **tassonomici** = potenziali funzioni:

- I **metanogeni diminuiscono** significativamente a tutti i livelli tassonomici
- Cambiano i rapporti fra i phyla produttori di acetato/propionato **a vantaggio del butirrato**
- I **fibrolitici e i proteolitici aumentano** e **cambiano** le famiglie responsabili della degradazione di cellulosa ed emicellulosa
- Aumentano i taxa produttori di **SCFA**

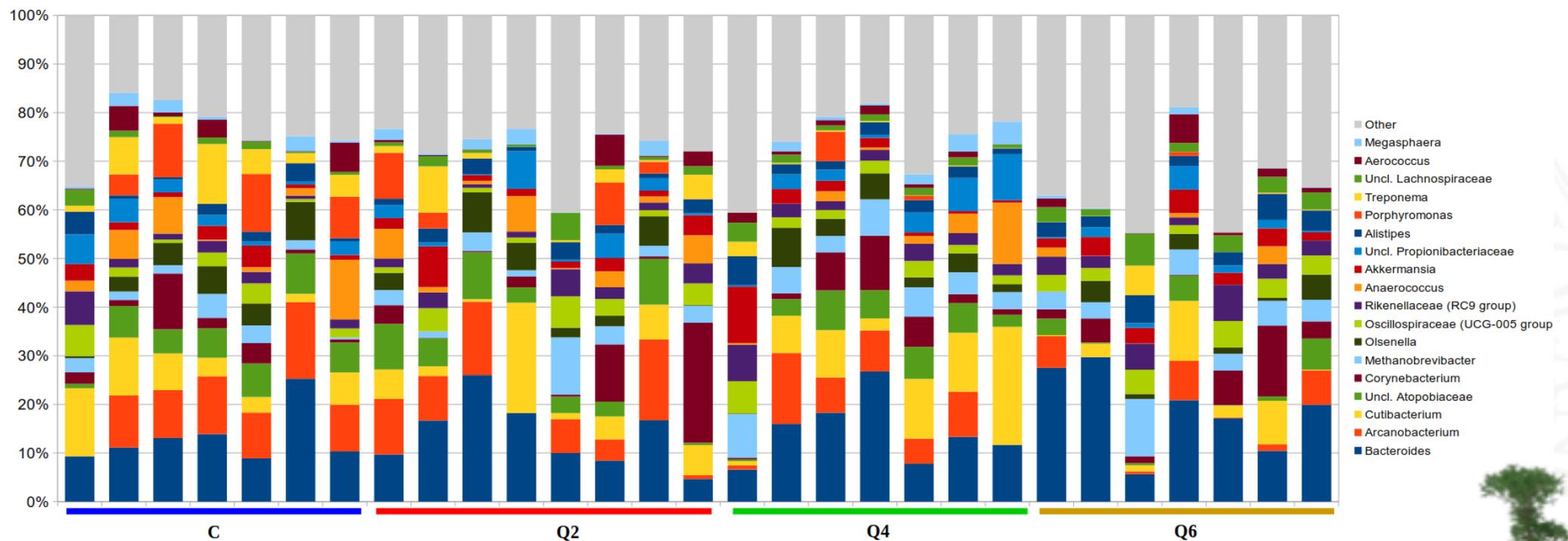
Quindi: I tannini inducono differenze statisticamente significative nella **composizione del microbiota**, apparentemente in senso positivo

