

Università degli Studi di Padova  
Facoltà di Agraria e Medicina Veterinaria  
Dipartimento di Biomedicina Comparata all'Alimentazione

---

*Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione*

TESI DI LAUREA

EFFETTO DELLA DIETA SULLE COMUNITA' MICROBICHE RUMINALI DELLA  
PECORA TRAMITE ANALISI NGS

*Relatore:*

Prof.ssa Sara Pegolo

*Laureanda:*

Anita Baccini

N. matricola: 2004086

*Correlatori:*

Dott.ssa Alice Vanzin

Prof. Mauro Dacasto

# SOMMARIO

<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1.1 IMPORTANZA DEL SETTORE CASEARIO OVINO IN SARDEGNA	6
1.2 QUALITA' E CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEL LATTE OVINO	9
1.3 UTILIZZO DELL'ERBA MEDICA (ALFALFA) NELL'ALIMENTAZIONE OVINA	14
1.3.1 RELAZIONE TRA DIETA E QUALITA' DEL LATTE	17
1.4 IL MICROBIOTA DI LIQUIDO RUMINALE, LATTE E FECI	21
IL MICROBIOTA RUMINALE OVINO	21
IL MICROBIOTA FECALE OVINO	28
IL MICROBIOTA DEL LATTE OVINO	30
1.4.1 RELAZIONE TRA MICROBIOTA E STATO DI SALUTE E METABOLICO DELL'ANIMALE	32
1.4.2 RELAZIONE TRA MICROBIOTA E QUALITA' DEL LATTE	35
1.4.3 VARIABILITA' DEL MICROBIOTA RUMINALE A SECONDA DELLA DIETA	36
1.5 TECNICHE DI ANALISI METAGENOMICHE	40
1.5.1 SHOTGUN METAGENOME SEQUENCING	47
1.5.2 RIBOSOMAL 16S	51
1.6 OBIETTIVO DELLA TESI	56
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>58</b>
2.1 DISEGNO SPERIMENTALE	58
2.2 CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	61
2.3 ESTRAZIONE DEL DNA DA LATTE, FECI E LIQUIDO RUMINALE	62
2.3.1 ESTRAZIONE DEL DNA DAL LATTE	62
2.3.2 ESTRAZIONE DA FECI E LIQUIDO RUMINALE	65
2.3.3 QUANTIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO	68
2.4 COSTRUZIONE DELLE LIBRERIE PER IL SEQUenziAMENTO	68
2.4.1 KIT UTILIZZATO E PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO	68
2.4.2 PROCEDURA	69

<b>2.5</b>	<b>SEQUENZIAMENTO CON TECNOLOGIA <i>ION TORRENT</i></b>	<b>75</b>
<b>2.6</b>	<b>ANALISI BIOINFORMATICA</b>	<b>81</b>
<b>2.7</b>	<b>ANALISI STATISTICHE</b>	<b>83</b>
<b>3.</b>	<b><u>RISULTATI</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b>4.</b>	<b><u>DISCUSSIONE</u></b>	<b><u>99</u></b>
<b>5.</b>	<b><u>CONCLUSIONI</u></b>	<b><u>104</u></b>
	<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b><u>106</u></b>
	<b><u>SITOGRAFIA</u></b>	<b><u>120</u></b>
	<b>BIBLIOGRAFIA IMMAGINI</b>	<b>121</b>
	<b><u>RINGRAZIAMENTI</u></b>	<b><u>122</u></b>

## ABSTRACT

Dairy sheep breeding play an important role in the agri-food sector in Italy. As for all the other compartments in this sector, a global challenge is underway to make the production processes related to agriculture and livestock more eco-sustainable and efficient, increasing the quality of the related finished products. This objective is achieved through techniques such as the selection and genetic improvement of plants and animals, the precision agriculture and animal husbandry or the implementation of activities associated with the circular economy, which see farms inter-operate with each other with the goal of transforming the output of one into input for the other and *viceversa*. In this context, the overall purpose of the project to which this thesis belongs is to increase the technological quality of sheep's milk through precision feeding techniques. Specifically, the goal is to find indicators of cheesemaking aptitude in dairy sheep and implement a series of actions to improve it through diet modulation. Being ruminants, sheeps host a complex structure of microbial communities in the rumen which, by fermenting and degrading what is ingested by the animal, regulates its digestion, absorption, the possible production of secondary substances and the correct functioning of the digestive system in general. It is also known that the composition of the rumen microbiota varies according to the type of diet that the host adopts, probably also affecting the products that derive from the animal, such as milk. In this study, we evaluated the differences in the ruminal microbial composition upon two diets that differed for the amount of alfalfa (*Medicago sativa*) and starches. The metagenomic analysis was conducted by sequencing the hypervariable regions V2-4-8 and V3-6, 7-9 of the 16S ribosomal gene with IonTorrent® technology.

The results obtained did not highlight significant differences between the control group and the treated one; the predominant *phyla* were Bacteroidetes, Proteobacteria and Firmicutes. The most frequently found genera corresponded to *Prevotella* and unidentified Succinivibrionaceae, genera which were associated with ruminants feed conversion efficiency. Milk parameters also

did not show significant differences, indicating the need for further investigations on the effect of alfalfa on rumen microbiota and milk quality.

## RIASSUNTO

L'allevamento ovino e i prodotti alimentari che ne derivano occupano in Italia un'importante posizione nel settore agroalimentare. Come per tutti gli altri compartimenti di questo settore è in atto una sfida a livello globale per rendere più eco-sostenibili ed efficienti i processi produttivi legati ad agricoltura e allevamento, aumentando la qualità dei relativi prodotti finiti. Questo obiettivo si raggiunge attraverso tecniche come la selezione e il miglioramento genetico di piante e animali, come l'agricoltura e la zootecnia di precisione o l'implementazione di attività associate all'economia circolare, che vedono inter-operare allevamenti e aziende agricole in modo da trasformare l'output degli uni in input per gli altri e viceversa. Stringendo un po' il campo, la finalità dello studio in cui si inserisce questa Tesi di laurea è quella di aumentare la qualità tecnologia del latte di pecora attraverso tecniche di alimentazione di precisione. Ciò significa trovare degli indicatori che permettano di stabilire l'attitudine casearia del latte prodotto dagli animali e mettere in atto una serie di azioni per migliorarlo attraverso la modulazione della dieta. Essendo ruminanti, gli ovini ospitano nel rumine una complessa struttura di comunità microbiche che, fermentando e degradando ciò che viene ingerito dall'animale, ne regola la digestione, l'assorbimento, l'eventuale produzione di sostanze secondarie e il corretto funzionamento del sistema digerente in generale. È inoltre noto che la composizione del microbiota ruminale varia a seconda del tipo di dieta che l'ospite adotta, andando probabilmente a influenzare anche i prodotti derivati, come appunto il latte. La correlazione che si ha provato quindi a dimostrare è quella che esiste tra composizione microbica del rumine e attitudine casearia del latte prodotto, mettendo a confronto questi due parametri ottenuti da due gruppi di animali sperimentali alimentati con due diete che differivano sulla quantità di alfalfa (*Medicago sativa*) e amidi. L'analisi metagenomica è stata condotta sequenziando le regioni ipervariabili V2-4-8 e V3-6, 7-9 del gene ribosomiale 16S con la tecnologia IonTorrent®.

I risultati ottenuti non hanno messo in luce significative differenze tra il gruppo di controllo e quello trattato; i *phyla* predominanti erano Bacteroidetes, Proteobacteria e Firmicutes. I generi più ritrovati corrispondevano a *Prevotella*, *Succinivibriaceae* non identificate e *Succinivibrio*,

generi associati all'efficienza di conversione alimentare dei ruminanti. Anche i parametri del latte non hanno mostrato differenze significative, indicando la necessità di ulteriori approfondimenti sull'effetto dell'erba medica sul microbiota ruminale.

## 1. INTRODUZIONE

Il progetto di Tesi sviluppato in questi mesi trova spazio in diversi ambiti di ricerca nel campo delle produzioni animali e alimentari, in particolare quello dell'alimentazione di precisione, dello studio del microbiota correlato alla dieta e del miglioramento della qualità tecnologica del latte nell'ottica della caseificazione.

Nel corso dell'ultimo decennio, il settore della produzione di alimenti di origine animale si è trovato ad affrontare una serie di sfide legate all'impatto ecologico della filiera e alla percezione che ne ha il consumatore (sempre più attento all'argomento), al rispetto del benessere animale, alla qualità e provenienza delle materie prime e del prodotto finito, al raggiungimento di un'economia circolare che ottimizzi i processi in modo da abbassare i costi e gli sprechi (Ward et al., 2016). Questi sono obiettivi che per essere raggiunti richiedono la cooperazione e l'impegno di tutti gli attori della filiera, dagli agricoltori, agli allevatori, ai distributori e anche ai consumatori. Appare chiaro che il mondo della ricerca in questo settore assume un ruolo decisivo, in quanto grazie alle conoscenze sempre più profonde che ha consentito di ottenere pone le basi per lo sviluppo di nuove tecniche e, in generale, di nuove prospettive. Enormi potenzialità in questo contesto sono associate alle biotecnologie, che nei decenni hanno rivoluzionato molti aspetti del settore agro-zootecnico. La possibilità di accedere alle informazioni contenute nel DNA e studiarle correlandole ai rispettivi caratteri fenotipici, ha permesso lo sviluppo di tecniche quali la selezione e il miglioramento genetico attraverso incroci controllati, lo studio e la caratterizzazione di varietà e di razze in specie animali e vegetali, il *genome editing*. Un tema molto legato allo sviluppo delle biotecnologie il cui interesse, infatti, è esploso negli ultimi vent'anni, è il concetto di microbiota e lo studio delle funzioni che esercita nei confronti dell'ospite. La curiosità e l'interesse che i ricercatori nutrono da sempre nei confronti del mondo dei microrganismi ha permesso la comprensione e l'approfondimento di innumerevoli fenomeni fisio-patologici e ambientali legati a piante, animali e umani e con l'avvento delle tecnologie di sequenziamento del DNA e della bioinformatica questo livello di conoscenze è notevolmente aumentato (Mardis, 2016). La caratterizzazione del microbiota presente in una determinata nicchia ecologica (che può essere



suolo, acqua, tratto gastro-intestinale, pelle, feci, matrici alimentari) è diventata un'analisi quasi di *routine* in vari ambiti di ricerca, primo fra tutti quello della medicina umana seguito da quello zootecnico, agroalimentare, ambientale (Nazir, 2016). Le potenzialità legate a questo tipo di studi consistono, per esempio, nella possibilità di eseguire analisi comparative tra individui sani e malati e trovare eventuali relazioni con le composizioni del rispettivo microbiota, correlare la produttività di animali di interesse zootecnico al microbiota che presentano, sviluppare probiotici in grado di modulare il microbiota residente per migliorare lo stato di salute o le *performance* produttive, comprendere come diversi tipi di dieta abbiano un determinato impatto sulle funzioni fisiologiche collegate all'azione del microbiota nei confronti dell'ospite, approfondire e gestire il problema dell'antibiotico-resistenza.

In questo contesto trova spazio il progetto nel quale si inserisce questo lavoro di Tesi, che ha come obiettivo la caratterizzazione del microbiota del latte, delle feci e del liquido ruminale di pecore di razza Sarda sottoposte a due differenti diete, in un'ottica di miglioramento quantitativo delle produzioni e della gestione dell'impatto ambientale delle produzioni zootecniche.

## 1.1 IMPORTANZA DEL SETTORE CASEARIO OVINO IN SARDEGNA

La tradizione dell'allevamento ovino in Sardegna rappresenta una caratteristica imprescindibile da questo territorio, visto il rilievo socio-economico a cui è da sempre associata. Il settore ovino è considerato quello che più di tutti ha intrapreso la via dello sviluppo e dell'innovazione in una regione che si distingue per il forte legame alle tradizioni storico-culturali. Le pecore sono animali perfettamente in grado di adattarsi a condizioni climatiche rigide e a territori ispidi per scarsità di acqua e vegetazione, perciò la tradizione del loro allevamento caratterizza regioni e paesi nel mondo più o meno svantaggiati a livello di morfologia e fertilità del terreno, come alcuni Paesi dell'America Latina e del Medio Oriente Asiatico. Nella dimensione europea possiamo associare queste caratteristiche alla Sardegna, dove il territorio è per il 67% di tipo collinare e solo il 20% è ritenuto idoneo all'agricoltura. (Idda et al., 2010). Gli allevamenti ovicaprini nel nostro Paese, in generale, giocano un ruolo fondamentale per il mantenimento

sociale, economico e culturale di aree marginali dove sarebbe complicato introdurre altre realtà produttive (Ismea, Report n.1/2022): la Sardegna, prima più e ora meno, si è sempre rispecchiata in questa situazione socio-territoriale. La popolazione residente si dedica da lungo tempo all'allevamento di pecore e lo fa in modo più o meno estensivo, aspetto che ha sempre contribuito al mantenimento dell'equilibrio tra pascolamento, biodiversità e conservazione delle risorse naturali (Pulino et al., 2018). È stimato che il 96% degli allevamenti e delle aziende agricole in Sardegna siano caratterizzati da gestione familiare (Pulino et al., 2018), peculiarità che riflette il meccanismo generazionale su cui si fonda la tradizione socio-culturale di questo settore.

È importante considerare che, in Sardegna, il comparto turistico esercita un importante peso su quello agro-zootecnico, in quanto all'altissima affluenza stagionale di turisti consegue un grande aumento della vendita e del consumo di prodotti tipici (Pulino et al., 2018).

Nel 2020 in Italia si contavano 85.880 allevamenti ovini per un totale di 6.492.539 capi, il cui 55% è deputato alla produzione di latte (Ismea Mercati, Scheda del Settore 2022); in Sardegna si collocano circa il 17% degli allevamenti (precisamente ne se contano 18.600 nel 2022, VetInfo, Anagrafe Nazionale Zootecnica – Statistiche 2022) e ben il 47% del totale dei capi ovini italiani (precisamente se ne contano 2.986.828 nel 2022, VetInfo, Anagrafe Nazionale Zootecnica – Statistiche 2022) (Ismea Mercati, Scheda del Settore 2022). In generale, l'allevamento e la produzione alimentare legata al comparto ovino si riconduce per la gran parte (circa l'80%) a tre regioni del centro-sud Italia ossia Lazio, Toscana e Sardegna, dove è generato il 60% del valore complessivo del settore latte ovino italiano (Ismea, Report n.1/2022). Tra il 2015 al 2020 è stata registrata una flessione nel numero degli allevamenti ovini in Italia del 6%, a causa del mancato ricambio generazionale e della mancanza di manodopera (Ismea Mercati, Scheda del Settore 2022). Ad oggi, la tipologia di allevamento più diffusa in Sardegna è rappresentata dall'allevamento "semintensivo sardo", con una media di 250 capi per allevamento e una produzione individuale di latte che si aggira tra i 230 e i 300 litri (Ismea Mercati, Scheda del Settore 2022). L'orientamento produttivo è nettamente rivolto verso il latte, con il quale si producono prevalentemente formaggi a pasta dura, sia DOP che non (Ismea Mercati, Scheda

del Settore 2022). La razza ovina più diffusa in Sardegna è quella Sarda, di cui si contano circa 2.500.000 di capi in tutta l'isola (ANSA, 21/05/2022). Si tratta di una razza con spiccata attitudine alla produzione di latte, con lattazioni che vanno da 100 l di latte per le primipare fino ad arrivare a 300 l per i capi più produttivi (IZS Sardegna); inoltre è stato dimostrato che in questa razza aumentando il pascolo aumenta anche la produzione di latte (Porcheddu, 2006).

In Sardegna si produce il 68.92% del latte di pecora prodotto in Italia e il 10% di quello prodotto in Europa (dato che pone l'Italia al terzo posto in Europa per produzione di latte ovino, Ismea, Report n.1/2022), (Agenzia Laore, 2020). Più precisamente, nel 2020 in Sardegna sono stati raccolti più di 3 milioni di quintali di latte di pecora, in leggerissima flessione rispetto ai tre anni precedenti (Istat 2022, consultazione del 20/10/2022). L'Isola si distingue inoltre per aver prodotto, nel 2019, 60.000 tonnellate di formaggi a base di latte di pecora, metà delle quali hanno dato origine a prodotti DOP (Agenzia Laore, 2020).

Tema caldo degli ultimi anni nel nostro Paese è stato il prezzo del latte ovino pagato agli allevatori sardi dalle aziende trasformatrici. Infatti, rispetto al prezzo pagato in regioni come Lazio e Toscana – dove il settore ovino gioca un ruolo importante in termini produttivi ed economici – in Sardegna questo valore si è sempre mantenuto ampiamente al di sotto, fino al settembre del 2021 dove ha raggiunto il suo picco (110€/100 l), per arrivare a un valore di 103€/100 l nel giugno 2022, che corrisponde comunque ad un +18.7% rispetto alla media nel 2021 (Ismea, Report n.1/2022). Al contrario, il prezzo del Pecorino Romano – punta di diamante del settore produttivo ovino in Sardegna – si caratterizza per essere aumentato costantemente nel periodo tra il 2019 e il 2021 (Ismea Mercati, Scheda del Settore 2022), fino a superare il prezzo del Parmigiano Reggiano a giugno 2022 (ANSA, 23/9/22). I principali Paesi esteri coinvolti nell'export del Pecorino Romano DOP sono Stati Uniti, Germania, Francia e Regno Unito, i quali hanno fatto registrare flessioni negli acquisti legate all'emergenza Covid-19 durante il 2021 (Ismea, Report n.1/2022), ma che già nel primo quadrimestre del 2022 hanno mostrato una spiccata ripresa. In generale, l'export di prodotti lattiero-caseari sardi contribuisce al 2.4% del ricavato totale delle esportazioni della Regione (Di Liberto e Pau, 2022). L'andamento sul mercato del Pecorino Romano DOP rappresenta un dato molto rilevante per

l'intera filiera del settore lattiero-caseario ovino sardo, in quanto rappresenta l'80% dei formaggi ovini DOP/IGP in termini di produzione e di fatturato realizzati a livello nazionale. Restrungendo il campo alla Sardegna, il Pecorino Romano rappresenta il prodotto finale per il 95% dal latte ovino prodotto (Ismea, Report n.1/2022), dato che sottolinea l'estrema importanza della sua produzione.

Mostrandosi chiaramente la rilevanza del settore lattiero-caseario ovino in Italia ma soprattutto in Sardegna, è fondamentale per gli attori della filiera acquisire conoscenze sempre maggiori in termini di buone pratiche di allevamento, fisiologia degli animali allevati, formulazione di diete *ad hoc*, caratteristiche tecnologiche del latte. Lo studio del microbiota ruminale, che rappresenta l'obiettivo di questa Tesi, fa parte del progresso nella ricerca in campo zootecnico volta a migliorare e ottimizzare, in generale, il sistema di allevamento e la relativa produzione di derivati del latte e della carne.

## 1.2 QUALITA' E CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEL LATTE OVINO

Il latte di pecora presenta buona attitudine alla caseificazione (Vacca et al., 2019), in quanto contiene più proteine, grassi e minerali del latte di capra e vacca, caratteristica che conferisce ai prodotti da esso derivati un altissimo valore nutrizionale insieme appunto a proprietà tecnologiche soddisfacenti (Araújo-Rodrigues et al., 2020). Il latte ovino viene raramente consumato liquido (Balthazar et al., 2017): la maggior parte della produzione mondiale viene destinata alla caseificazione perciò la qualità tecnologica della materia prima "latte" assume un'importanza notevole (Pirisi et al., 2007). La Tabella 1 riporta le composizioni dei lattini prodotti da vacca, pecora e capra, poste a confronto. Si può facilmente carpire come il latte di pecora presenti una frazione solida nettamente maggiore rispetto agli altri due. Alto contenuto di grassi, proteine e sostanza secca totale si traduce in alta resa durante la caseificazione, che per il latte di pecora si attesta essere circa del 20% (Araújo-Rodrigues et al., 2020).

Il latte di pecora presenta un contenuto proteico maggiore rispetto a quello di vacca e di capra, stando ad indicare una qualità tecnologica superiore (Bencini et al., 1997). Inoltre, presenta una

maggior capacità tampone del latte bovino, com'è stato dimostrato nello studio di Sanjuan et al. (2003) dove nei campioni di latte pecorino non si sono registrate variazioni di pH (rimasto al valore di 6,77) nell'arco di 96 ore.

Tabella 1. Composizione del latte di vacca, capra e pecora messe a confronto. Fonte: Balthazar et al., 2017.

