

Effetto degli alimenti con tannini sul microbiota gastrointestinale della capra da latte

Fra le varie attività svolte, il progetto CASCO ha valutato l’impatto dei tannini sull’efficienza e sulle modalità di trasformazione dei substrati alimentari nel rumine analizzando i cataboliti prodotti e le loro variazioni, con particolare attenzione ai nitrati e al metano. Per comprendere ancora meglio questi fenomeni, è stata condotta un’analisi dettagliata delle loro conseguenze sulle popolazioni microbiche che compongono il microbiota ruminale e fecale della capra.

Come ben sappiamo, è il microbiota ruminale a rendere possibile ai ruminanti ciò che non lo è per molti altri mammiferi: estrarre energia dalle fibre. Gli enzimi prodotti dai batteri fibrolitici permettono infatti di liberare gli zuccheri contenuti nella cellulosa rendendoli disponibili per il metabolismo e la trasformazione in energia utilizzabile dall’animale. Questo piccolo “miracolo” chimico ha però come prezzo la produzione di metano, uno dei più importanti gas serra, da parte dei microrganismi metanogeni. La produzione di metano enterico è stata molto ben studiata nei bovini, i principali responsabili della produzione di gas serra da attività zootecniche.

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 ₂	H ₂	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. hungatei</i> , <i>B. proteoclasticus</i>		✓	✓						✓	✓	✓				✓
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>		✓	✓						✓	✓	✓				✓
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>			✓						✓	✓	✓				✓
<i>Succinoclasticum ruminis</i>			✓						✓	✓	✓				✓
<i>Christensenella minuta</i>			✓						✓	✓	✓				✓
<i>Anaeroplasma abactoclasticum</i>			✓						✓	✓	✓				✓

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

I lavori condotti finora hanno evidenziato chiaramente che la composizione della dieta può favorire l’instaurarsi di comunità microbiche ruminali che producono maggiori quantità di acidi grassi volatili, assorbibili dall’animale come energia, rispetto al metano, e l’integrazione con tannini fa parte delle strategie nutrizionali capaci di sortire questo effetto benefico. Nella capra, tuttavia, le informazioni a riguardo sono carenti; sappiamo inoltre che questi animali hanno una maggiore capacità di detossificare i tannini e che mostrano una maggiore tolleranza nei loro confronti. Le comunità microbiche ruminali della capra potrebbero essere quindi più resistenti e non subire variazioni di rilievo, o ancora essere più resilienti e ritornare più facilmente alle condizioni di partenza dopo la variazione iniziale indotta dalla dieta. In considerazione di queste importanti differenze, diviene quindi importante studiare i cambiamenti specifici che avvengono nel microbiota intestinale della capra quando si adottino strategie nutrizionali mirate a limitare la produzione di metano.

Tutto ciò considerato, il progetto CASCO ha valutato gli effetti dell’integrazione alimentare con tre concentrazioni crescenti di tannini estratti dal quebracho sul microbiota ruminale della capra. Lo studio è

stato inoltre esteso al microbiota fecale, con l'obiettivo di ottenere un quadro più completo ma anche di valutare se l'analisi del solo campione di feci, molto semplice da prelevare, consenta di ricavare un quadro sufficientemente informativo delle alterazioni del microbiota evitando di ricorrere al campionamento ruminale, più invasivo, traumatico ed impegnativo. In sintesi, il lavoro di ricerca ha avuto i seguenti obiettivi:

- Valutare l'impatto dell'integrazione della dieta con tannini 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, fra cui il metano;
- 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.

In un modello a quadrato latino, otto capre pluripare in lattazione hanno ricevuto quattro diverse diete; una di base e tre integrate con **concentrazioni crescenti di estratti di quebracho (2%, 4% e 6%)**.



Al termine del progetto, sono stati ottenuti 8 campioni di rumine ed 8 di feci per ciascuna dieta. La composizione e i cambiamenti delle comunità microbiche ruminali e fecali sono stati valutati con un approccio "omico", ovvero con metodiche sperimentali che affrontano il campione "in toto" anziché misurare il cambiamento di pochi microrganismi specifici (ad es. con la PCR). Ciò rende possibile ottenere una prospettiva generale di cosa cambia nelle popolazioni che compongono il microbiota e in quale direzione, vale a dire quali gruppi aumentano e quali diminuiscono in risposta ai cambiamenti della dieta, al fine di ricavare indicazioni sui possibili cataboliti (prodotti di scarto) generati, fra cui il metano.