# Risultati - feci

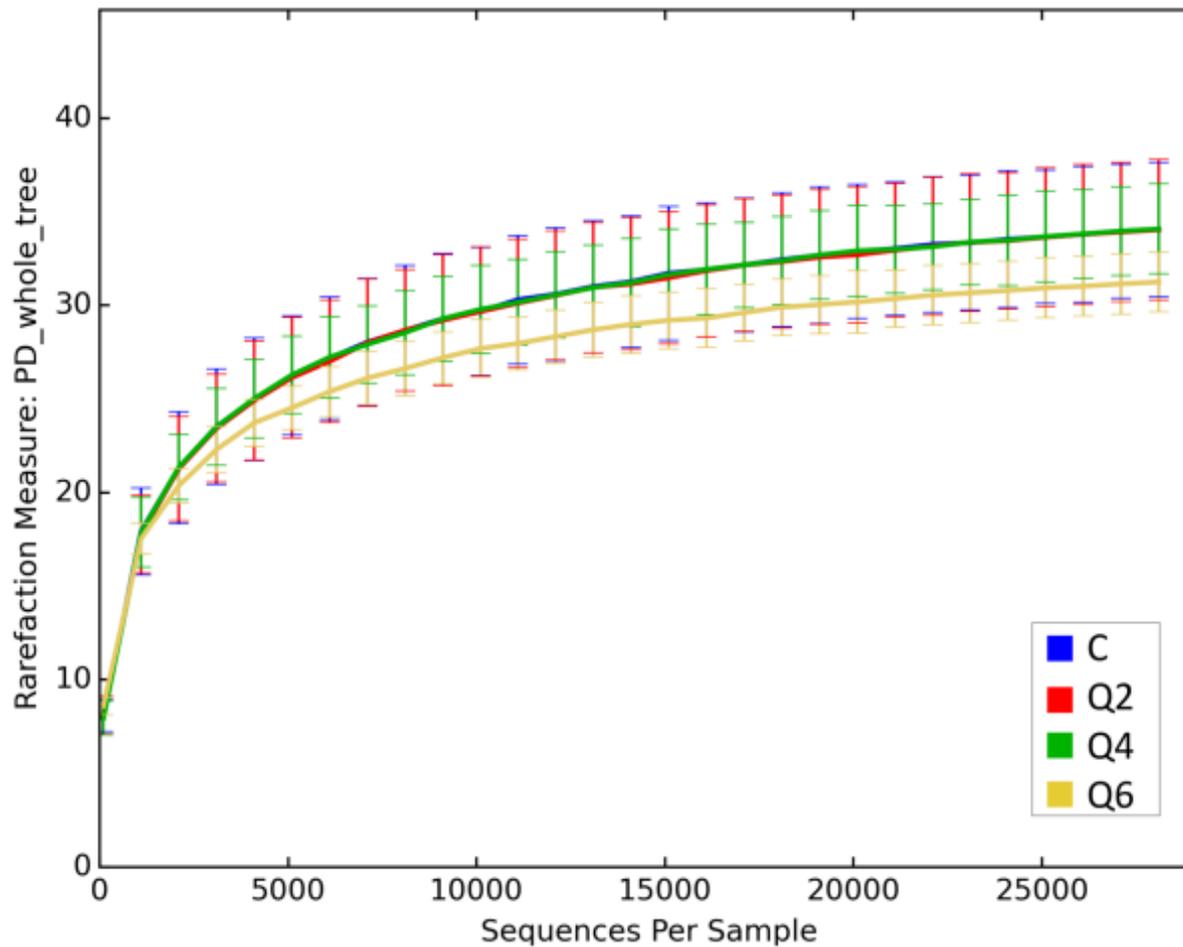


# Feci – composizione tassonomica

## Risoluzione a livello di generi di batteri ed archea



# Feci – diversità e dieta