Parameter	Cow milk	Goat milk	Sheep milk
Moisture (g/100 g)	87.9 ± 0.5	87.6 ± 0.7	82.9 ± 1.4
Fat (g/100 g)	3.3 ± 0.2	3.8 ± 0.1	5.9 ± 0.3
Ash (g/100 g)	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Lactose (g/100 g)	4.7 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.8 ± 0.4
Protein (g/100 g)	3.4 ± 0.1	3.7 ± 0.1	5.5 ± 1.1
Casein (g/100 g)	3.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1	4.7 ± 0.5
αs1-casein (%) <sup>b</sup>	39.7	5.6	6.7
αs2-casein (%) <sup>b</sup>	10.3	19.2	22.8
β-Casein (%) <sup>b</sup>	32.7	54.8	61.6
κ-Casein (%) <sup>b</sup>	11.6	20.4	8.9

Per questi motivi il latte di pecora è impiegato per la produzione di formaggi tipici (Selvaggi et al., 2014), derivati appunto dal latte ma anche dal siero (Balthazar et al., 2017).

Le caratteristiche genetiche influenzano qualitativamente e quantitativamente i parametri del latte (Albenzio et al., 2011), insieme a fattori ambientali (Selvaggi et al., 2017) come la razza, l'età, il tipo di allevamento, la dieta, la modalità di mungitura (Reinemann, D. J., 2017), lo stadio di lattazione, il numero di parti, il peso della pecora (Bencini et al., 1997), l'insorgenza di patologie (Balthazar et al., 2017) e il periodo in cui avviene la lattazione (Araújo-Rodrigues et al., 2020). È noto, inoltre, che la composizione del latte di pecora varia in base alla stagione in cui viene prodotto (Araújo-Rodrigues et al., 2020, Balthazar et al., 2017). In particolare riferimento alla razza Sarda, il latte prodotto da queste pecore risulta essere alquanto variabile, caratteristica che rende i prodotti derivati da esso unici e non standardizzati (Vacca et al., 2019). In Italia questa razza è diffusa soprattutto per la grande resa e qualità del latte. (Vacca et al., 2019).

Come riportato da Balthazar et al. (2017) il beta-carotene presente nel latte di pecora viene convertito in retinolo, connotato che rende il latte di più ricco di vitamina A e soprattutto più bianco, caratteristica tecnologica positiva per la produzione di determinati formaggi (Tamime et al., 2011). Altre due peculiarità che contraddistinguono il latte di pecora sono (1) l'assenza di agglutinine – proteine coinvolte nell'aggregazione delle caseine – che ne aumenta la

digeribilità (Balthazar et al., 2017) e (2) la bassa attitudine a fare sviluppare allergie o intolleranze (Balthazar et al., 2017), per la maggior parte legate alle proteine del siero. Come affermano Pirisi et al. (2007) la qualità finale della materia prima dipende in larga parte anche dalle caratteristiche igieniche, come la carica microbica totale e la quantità di cellule somatiche. In seguito questi aspetti influiranno sulle proprietà di coagulazione del latte, che dipendono anche dalla qualità del processo di caseificazione.

La porzione proteica del latte costituisce quella più rilevante dal punto di vista tecnologico. Come afferma Vacca et al. (2019) più proteine sono presenti maggiore sarà la resa della cagliata, in quanto si originerà una miglior matrice proteica in grado di trattenere più grasso e altre sostanze nella cagliata. Le proteine del latte possono essere suddivise in solubili (rappresentate dalle proteine del siero) e insolubili (rappresentate dalla frazione caseinica) (Balthazar et al., 2017). Le caseine rappresentano l'80% delle proteine totali del latte di pecora, all'interno del quale si ritrovano  $\alpha$ -s1 caseina,  $\alpha$ -s2 caseina,  $\beta$ -caseina (presente in 2 forme) e k-caseina (Park et al., 2007) nelle rispettive percentuali di 6.7%, 22.8%, 61.6% e 8.9% (Selvaggi et al., 2014). In grammi risultano essere 4.2-5.5g/100g di caseine e 1.02-1.3g/100g di proteine del siero (Selvaggi et al., 2014). Le caseine sono considerate uno dei principali componenti nel processo di coagulazione (Vacca et al., 2019). Il siero contiene principalmente  $\alpha$ -lattoalbumina e  $\beta$ -lattoglobulina, siero-proteine che nel latte di pecora risultano essere particolarmente termostabili conferendo un'ottima consistenza ai prodotti da esso derivati (Balthazar et al., 2017).

Le caseine sono presenti nel latte sotto forma di micelle sferiche che nella pecora presentano un diametro di circa 193 nm (Balthazar et al., 2017) e sono più mineralizzate rispetto a quelle del latte di altre specie, il che si traduce in un vantaggio tecnologico in quanto non è necessaria l'aggiunta di carbonato di calcio in fase di precipitazione della cagliata; sono inoltre meno idratate rispetto a quelle del latte di vacca. La presenza di calcio è fondamentale alla corretta coagulazione delle caseine, in quanto lo ione interagisce con le porzioni fosforilate delle proteine consentendone l'aggregazione. Osservando la Tabella 2 si può denotare l'importante presenza di calcio e altri minerali nel latte di pecora rispetto a quello di vacca e capra.

Tabella 2. Contenuto di vitamine e minerali del latte di vacca, capra e pecora. Fonte: Balthazar et al., 2017.

Parameter	Cow milk	Goat milk	Sheep milk
<b>Minerals</b>			
Calcium (mg/100 g)	112.0 ± 14.5	130 ± 4.0	197.5 ± 2.5
Iron (mg/100 g)	0.1 ± 0.1	0.06 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Magnesium (mg/100 g)	11.0 ± 0.5	14.5 ± 1.5	19.5 ± 3.0
Phosphorous (mg/100 g)	91.0 ± 5.5	109 ± 12.0	141.0 ± 1.7
Potassium (mg/100 g)	145.0 ± 11.5	185.5 ± 4.5	138.0 ± 2.0
Sodium (mg/100 g)	42.0 ± 6.5	39.5 ± 1.5	39.0 ± 7.0
Zinc (mg/100 g)	0.4 ± 0.0	0.43 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Copper (mg/100 g)	Trace	0.04 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Selenium (μg/100 g)	1.8 ± 1.3	1.665 ± 0.4	1.7 ± 1.0
Manganese (μg/100 g)	6.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	7.15 ± 1.8
<b>Vitamins</b>			
Retinol (μg/100 g)	35.0 ± 8.0	0.04 ± 0.0	64.0 ± 19.5
Carotenoids (μg/100 g)	16.0 ± 8.0	Trace	Trace
Vitamin A (μgRE/100g)	37.0 ± 8.0	54.32 ± 0.0	64.0 ± 5.5
Vitamin E (mg/100 g)	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.0	0.11 ± 0.01
Thiamin (mg/100 g)	0.04 ± 0.01	0.059 ± 0.0	0.07 ± 0.01
Riboflavin (mg/100 g)	0.2 ± 0.01	0.175 ± 0.0	0.3 ± 0.02
Niacin (mg/100 g)	0.13 ± 0.05	0.235 ± 0.0	0.41 ± 0.05
Pantothenic acid (mg/100 g)	0.43 ± 0.12	0.31 ± 0.0	0.43 ± 0.02
Vitamin B <sub>6</sub> (mg/100 g)	0.04 ± 0.01	0.048 ± 0.0	0.07 ± 0.01
Folate (μg/100 g)	8.5 ± 1.5	1.0 ± 0.0	6.0 ± 0.06
Biotin (μg/100 g)	2.0 ± 0.5	1.75 ± 0.3	2.5 ± 0.0
Vitamin B <sub>12</sub> (μg/100 g)	0.5 ± 0.3	0.065 ± 0.0	0.66 ± 0.05
Vitamin C (mg/100 g)	1.0 ± 0.5	1.295 ± 0.0	4.6 ± 0.4
Vitamin D (μg/100g)	0.2 ± 0.1	0.15 ± 0.1	0.2 ± 0.0

Un altro vantaggio è che risulta essere necessaria una minor componente enzimatica rispetto al latte di vacca per dare una cagliata soddisfacente (Balthazar et al., 2017)

La componente lipidica presente nel latte si trova in stato colloidale sotto forma di globuli di grasso, che nella pecora presentano un diametro di circa 3.5 μm (Park et al., 2007), minore di quello che caratterizza il grasso del latte di vacca e che conferisce determinate caratteristiche di *texture* ai prodotti pecorini. La maggior parte degli acidi grassi sono saturi (circa il 70%, Balthazar et al., 2017) e sono rappresentati principalmente da acido caproico, caprilico e caprico. Messo a confronto con altre specie di ruminanti, il latte di pecora è quello che presenta più coniugati dell'acido linoleico, acidi grassi insaturi benefici per la salute del consumatore (Balthazar et al., 2017). È importante considerare che il profilo acidico varia in base alla stagione, che comporta cambiamenti a livello di composizione dei foraggi (Balthazar et al., 2017). Dal punto di vista tecnologico la frazione lipidica del latte si trova "subordinata" alle caseine, le quali devono riuscire a imbrigliarne il più possibile all'interno della matrice proteica che generano. Vacca et al. (2019) affermano infatti che i lipidi influenzano in misura minore le proprietà di coagulazione rispetto alle proteine e al lattosio; gli autori hanno però constatato che all'aumentare del contenuto di grasso si abbassava l'efficienza di caseificazione. Il valore di

REC (*curd nutrient recovery* o quota di nutrienti trattenuta dalla cagliata, Vacca et al., 2019) citato nello studio e riferito ai grassi risulta essere particolarmente importante dal momento in cui essi sono i componenti più coinvolti nel *flavour* che caratterizza tutti i prodotti lattiero-caseari.

È necessario porre adeguata attenzione sul contenuto di cellule somatiche del latte, in quanto ne influenzano la qualità, le proprietà tecnologiche e il processo di caseificazione in generale (Caboni et al., 2017). Esse derivano per un 10% dallo sfaldamento del tessuto mammario e il restante 90% è costituito da leucociti (Bencini et al., 1997); la loro presenza è correlata allo stato di salute dell'animale e in linea generale il valore fisiologico che caratterizza il latte di pecora è 265.000 cellule/ml (Rosati et al., 2005). Bencini et al. (1997) hanno osservato che l'aumento di cellule somatiche avviene in concomitanza con la diminuzione di grassi, proteine e sostanza solida totale e con l'aumento di azoto non proteico e proteine del siero. Sevi (2007) ha osservato che la qualità microbiologica e l'attitudine alla coagulazione diminuiscono notevolmente quando il contenuto di cellule somatiche supera il valore di 700.000 cellule/ml; l'autore spiega poi come la presenza di cellule somatiche implichi una maggiore attività delle plasmine (enzimi endogeni responsabili della proteolisi nel latte), che causano la proteolisi delle  $\alpha$  e  $\beta$  caseine.

Per determinare le proprietà di coagulazione del latte (MCP – *Milk Coagulation properties*) molto spesso si utilizza il lattodinamografo Formagraph (Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark) strumento che stima tre parametri: (1) RCT (*rennet coagulation time*) cioè l'intervallo di tempo che intercorre tra l'aggiunta del caglio e l'inizio della formazione del coagulo, (2)  $k_{20}$ , il tempo del rassodamento del coagulo in minuti, (3)  $a_{30}$ , la consistenza del coagulo a 30 minuti dall'aggiunta del caglio. In uno studio del 2014 condotto da Pazzola et al. su pecore di razza Sarda ha fatto registrare un valore medio di RCT di 8.6 minuti, tempo che si discosta significativamente da quello registrato per il latte di vacca che arriva a 10-20 minuti (Bittante et al., 2012). Inoltre nello stesso studio, i valori medi di  $k_{20}$  e  $a_{30}$  (rispettivamente di 2 minuti e 50 mm) si dimostrano migliori nel latte di pecora rispetto quello di vacca; infatti il valore di  $a_{30}$



registrato per vacche di razza Brown Swiss, caratterizzata da un'ottima attitudine alla caseificazione, si ferma a 30 mm (Cipolat-Gotet et al., 2011).

In conclusione, la qualità tecnologica del latte di pecora – sebbene sia influenzata da numerosi fattori – è indubbiamente uno dei punti di forza di questo prodotto, aspetto che sta alla base del suo quasi totale impiego per la caseificazione. Avendo osservato come a livello di composizione il latte pecorino sia notevolmente più ricco di proteine, grassi e minerali rispetto al latte prodotto da altri ruminanti risulta particolarmente importante comprendere più approfonditamente in che modo e in quale misura ogni sua peculiarità contribuisce alla qualità finale dei prodotti, con lo scopo – anche qui – di ottimizzare i processi produttivi e aumentare la qualità del prodotto finale.

### 1.3 UTILIZZO DELL'ERBA MEDICA (alfalfa) NELL'ALIMENTAZIONE OVINA

L'erba medica (*Medicago sativa*), detta alfalfa, viene definita da Samac et al. (2016) la "Regina dei Foraggi", in riferimento al fatto che in molti Paesi del mondo rappresenta un componente base delle diete di ruminanti come vacche, capre e pecore. È una leguminosa che presenta diverse caratteristiche che la portano ad essere una delle alternative predilette per l'alimentazione di questi animali (Liu et al., 2018). È una pianta che viene coltivata in tutto il mondo e utilizzata come foraggio anche per altri animali da reddito. (Yang et al., 2022). L'alfalfa provvede a fornire adeguate quantità di fibre digeribili, vitamine, minerali e proteine necessarie per il sostentamento dell'animale; contemporaneamente presenta grandi potenzialità anche dal punto di vista della produzione di biocarburanti, etanolo e altri bio-prodotti (Samac et al., 2016).

È stato osservato che la coltivazione di alfalfa migliora la qualità del terreno aumentandone la permeabilità nei confronti dell'acqua e implementando la presenza di sostanze organiche (Samac et al., 2016). Kim e Dale (2003) hanno dimostrato che la coltivazione di alfalfa abbatta i costi, soprattutto se messa a confronto con la soia e il mais, considerato che non richiede fertilizzanti azotati. L'utilizzo di alfalfa per il *feeding* di pecore e ruminanti in generale diventa

molto importante in regioni dove le condizioni climatiche impediscono la coltivazione di foraggi stagionali nelle stagioni invernali; essendo l'erba medica una pianta perenne, la sua coltivazione aiuta a sopperire la mancanza di foraggi nelle stagioni più rigide (Li et al., 2007). Inoltre, presenta una spiccata capacità di fronteggiare situazioni di scarsità d'acqua o siccità (Viti et al., 2021). Un aspetto molto importante da sottolineare è che l'alfalfa non è un prodotto alimentare per cui il bestiame compete con l'uomo (Viti et al., 2021), cosa che contribuisce alla sostenibilità del suo utilizzo aumentando l'efficienza dell'agricoltura a livello di terra occupata per il *food* e per il *feed*.

Considerando il peso secco, l'erba medica contiene tra il 18 e il 22% di proteine, la maggior parte concentrata nelle foglie (Arinze et al., 2003). Quando coltivata come *feeding* per i ruminanti, viene infatti raccolta presto, mentre la quantità di foglie è all'apice (Samac et al., 2016). Oltre all'alto contenuto di proteine non è da sottovalutare l'apporto di metaboliti secondari come saponine, cumarine e isoflavoni, sostanze il cui effetto benefico è stato dimostrato nei ruminanti e non solo (Liu et al., 2018). In particolare, è stato osservato su agnelli sperimentali che le saponine contenute nell'erba medica esercitano un effetto positivo sulle performance di crescita, sui livelli di colesterolo e sul sistema immunitario (Yang et al., 2022). L'alfalfa è altresì ricca di flavonoidi antiossidanti, fitoestrogeni e xantofille, i quali vengono trasferiti ai prodotti ricavati dall'allevamento dei ruminanti (carne, latte); ciò viene considerato importante in virtù del fatto che esercitano un impatto positivo anche sulla salute dei consumatori finali di questi prodotti (Hwang et al., 2001 e Stochmal et al., 2001)

L'incremento demografico e il conseguente aumento di domanda di beni alimentari, implica un aumento anche della produzione di mangimi per gli animali di interesse zootecnico. Viti et al. (2021) hanno proposto una combinazione interessante tra alfalfa e prodotti/sottoprodotti derivati dall'agricoltura locale da utilizzare per l'allevamento ovino, con l'obiettivo di raggiungere un'economia circolare che permette di usare gli scarti di un processo come input per un altro. Come affermano gli autori, questo tipo di regime alimentare (alfalfa con sottoprodotti dell'agricoltura) sembra apportare benefici alle comunità microbiche ruminali e, di conseguenza, anche alla carne e al latte derivato dai ruminanti (i risultati definitivi non sono

ancora conclusi). Alla fine, anche questi autori si sono posti l'obiettivo di approfondire come il supplemento di alfalfa nella dieta degli ovini potesse migliorare la qualità del latte, passando per il microbiota ruminale (Figura 1).

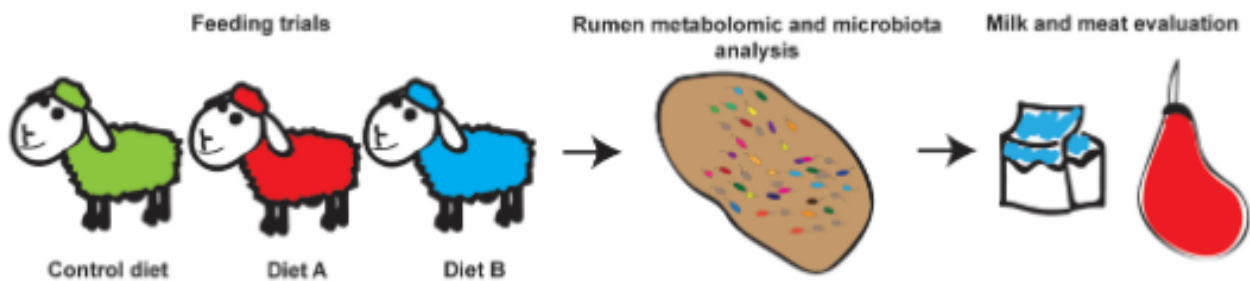


Figura 1. Rappresentazione di uno degli scopi del progetto di Viti et al, 2021.

Un altro studio, condotto da Rong et al. (2014), ha messo in luce come agnelli nutriti con un supplemento giornaliero di alfalfa pari a 375 g/kg assumevano e digerivano più proteina grezza, materia secca, materia organica e fibre, il che si rifletteva sul profitto calcolato per agnello in base della diversa percentuale di alfalfa nella dieta (il più alto era associato a questa quantità, 375 g/kg).

Si può quindi facilmente concludere che un foraggio come l'erba medica risulta indubbiamente adatto all'alimentazione dei ruminanti e in più, in riferimento a quanto riportato nel paragrafo "Rilevanza dell'allevamento ovino in Sardegna", presenta una serie di caratteristiche che la rendono adatta alla coltivazione in un territorio come la Sardegna. In generale, sono presenti parecchi lavori in letteratura (ad esempio He et al., 2018 oppure Yang et al., 2015) dove l'alfalfa viene utilizzata come supplemento nella dieta dei ruminanti, oppure viene inserita in sostituzione ad altre fonti proteiche; questo sta ad indicare che tale pianta presenta grandi potenzialità come *feed*, grazie alla sua composizione, i costi relativamente bassi rispetto a concentrati proteici o altre fonti di proteine, gli effetti benefici – nei confronti dell'ambiente e dei prodotti derivati dai ruminanti – a cui è associata.

### 1.3.1 RELAZIONE TRA DIETA E QUALITA' DEL LATTE

La dieta è il primo fattore che influenza la qualità del latte e di conseguenza dei prodotti lattiero-caseari derivati (Nudda et al., 2014). In particolare, lo stile alimentare influenza in modo più marcato la composizione del latte negli animali molto produttivi (Pulina et al., 2006). La porzione del latte più modulabile attraverso la dieta è nota essere quella lipidica. I fattori dietetici che più influenzano la concentrazione lipidica sono l'equilibrio energetico dell'animale (con particolare riferimento alla quantità di grasso corporeo), la presenza di carboidrati non fibrosi, la quantità di fibra detergente neutra (sono presenti in letteratura ipotesi contrastanti; sembra che siano correlati positivamente sono nel caso di animali molto produttivi), la morfologia delle particelle alimentari ingerite e il profilo acidico di eventuali supplementi (Pulina et al., 2006). I supplementi lipidici sono considerati da diversi autori una strategia molto importante per modulare il profilo acidico del latte (Sampelayo et al., 2007). È utile considerare poi che ad inizio lattazione i grassi della dieta vengono trasferiti al latte più che in qualsiasi altro momento (Sampelayo et al., 2007), perciò la somministrazione di codesti supplementi sarà più concentrata in quel lasso di tempo. Si consideri che una quantità troppo elevata di grassi addizionata alla dieta può avere effetti negativi sull'attività fermentativa ruminale, che può portare ad una minore concentrazione di grassi trasferiti al latte (Pulina et al., 2006). Diete ricche di carboidrati non strutturali, fibre pellettate o ridotte in piccole dimensioni e il troppo basso rapporto foraggi/concentrati influisce sulla sintesi degli acidi grassi e soprattutto del butirrato, precursore degli acidi grassi sintetizzati dalla ghiandola mammaria e trasferiti al latte (Sampelayo et al., 2007). La bassa quantità di fibre nella dieta può portare inoltre alla formazione di acidi grassi in conformazione *trans*, i quali sono stati associati ad un decremento generale dei grassi nel latte (Sampelayo et al., 2007). È giusto considerare che i grassi presenti nei prodotti derivati da ruminanti sono per la maggior parte saturi, aspetto che ha portato ad approfondire in che modo la qualità nutrizionale dei prodotti in termini di grassi saturi e insaturi potesse essere migliorata attraverso la dieta (Nudda et al., 2014). A questo proposito, in letteratura è riportato che la somministrazione di foraggi freschi determina una modificazione nel contenuto di acidi grassi polinsaturi nel latte di pecora, aumentata rispetto a quella di

animali nutriti con sostanze secche (Pulina et al., 2006). È importante ricordare che la componente lipidica è fondamentale soprattutto per la qualità organolettica di un prodotto caseario, in quanto i grassi sono i maggiori responsabili dell'aroma e della *texture* finale.