Ma veniamo ora ai risultati ottenuti. Nel rumine, l'integrazione dei mangimi con tannini estratti dal quebracho ha ridotto la biodiversità del microbiota ruminale delle capre (la cosiddetta alfa-diversità), in maniera proporzionale alla concentrazione di tannini nella dieta. I campioni corrispondenti alla stessa dieta erano più simili fra loro rispetto ai campioni corrispondenti alle altre

diete, raggruppandosi in funzione della concentrazione di tannini (anche la beta-diversità è stata quindi significativa). In termini di gruppi microbici (le tassonomie), andando dal generale al particolare, in primo luogo si è osservata l'inversione dei rapporti fra i due phylum principali, Firmicutes e Bacteroidota; da 1,06 nella dieta di controllo si è scesi fino a 0,63. Queste due rilevanti componenti del microbiota fermentano i carboidrati in modo differente; i primi sono maggiormente associati con la produzione di acetato mentre i secondi con quella di butirato. È inoltre aumentata l'abbondanza dei batteri fibrolitici (che sono passati da 0,63% fino a 1,24%) già con il 2% di estratto, e sono cambiati i rapporti fra le famiglie batteriche responsabili della degradazione di cellulosa ed emicellulosa. Ma una delle osservazioni forse più interessanti è stata la riduzione significativa degli Euryarcheota, il phylum responsabile della produzione di metano. Si è infatti passati da un'abbondanza relativa percentuale del 34,75% fino al 27,50% già nella dieta addizionata con il 2% di estratto di tannini. La riduzione dei metanogeni si è confermata fino a livello di genere:

Methanobrevibacter è passato da un'abbondanza percentuale del 6,66% fino al 2,26% con il 6% di estratto. Come ulteriore effetto positivo, e coerentemente con la riduzione di metano, in presenza di tannini sono aumentati i generi produttori di acidi grassi volatili (es. *Succiniclasticum*). Le differenze osservate erano generalmente significative solo alle concentrazioni di tannini più elevate; tuttavia, un prolungamento della strategia nutrizionale potrebbe portare a cambiamenti significativi anche con concentrazioni inferiori, grazie all'effetto di contrasto alla resilienza del microbiota con l'instaurazione di un adattamento delle popolazioni microbiche ruminali al nuovo regime alimentare.

Per quanto riguarda i risultati osservati nel campione di feci, anche in questo caso si è visto un generale calo della diversità, ma non è stata raggiunta la significatività statistica. L'impatto dei tannini sul microbiota fecale è stato quindi meno intenso, e l'analisi delle feci non ha catturato il calo di biodiversità avvenuto nel rumine. Le osservazioni sui cambiamenti della tassonomia sono state inoltre differenti da quelle del rumine; paradossalmente, in questo campione si è visto un incremento dei metanogeni, con un comportamento inverso rispetto a quello avvenuto nel rumine. L'utilizzo del solo campione fecale quindi, benché più agevole ed utile per ottenere un quadro più completo, potrebbe essere insufficiente o fuorviante come proxy dei cambiamenti ruminali. Resta quindi preferibile ricorrere al campionamento del rumine per l'ottenimento di informazioni complete ed affidabili sugli effetti della dieta nei confronti delle popolazioni microbiche intestinali della capra.

Possiamo quindi riassumere di seguito i **risultati principali del lavoro di ricerca**:

- I tannini **riducono** significativamente la diversità del microbiota ruminale anche nella capra;
- La **biodiversità** del microbiota **diminuisce proporzionalmente** all'aggiunta di tannini alla dieta;
- I campioni corrispondenti alla stessa dieta mostrano una tendenza a raggrupparsi fra loro, seguendo la concentrazione di tannini;
- In termini tassonomici (funzioni potenziali), i tannini inducono differenze statisticamente significative nella composizione del microbiota, apparentemente in senso positivo;
- **L'abbondanza** relativa dei **metanogeni cala** in modo significativo;
- Cambiano i rapporti fra i phyla produttori di acetato/propionato a vantaggio del butirrato;
- **I batteri fibrolitici aumentano** e cambiano i rapporti fra le famiglie batteriche responsabili della degradazione di cellulosa ed emicellulosa;
- Aumentano i taxa produttori di acidi grassi a catena corta (SCFA);
- **Il campione fecale non riflette correttamente i cambiamenti che avvengono nel rumine**; molte osservazioni non sono statisticamente significative e il comportamento di alcune popolazioni microbiche è differente nei due tipi di campione. Per un corretto studio dell'impatto della dieta sul microbiota, resta quindi preferibile l'utilizzo del campione ruminale.

Bibliografia

Aboagye, I.A., and K.A. Beauchemin. 2019. Potential of molecular weight and structure of tannins to reduce methane emissions from ruminants: a review. *Anim. Open Access J.* 9:856.

Battelli M, Colombini S, Parma P, Galassi G, Crovetto G M, Spanghero M, Pravettoni D, Zanzani S A, Manfredi M T, Rapetti L. 2023. In vitro effects of different levels of quebracho and chestnut tannins on rumen methane production, fermentation parameters, and microbiota. *Frontiers in Veterinary Science*, 10,1178288

Cremonesi, P., G. Conte, M. Severgnini, F. Turri, A. Monni, E. Capra, L. Rapetti, S. Colombini, S. Chessa, G. Battelli, S.P. Alves, M. Mele, and B. Castiglioni. 2018. Evaluation of the effects of different diets on

microbiome diversity and fatty acid composition of rumen liquor in dairy goat. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 12:1856–1866.

Fliegerova, K.O., S.M. Podmirseg, J. Vinzelj, D.J. Grilli, S. Kvasnová, D. Schierová, H. Sechovcová, J. Mrázek, G. Siddi, G.N. Arenas, and G. Moniello. 2021. The effect of a high-grain diet on the rumen microbiome of goats with a special focus on anaerobic fungi. *Microorganisms* 9:157.