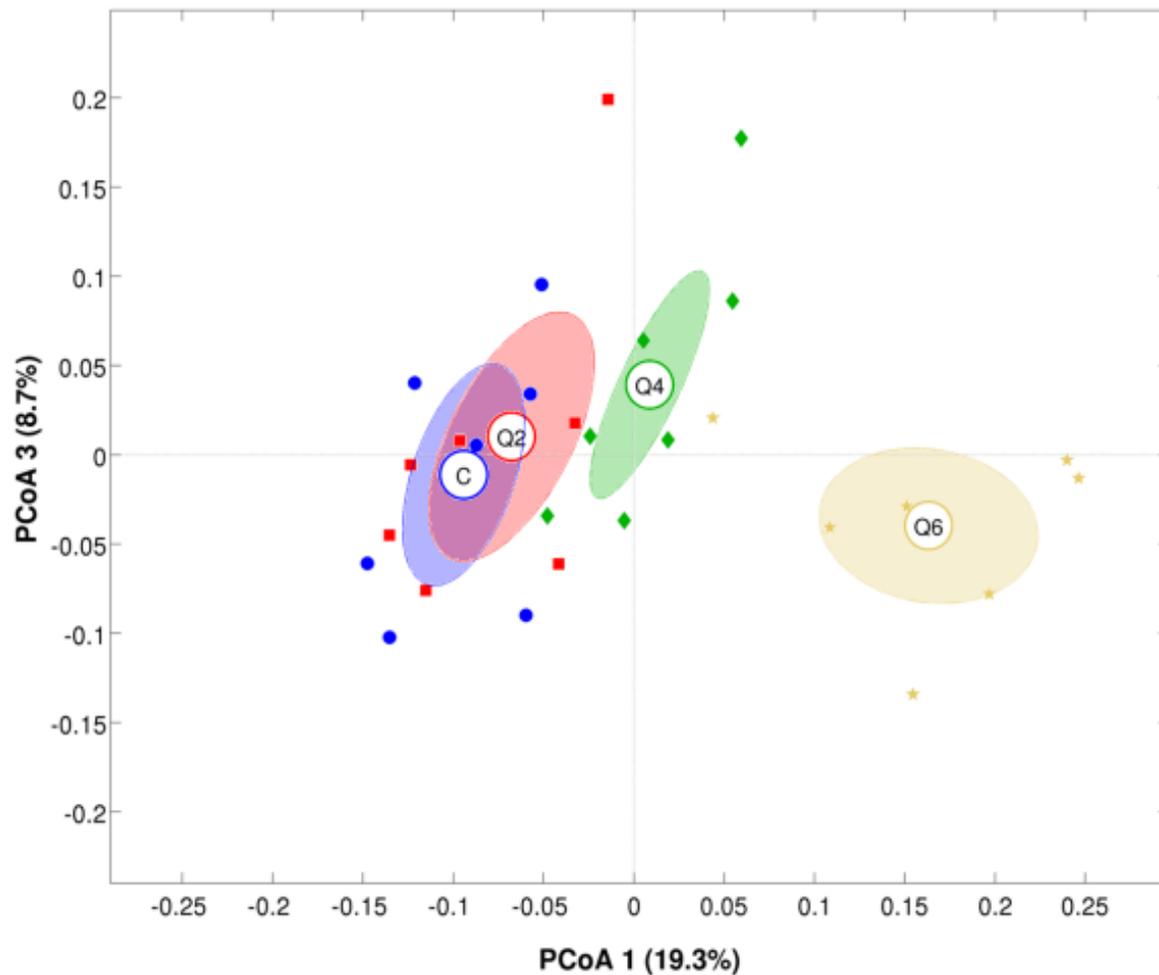
**Non si osservano differenze statisticamente significative nella biodiversità del microbiota fecale delle capre alimentate con diverse concentrazioni di tannini**