La porzione proteica è molto meno predisposta a mutare rispetto a quella lipidica, anche in situazioni di supplemento di proteine o amminoacidi (Pulina et al., 2006); la sua presenza invece è controllata prevalentemente dalle caratteristiche genetiche di ogni animale.

La quota di proteine presenti nel latte di pecora è correlata positivamente all'energia fornita dalla dieta, come dimostrato dal fatto che pecora nutrite con alte concentrazioni di cereali presentavano nel latte una concentrazione proteica superiore rispetto ad altre che ne assumevano meno (Pulina et al., 2006). La correlazione svaniva però a metà lattazione. È stato dimostrato che la fonte proteica impiegata nell'alimentazione ovina ha impatto sulla concentrazione proteica del latte e sulla resa casearia: la somministrazione di proteine animali (ad esempio del pesce) al posto di fonti vegetali (ad esempio la soia o altri legumi) comporta un maggior contenuto di proteine nel latte e una resa casearia maggiore (Pulina et al., 2006). La concentrazione proteica del latte non è correlata alla quantità di proteine somministrate con la dieta (Nudda et al., 2020); quest'ultima però è fortemente correlata alla quantità di azoto non proteico, rappresentato principalmente dall'urea che viene escreta attraverso feci e latte e che si ritrova aumentata anche nel sangue (Nudda et al., 2020) – indici di diminuita efficienza di utilizzo. È stato altresì osservato che l'aumento di urea nel latte era correlato ad una minore concentrazione di caseine (Pulina et al., 2006). La forte correlazione che esiste tra urea nel latte, resa casearia del latte e qualità del latte è ben nota, in quanto – a riprova di quanto appena riportato – è stato osservato che l'aumento dell'urea comporta un decremento della frazione proteica che consegue in una deplezione delle proprietà coagulative (Nudda et al., 2020). Il livello di urea nel latte viene utilizzato come indicatore nutrizionale soprattutto per gli animali al pascolo, in modo da capire se sono necessari eventuali supplementi.

L'alimentazione e la dieta influenzano in modo indiretto anche il numero di cellule somatiche presenti nel latte, parametro che se troppo elevato va a minare la proprietà di coagulazione come già illustrato nei paragrafi precedenti (Pulina et al., 2006). Nudda et al. (2020) affermano

che gli scompensi nutrizionali che andrebbero ad influenzare la presenza di cellule somatiche sono principalmente una dieta ipocalorica, lo squilibrio tra energia totale e quota proteica, una dieta ipoproteica, il troppo azoto non proteico assunto con la dieta, l'avvento di disordini metabolici come acidosi o ketosi. In aggiunta, una dieta povera in vitamine e minerali può abbassare l'efficienza del sistema immunitario predisponendo l'animale a sviluppare infezioni e di conseguenza presentare più cellule somatiche nel latte. Per mantenere sotto controllo la quantità di cellule somatiche nel latte è quindi necessario formulare diete bilanciate con particolare attenzione ai micronutrienti, che devono essere presenti in quantità sufficiente (Nudda et al., 2020).

È importante considerare che la dieta apporta anche altre sostanze e molecole di varia natura oltre ai principali macronutrienti. Rispetto a *feed* concentrati, foraggi, pascoli, leguminose o combinazioni di esse contengono molte più sostanze funzionali e benefiche per la salute dell'animale, insieme a molecole aromatiche che contribuiscono alla formazione del sapore e del *flavour* finale del latte, della carne e dei prodotti derivati dai ruminanti. La stessa cosa vale per i pascoli, naturalmente ricchi di antiossidanti, terpeni, polifenoli. È noto che i foraggi freschi siano i più ricchi di PUFA (*poly-unsaturated fatty acid*) e che queste molecole vengono ritrovate in maggior quantità su latte di animali che si nutrono al pascolo. Questo meccanismo varia in base alle stagioni e alla conseguente qualità dei foraggi, maggiore in primavera. Nell'allevamento di pecore la qualità dei pascoli è fondamentale in quanto la composizione botanica definisce la qualità e la concentrazione di sostanze aromatiche quali aldeidi, chetoni, alcoli, esteri e idrocarburi aromatici, che vengono ingerite e potenzialmente trasferite al latte (Pulina et al., 2006). Oltre quindi alla qualità tecnologica, la dieta può essere sfruttata per aumentare anche la qualità nutrizionale e organolettica dei prodotti finali. Al contrario, il latte di pecora può contenere xenobiotici come diossina, metalli pesanti e POP (*persistent organic pollutants*), associati prevalentemente a pascoli inseriti in contesti urbani; anche le micotossine costituiscono una minaccia rilevante a livello di bio-sicurezza, anche se è noto che le pecore sono più resistenti a tale xenobiotico rispetto alle vacche, il che si traduce in una quota minore trasferita nel latte (Pulina et al., 2006). Nonostante questo, la diffusa pratica di utilizzo di

alimenti concentrati per l'alimentazione delle pecore (ad esempio a base di mais o altri cereali) aumenta la probabilità di ritrovare micotossine nel latte in quanto queste matrici alimentari ne sono particolarmente soggette (Pulina et al., 2006); non sono da sottovalutare però i foraggi, anch'essi a rischio (Nudda et al., 2020). Nudda et al. (2020) sottolineano il ruolo del microbiota ruminale nella disattivazione di queste molecole, contribuendo a mantenere lo stato di salute dell'animale e la sicurezza sanitaria dei prodotti da esso derivati. Ad esempio, è nota l'attività litica dei protozoi ruminanti nella degradazione dell'Ocratossina A (Battacone et al., 2010), degradazione implementata da una dieta a base di fieno rispetto a diete ricche di cereali (Nudda et al., 2020).

Per quanto riguarda la qualità microbiologica del latte, non è tanto correlata alla dieta quanto alle condizioni igieniche dell'allevamento anche se, ad esempio, Bencini et al. (2010) afferma che l'utilizzo di insilati può aumentare la probabilità di ritrovare specie di *Clostridium* nel latte, situazione sconsigliata dal punto di vista tecnologico e organolettico.

Alcuni autori propongono l'utilizzo di *feed* alternativi, come sotto-prodotti industriali locali, foraggi più eco-sostenibili, arbusti e leguminose per abbattere i costi dell'allevamento senza abbassare la *performance* produttiva degli animali. Molte di queste fonti alimentari alternative contengono quantità variabili di tannini, sostanze la cui moderata presenza è correlata ad un lieve aumento di proteine nel latte e di resa casearia del latte. Se troppo abbondanti però, compromettono l'attività ruminale e la conseguente digestione delle proteine per ottenere aminoacidi essenziali, in quanto riducono la disponibilità dell'azoto solubile nel rumine (Nudda et al., 2020). In più, è stato osservato che i tannini impediscono la bio-idrogenazione nel rumine degli acidi grassi polinsaturi (PUFA), consentendone il trasferimento al latte (Nudda et al., 2020); sembrano anche esercitare una certa azione battericida nei confronti dei principali agenti eziologici delle mastiti, data la loro correlazione negativa con la quantità di cellule somatiche nel latte (Nudda et al., 2020).

Si può quindi concludere che lo stile alimentare adottato per l'allevamento ovino racchiude grandi potenzialità nell'ottica del miglioramento della salute dell'animale ma anche, soprattutto, della qualità dei prodotti da esso derivati. È necessario tenere in considerazione

però che la correlazione genetica delle concentrazioni di proteina e grasso nel latte di pecora – parametri tecnologicamente più rilevanti – supera i fattori ambientali che possono influenzarle (Pulina et al., 2006).

#### 1.4 IL MICROBIOTA DI LIQUIDO RUMINALE, LATTE E FECI

Con il termine “microbiota” si fa riferimento ad una comunità microbica che popola un determinato ambiente e con “microbioma” alle caratteristiche genetiche che presenta la suddetta comunità (Ferafontova et al., 2020). Il concetto di “olobionte” esprime chiaramente la vitale relazione che esiste tra ospite e l’insieme di tutti i microrganismi che lo popolano. Prende così vita l’“ologenoma”, ossia l’insieme di tutti i geni che presenta l’olobionte (Bharti et al., 2021). Poter disporre di questo tipo di dato permetterebbe di acquisire una visione ancora più complessiva del sistema in atto tra l’ospite (a partire dall’organismo più semplice a quello più evoluto) e l’intero microbiota residente in esso. Con l’avvento delle tecnologie di sequenziamento di seconda e terza generazione, le conoscenze nel campo del microbiota e del relativo microbioma stanno diventando sempre più consistenti, aprendo nuove prospettive per tantissimi ambiti della ricerca. Quello delle produzioni animali rappresenta un ambito dove la conoscenza e comprensione del microbiota risulta essenziale, considerata la simbiosi che caratterizza gli animali da reddito ed i microrganismi che li popolano, modulandone la fisiologia, l’omeostasi, lo stato immunitario, la *performance* produttiva. In questo paragrafo verranno delineate le principali caratteristiche e funzioni del microbiota ruminale *in primis* e a seguire verranno descritti brevemente anche il microbiota del latte e delle feci dei ruminanti, con particolare riferimento alla specie ovina.

##### Il microbiota ruminale ovino

I responsabili delle fermentazioni che avvengono all’interno del rumine dei ruminanti sono le comunità microbiche anaerobiche che vi abitano (Malik et al., 2022) e che costituiscono l’ecosistema intestinale considerato il più diversificato del mondo animale (Newbold et al., 2020). Queste fermentazioni danno origine a proteine, acidi organici, gas fermentativi e acidi



grassi volatili, rappresentati principalmente da propionato, acetato e butirato, che forniscono quasi il 70% dell'energia necessaria all'animale ospite (Zhang et al., 2021). Le cellule epiteliali del ruminale sono coinvolte nell'assorbimento di queste sostanze, occupando una posizione chiave nella corretta interazione ospite-microbiota. I principali nutrienti assorbiti sono gli acidi grassi volatili a catena corta (SCFA), i quali esercitano un'influenza sulla crescita e funzionalità di queste cellule (Lv et al., 2021). A questo proposito, assume particolare importanza l'espressione dei geni responsabili dell'assorbimento dei nutrienti e della barriera immunologica ruminale (Lv et al., 2021), che vanno a modificare l'efficienza del microbiota a livello di "recepimento" delle sostanze nutrienti da parte dell'animale. In più, il microbiota ruminale provvede alla sintesi di alcune vitamine quali la B12 e la K e gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e regolazione del sistema immunitario dei ruminanti fin dalla nascita, contribuendo per tutta la vita a mantenerlo funzionale (Liu et al., 2021). È altresì noto che cambiamenti a livello di composizione microbica ruminale possono comportare disbiosi e insorgenza di patologie (Liu et al., 2021). Una delle peculiarità delle comunità ruminali è che ogni sostanza prodotta rappresenta l'output per un determinato componente e l'input per qualcun altro. Ad esempio, l'anidride carbonica e l'idrogeno prodotto dai batteri viene utilizzato dalle comunità di archea per produrre metano (Mailk et al., 2022). Questi microrganismi "metanogeni" suscitano non poco interesse nella comunità scientifica dato l'impatto ecologico della produzione di metano dei ruminanti (sono responsabili dell'immissione in atmosfera di circa il 10% dei gas serra antropogenici, Matthews et al., 2019). La produzione di metano da parte dei metanogeni dipende dalla dieta, dalla specie ospite, dalla frequenza d'ingestione di cibo e dalla struttura del microbiota e delle comunità metanogene (Malik et al., 2022). Come affermano Malik et al. (2022), per mettere in pratica strategie di riduzione della metanogenesi ruminale è necessario conoscere e analizzare l'intera comunità metanogena e microbica in generale.

I fattori che influenzano le caratteristiche del microbiota dei ruminanti sono l'assetto genetico dell'ospite (in riferimento ai geni che governano la risposta immunitaria, Liu et al., 2021), la corretta interazione con l'ospite (riferita per esempio alla buona capacità delle cellule epiteliali

di assorbire i nutrienti), la dieta, l'età, lo stato di salute, le condizioni ambientali (ad esempio la temperatura, che è stato dimostrato avere una forte influenza sul microbiota ruminale da Guo et al., 2021), la quantità di cibo ingerita (Guo et al., 2021), l'efficienza di conversione del *feed* (Liu et al., 2021), addirittura la durata delle ore di luce/buio (Thomas et al., 2019). È stato dimostrato in uno studio di Ji et al. (2018) che il microbiota ruminale presenta determinate correlazioni anche con il sesso dell'animale, mentre Mani et al. (2022) ha osservato come ci fosse correlazione tra determinate popolazioni batteriche e polimorfismi nel genoma della pecora, ottenendo risultati significativi.

Liu et al. (2021) definiscono il rumine una "*black box*" (scatola nera) in riferimento alla moltitudine di microrganismi che ospita, stimata essere nell'ordine dei trilioni con un assetto genetico centinaia di volte superiore ai geni contenuti nelle cellule dell'animale ospite. Il microbiota ruminale è composto da batteri (che rappresentano la quota preponderante), archea, protozoi, funghi e virus, i quali vanno a formare il viroma ruminale ad oggi largamente sconosciuto (Newbold et al., 2020). Sebbene a livello di regni e *phyla* la composizione del microbiota ruminale dei ruminanti sia abbastanza omogenea (definita infatti "*core microbiota*"), è nota la presenza di microrganismi specie-ospite – specifici ("*non-core microbiota*"), dovuta probabilmente alla loro co-evoluzione avvenuta nel tempo (Glendinning et al., 2021). In ogni caso, Glendinning et al. (2021) hanno osservato che nonostante le differenze di specie e di ceppi microbici tra le diverse specie di ruminanti, i microbi insediati mostravano ruoli metabolici analoghi.

I batteri sono i costituenti principali del microbiota ruminale e, proprio per questo, sono protagonisti di numerosissimi progetti di caratterizzazione. Due importanti esempi sono lo studio di Stewart et al. (2018) che ha descritto 913 genomi batterici ritrovati nel rumine di vacche e l'estensione del progetto l'anno successivo (Stewart et al., 2019) che ha premesso di ottenere 4900 genomi batterici, provenienti sempre dal rumine di vacche. Da questi dati si può facilmente dedurre la complessità della componente batterica ruminale, comunità che nonostante i numerosissimi studi presenti in letteratura non è ancora totalmente conosciuta e caratterizzata.

Gli archea rappresentano dallo 0.3% al 3% della composizione del microbiota dei ruminanti (Newbold et al., 2020) e sono per la maggior parte metanogeni. Quelli più ritrovati nel corso dei progetti di caratterizzazione del microbiota ruminale sono principalmente il genere anaerobio *Methanobrevibacter* seguito da altri gruppi di metanogeni anaerobi quali *Methanosphaera*, *Methanimicrococcus* e *Methanobacterium* (Newbold et al., 2020). L'attività dei metanogeni comporta una perdita di energia in termini di utilizzazione dell'azoto che va dal 2 al 12% (Matthews et al., 2019); gli autori Matthews et al. (2019) sottolineano l'importanza della dieta come modulatrice della produzione di metano, andando ad agire sul numero e sulle specie di metanogeni presenti nel rumine.

I protozoi costituiscono fin al 50% della biomassa presente nel rumine (Newbold et al., 2020) e sembrano essere altamente coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi generale dell'ospite. Sono rappresentati principalmente dai ciliati, che presentano (insieme ai batteri) una grande capacità fibrolitica; in più, è stato osservato che i protozoi contribuiscono al mantenimento del pH ruminale (ne impediscono l'eccessivo abbassamento) consumando lattato (Newbold et al., 2020). Generalmente, il pH ruminale si trova nel *range* di valori che va da 6 a 7, dipendentemente dalla dieta (Matthews et al., 2019). La maggior parte degli studi sul metabolismo dei protozoi ruminali sono condotti sulla specie rappresentativa *Entodinium caudatum* (Park et al., 2018).

I funghi costituiscono fino al 20% della composizione del microbiota ruminale e comprendono specie anaerobie anch'esse coinvolte nella degradazione della fibra vegetale e nella produzione di metano (Newbold et al., 2020). I generi più comunemente ritrovati nel rumine sono *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces* e *Cyllamyces* (Newbold et al., 2020). Matthews et al. (2019) affermano che la scoperta nel rumine di funghi anaerobi ha rivoluzionato il dogma della microbiologia secondo cui i funghi sono necessariamente aerobi, informazione da cui possiamo dedurre una conoscenza ancora molto limitata in tantissimi aspetti della biologia. Per quanto riguarda il viroma che caratterizza il rumine, questo è la componente più scarsamente caratterizzata nonostante stiano apparendo i primi studi come quelli condotti da Gilbert et al. (2017), Namonyo et al. (2018), Hitch et al.

(2019). In generale, la maggior parte dei virus che vive nel rumine sono batteriofagi (Matthews et al., 2019).

Ai microrganismi del rumine può essere applicata la seguente classificazione (Su et al., 2022): microrganismi associati alla componente liquida, che si ritrovano in sospensione (corrispondono al 25% della massa microbica ruminale, Matthews et al., 2019); microrganismi associati alle particelle solide (che vengono ulteriormente suddivisi dagli autori dello studio – Su et al. – in base alla forza con cui sono adesi; questi rappresentano il 70% della massa microbica ruminale, Matthews et al., 2019); microrganismi che colonizzano il tessuto epiteliale del rumine, che compongono il restante 5% della massa microbica (Matthews et al., 2019). Queste tre componenti sono tassonomicamente molto diverse tra loro e una delle principali cause sembra essere la dieta (Su et al., 2022), come dimostrato da Sadet et al. (2007). Lo studio di Su et al. (2022) ha messo in luce come nella fase solida fossero presenti (nel genoma dei microrganismi associati) più geni dedicati alla degradazione della cellulosa mentre in quella liquida più enzimi amilolitici. Inoltre, è stato osservato da Gleason et al. (2021) che i *phyla* Fibrobacteres e Spirochaetes erano largamente più presenti nella frazione solida rispetto a quella liquida. Da questi studi si può cogliere l'importanza della fase di campionamento del liquido ruminale, che deve comprendere possibilmente sia parti solide che la soluzione liquida, in modo da non tralasciare diverse componenti importanti della comunità microbica.

Fin dai primi studi sulla caratterizzazione del microbiota ruminale, una delle principali considerazioni che sono state fatte dai ricercatori è stata la possibilità di agire su determinati fattori ambientali (in modo particolare la dieta, i cui effetti verranno approfonditi in uno dei paragrafi successivi) in modo da massimizzare la conversione di matrici vegetali non utilizzabili nell'alimentazione umana in prodotti edibili (carne, latte), minimizzando l'impatto ambientale che implica questo processo fermentativo (Newbold et al., 2020). L'efficienza di conversione che caratterizza questo processo è fortemente influenzata dai *pathways* metabolici messi in atto dai microrganismi (Glendinning et al., 2021), aspetto molto rilevante – perciò necessario da comprendere – per la modulazione del microbiota orientata all'ottimizzazione del suo funzionamento. Le tecniche di analisi metagenomiche hanno aperto la strada al

raggiungimento di tale livello di conoscenza. Lo studio di Glendinning et al. (2021), attraverso un'analisi *shotgun sequencing*, ha messo in luce come il microbiota ruminale tipico della specie *Ovis aries* fosse costituito per il 97% da batteri, per il 2.3% da archea e per lo 0.23% da microrganismi eucarioti. Oltretutto, nell'ambito di tale studio il microbiota di queste specie ha fatto emergere l'esistenza di 23 specie microbiche ruminanti mai sequenziate prima, aspetto dal quale si può dedurre la necessità di studi che approfondiscano l'argomento. I *phyla* batterici preponderanti nel rumine della pecora sono risultati essere Bacteroidetes (64%) e Firmicutes (29%), in accordo con la maggioranza dei progetti analoghi pubblicati in letteratura (anche se si osservano percentuali leggermente differenti). Lo studio di Zhang et al. (2021) aggiunge un terzo e quarto posto, rappresentati rispettivamente da Fibrobacteres (8,27%) e Proteobacteria (7.28%), anche se in base alla letteratura disponibile sono solo i primi due *phyla* Bacteroidetes e Firmicutes a costituire il *core microbiota* nella pecora, dal terzo in poi si osserva discreta variabilità. Sempre dai risultati di quest'ultimo studio è emerso che le classi maggiormente rappresentate erano Bacteroidia (40.95%) e Clostridia (29.69%); gli ordini maggiormente rappresentati erano Clostridiales (29.69%), Bacteroidales (40.50%), Fibrobacterales (8.27%), Aeromonadales (5.95%), Selenomonadales (5.41%), Spirochaetales (4.92%), e Erysipelotrichales (1.22%); i generi più presenti erano generi non identificati appartenenti alla famiglia delle Prevotellaceae, il genere *Fibrobacter*, generi non identificati appartenenti alla famiglia delle Lachnospiraceae, il genere *Saccharofermentans* e il genere *Succinivibrio*. Questo è solo un esempio di composizione microbica del rumine di pecora, in quanto questa è molto variabile sia a livello di composizione che di abbondanze relative, come dimostrano gli altri studi citati (McLoughlin et al., 2020; Zhang et al., 2021; Glendinning et al., 2021; Malik et al., 2022; Martinez B. et al., 2021).

Come affermato in precedenza, l'efficienza con cui le comunità microbiche dei ruminanti convertono le fibre vegetali in proteine ad alto valore biologico è un tratto economicamente molto rilevante – considerati i costi del *feed*, che pesano per il 65-70% del costo dell'allevamento ovino (Zhang et al., 2021) – e viene comunemente misurato attraverso il parametro RFI (*residual feed intake*). Lo studio di Zhang et al. (2021) aveva come obiettivo

quello di rilevare eventuali differenze a livello di composizione del microbiota relativa a pecore caratterizzate da alto o basso RFI, in modo da associare a determinati microrganismi un ruolo chiave nell'efficienza di utilizzazione del *feed*. Questo rappresenta un esempio di come sia possibile avvalersi del microbiota per ottimizzare la produzione animale, in questo caso legata agli ovini. I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti nell'ottica in cui sono emerse popolazioni correlate all'RFI caratterizzate da precisi *pathways* metabolici. In particolare, il rapporto Firmicutes:Bacteroidetes viene proposto come indice utile per stimare l'RFI, vista la significativa correlazione osservata con gli animali a basso RFI; il genere *Succinivibrio* era anch'esso correlato significativamente agli animali più efficienti. Al contrario, la classe Negativicutes, l'ordine Selenomonadales e la famiglia delle Prevotellaceae erano sempre più presenti negli animali a bassa efficienza. Inoltre, è emerso che il microbiota correlato agli animali più efficienti era più diversificato, stando ad indicare una maggiore stabilità, resistenza e resilienza. Questa caratteristica risulta abbastanza controversa, in quanto altri autori hanno osservato che minore *richness* era correlata a maggior efficienza nelle vacche (Shabat et al., 2016). Questo è legato all'ipotesi che un microbiota meno differenziato e più specializzato produce meno metaboliti ma che sono più utili all'ospite, senza dispendio di energie in altre molecole non necessarie. Alla luce di ciò, sono necessari ulteriori approfondimenti in merito a questa importante caratteristica del microbiota ruminale.

Anche Martinez B. et al. (2021) hanno osservato una significativa correlazione negativa tra il genere *Prevotella* e alcuni tratti del latte come contenuto di grasso, di proteina, di caseine e di acidi grassi saturi. Un altro studio (Liu et al., 2021) ha approfondito il meccanismo di utilizzo dell'azoto da parte del microbiota ruminale e la relativa efficienza, concludendo che le specie *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Ruminococcus\_sp.\_HUN007* fossero quelle più coinvolte. Queste informazioni potranno essere sfruttate per promuovere la crescita delle comunità microbiche più efficienti, ad esempio servendosi di pro e prebiotici specifici, oppure semplicemente per valutare l'efficienza di un determinato animale in base alla composizione del suo microbiota. Un altro interessante progetto (Yoshihara et al., 2021) ha approfondito come variasse il microbiota in funzione dello stress (di vario tipo) a cui erano sottoposte le

pecore, facendo emergere che in quelle più stressate crescevano maggiormente batteri opportunisti rispetto a componenti benefici dediti alle fermentazioni e alla digestione. In particolare, è stata riscontrata l'importante crescita del genere *Acinetobacter*, patogeno appartenente al *phylum* Proteobacteria, insieme al decremento del genere *Ruminococcus*, importanti batteri cellulolitici. In aggiunta è stato osservato che la comunità ruminale delle pecore stressate era meno diversificata di quelle non stressate, aspetto che sembra confermare l'importanza del grado di diversità che renderebbe più efficace, plastico e resistente il microbiota.

Alla luce di tutto ciò, comprendere come e perché il microbiota ruminale muti a seconda soprattutto di fattori ambientali, è importante nell'ottica in cui dal suo corretto funzionamento ed equilibrio dipendono molti aspetti fisiologici dell'ospite, tra cui l'efficienza dell'alimentazione, l'efficienza di utilizzo dell'azoto per dare proteine ad alto valore biologico, il mantenimento di un sistema immunitario funzionale, la produzione di derivati (latte, carne) di alta qualità tecnologica e nutrizionale.

### Il microbiota fecale ovino

Il microbiota dell'intero tratto gastrointestinale della pecora è ancora largamente sconosciuto, ma sembra che le popolazioni insediate nella porzione distale dell'apparato siano coinvolte principalmente in *pathways* catabolici (Tanca et al., 2017). La parte finale dell'intestino dei ruminanti gioca infatti un ruolo fondamentale nella conclusione della digestione del materiale vegetale (Shabana et al., 2021). Lo studio di Tanca et al. (2017) rappresenta il primo studio che utilizza un approccio "omico" per lo studio e la caratterizzazione del microbiota fecale della pecora. È stato condotto attraverso tecniche di *shotgun sequencing* e di *amplicon sequencing* e consisteva nella caratterizzazione del microbiota fecale di 5 esemplari di *Ovis aries*. Sono stati ottenuti i seguenti risultati: i *phyla* Firmicutes e Bacteroidetes rappresentavano l'80% dei batteri presenti; la quantità relativa di Firmicutes si è rivelata essere poco variabile tra gli individui. Questi due *phyla* batterici sono correlati principalmente alla degradazione e digestione della cellulosa (Qin et al., 2020). All'interno del *phylum* Firmicutes le famiglie più rappresentate erano

le Ruminococcaceae, Lachnospiraceae e Clostridiaceae. La famiglia più rappresentata del *phylum* Bacteroidetes è risultata essere quella delle Prevotellaceae. In minor misura è emersa la presenza di batteri appartenenti al *phylum* Spirochaetes, rappresentati del genere *Treponema* e archea appartenenti al *phylum* Euryarchaeota. Uno studio del 2018 (Huang et al., 2018) ha inoltre osservato come il genere *Campylobacter* fosse quello preponderante in tutti i 18 campioni di feci di agnelli, risultato che trova riscontro con lo studio di Qin et al. (2020) dove sono stati ritrovati nelle feci di pecora agenti altamente patogeni come appunto *Campylobacter* ma anche *Helicobacter* e *Shigella*. Sempre nell'ambito di questo studio è emerso che il tipo di dieta influenzava in maniera ridotta la composizione del microbiota fecale (rispetto ad esempio all'effetto che ha su quello ruminale), agendo solamente a livello di genere. Per quanto riguarda i funghi, questi componevano dallo 0.05% all'1.1% del microbiota fecale (Tanca et al., 2017). Il *phylum* più presente corrispondeva a Ascomycota. Durante lo studio è stato indagato anche l'assetto funzionale e il proteoma del microbiota fecale che ha mostrato una prevalenza di geni codificanti per trasportatori di membrana, per enzimi implicati nella trascrizione e traduzione di proteine, per il *foldings* proteico. La maggior parte degli enzimi ritrovati era associata al catabolismo dei carboidrati, a seguire si ponevano gli enzimi per l'anabolismo proteico. In minor misura sono stati rilevati anche enzimi per la metanogenesi e sono state ritrovate spore associate probabilmente ai gruppi di clostridi. Uno studio analogo più recente (Shabana et al., 2021) ha ottenuto risultati contrastanti da quello di Tanca et al. (2017), avendo osservato che il secondo *phylum* più presente nel microbiota fecale di pecora era Proteobacteria e non Bacteroidetes (nettamente meno presenti nei risultati di questo secondo studio). Inoltre, gli autori hanno osservato un incremento di diversità del microbiota fecale all'aumentare dell'età delle pecore. Al contrario, lo studio di Mamun et al. (2019), anch'esso condotto per caratterizzare la composizione del microbiota fecale della pecora, trova concordanza in termini di composizione microbica con i risultati di Tanca et al. (2017), stando ad indicare l'urgente necessità di studi più approfonditi sull'argomento come sottolineano tutti gli autori appena citati.



## Il microbiota del latte ovino

La composizione e il valore nutrizionale del latte permettono la crescita al suo interno di un vasto numero di microrganismi (Tilocca et al., 2020), che danno origine ad un ricco microbiota. I microrganismi autoctoni del latte inducono una serie di reazioni biochimiche legate al loro metabolismo che, insieme a quelle messe in atto dagli inoculi, determinano il risultato finale del processo di caseificazione. Le comunità microbiche possono rappresentare un punto di forza in ambito caseario conferendo determinate caratteristiche ai prodotti, come possono esercitare un'azione deteriorante nel latte e nei formaggi, o essere patogeni oppure, ancora, risultare benefici per la salute umana (Quigley et al., 2013). I microrganismi che contaminano il latte – che prima di essere secreto da una mammella sana è sterile – possono derivare da diverse fonti tra cui i capezzoli, gli strumenti per la mungitura, l'aria, il suolo, l'acqua, i mangimi e altro ancora (Quigley et al., 2013). Le tecnologie casearie e i processi produttivi esercitano un forte impatto sulle comunità microbiche residenti, che possono influenzare negativamente la caseificazione e la qualità del prodotto finale (Quigley et al., 2013). Ad esempio, la pastorizzazione del latte o la cottura della cagliata uccidono la maggior parte dei batteri termosensibili, determinando un cambiamento nella composizione del microbiota. I batteri lattici rappresentano la popolazione dominante nel latte di pecora: questi sono caratterizzati dall'attitudine a convertire il lattosio presente nel latte in acido lattico (Quigley et al., 2013), acidificando l'ambiente. Esteban-Blanco et al. (2020) sono stati i primi a caratterizzare il microbiota del latte di pecora sequenziando la regione ipervariabile V4 del gene batterico 16S e hanno rilevato la presenza di 43 *phyla*, due dei quali appartenenti al regno Archea. I *phyla* più rappresentati erano Firmicutes (64.44%), Actinobacteria (14.25%), Proteobacteria (9.08%), Acidobacteria (2.7%), Bacteroidetes. Il genere dominante in questi campioni era *Staphylococcus*, seguito da *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e *Escherichia/Shigella*. Gli autori hanno poi indagato sulla presenza di eventuali correlazioni tra composizione del microbiota e quantità di cellule somatiche ed è emerso che i seguenti generi erano presenti solo nei campioni con valore di SCC (*somatic cell count*) superiori a 400.000: *Alloiococcus*, *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*, *Jeotgalicoccus*, *Pseudomonas*, *Romboutsia* e

*Turicibacter*. Inoltre, i campioni con alto SCC presentavano una diversità microbica inferiore, legata all'incremento di specie patogene. In particolare, le popolazioni di lattobacilli diminuivano in tutti i campioni di latte con alte SCC, dove invece *Staphylococcus* spp. aumentava. Purtroppo, in letteratura non sono presenti lavori che abbiano considerato il microbiota della mammella delle pecore, aspetto che determina un grande impatto sulla formazione e composizione del microbiota del latte. Nello studio di Quigley et al. (2013) – dove sono state applicate sia tecniche coltura-dipendenti che indipendenti – i ceppi dominanti sono risultati essere *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e ssp. *cremoris*, specie di lattobacilli quali *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus parabuchneri* e *Lactobacillus brevis* sono state comunemente ritrovate insieme a *Leuconostoc* spp, *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp., popolazioni di *Flavobacteria* e *Actinobacteria*, *Tetragenococcus halophilus*. Questi risultati si trovano in disaccordo con quelli ottenuti da Esteban-Blanco et al. (2020) per quanto riguarda le specie dominanti, che nel suo studio appartenevano al genere *Staphylococcus*. La carica batterica mesofila era di circa a  $10^2 - 10^6$  CFU/ml (Quigley et al., 2013) mentre quella psicrotrofa si aggirava sui  $10^2 - 10^4$  CFU/ml (Quigley et al., 2013). Nel latte di pecora sono stati ritrovati patogeni come *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. (Quigley et al., 2013). Lieviti e muffe sono risultati essere anch'essi presenti: Quigley et al. (2013) riportano che la popolazione fungina era di circa  $10^5 - 10^6$  CFU/g. In questo studio sono emerse anche popolazioni batteriche minori quali *Lactococcus garvieae*, *Tetragenococcus halophilus*, *Streptococcus salivarius*, *S. thermophilus* e *Streptococcus vestibularis*. Gli autori hanno poi investigato anche il microbiota di un formaggio di pecora, attraverso tecniche di sequenziamento *high-throughput*. sono stati rilevati 40 generi batterici, ma quello dei lattobacilli comprendeva il 97% delle sequenze ottenute (Quigley et al., 2013), fatto che associerebbe grande importanza casearia a questo genere di batteri lattici. Altri generi discretamente rappresentati erano i bifidobatteri, *Enhydrobacter* spp., bacilli non identificati. Per quanto riguarda i microrganismi patogeni, si cita lo studio di Bogdanovičová et al. (2015) in cui gli autori, attraverso tecniche coltura-dipendenti, hanno rilevato *E. coli* nel 90.3% dei campioni di latte di pecora, *S. aureus* nel 29% e *L. monocytogenes* nel 3.2%. Come affermano

gli autori, il latte di pecora sembra essere più predisposto a contaminazioni da parte di batteri patogeni rispetto al latte di vacca.

#### 1.4.1 RELAZIONE TRA MICROBIOTA E STATO DI SALUTE E METABOLICO DELL'ANIMALE

L'acidosi ruminale è una condizione di più o meno grave compromissione della salute del rumine e una delle cause più associate è la troppo abbondante quota di amidi nella dieta (Weimer et al., 2015). L'acidosi può presentarsi in forma acuta o sub-acuta e può esercitare un'influenza anche molto negativa sulle *performance* produttive dei ruminanti. Nei bovini questa condizione è stata correlata all'attività della specie batterica *Streptococcus bovis* (Weimer et al., 2015), che produce grandi quantità di acido lattico dalle fermentazioni. L'acidosi ruminale, infatti, viene definita da Henning et al. (2010) come un massiccio accumulo di acido lattico nel rumine. Una delle soluzioni proposte dagli autori (Weimer et al., 2015) è l'utilizzo di probiotici che consumino l'acido lattico, con particolare *focus* sulla specie *Megasphaera elsdenii*. In riferimento a questa specie, si cita lo studio di Henning et al. (2010) dove è stato approfondito il potenziale probiotico di questa specie batterica in caso di acidosi ruminale. È stata osservata una pronunciata riduzione di acido lattico nel rumine insieme ad un incremento del pH durante una serie di *trials in vivo* e *in vitro* che hanno confermato l'abilità di diversi ceppi di *M. elsdenii* di contribuire alla stabilità del rumine a livello di acidità. Anche Chen et al. (2021) riportano che il microbiota ruminale varia consistentemente con l'aumento di cereali nella dieta e con il conseguente avvento di acidosi ruminale subacuta (SARA, *subacute ruminal acidosis*), condizioni la cui correlazione è stata indagata nel loro studio svolto su capre. SARA è caratterizzata dal decremento del pH ruminale, in particolare sotto il valore di 5.6 per più di 3 ore; a causa di tale acidità si osserva decremento di batteri cellulolitici, il danneggiamento dell'epitelio ruminale e l'attivazione di una risposta infiammatoria. In questo studio è emerso che le comunità microbiche ruminali di capre sane e quelle di capre affette da SARA sono significativamente diverse, indicando il coinvolgimento di questo microbiota nell'evolversi della malattia nei ruminanti. Zein-Eldin et al. (2014) affermano che l'acidosi nei ruminanti può costituire una minaccia letale in meno di 24 ore. La gravità del disturbo è legata alla quantità e

al tipo di carboidrati somministrati e alle comunità microbiche che meglio si adattano a questo tipo di regime alimentare, diventando preponderanti all'interno del microbiota ruminale. Vengono distinte due fasi "chiave" nell'eziologia di questa patologia, costituite rispettivamente (1) dalla fermentazione dei carboidrati assunti con la dieta (che danno origine ad una serie di acidi organici, in proporzione alla quantità di carboidrati fermentescibili dal microbiota) e (2) dall'assorbimento degli acidi organici sintetizzati nelle fermentazioni; se quest'assorbimento coinvolge grandi quantità di acidi si verifica la condizione di acidosi metabolica sistemica. Negli ovini questo disturbo si esplica attraverso sintomi che comprendono ottusità, depressione, anoressia, diversi gradi di disidratazione, stasi ruminale e diarrea intermittente da pastosa a semifluida, ma anche cecità, salivazione pronunciata e digrignamento dei denti (Zein-Eldin et al., 2014). Quando il pH ruminale si abbassa particolarmente, si riduce anche la diversità microbica e la quota di protozoi, organismi che sembrano contribuire allo smaltimento dell'acido lattico in eccesso presente nel rumine (Zein-Eldin et al., 2014). Inoltre, è stata osservata una significativa diminuzione di ammoniaca a livello ruminale dopo aver indotto l'acidosi, a detta degli autori Zein-Eldin et al., 2014, legata alla deplezione della microflora e microfauna ruminale. Spesso si addiziona alle diete ad alto contenuto di cereali un *buffer* quale il bicarbonato di sodio, che sembra contribuire al miglioramento delle *performance* produttive degli animali sottoposti a questo tipo di dieta. Altri "additivi" – la cui efficacia è stata dimostrata – che possono essere utilizzati in caso di acidosi negli ovini sono determinate specie di lieviti e estratti di genziana (Zein-Eldin et al., 2014). La principale prospettiva di approccio all'acidosi ruminale è quella di abbassare i livelli di acidi (soprattutto lattico) nel rumine attraverso *pathways* metabolici che prevedano il catabolismo delle sostanze acidificanti associati a determinate specie batteriche considerate in questo caso probiotiche.

La ketosi – clinica o subclinica a seconda della presenza di sintomi clinici – è invece descritta come un disordine metabolico che prevede l'accumulo di corpi chetonici (soprattutto beta-idrossibutirrato, acetoacetato, acetone) in sangue, urine e latte (Gebreyesus et al., 2020). Questa patologia costituisce in scala globale una dei principali problemi di salute in ruminanti quali pecore, capre e vacche (Marutsova et al., 2018) e insorge in concomitanza ad una richiesta

energetica maggiore di quella fornita dalla dieta, che induce la mobilitazione del grasso corporeo per sintetizzare corpi chetonici (Brown et al., 2018). Tale condizione affligge molto spesso animali in stato di gravidanza (che infatti richiedono cospicui livelli di energia) e viene definita "tossiemia in gravidanza", *pregnancy toxemia* (Marutsova et al., 2017). Alcuni autori hanno osservato che il tasso di frequenza di questa condizione nelle pecore va dal 6.5% al 37% (Marutsova et al., 2018), comportando perdite economiche legate alle spese mediche e alla morte degli animali e della loro progenie. La maggior parte degli studi presenti in letteratura condotti sugli ovini si concentra infatti sulla ketosi legata alla gravidanza, ma senza indagare su una possibile correlazione tra questo disturbo patologico e il microbiota ruminale. Durante uno studio condotto su bovini (Gebreyesus et al., 2020) è stata messa in luce un'associazione positiva tra il genere di archea *Methanobrevibacter* e la concentrazione di corpi chetonici nel latte, invece sembra sussistere una correlazione negativa tra le famiglie di Prevotellaceae e Ruminococcaeae e la concentrazione ematica di beta-idrossibutirrato insieme al *residual feed intake*. Gli autori non hanno caratterizzato completamente e approfonditamente il microbiota ruminale di bovini affetti da ketosi, sebbene sottolineino la mancanza di studi (su bovini) mirati a delucidare il ruolo del microbiota ruminale in disturbi come il presente.