**Q6 ha una diversità che tende ad essere inferiore, ma il dato non è statisticamente significativo**

**L'analisi delle feci non cattura il calo di biodiversità avvenuto nel rumine**

**L'impatto dei tannini sul microbiota fecale è meno intenso**

# Feci – diversità e dieta



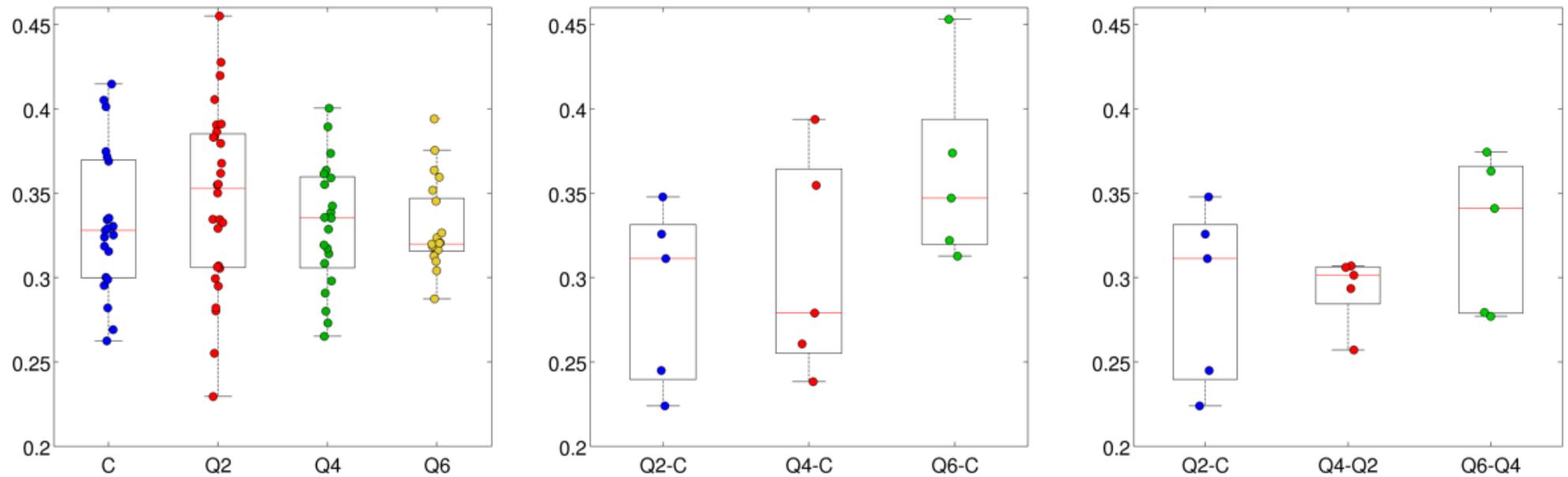
I campioni corrispondenti alla stessa dieta:

- **clusterizzano** fra loro
- mostrano una **tendenza** lungo la prima coordinata principale in **funzione della concentrazione di tannini**

**Q6 sono nettamente separati da tutti gli altri**

**Le differenze non sono statisticamente significative**

# Feci – diversità e dieta



Le distanze fra gruppi alimentari tendono ad aumentare con **la concentrazione di tannini** ma **NON sono statisticamente significative**



# Feci – gruppi microbici modificati dalla dieta

Phylum	Aumento / diminuzione	Dieta			
		C	Q2	Q4	Q6
Actinobacteriota	↓	33.32	32.33	33.76	20.81*
Metanogeni → Euryarchaeota	↑	2.52	3.98	5.95*	5.83*
Verrucomicrobiota	↑	2.87	4.07	3.94	6.43*
Spirochaetota	↓	5.06	2.64	0.98*	3.04
Desulfobacterota	↑	1.06	1.23	1.11	1.52*
Bacteria (other)	↓	1.24	1.50	1.02	0.49*
Planctomycetota	↑	0.43	0.49	0.64	1.04*
→ Firmicutes / Bacteroidota ratio	Invariato				