In generale, è largamente risaputo che il microbiota ruminale influenza lo stato di salute dei ruminanti dal momento in cui rappresenta la principale interfaccia tra il *feed* e l'energia da esso fornita; ci sono evidenze, ad esempio, della correlazione positiva tra acidi grassi volatili di origine ruminale ed efficienza produttiva/miglior utilizzazione dell'azoto, con le specie batteriche *Sharpea* spp. e *Megasphaera* spp. (Moraïs et al., 2019). Ciò indica che la composizione del microbiota ruminale determina in modo più o meno marcato una serie di caratteristiche metaboliche legate ai ruminanti, che inevitabilmente hanno un impatto anche sullo stato di salute. La mancanza di studi condotti sugli ovini mirati a valutare eventuali associazioni tra composizione del microbiota ruminale e stato di salute generale è pressoché totale, rendendo alquanto complicato fornire un quadro completo sull'argomento.

#### 1.4.2 RELAZIONE TRA MICROBIOTA E QUALITA' DEL LATTE

È noto che la sintesi di proteine microbiche e gli acidi grassi volatili legati al metabolismo microbico del ruminante sono fattori chiave che influenzano la biosintesi del latte (Xue et al., 2019), determinandone quindi la composizione. La maggior parte degli studi a riguardo si riferiscono al latte di vacca, con scarsi riferimenti al latte di pecora. Lo studio di Xue et al. (2019) indaga la correlazione tra microflora ruminale e tratti del latte (in particolare la quantità di proteine) di origine vaccina. Una maggiore resa proteica del latte (data dal prodotto tra contenuto di proteine e resa del latte), maggiore produzione di acidi grassi volatili e minor contenuto di grassi nel latte erano associate ad una minore *richness*; anche l'efficienza di conversione era associata ad una *richness* minore, in accordo con i risultati di altri studi. La concentrazione di acidi grassi volatili era superiore nelle vacche ad alta efficienza, stando a significare una maggiore efficienza di fermentazione nel ruminante. Gli autori hanno osservato poi che l'abbondanza relativa del genere *Succinivibrio* era associata positivamente con il contenuto di proteine nel latte (Xue et al., 2019); era già stato osservato sulle vacche che specie appartenenti a questo genere producevano un effetto positivo sull'efficienza di conversione, tendendo a confermare l'associazione emersa nello studio di Xue et al. Gli autori affermano che la famiglia delle Succinivibrionaceae influenza la produzione di SCFA (specialmente di propionato) che a sua volta influenza la gluconeogenesi nel fegato, da cui deriva il glucosio per la lattogenesi che avrà un impatto sulla resa proteica del latte. Al contrario, il genere *Prevotella* era associato – come in altri studi – ad una minore resa del latte ma ad una maggiore produzione di acidi grassi volatili. Gli autori precisano che nonostante i risultati ottenuti non è chiaro come questo *taxon* abbia un impatto sulla resa proteica del latte. Anche il genere *Clostridium* si è dimostrato essere correlato ad una minore resa proteica del latte e, in base a quanto osservato anche da altri autori, sembra che questo genere sia associato a un minor contenuto di proteine. Nel corso di questo studio è emersa la forte presenza del genere *Sharpea* nel ruminante delle vacche più efficienti, batteri che fermentano il lattato e che sono stati correlati ad una maggiore concentrazione di SCFA. Inoltre, questi batteri sono stati associati da Kamke et al. (2016) ad una minor emissione di metano nelle pecore. Si può quindi speculare che un incremento della

concentrazione di questo genere aiuti a ridurre la perdita di energia ed efficienza che si verifica con la produzione ed emissione di metano da parte dei ruminanti, insieme ad un miglioramento della resa proteica del latte. In quest'ottica, studi più approfonditi a riguardo potranno aprire la strada allo sviluppo di probiotici atti a migliorare la qualità del latte agendo a livello di microbiota ruminale. La *review* di Matthews et al. (2019) si concentra anch'essa sulla relazione che sussiste tra microbiota ruminale e qualità del latte e carne derivati dall'animale, in termini di miglior utilizzazione dell'azoto da parte delle comunità ruminali. Gli autori affermano che una volta approfondita la conoscenza dei *pathways* metabolici che avvengono nel rumine sarà possibile formulare diete che inducano una migliore conversione dell'azoto in proteine ad alto valore biologico, che influenzeranno poi la qualità e composizione di carne e latte derivati. La ricerca in questo frangente della produzione animale è evidentemente ancora agli albori data la scarsità di dati a riguardo presenti in letteratura, ma rappresenta una grande potenzialità per un'ancora maggiore ottimizzazione dell'allevamento e della produzione zootecnica. Inoltre, una migliore utilizzazione dell'azoto nel rumine implica – come dimostrato in diversi progetti di ricerca – una minore liberazione di metano, connotato ecologicamente parlando molto rilevante.

#### 1.4.3 VARIABILITA' DEL MICROBIOTA RUMINALE A SECONDA DELLA DIETA

La dieta è uno dei principali fattori determinanti la composizione e la funzione del microbiota ruminale, che è il principale intermediario tra nutrienti assunti e *performance* dell'animale (Gleason et al. 2021). Ellison et al. (2017) affermano che la dieta influisce sulla composizione del microbiota ruminale più di quanto lo faccia la specie in cui questo risiede. Gleason et al. (2021) affermano che le variazioni di diversità microbica, di *richness* e di abbondanza relativa dei maggiori componenti sono correlati alla produttività dell'animale in termini di resa di latte ed efficienza di conversione. Alla luce di ciò, capire come formulare una dieta in funzione delle conseguenze che può avere su questi tratti tecnologici/economici dell'allevamento ovino risulta fondamentale. Per i ruminanti, la formulazione di diete ricche di foraggi sta diventando sempre più comune anche se in letteratura scarseggiano studi rivolti all'approfondimento della

loro influenza sul microbiota ruminale (Saro et al., 2014). Nonostante ciò, Liu et al. (2021) affermano che diversi tipi di foraggi influenzano la composizione del microbiota ruminale ma è evidente la necessità di ulteriori indagini a riguardo, soprattutto per quanto riguarda la specie *Ovis aries*. Il regime alimentare influenza anche la morfologia dell'epitelio ruminale, modulando quindi la fase di assorbimento dei nutrienti. Lo studio di Fernando et al. (2010) ha messo in luce come diete ad alto apporto di cereali aumentano l'accumulo di acidi grassi volatili nel rumine (specialmente propionato), causando modificazioni a livello di composizione e funzionalità delle comunità microbiche. Come affermano Liu et al. (2021) l'aumento degli acidi grassi implica un decremento di pH nel microambiente ruminale, condizione che potrebbe portare allo sviluppo di acidosi. Altri autori affermano inoltre che una dieta prolungata di questo tipo ha effetto sulle comunità microbiche associate alle cellule epiteliali del rumine, causando una serie di disordini metabolici nella pecora e anche in altri ruminanti (Q. Wang et al., 2020). Lo studio di Q. Wang et al. (2020) ha mostrato che il microbiota ruminale di pecora sottoposte ad una dieta meno calorica fosse maggiormente diversificato rispetto ad altre sottoposte ad una dieta più calorica. Il *phylum* Chloroflexi in particolare era significativamente più presente nei campioni riferiti alla dieta meno calorica; anche i generi *Papillibacter* e *Flexilinea* seguivano lo stesso andamento, potendo ipotizzare una sorta di migliore capacità di adattamento ed efficienza di conversione di questi microrganismi in caso di diminuito *intake* calorico. Al contrario, generi non identificati di Lachnospiraceae, il genere *Acetitomaculum*, generi non identificati di Veillonellaceae, i generi *Anaerovibrio* e *Succinivibrio* erano significativamente più presenti nel rumine di pecore sottoposte a dieta più calorica. Per quanto riguarda l'assetto funzionale, come da aspettative, il microbiota degli animali nutriti con alto apporto calorico presentava significativamente più geni legati alla degradazione dei carboidrati. Gli autori concludono sostenendo che la dieta più calorica sia quella da adottare per il *feeding* delle pecore. B. Wang et al. (2020) hanno messo a confronto il microbiota ruminale di pecore alimentate con una dieta ad alto contenuto di mais e pecore lasciate libere al pascolo. Le seconde presentavano una maggiore concentrazione di batteri appartenenti *phylum* Bacteroidetes, noti per essere molto efficienti nella degradazione di carboidrati complessi e per esercitare un effetto benefico sull'ospite. Nel primo gruppo invece è stato



osservato un significativo incremento del genere *Prevotella* (come da aspettative), associato principalmente alla degradazione dell'amido dei cereali. Come citato in precedenza, le prevotellacee sono associate a pecore con alto *residual feed intake* (Zhang et al., 2021), stando a significare una minor efficienza degli animali in cui questo genere batterico è molto presente nel rumine. Inoltre, Belanche et al. (2019) hanno osservato che il microbiota ruminale di pecore lasciate nutrirsi al pascolo era più abbondante e diversificato rispetto a quello di pecore a cui veniva somministrata una dieta precisa, fatto che rappresenta un importante processo adattativo. Lo studio di Saro et al. (2014) metteva a confronto l'effetto sul microbiota ruminale di una dieta basata su una specie di leguminosa (alfalfa) e una composta principalmente da fieno d'erba. Nel rumine del primo gruppo di pecore erano presenti più acidi grassi volatili, condizione dovuta probabilmente al maggior introito proteico. Gli acidi grassi volatili a catena corta (SCFA) esercitano un effetto benefico sulla fisiologia del rumine, oltre a rappresentare la maggior fonte di energia per il ruminante; adottare una dieta che implica una maggiore produzione di SCFA può essere una strategia di miglioramento dello stato di salute dell'animale, che si traduce in una maggiore efficienza produttiva. Quest'affermazione si basa sulla consapevolezza che la dieta sia il primo fattore che modula la concentrazione di questi metaboliti nel rumine di pecora e vacche (Ellison et al., 2017). Gli autori (Saro et al.) hanno investigato anche le popolazioni di protozoi, ma considerati anche altri progetti di ricerca analoghi presenti in letteratura non è possibile definire significative associazioni. *Fibrobacter succinogenes* si è rivelata essere la specie cellulolitica più presente nel rumine di entrambi i gruppi – in concordanza con risultati prodotti da studi analoghi –, associata però ad un'alta concentrazione di *Ruminococcus albus* nel gruppo nutrito con erba medica e di *Ruminococcus flavefaciens* (insieme a più popolazione fungine) nel gruppo nutrito con fieno. Gli autori sostengono che l'utilizzo di foraggi di bassa qualità esacerba la presenza e l'attività di batteri cellulolitici, ipotesi confermata dai risultati dello studio. Un altro studio (Gleason et al., 2021) ha approfondito l'effetto di diete con differenti apporti di fibra e di proteine sulla composizione del microbiota ruminale delle pecore: il cambiamento nella quantità di fibre ha avuto un impatto molto maggiore sulle comunità microbiche rispetto alle variazioni della quota proteica. In particolare, il *phylum* Bacteroidetes (con particolare riferimento alle famiglie Prevotellaceae

e Bacteroidaceae) si è dimostrato essere il più sensibile al cambiamento dell'apporto fibroso, aspetto che non sorprende dato il loro ruolo funzionale di degradazione della fibra. I generi *Ruminococcus* e *Clostridium* (appartenenti al *phylum* Firmicutes) hanno seguito lo stesso andamento, essendo anch'essi coinvolti nella fermentazione delle fibre vegetali. In generale, la maggior parte dei microrganismi che degradano la fibra diminuisce col diminuire della fibra stessa, comportando il decremento di tutta una serie di metaboliti (ad esempio gli SCFA) associati al metabolismo delle comunità microbiche. Gli autori hanno provato a correlare le popolazioni di archea con l'apporto di fibra, ottenendo però risultati contraddittori rispetto ad altri studi in letteratura, fatto che sottolinea la scarsità di informazioni di questo tipo. Per quanto riguarda la variazione della componente proteica, è emerso il leggero incremento di un genere della famiglia Paraprevotellaceae e di qualche popolazione appartenente al *phylum* Spirochaetes. È stato osservato infatti che alcuni membri di questo *phylum* presentano enzimi utili alla degradazione di peptidi e amminoacidi, avvalorando la conclusione secondo cui il decremento di un determinato substrato comporta la diminuzione dei batteri implicati nel suo metabolismo. Ellison et al. (2017) sostengono che popolazioni ruminali di *Bifidobacterium* siano associate a diete ad alto contenuto di cereali e nel corso dello studio hanno mostrato correlazione positiva con l'efficienza espressa in RFI, rappresentando questo un risultato che non era mai stato osservato. In ultimo, gli autori hanno messo in luce una correlazione negativa tra produzione di metano e dieta a base di foraggi, aspetto più che rilevante nell'ottica in cui la dieta può essere formulata anche con lo scopo di ridurre popolazioni microbiche associate alla metanogenesi.

In conclusione, è largamente condiviso (e dimostrato) che la dieta sia il principale fattore che determina la composizione del microbiota ruminale, che va a sua volta a influenzare il metabolismo dell'ospite, il suo stato di salute, le sue *performance* produttive e i prodotti da esso derivati. È evidente che ad oggi, in letteratura, sia limitata la presenza di studi che trattano l'argomento nei confronti della specie *Ovis aries* rispetto ad altri ruminanti quali la vacca, ma come riportato dalla maggior parte degli autori degli studi considerati, sta aumentando l'interesse per questo settore zootecnico. Anche in questo caso, l'avvento delle tecnologie di

sequenziamento *high-throughput* si pone alla base di studi di questo genere, dove variazioni a livello di composizione microbica non sarebbero mai rilevabili (o sarebbero assolutamente troppo grossolane) da tecniche coltura-dipendenti. Con la futura acquisizione di ulteriori conoscenze in questo campo sarà possibile comprendere (e sfruttare) in maniera più olistica le complesse interazioni che esistono tra dieta, microbiota ruminale e performance produttive degli animali.

## 1.5 TECNICHE DI ANALISI METAGENOMICHE

La metagenomica è definita come la raccolta teorica dei genomi di tutte le comunità microbiche presenti in un determinato ambiente (Escobar-Zepeda et al., 2015). Questa branca della biologia trova le sue origini nell'evoluzione della microbiologia classica e nello sviluppo continuo di tecniche che permettessero di arricchire sempre di più le conoscenze del mondo dei microrganismi.

A partire dai tentativi di Robert Koch di isolare e studiare determinati tipi di microbi, dall'utilizzo del microscopio all'ideazione e applicazione dei terreni di coltura selettivi fino all'avvento delle tecniche molecolari come la PCR (sviluppata nel 1985 dal premio Nobel Kary B. Mullis, Dale et al., 2013), l'elettroforesi e lo sviluppo di marcatori molecolari, lo studio della micro-ecologia delle comunità microbiche è stato oggetto di innumerevoli studi e ricerche. Questo interesse nasce dall'influenza che il microbiota esercita sull'ospite o sulla nicchia ecologica in cui risiede: alla luce di ciò, conoscerne la composizione e metterne in evidenza le differenze diventa uno degli obiettivi principali dei ricercatori. Da questa prospettiva la metagenomica viene applicata a scopo "filogenetico" (Garrido-Cardenas et al., 2017), dove sfruttando geni come l'rRNA 5S o 16S si identificano i componenti a livello tassonomico del microbiota, ma le analisi metagenomiche spesso vengono condotte per ottenere informazioni anche sul profilo funzionale del microbiota. Ciò significa indagare sulla presenza di determinati geni, proteine o enzimi contenuti nei genomi dei microrganismi presenti oppure espressi fenotipicamente. Le tecniche molecolari alla base dell'analisi metagenomica sono classificate come tecniche coltura-indipendenti in quanto non richiedono l'isolamento e la caratterizzazione del

microrganismo in laboratorio attraverso la semina in agar colturali, bensì sfrutta le informazioni che si possono ottenere dall'analisi del DNA. Questo è il motivo principale dell'espansione e del successo delle biotecnologie di nuova generazione, alla luce della recente consapevolezza che circa il 99% dei microrganismi conosciuti non sono coltivabili in laboratorio (Garrido-Cardenas et al., 2017).

Per poter quindi usufruire delle informazioni contenute nel DNA, si è reso necessario venire a conoscenza della sua sequenza. Da qui l'avvento delle tecnologie di sequenziamento che si trovano alla base delle analisi metagenomiche. Dagli anni Settanta ai primi anni 2000 la tecnica più rivoluzionaria e utilizzata per il sequenziamento del DNA è stata quella sviluppata da Frederick Sanger e colleghi (Van Dijk et al., 2014), nota anche come sequenziamento con dideossiterminatori (Dale et al., 2013), basata sull'impiego di dideossinucleotidi (nucleotidi sprovvisti del gruppo 3' -OH necessario per formare il legame fosfodiesterico) i quali permettono di ottenere, attraverso clonaggi, frammenti di lunghezza diversa a seconda di dove si lega il dideossinucleotide. Eseguendo quattro diverse reazioni – una per ogni nucleotide marcato – e sottoponendo i frammenti prodotti a elettroforesi capillare dov'è presente un detector deputato alla captazione della luminescenza dei nucleotidi, si risale alla sequenza del DNA stampo (ordinando i frammenti del più corto al più lungo). Il metodo di Sanger consente di ottenere delle sequenze dette "*reads*" lunghe circa 800 bp con un'accuratezza molto alta, qualità che ancora oggi lo rendono il *gold standard* per alcuni tipi di sequenziamenti (Niedringhaus et al., 2011). Nonostante ciò il metodo Sanger presenta alcuni svantaggi, soprattutto se lo si mette a confronto con le tecnologie di nuove generazione: l'alta laboriosità del processo, i tempi relativamente lunghi e i costi alti, caratteristiche che alla fine del Ventesimo secolo diventavano sempre più incompatibili con la crescente richiesta di analisi molecolari (Brown, 2008). Per tale motivo il mondo della ricerca ha intrapreso lo sviluppo di tecniche per il sequenziamento più rapide, meno costose e più efficienti; queste tecnologie sono quelle che oggi vengono denominate *Next Generation Sequencing* (NGS). Tali strumenti hanno a poco a poco preso piede in molti ambiti della ricerca, portando il livello di conoscenze nella biologia a livelli mai raggiunti (Mardis, 2016). La Figura 2 illustra le scoperte e le invenzioni

responsabili degli enormi progressi in campo biologico e microbiologico, a partire dal Quindicesimo secolo fino ad arrivare ai giorni nostri.

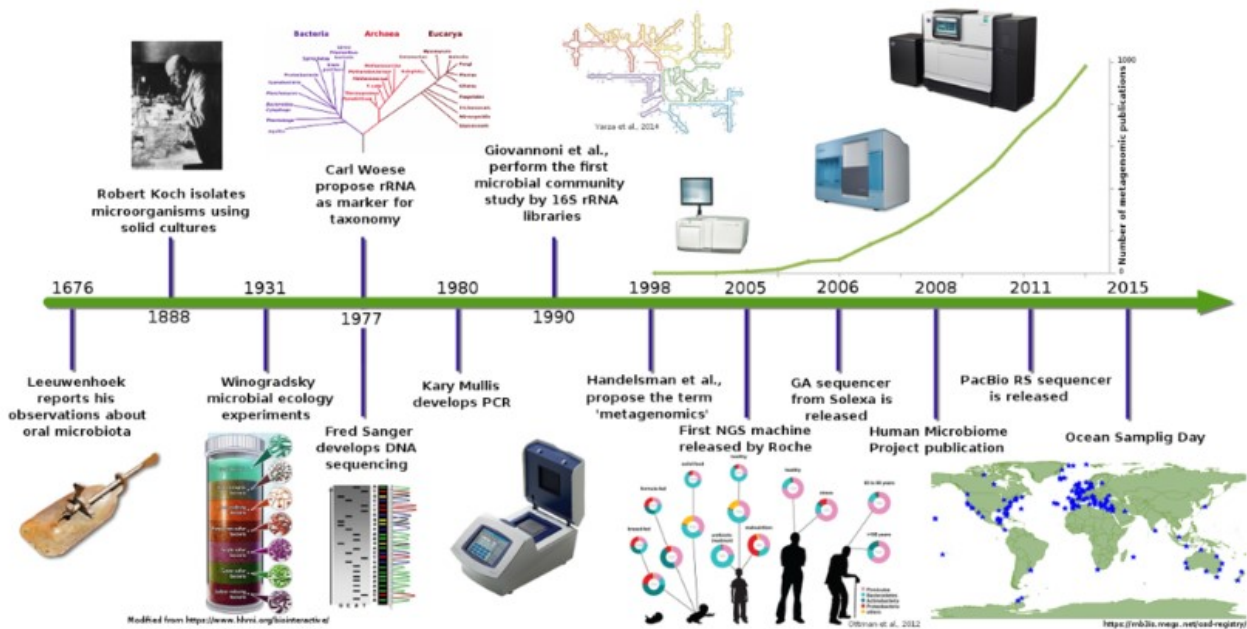


Figura 2. Linea del tempo che riporta le principali scoperte e pietre miliari della microbiologia. Fonte: Escobar-Zepeda et al., 2015.

La prima piattaforma per il sequenziamento NGS è stata immessa sul mercato nel 2005 e si trattava della Roche 454®, basata sulla tecnica del pirosequenziamento (Van Dijk et al., 2014). Questo sistema si basa sul rilascio di pirofosfato al momento dell'incorporazione di un nucleotide al filamento di DNA, utilizzato dall'enzima ATP sulfurilasi per produrre ATP. In presenza dell'enzima luciferasi e del suo substrato luciferina l'ATP viene utilizzato per far avvenire una reazione luminosa tra le due che si traduce in un picco, indicando l'incorporazione del corretto nucleotide. L'incorporazione di nucleotidi dello stesso tipo è rappresentata da un picco dell'altezza proporzionale al numero di nucleotidi. L'amplificazione dei frammenti avviene attraverso una *emultion PCR* su biglie immobilizzate su un vetrino posto sopra un *detector*, che capta la luce prodotta da ogni microreattore contenete una biglia. La sequenza delle basi viene quindi ricavata sfruttando la sintesi di un nuovo filamento di DNA, aspetto da

cui prende il nome la dicitura *sequencing by synthesis*, che caratterizza altre tecnologie come Illumina o il sequenziamento basato sul rilascio di ioni idrogeno (Ion-Torrent). Grande punto di forza della Roche 454® è la capacità di produrre *reads* lunghe fino 450-900 bp o più, (Goswami et al., 2022) il che la rende la tecnologia più performante da questo punto di vista. La Figura 3 illustra il principio di funzionamento di questa tecnologia.

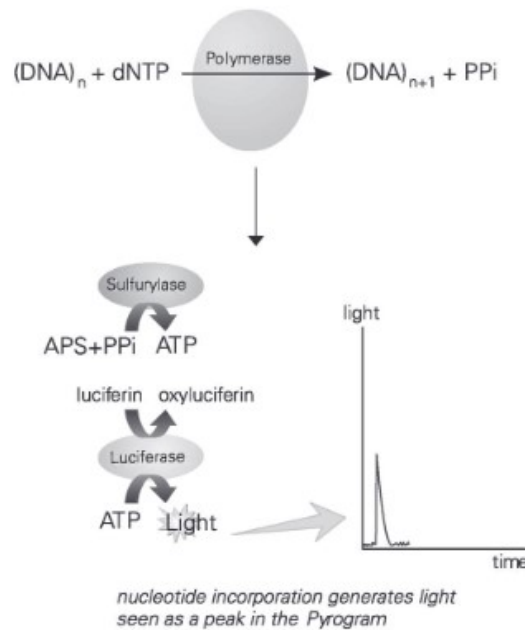


Figura 3. Il principio del Pirosequenziamento. Fonte: Marsh et al., 2007.

Poco dopo viene introdotto in commercio il sequenziatore Illumina®, anch'esso basato sul sequenziamento *by synthesis*. La tecnica prevede l'amplificazione clonale dei frammenti di DNA attraverso una *bridge PCR* (Figura 4), dove i frammenti sono ligati ad una base solida grazie a degli adattatori che presentano alle estremità. Questi vengono amplificati una volta che l'estremità libera si lega anch'essa al supporto solido grazie all'altro adattatore, facendo assumere al frammento una forma a ponte. I nucleotidi utilizzati dalla polimerasi sono marcati con fluorofori diversi in modo che ognuno emetta fluorescenza a lunghezze d'onda specifiche. Registrando questi eventi luminosi si risale alla sequenza del DNA stampo. Attraverso il

sequenziamento Illumina si ottengono *reads* lunghe 100-150 bp e quantità di dati in uscita che vanno da 360 a 500 Gb (Goswami et al., 2022).

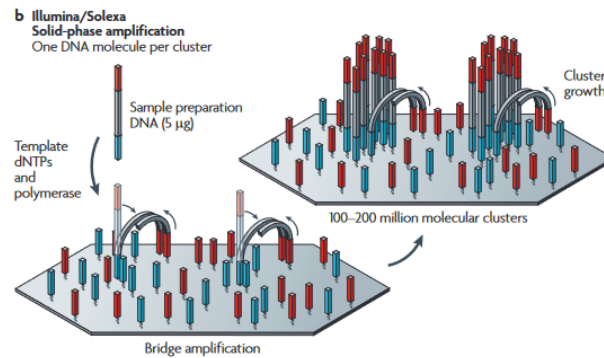


Figura 4. Bridge amplification che avviene durante il sequenziamento Illumina. Fonte: Metzker et al., 2010.

Un altro tipo di sequenziatore utilizzato spesso per le analisi metagenomiche – come in questo studio – è la tecnologia Ion-Torrent, che sfrutta le variazioni di pH (0,02 unità di pH per ogni nucleotide, Rothberg et al., 2011) dovute al rilascio di protoni conseguente all’incorporazione dei diversi nucleotidi al DNA in replicazione (Figura 5B e 6). I frammenti di DNA muniti di adattatori vengono ligati ognuno alla superficie di una biglia, supporto sul quale avverrà l’*emulsion PCR*. Questa ha luogo all’interno di migliaia di pozzetti contenenti la biglia sulla quale il DNA si amplificherà. Al di sotto dei micropozzetti si trova uno stato metallico sensibile ai cambiamenti di pH, poi un altro strato ricco di sensori FET (*field effect transition*, Niedringhaus et al., 2011) che si trovano uno sotto ogni pozzetto e che registrano queste differenze di concentrazione ionica (Figura 5A). Una fase fluida, infine, consente lo scorrimento ed il lavaggio dei diversi nucleotidi utilizzati dalla polimerasi. Una delle caratteristiche che contraddistinguono questa tecnologia è la capacità di sequenziare con grande accuratezza le regioni omopolimeriche; è stato osservato che un omopolimero di 5 nucleotidi viene sequenziato da Ion Torrent con un’accuratezza del 97.5% (Niedringhaus et al., 2011). Altro aspetto importante di questo sequenziatore è l’assenza di sistemi di letture della luce, il che dovrebbe portare ad un abbassamento dei costi di produzione e utilizzo (Niedringhaus et al., 2011).

Anche questa tecnologia di sequenziamento sfrutta la sintesi del frammento complementare al DNA stampo (*sequencing by synthesis*). Le *reads* prodotte hanno una lunghezza di 150-200 bp, con un tasso di errore pari all'1,7% (Goswami et al., 2022). Reads così corte rendono molto più laboriosa la fase di assemblaggio delle sequenze, riducendo l'utilità di Ion Torrent nei progetti di sequenziamento e assemblaggio *de novo* dei genomi (Niedringhaus et al., 2011).

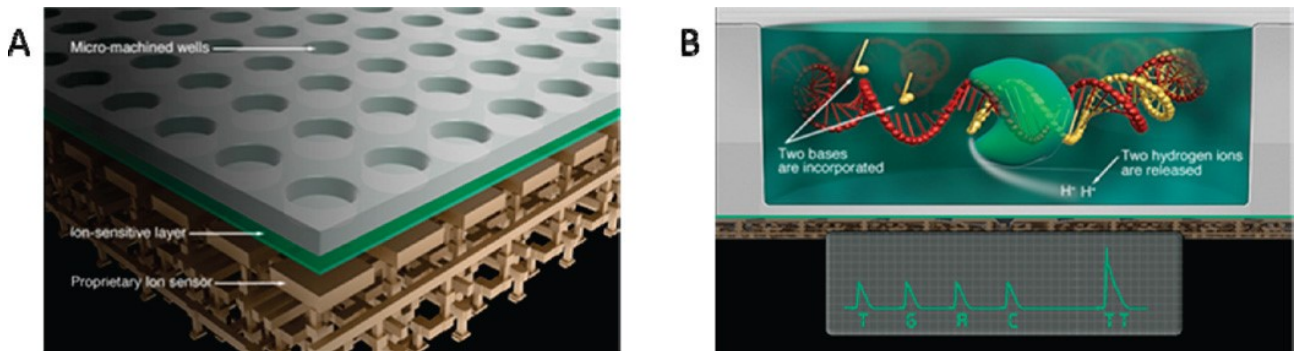


Figura 5. (A) Struttura del chip di sequenziamento. (B) Principio del sequenziamento Ion Torrent. Fonte: Niedringhaus et al., 2011.

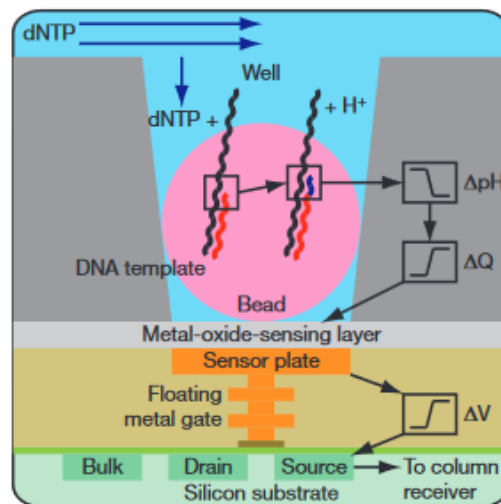


Figura 6. Descrizione più dettagliata del principio del sequenziamento Ion Torrent. Fonte: Rothberg et al., 2011.

Queste sono le tre tecnologie più utilizzate per condurre analisi metagenomiche (Escobar-Zepeda et al., 2015), anche se non sono da sottovalutare tecniche emergenti quali PacBio RS (Pacific Bioscience) e l'Oxford Nanopore, le cosiddette *Third Generation Sequencing* o 3GS (Ye



et al., 2016). La differenza fondamentale di queste ultime rispetto alle tecnologie di seconda generazione è rappresentata dall'assenza di uno step di amplificazione clonale, in quanto questi strumenti sono in grado di sequenziare una singola molecola di DNA, producendo *reads* da 100.000 bp (Lee et al., 2016) con un *coverage* molto alto (50x o 100x, Ye et al., 2016). Per questo motivo le tecnologie di terza generazione trovano vasto impiego nel sequenziamento di genomi *de novo* (Lee et al., 2016), dove avere lunghe sequenze di riferimento consente di assemblare le *reads* ottenute dal sequenziamento di seconda generazione più facilmente. Come riportato in Figura 7, le sequenze ottenute dalle 3GS presentano un tasso d'errore non indifferente, decisamente maggiore di quello delle *reads* prodotte dalle NGS di seconda generazione; per questo motivo sono stati sviluppati *tools* bioinformatici in grado di correggere parte degli errori associati alle 3GS, i quali esercitano un però un peso non indifferente a livello computazionale e tempistico (Ye et al., 2016). L'enorme quantità di *reads* molto lunghe ottenute dai sequenziamenti di terza generazione contribuiscono anche ad aggravare il problema dell'analisi e dello *storage* dei dati bioinformatici, che richiedono database sempre più grandi e software sempre più efficienti.

La Figura 7 riporta alcune caratteristiche tecniche associate alle principali piattaforme di sequenziamento utilizzate per le analisi metagenomiche.

	<b>Roche 454</b>	<b>IonTorrent PGM</b>	<b>Illumina</b>	<b>PacBio RSII<sup>a</sup></b>
Maximum read length (bp)	1200	400	300 <sup>b</sup>	50,000
Output per run (Gb)	1	2	1000 <sup>c</sup>	1
Amplification for library construction	Yes	Yes	Yes	No
Cost/Gb (USA Dollar)	\$9538.46	\$460.00	\$29.30	\$600
Error kind	Indel	Indel	Substitution	Indel
Error rate (%)	1	~1	~0.1	~13
Run time	20h	7.3h	6 days	2h

Figura 7. Caratteristiche delle principali piattaforme utilizzate per la metagenomica. Fonte: Escobar-Zepeda et al., 2015.

Ad oggi, un'analisi metagenomica può essere condotta secondo due diversi approcci: il metodo *shotgun sequencing* e il metodo *amplicon sequencing*. La scelta dipende dall'obiettivo della ricerca, in quanto sfruttando il primo approccio si possono ottenere informazioni riguardo

la composizione tassonomica e funzionale della comunità microbica, mentre con il secondo si caratterizza solo dal punto di vista della composizione tassonomica. La Figura 8 riporta i *workflow* relativi ai due approcci, che verranno approfonditi nelle prossime pagine.

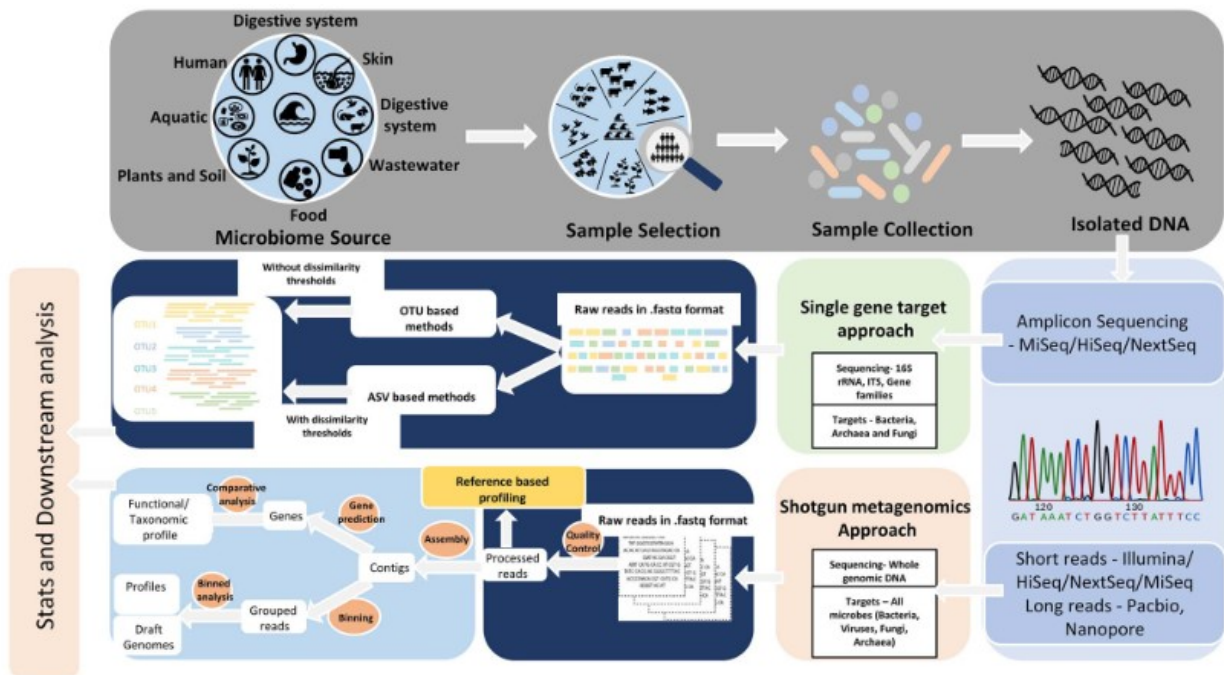


Figura 8. Workflow relativi all'approccio shotgun e all'approccio single gene target (amplicon sequencing) nell'ambito di analisi metagenomiche. Fonte: Bharti et al., 2021.

### 1.5.1 SHOTGUN METAGENOME SEQUENCING

Con *Shotgun Metagenome Sequencing* si intende un'analisi *untargeted*, dove lo scopo non è ottenere la sequenza di un preciso gene e nemmeno dell'intero genoma di un preciso microrganismo; la finalità è quella di sequenziare gli interi genomi di tutti i microrganismi presenti nel campione, che rappresenta direttamente il loro ambiente naturale (Quince et al., 2017 e Chen et al., 2005). Questo tipo di sequenziamento si basa sulla frammentazione casuale del DNA genomico, sul sequenziamento dei frammenti ottenuti e sull'assemblaggio e l'analisi di questi ultimi, dai quali si possono ottenere informazioni riguardo la composizione tassonomica della comunità microbica considerata e del relativo microbioma, senza sapere,

all'inizio, a quale genoma appartenga ogni frammento (Sharpton et al., 2014). La Figura 9 illustra schematicamente gli obiettivi che vengono posti nell'ambito di un'analisi *shotgun*.

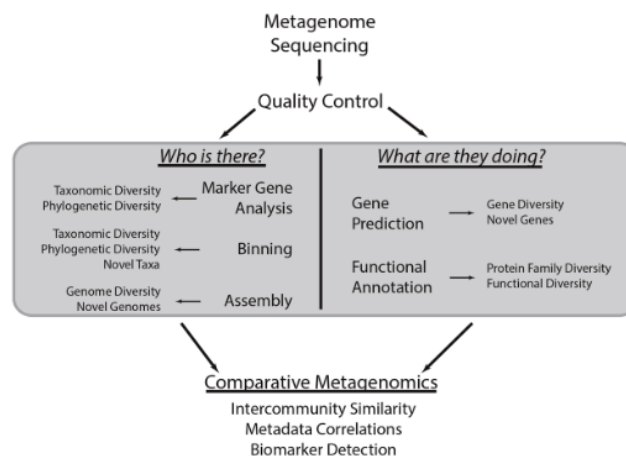


Figura 9. Schema degli obiettivi da raggiungere attraverso un'analisi *shotgun*. Fonte: Sharpton et al., 2014.

Dal punto di vista analitico l'analisi *shotgun* prevede un primo step di estrazione del DNA microbico e di preparazione delle librerie: è noto che il metodo di estrazione del DNA può impattare l'analisi metagenomica a livello di composizione dei dati provenienti dal sequenziamento, in quanto la tecnica per l'estrazione scelta potrebbe lisare le cellule in modo non equo, ricavando il DNA genomico solo dei microrganismi meno resistenti (Quince et al., 2017). Anche le potenziali contaminazioni che interessano i reagenti non sono da sottovalutare (Quince et al., 2017).

Una fase fondamentale dell'analisi metagenomica è l'analisi bioinformatica. Lo step di *binning* consiste in un primo assemblaggio delle sequenze in *contig* e nell'associazione di ogni *contig* ottenuto ad una determinata unità tassonomica in base a un confronto con specifici *dataset* (metodo *supervised*); in alcuni casi si può evitare di sfruttare genomi già sequenziati e associare i *contig* in base alla similarità delle sequenze, considerando per esempio il contenuto di guanina e citosina o il livello di *coverage* (metodo *unsupervised*). Punto critico (Figura 11) è l'assemblaggio delle reads in *contig* sempre più grandi, poi in *scaffold*, per elaborare alla fine l'intero genoma dei microrganismi presenti nel campione.

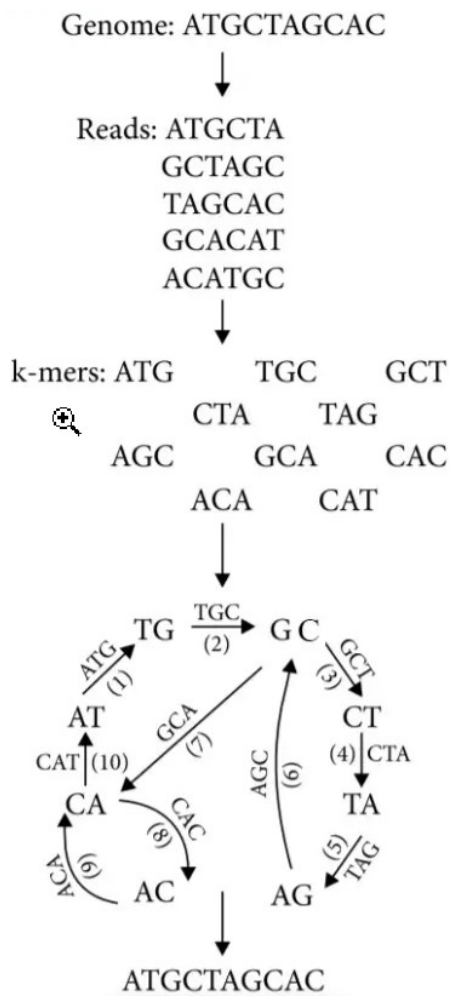


Figura 10. Esempio di costruzione di un grafico di de Bruijn. Fonte: <https://towardsdatascience.com/genome-assembly-using-de-bruijn-graphs-69570efcc270>

Esiste un metodo molto diffuso per l'assemblaggio *de novo* dei genomi, introdotto nel 1995 da Ramana M. Idury e Michael S. Waterman (Li et al., 2012): si tratta del metodo di *de Bruijn* (Quince et al., 2017), dove si dividono le *reads* ottenute dal sequenziamento in sotto-sequenze parzialmente sovrapposte di lunghezza fissa  $k$  ( $k$ -mers) che danno origine al grafico di *de Bruijn* (Figura 10). I vertici sono rappresentati dalle stringhe  $k$ -mer mentre i bordi sono costituiti dai nucleotidi che si sovrappongono, quello precedente e quello successivo. L'assemblatore deve, attraverso il grafico, riuscire a ricostruire il genoma evitando ripetizioni e generazione di sequenze non genomiche. Esempi di programmi sviluppati per l'assemblaggio di sequenze basati sul metodo *de Bruijn* sono Velvet e ABySS (Khan et al., 2018), ritenuti da Khan et al. i migliori *tools* per l'assemblaggio *de novo* dei genomi in base ad un confronto con altri cinque programmi.