\* P < 0.05



# Feci – gruppi microbici modificati dalla dieta

Famiglie		Aumento / diminuzione	Dieta			
			C	Q2	Q4	Q6
Metanogeni →	Atopobiaceae	↓	9.87	9.42	8.60	4.86*
	Actinomycetaceae	↓	9.65	8.08	6.54	3.42*
	Rikenellaceae	↑	4.71	4.95	6.14	7.73*
	Methanobacteriaceae	↑	2.52	3.98	5.95*	5.83*
	Lachnospiraceae	↑	2.57	3.62	3.63	7.71*
	Clostridia Family XI	↓	7.39	4.91	3.54	1.44*
Fibrolitici →	Spirochaetaceae	↓	5.06	2.64	0.98*	3.04
	Ruminococcaceae	↑	0.87	1.12	1.79	1.53*
	Desulfovibrionaceae	↑	0.99	1.15	1.11	1.52*
	Bacteria (other)	↓	1.24	1.50	1.02	0.49*
	Bacteroidales RF16 group	↓	0.89	1.38	1.64	0.27*
	Acidaminococcaceae	↓	1.04	1.18	1.29*	0.59
	Eubacterium coprostanoligenes group	↑	0.63	0.70	0.94	1.32*
	Puniceicoccaceae	↑	0.24	0.57	0.07	2.36*
Pirellulaceae	↑	0.43	0.49	0.64	1.04*	
Erysipelatoclostridiaceae	↑	0.04	0.14	0.12*	1.03*	

\* P < 0.05



# Feci – gruppi microbici modificati dalla dieta

	Generi	Aumento / diminuzione	Dieta			
			C	Q2	Q4	Q6
	Arcanobacterium	↓	9.61	8.04	6.51	3.39*
	Uncl. Atopobiaceae	↓	5.69	5.55	4.72	2.39*
Metanogeni →	Methanobrevibacter	↑	2.46	3.85	5.61*	5.28*
	Rikenellaceae RC9 gut group	↑	2.47	2.59	3.24	3.83*
	Anaerococcus	↓	4.38	3.22	3.02	0.93*
	Alistipes	↑	2.08	2.16	2.64	3.62*
	Treponema	↓	4.89	2.56	0.58*	0.94*
	Uncl. Lachnospiraceae	↑	1.24	1.60	1.71	3.30*
	Megasphaera	↓	1.40	1.41	1.90	0.38*
	Bacteria (other)	↓	1.24	1.50	1.02	0.49*
	Cerasicoccus	↑	0.19	0.53	0.05*	2.29*
	Murdochiella	↓	1.42	1.05	0.32*	0.07*
	Bacteroidales GWE2-31-10 group	↑	0.17	0.07	0.40	2.10*
	Bacteroidales RF16 group	↓	0.55	0.70	1.19	0.14*
	Corynebacterium	↑	0.12	0.02	0.10	1.48*
	Acetitomaculum	↑	0.05	0.13	0.25*	1.22*

\* P < 0.05



# Conclusioni

**Nel campione di rumine, al crescere della concentrazione di tannini:**

- La **diversità** del microbiota ruminale **diminuisce**
- I **metanogeni del rumine calano** significativamente a tutti i livelli tassonomici
- Cambiano i rapporti fra i phyla produttori di acetato/propionato **a vantaggio del butirrato**
- I **fibrolitici e proteolitici aumentano** e **cambiano** le famiglie responsabili della degradazione di cellulosa ed emicellulosa
- Aumentano i taxa produttori di **SCFA**

**Nel campione di feci:**

- Le osservazioni sulla biodiversità **non raggiungono la significatività statistica**
- Le osservazioni sui cambiamenti della tassonomia **sono differenti da quelle del rumine**
- L'utilizzo del solo campione fecale, benché più agevole, potrebbe essere **insufficiente o fuorviante** come proxy dei cambiamenti ruminali; è però utile per ottenere un quadro più completo

**Cosa manca ancora: le analisi del microbiota fungino e protozario del rumine sono in fase di completamento**

***Hanno collaborato:***



**PSR** LOMBARDIA  
L'INNOVAZIONE  
METTERE RADICI  
2014 2020



Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali



**Marco Battelli**

**Luca Rapetti**



**Paola Cremonesi**

**Marco Severgnini**



**Valentina Monistero**

**Martina Penati**

**Maria Teresa Manfredi**

*Capre all'Argentiera, Sardegna nord-ovest*