Assemblare uno o più genomi senza poter usufruire di un riferimento rappresenta un passaggio alquanto arduo: *in primis* per l'alto tasso di polimorfismo dei genomi appartenenti ad individui della stessa specie; in seconda battuta, anche le sequenze conservate possono dar luogo a false sovrapposizioni e complicare ulteriormente l'assemblaggio (Chen et al., 2005). In quest'ottica si associa grande potenzialità alle tecniche di sequenziamento di terza generazione che producendo *reads* lunghe migliaia di basi con alto *coverage*, rendono questo passaggio decisamente meno problematico (Quince et al., 2017). Per quanto riguarda il *coverage*, nell'ambito di un'analisi metagenomica è importante che sia uniforme lungo tutto il genoma;

questo è molto d'aiuto per la ricostruzione di sequenze ripetute, per rilevare eventuali errori di sequenziamento e per determinare la presenza di aplo tipi/alleli diversi (Quince et al., 2017).

Una volta acquisito il genoma assemblato, ha luogo l'analisi delle sequenze per completare il profilo tassonomico e funzionale delle comunità microbiche attraverso specifici *tools* bioinformatici: due programmi molto utilizzati per l'analisi della diversità tassonomica sono QIIME e Mothur, invece per l'analisi funzionale e la predizione genica sono da ricordare BLAST2GO, MEGAN e KEGG (Hodkinson et al., 2015). Lo studio delle caratteristiche funzionali

molto spesso si sfrutta per caratterizzare il resistoma del microbiota (Quince et al., 2017) oppure per ricercare la presenza di microrganismi o geni rari (Langille et al., 2013). Il successo di quest'analisi è legato all'annotazione e alla disponibilità di sequenze codificanti, come la presenza di genomi sequenziati e pubblicati determina il successo generale del *shotgun metagenomic sequencing*. La relativamente bassa presenza di annotazioni, infatti, è uno dei principali *gap* della presente tecnica (Quince et al.,

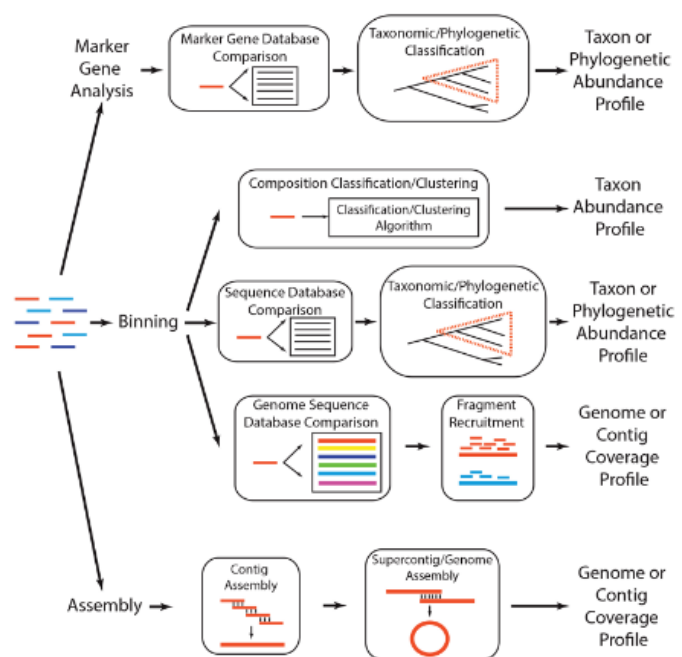


Figura 11. Step che costituiscono un'analisi shotgun. Fonte: Sharpton et al., 2014.

2017). La Figura 11 sintetizza i diversi passaggi che costituiscono un'analisi *shotgun*.

Questa tecnica per studiare le comunità microbiche si contrappone all'*amplicon sequencing* – tecnica *targeted* utilizzata nel presente studio – dove attraverso una PCR viene amplificato un gene marker tassonomicamente informativo: il più utilizzato è il gene ribosomiale 16S (Bharti et al., 2021). L'analisi delle sequenze ottenute permette di ricavare in termini qualitativi e quantitativi la composizione delle comunità microbiche. Come afferma Sharpton et al. (2014) questo approccio presenta alcuni svantaggi che verrebbero ovviati da quello *shotgun*: la poca

efficacia della PCR nei confronti di determinati componenti della comunità microbica; gli errori nell'assemblaggio degli ampliconi o durante il sequenziamento che danno origine a sequenze artificiali e/o difficili da identificare; l'impossibilità di caratterizzare il microbiota dal punto di vista funzionale; il rischio di non amplificare il marker scelto in microrganismi il cui genoma muta più velocemente della media; il rischio di sovrastimare la diversità microbica legato all'*horizontal gene transfer* che avviene tra i vari *taxa*. D'altro canto anche la metagenomica *shotgun* può risultare svantaggiosa per altri motivi come la maggior soggezione a contaminazioni di DNA estraneo al campione, la necessità di specifiche conoscenze e competenze, l'utilizzo di strumenti bioinformatici computazionalmente complicati, i costi maggiori.

#### 1.5.2 RIBOSOMAL 16S

L'approccio *amplicon sequencing* che sfrutta il gene 16S (detto metatassonomica o *metabarcoding*, Durazzi et al., 2021 e Pollock et al., 2018) si pone come obiettivo quello di identificare dal punto di vista tassonomico i microrganismi presenti nel campione, a differenza dell'approccio *shotgun* in cui si mira anche ad un'analisi funzionale (Garrido-Cardenas et al., 2017). L'analisi del microbiota sotto questo punto di vista è concettualmente meno complicata della *shotgun metagenomic*, in quanto non si presenta il problema dell'assemblaggio di svariati genomi, bensì solo di alcune porzioni di un gene omologo tassonomicamente informativo. Il gene considerato il *gold standard* per la caratterizzazione tassonomica del microbiota è il gene procariotico ribosomiale 16S, che costituisce la subunità minore 30S del ribosoma (Bharti et al., 2021). Questo gene è universale (Wang et al., 2009) e altamente conservato tra le specie – nonostante possieda un efficace potere discriminatorio –, indicando il suo coinvolgimento in funzioni cellulari di base. Presenta regioni molto conservate che vengono sfruttate per disegnare *primer* universali in modo da amplificare l'intero gene o solo alcune porzioni. Queste ultime sono quelle ipervariabili, utili all'analisi filogenetica in quanto presentano sufficienti diversità interspecifica e similarità intraspecifica. Altra caratteristica vantaggiosa è rappresentata dalla sua lunghezza di appena 1540 bp (Bharti et al., 2021). Ad oggi, questo

approccio per studiare le comunità microbiche è diventato il più diffuso al mondo (Pollock et al., 2018) grazie a una serie di vantaggi che presenta e che comprendono: accessibilità a livello economico; disponibilità e praticità di kit commerciali per l'estrazione del DNA e la preparazione delle librerie; la velocità dell'analisi; la relativamente alta profondità tassonomica che si raggiunge; la disponibilità di database di sequenze annotate (Starke et al., 2021). Un esempio di quest'ultima è rappresentato dal *Ribosomal Database Project*, che accumula le sequenze dei geni ribosomiali ottenute dai vari gruppi di ricerca, in modo da raccogliere e approfondire le conoscenze dei polimorfismi del gene (Wang et al., 2009). Nonostante i grandi vantaggi che caratterizzano l'approccio *amplicon sequencing*, Durazzi et al. (2021) hanno dimostrato che con l'approccio *shotgun* è possibile identificare un numero maggiore di generi batterici rispetto alla tecnica del 16S. È altresì noto che i polimorfismi del gene 16S non sono sufficienti per discriminare specie strettamente collegate tra loro (Coenye et al., 2003).

Con l'avvento e l'implementazione delle tecnologie di sequenziamento *high-throughput* insieme al conseguente aumento dei sequenziamenti, è emersa l'esistenza di diverse regioni ipervariabili tassonomicamente informative all'interno del gene 16S (Mao et al., 2012); ad oggi siamo a conoscenza di 9 di queste regioni, indicate in Figura 12 insieme alle regioni conservate

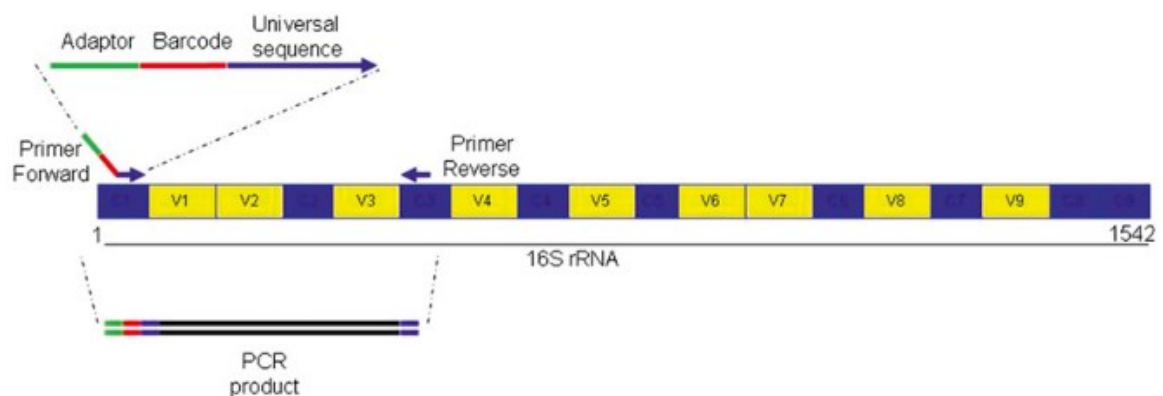


Figura 12. Illustrazione delle regioni variabili e conservate del gene 16S insieme ad un prototipo di primer universale che presenta una sequenza barcode e un altro adattatore. Fonte: Del Chierico et al., 2015.

sfruttate per disegnare i primer ed al prototipo di un prodotto di PCR flaggato con la sequenza *barcode* campione-specifica e l'adattatore utile per il sequenziamento.

Per aumentare l'accuratezza tassonomica dell'analisi spesso si adotta un approccio *multi-amplicon*, come nel caso del presente progetto di Tesi. Vengono cioè sequenziate

simultaneamente più regioni ipervariabili o più parti di queste regioni (Schriefer et al., 2018). Ad esempio, uno studio dimostra che la combinazione delle regioni V2,3,6 è stata in grado di discriminare correttamente a livello di specie tutti i componenti presenti nel campione (110 specie, Pollock et al., 2018). In generale è stato osservato che le regioni V3 e V6 sono le più utilizzate per gli studi metagenomici, anche se i primer utilizzati dai diversi gruppi di ricerca non sempre corrispondono, portando ad una minor standardizzazione nell'ambito di analisi comparative (Wang et al., 2009). In base alla bibliografia attualmente presente, le regioni più variabili sembrano essere la 1, la 2 e la 6, in particolare le sotto-regioni non coinvolte nelle strutture terziarie, quelle più distanti dal centro del ribosoma assemblato e quelle note per essere molto variabili anche all'interno della stessa specie (Coenye, et al., 2003). Bukin et al. (2019) affermano che le regioni V2 e V8 sono quelle che mutano più velocemente, mentre Chakravorty et al. (2007) hanno appurato che la regione V6 è la più corta ed eterogenea. È importante considerare che la selezione di una o più regioni da sequenziare ha un impatto sulla stima della diversità microbica (Bukin et al., 2019) insieme alla scelta dei primer, che, come dimostrato da Fouhy et al. (2016) influenza significativamente la composizione microbica in quanto alcuni set potrebbero essere inefficaci nei confronti di alcuni gruppi tassonomici. I primer utilizzati per amplificare una o più regioni del gene sono lunghi solitamente 15-20 nucleotidi e il primo set è stato sviluppato sul rRNA 16S di *Escherichia coli* (Wang et al., 2009). In generale, si consideri che nessun primer universale è efficace per la totalità dei microrganismi presenti nel campione (Pollock et al., 2018).

In questo contesto si associano enormi aspettative all'avvento delle tecnologie di sequenziamento di terza generazione, in quanto sarà possibile ottenere l'intera sequenza del gene 16S e aumentare la risoluzione tassonomica delle comunità microbiche oggetto di studio (Seol et al., 2022).

All'interno della cellula il prodotto del gene ribosomiale presenta una struttura secondaria stabile e ripiegata, che in alcuni punti assume forme ad anello (*loops*) intervallando tratti più lineari. Alcune delle regioni *loop* sono fortemente conservate tra procarioti, quelle lineari sono



di solito le più variabili (Wang et al., 2009). La Figura 13 riporta la struttura secondaria del gene 16S di *E. coli*.

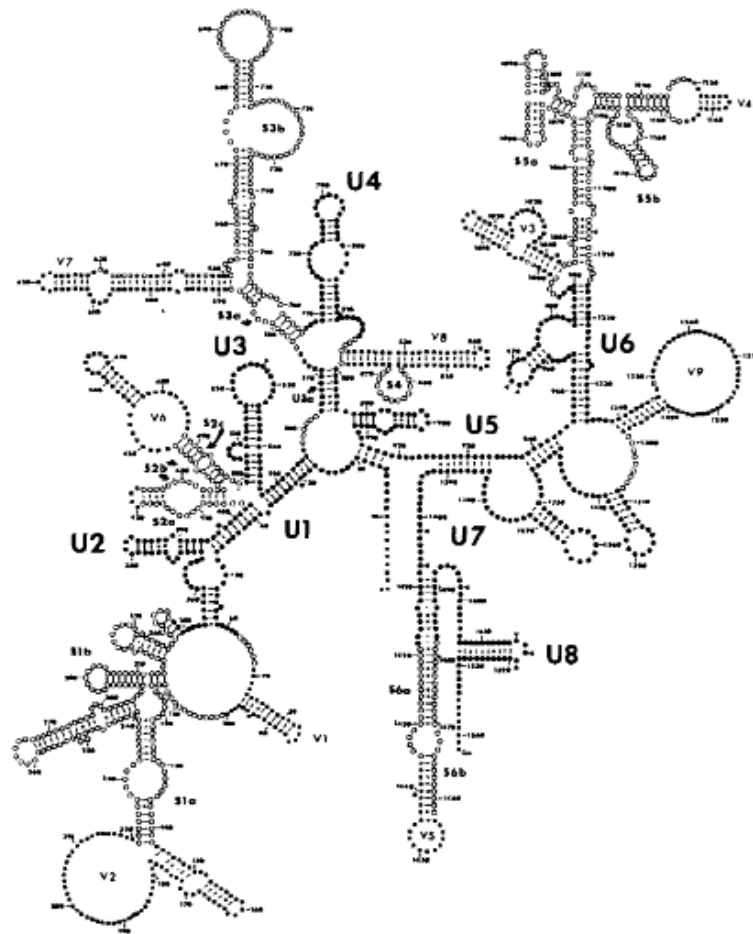


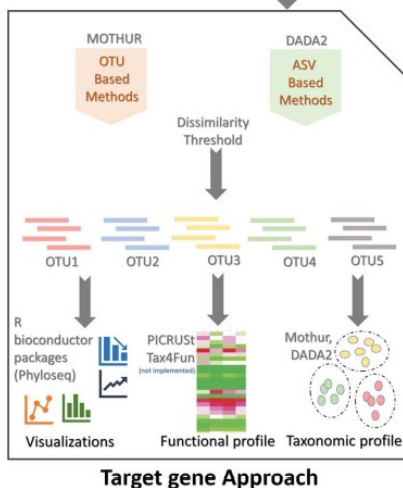
Figura 13. Rappresentazione delle regioni universali ("U"), semi-conservate ("S") e variabili ("V") del gene 16S di *E. coli* riportata in base alla sua struttura secondaria. Fonte: Gray et al., 1984.

Nei genomi batterici è possibile riscontrare più copie del gene 16S, da una fino a 15 (Coney et al., 2003). Coenye et al. (2003) affermano che il numero massimo di nucleotidi diversi tra le copie del 16S nello stesso genoma è 19, quindi la percentuale minima di similarità tra le sequenze sarebbe pari al 98.74%. Nonostante ciò, è stato osservato su alcuni actinomiceti che l'eterogeneità intra-genomica delle sequenze di queste copie può arrivare al 6.5% (Coney et al., 2003). Un'altra interessante osservazione degli autori riguarda il numero di copie del 16S presenti nel genoma, il quale sembra essere collegato alla microecologia del batterio: condizioni ambientali spesso variabili rispecchiano un numero maggiore di copie nel genoma (Coenye et al., 2003).

Come per la metagenomica, anche in questo approccio il metodo di estrazione del DNA ha impatto sul successo finale dell'analisi. C'è infatti il rischio che il metodo di estrazione non sia pienamente efficace soprattutto nei confronti di microrganismi resistenti, lasciando intatte, per esempio, endospore o parte dei batteri Gram positivi (Pollock et al., 2018). È stato osservato da numerosi autori che specifici gruppi tassonomici variano in base al metodo di estrazione; in linea di massima, sembra che tecniche di estrazione che prevedono l'utilizzo di biglie (come nel caso del presente progetto di Tesi) migliorino la performance generale dell'analisi, aumentando la quantità di DNA estratto (soprattutto di spore e Gram positivi) e facendo registrare maggiore diversità batterica (Pollock et al., 2018).

Per accertare l'efficacia dei diversi step dell'analisi (estrazione, amplificazione, costruzione delle librerie e sequenziamento) è possibile impiegare come controllo delle *mock communities*, comunità microbiche artificiali a composizione nota. In alternativa esistono dei *spike-in standards* da aggiungere direttamente al campione (Pollock et al., 2018).

L'associazione delle *reads* sequenziate a determinate OTU (*operative taxonomic unit*) è uno dei primi step dell'analisi dei dati nell'ambito del *metabarcoding* (Pollock et al., 2018). Questa



operazione consiste nel raggruppare le sequenze ottenute in base alla similarità, che significa vicinanza tassonomica. Anche questo passaggio è soggetto a potenziali *bias* legati al metodo scelto per il *clustering* e alla soglia di similarità inserita per il raggruppamento in OTU (Pollock et al., 2018). Alcuni dei programmi più utilizzati per condurre le analisi di diversità microbica sono MG-RAST, DADA2 e, anche per questo approccio, Mothur e QIIME. Un altro metodo più recente e

Figura 14. Rappresentazione delle due tecniche di assegnazione tassonomica alle sequenze ottenute (OTU e ASV).  
Fonte: Bharti et al., 2021.

meno diffuso per classificare le *reads* ottenute del sequenziamento è l'*amplicon sequencing variants* (ASV), considerato più accurato del raggruppamento in OTU in

quanto implica l'utilizzo di una soglia di similarità tra le sequenze più alta (Bharti et al., 2021).

Alla luce di tutti i potenziali punti critici che si possono presentare nel corso di un'analisi di *metabarcoding*, appare essenziale l'elaborazione di un preciso e solido disegno sperimentale (Pollock et al., 2018).

In riferimento al fatto che il *metabarcoding* non consente di acquisire informazioni sul profilo funzionale del microbiota in esame, si cita uno studio pubblicato nel 2013 da Langille et al. in cui viene sviluppato un programma (PICRUSt) in grado di predire una serie di caratteristiche funzionali in base alle informazioni filogenetiche rappresentate in questo caso dalle sequenze del 16S, servendosi di un database di riferimento (Langille et al., 2013). Nello specifico vengono considerati i genomi di riferimento annotati di organismi filogeneticamente molto vicini, grazie ai quali viene predetto l'assetto funzionale delle comunità microbiche presenti nel campione in base alle sequenze del gene marker tassonomicamente rilevante. Un altro programma molto utilizzato dai ricercatori per la predizione del profilo funzionale è Tax4Fun (Zhang et al., 2021). Questo rappresenta un grande opportunità per il mondo della ricerca nel campo della microbiologia, che prende il nome di "metagenomica predittiva" e che concettualmente combina *shotgun metagenomic e amplicon sequencing* (Langille et al., 2013).

## 1.6 OBIETTIVO DELLA TESI

Questo lavoro di Tesi si colloca all'interno del progetto PRECISLAT, che si pone come scopo il miglioramento dell'efficienza e della sostenibilità dell'allevamento ovino, con particolare attenzione alla produzione lattiero-casearia e alle proprietà tecnologiche del latte, attraverso tecniche di alimentazione e zootecnia di precisione. In questo contesto, scopo della presente Tesi è stato quello di caratterizzare il microbiota di tre diverse matrici, latte, feci e liquido ruminale, provenienti da due gruppi sperimentali di pecore di razza Sarda sottoposte a due diete, che differivano per la quantità di alfalfa (*Medicago sativa*). L'erba medica è una leguminosa che viene utilizzata in tutto il mondo per il *feeding* dei ruminanti, in quanto presenta ottime caratteristiche nutrizionali unite ad un costo moderato della sua coltivazione. La quota di questo foraggio nella dieta sperimentale ha lo scopo di fornire maggiore quantità

di fibra digeribile rispetto ai concentrati amilacei che caratterizzano la dieta iniziale, in modo da migliorare l'equilibrio ruminale e lo stato immunitario dell'animale.

La caratterizzazione del microbiota è stata condotta mediante un'analisi metagenomica di tipo *amplicon sequencing* (dove quindi ci si concentra sul gene target 16S) attraverso tecnologia Ion-Torrent, per evidenziare eventuali differenze indotte dalle due diverse diete. Sebbene parte delle analisi siano state condotte su tutte e tre le matrici (liquido ruminale, latte e feci), in questa Tesi vengono discussi i risultati riferiti solo al microbiota ruminale. L'integrazione delle informazioni ottenute dai diversi substrati potrebbe contribuire allo sviluppo e all'applicazione di tecniche di alimentazione di precisione in grado di migliorare l'efficienza produttiva e la qualità dei prodotti ma anche di ridurre i costi e l'impatto ambientale dell'allevamento. Un microbiota sano, casua-effetto di un corretto stile alimentare, contribuisce al mantenimento del buono stato di salute e del sistema immunitario dell'animale, aspetti critici in ambito di produzione casearia in quanto se l'animale è sano produrrà di più e meglio, tenderà a non richiedere cure mediche e aumenterà l'efficienza del sistema produttivo.

## 2. MATERIALI E METODI

Le attività svolte nell'ambito di questa Tesi sono parte di un progetto più ampio, il progetto PRECISLAT, e si sono concentrate nella caratterizzazione del microbiota ruminale, fecale e del latte degli animali coinvolti nell'esperimento. Le analisi sono state condotte presso il Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università degli studi di Padova.

### 2.1 DISEGNO SPERIMENTALE

Obiettivo del progetto PRECISLAT, nel quale è inserito questo lavoro di Tesi, è il miglioramento dell'efficienza e della sostenibilità dell'allevamento ovino in funzione della produzione lattiero-casearia e delle proprietà tecnologiche del latte attraverso tecniche di alimentazione e zootecnia di precisione. Queste ultime nascono dalle prospettive future che vedono salire la popolazione mondiale a 9.8 miliardi nel 2050 (Nazione Unite - 2017), a cui consegnerà un proporzionale aumento della richiesta e del consumo di tutti i prodotti agroalimentari. Per continuare a soddisfare questi crescenti bisogni, a parità di terra da dedicare all'agricoltura e alla zootecnia, bisognerà riuscire ad aumentare l'efficienza del sistema agroalimentare, ottimizzando la resa di ogni singolo processo riducendo al minimo le risorse di input per ottenere il massimo output. La zootecnia di precisione, in particolare, mira ad aumentare i capi per allevamento senza la necessità di incrementare anche il personale, ma piuttosto avvalendosi di sistemi di monitoraggio e raccolta dati automatizzati che comprendono, ad esempio, sensori localizzati in stalla o sull'animale. Questo sistema si traduce nella capacità di mantenere alto il livello di benessere animale, il quale produrrà di più e meglio (Centro Studi l'Uomo e l'Ambiente, 2014). L'alimentazione di precisione si basa quindi sulla progettazione di diete che si adattino a razza, sesso, peso o ad altri aspetti che riguardano l'animale in modo da massimizzarne la *performance* produttiva.

La prova sperimentale è stata svolta su pecore di razza Sarda presso l'azienda didattico-sperimentale del Dipartimento di Agraria di Sassari. Nel dettaglio, il piano sperimentale prevede un primo momento nel quale sono stati selezionati 48 animali nella prima fase di lattazione, ai quali è stata somministrata la stessa dieta formulata con apporto di amidi studiato per la prima fase della lattazione, per un periodo di circa 15 giorni. Quindi, sono stati effettuati dei rilievi per valutare la produzione individuale di latte, la composizione chimica e lo stato di salute degli animali; inoltre è stata valutata l'attitudine casearia del latte prodotto da ogni animale mediante i parametri lattodinamografici (RCT,  $k_{20}$  e  $a_{30}$ ). In questo modo è stato possibile distinguere due gruppi di animali sulla base, appunto, dell'attitudine casearia alta o bassa.

Per la seconda fase di sperimentazione il gruppo di animali con bassa attitudine ( $T_{0AB}$ ,  $n=24$ ) è stato ulteriormente suddiviso in due gruppi di 12 animali ciascuno, uno che manterrà la dieta iniziale ( $T_{0B}$ , gruppo BASSA MEDICA) e un altro che verrà sottoposto a una dieta in cui la quota amidacea è sostituita con sottoprodotti ricchi in fibra digeribile, rappresentati dall'erba medica ( $T_{0A}$ , gruppo ALTA MEDICA). Nel corso delle analisi è stata mantenuta questa suddivisione in gruppi, denominando appunto "T0" i 24 animali selezionati per la bassa attitudine (suddividendoli ulteriormente in "A" e "B" in base alla futura dieta a cui sarebbero stati sottoposti), "T1A" i 12 animali sottoposti alla dieta ad alto contenuto di erba medica e "T1B" i 12 animali che hanno continuato a seguire la dieta iniziale (BASSA medica). I tre gruppi che hanno seguito la dieta a basso contenuto di erba media ( $T_{0A}$ ,  $T_{0B}$ ,  $T_{1B}$ ) sono stati considerati come controlli. La Tabella 3 rappresenta questa suddivisione mentre in Tabella 4 sono riportate le formulazioni delle due diete.

Tabella 3. Gruppi di animali utilizzati per l'esperimento.

Tempo 0		Tempo 1	
BASSA MEDICA (controlli)		ALTA MEDICA (trattati)	
T0A (12)	T0B (12)	T1B (12)	T1A (12)
Pecore a bassa altitudine (24)			

Tabella 4. Descrizione delle due diete sperimentali ALTA e BASSA medica.

Diete sperimentali		
Ingredienti g/kg SS	Bassa Medica (BM)	Alta medica (AM)
Fieno polifita	291	58
Mais fioccato	166	158
Mais in farina	165	141
Fieno di medica	132	534
F. e soia 47	111	42
Orzo schiacciato	56	38
Melasso	79	30
Composizione chimica		
Sostanza secca	85.90	84.29
Proteina grezza, % SS	17.53	17.58
NDF, % SS	34.46	34.28
Ceneri, % SS	8.22	8.37
NEL, Mcal/kg SS	1.49	1.47

La seconda fase ha avuto una durata di 28 giorni, durante i quali sono stati effettuati determinati misurazioni e campionamenti. Sui campioni di latte raccolti sono state condotte una serie di analisi volte a determinarne la composizione, il profilo acidico, minerale, proteico, i parametri lattodinamografici e il microbiota, che rappresenta uno degli obiettivi di questa Tesi.

In linea generale, lo scopo di queste analisi è quello di determinare fenotipi innovativi che contribuiranno a caratterizzare gli animali con bassa altitudine alla caseificazione, al fine di

trovare indicatori alimentari, metabolici e di qualità che consentiranno di fornire la base futura per la formulazione di razioni orientate al miglioramento della qualità casearia del latte.

## 2.2 CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La fase di campionamento che ha interessato questo lavoro di Tesi è stata condotta presso l'azienda didattico-sperimentale sita a Sassari, Sardegna, tra i mesi di novembre e dicembre 2021.

Tutti i campioni di latte, feci e liquido ruminale destinati all'analisi metagenomica sono stati prelevati in doppio dai 24 animali appartenenti al gruppo con bassa attitudine casearia individuato per la seconda fase sperimentale (T0<sub>AB</sub>). In questo progetto di Tesi sono stati considerati 2 campioni per ogni animale, prelevati a inizio e fine prova. Più precisamente:

- Latte (n= 48): il campionamento è avvenuto prima della mungitura meccanica della mattina. La mammella e i capezzoli sono stati puliti e disinfettati con una soluzione di Betadine® e asciugati con carta assorbente. I primi getti di latte sono stati eliminati, dopodiché l'animale è stato munto manualmente direttamente nella provetta sterile da 50 ml. Il campione è stato subito suddiviso in due aliquote.
- Feci (n=48): il campionamento è avvenuto prima della mungitura serale. I campioni di feci sono stati prelevati manualmente dal retto dell'animale con l'utilizzo di guanti sterili.
- Liquido ruminale (n= 48): il liquido ruminale è stato prelevato con una pompa da vuoto collegata ad una sonda esofagea. I campioni sono stati subito filtrati con delle garze sterili per eliminare le parti più grossolane all'interno delle provette sterili da 15 ml.

Tutti i campioni, subito dopo essere stati prelevati, sono stati posti a -20°C fino alla conclusione del campionamento; in seguito, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi, garantendo il mantenimento della catena del freddo anche durante le fasi di trasporto.



## 2.3 ESTRAZIONE DEL DNA DA LATTE, FECI E LIQUIDO RUMINALE

### 2.3.1 ESTRAZIONE DEL DNA DAL LATTE

Per estrarre il DNA batterico dai campioni di latte è stato utilizzato il kit DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Il principio del metodo si basa su una lisi chimica e meccanica consentita da una serie di *buffer* di lisi forniti dal kit e dall'azione di biglie specifiche in grado di rompere le cellule microbiche presenti nel campione. L'utilizzo delle colonnine a scambio ionico permette poi di mantenere il DNA legato mentre vengono sottratti inibitori e altri residui organici e inorganici. L'ultimo step prevede l'eluizione del DNA dalla colonnina servendosi di un *buffer* di eluizione.

In dettaglio, il protocollo prevede i seguenti step:

1. Unire due aliquote di campione da 1.8 ml dopo averle centrifugate, aver rimosso il grasso affiorato e 0.9 ml di surnatante da entrambe.

*Questo passaggio è stato eseguito in modo da concentrare il campione essendo molto diluito.*

2. Per due volte centrifugare a 13.000 rcf per 1 minuto e rimuovere il surnatante.
3. Risospendere il pellet in 450 µL di MBL.

*MBL è una soluzione pre-riscaldata a 55°C che agisce lisando le pareti cellulari e contribuisce a rimuovere residui organici e inorganici diversi dal DNA.*

4. Trasferire la soluzione nei tubini contenenti le PowerBead, posizionare i tubini orizzontalmente nel Vortex Adapter e portarlo alla massima velocità per 10 minuti.

*Le biglie presenti nei suddetti tubini sono responsabili della lisi meccanica delle cellule; la posizione sul Vortex Adapter permette di aumentare le superfici da lisare e quindi massimizzare il rilascio di DNA dalle cellule.*

5. Dopo aver centrifugato, prelevare il surnatante (circa 400 µL) e trasferirlo in un nuovo tubino da 2 ml (Collection Tube).

6. Aggiungere 100  $\mu$ L di IRS, vortexare brevemente e incubare in frigorifero per 5 minuti.

*IRS è una soluzione che aiuta a rimuovere residui proteici e non che potrebbero influire negativamente sulla qualità del DNA.*

7. Dopo aver centrifugato, prelevare il surnatante (che contiene il DNA) evitando il pellet e trasferirlo in nuovi Collection Tube.

8. Aggiungere 900  $\mu$ L di MR.

*MR è una soluzione ad alta concentrazione salina che permette esclusivamente al DNA presente di legarsi fortemente alle colonnine silicee MB Spin Column.*

9. Prelevare 650  $\mu$ L di surnatante, trasferirli nelle colonnine silicee MB Spin Column e centrifugare a 13.000 rcf per 1 minuto. Ripetere il passaggio per trasferire tutto il surnatante a disposizione.

10. Inserire le colonnine in nuovi Collection Tube e aggiungere 650  $\mu$ L di PW.

*La soluzione PW è una soluzione a base alcolica che permette di rimuovere eventuali contaminanti e residui diversi dal DNA rimasti legati alle colonnine.*

11. Dopo aver centrifugato, scartare il filtrato e aggiungere 650  $\mu$ L di etanolo.

*L'etanolo si aggiunge con lo scopo di eliminare tutti i residui di PW per ottenere una maggiore qualità e purezza del DNA da estrarre.*

12. Centrifugare ulteriormente e trasferire le colonnine in nuovi Collection Tube.

13. Aggiungere 100  $\mu$ L di Elution Buffer, scrupolosamente al centro della membrana filtrante.

*Questo passaggio consente al DNA legato di essere eluito nel Collection Tube, in quanto questa soluzione non contiene sali, necessari per il legame dell'acido nucleico alla membrana silicea.*

14. Centrifugare a 13.000 per 1 minuto. Ripetere questo passaggio una seconda volta.

15. Questa volta il filtrato contiene il DNA estratto. Conservare il DNA tra -20° C e -80°C.

La Figura 15 riporta il diagramma di flusso della procedura.

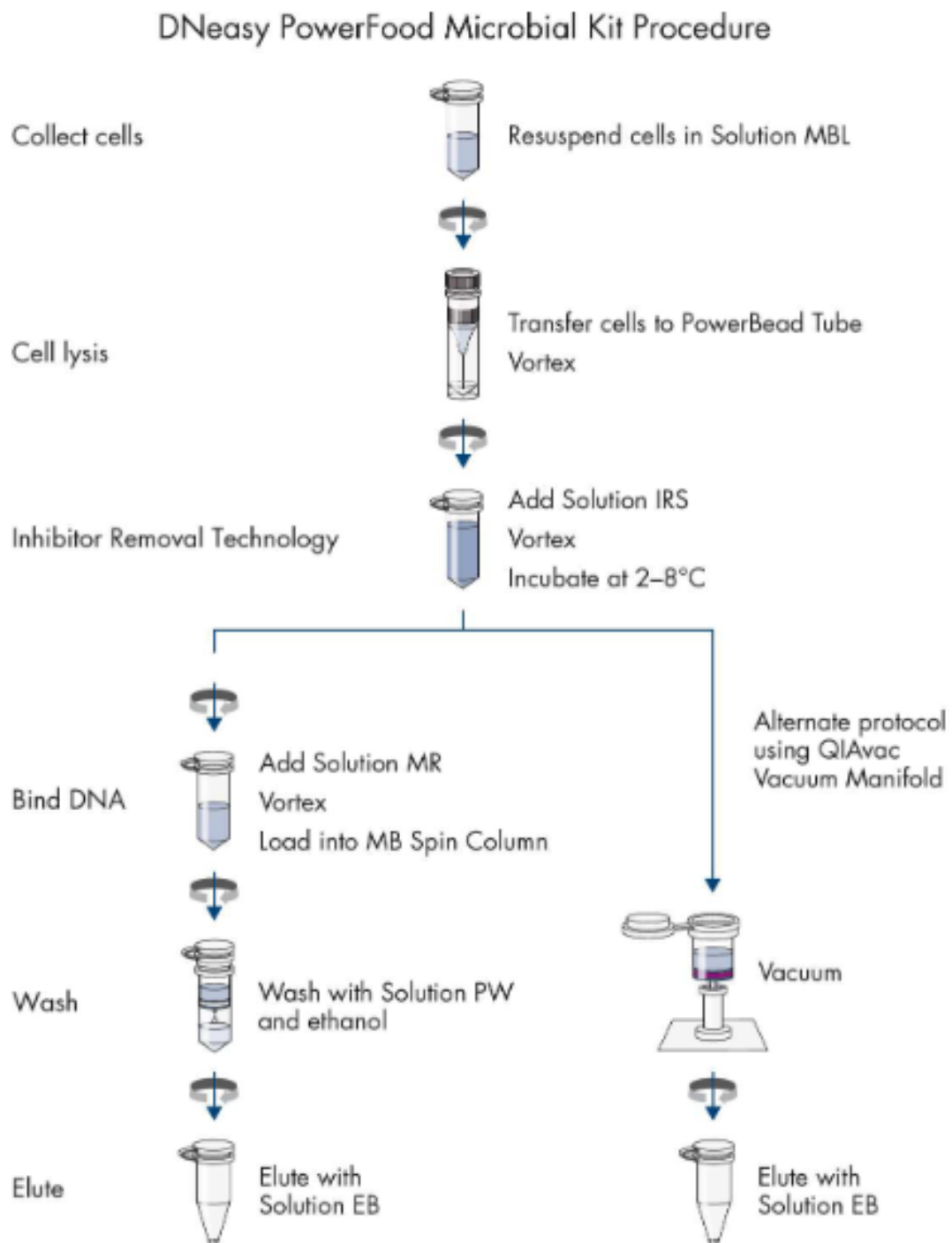


Figura 15. Diagramma di flusso della procedura per l'estrazione del DNA dal latte (Fonte: Protocollo).

### 2.3.2 ESTRAZIONE DA FECI E LIQUIDO RUMINALE

Per estrarre il DNA batterico dai campioni di feci e di liquido ruminale è stato utilizzato il kit QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Il principio del metodo si basa su una lisi chimica e meccanica consentita da una serie di *buffer* di lisi e dall'azione di biglie specifiche in grado di rompere le cellule microbiche presenti nel campione. L'utilizzo delle colonnine a scambio ionico permette poi di mantenere il DNA legato mentre vengono sottratti inibitori e altri residui organici e inorganici. L'ultimo step prevede l'eluizione del DNA dalla colonnina servendosi di un buffer di eluizione.

In dettaglio il protocollo prevede:

1. Aliquotare 200 µL di liquido ruminale per campione nei tubini contenenti le PowerBead, posizzarli orizzontalmente nel Vortex Adapter e impostarlo alla massima velocità per 10 minuti.
2. Dopo aver centrifugato, trasferire il surnatante in nuovi tubini e aggiungere 200 µL di soluzione CD2.

*La soluzione CD2 contiene Inhibitor Removing Technology (IRT), un reagente che tende a far precipitare inibenti (come polisaccaridi e sali biliari) o contaminanti presenti nel campione.*

3. Dopo aver centrifugato, prelevare il surnatante (circa 600 µL), trasferirlo in nuovi tubini e aggiungere 600 µL di soluzione CD3. Evitare il pellet che contiene residui contaminanti.

*CD3 è una soluzione ad alta concentrazione salina che permette esclusivamente al DNA presente di legarsi fortemente alle colonnine silicee MB Spin Column.*

4. Prelevare 650 µL di campione, trasferirli nelle MB Spin Column, centrifugare, scartare il filtrato (il DNA è fortemente legato alle colonnine) e ripetere il medesimo passaggio in modo da filtrare tutto il surnatante a disposizione.
5. Inserire le colonnine in nuovi Collection Tube e aggiungere 500 µL di soluzione EA.

*La soluzione EA ha lo scopo di eliminare eventuali inibenti o altri residui rimasti adesi alla membrana insieme al DNA.*

6. Dopo aver centrifugato, eliminare il filtrato e riporre la colonnina nello stesso tubino.

7. Aggiungere 500 µL di soluzione C5 e centrifugare a 15.000 rcf per 1 minuto.

*Il reagente C5 è una soluzione a base alcolica che ripulisce ulteriormente le colonnine da eventuali sostanze diverse dal DNA rimaste legate.*

8. Eliminare il filtrato, trasferire le colonnine in nuovi Collection Tube e centrifugare ulteriormente.

9. Eliminare il filtrato e porre le colonnine in nuovi Elution Tube da 1.5 ml.

*Questo passaggio in centrifuga ha lo scopo di eliminare i residui di C5 in quanto l'etanolo in essa contenuto potrebbe andare a interferire negativamente con le future applicazioni del DNA estratto.*

10. Aggiungere 100 µL di soluzione C6 al centro della membrana filtrante.

*La soluzione C6 è un buffer di eluizione che, non contenendo sali, permette il distacco del DNA dalla membrana silicea.*

11. Centrifugare a 15000 rcf per un minuto. Questa volta il filtrato ottenuto contiene il DNA estratto.

12. Conservare il DNA tra -20° C e -80°C.

La Figura 16 riporta il diagramma di flusso della procedura.

## QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit Procedure

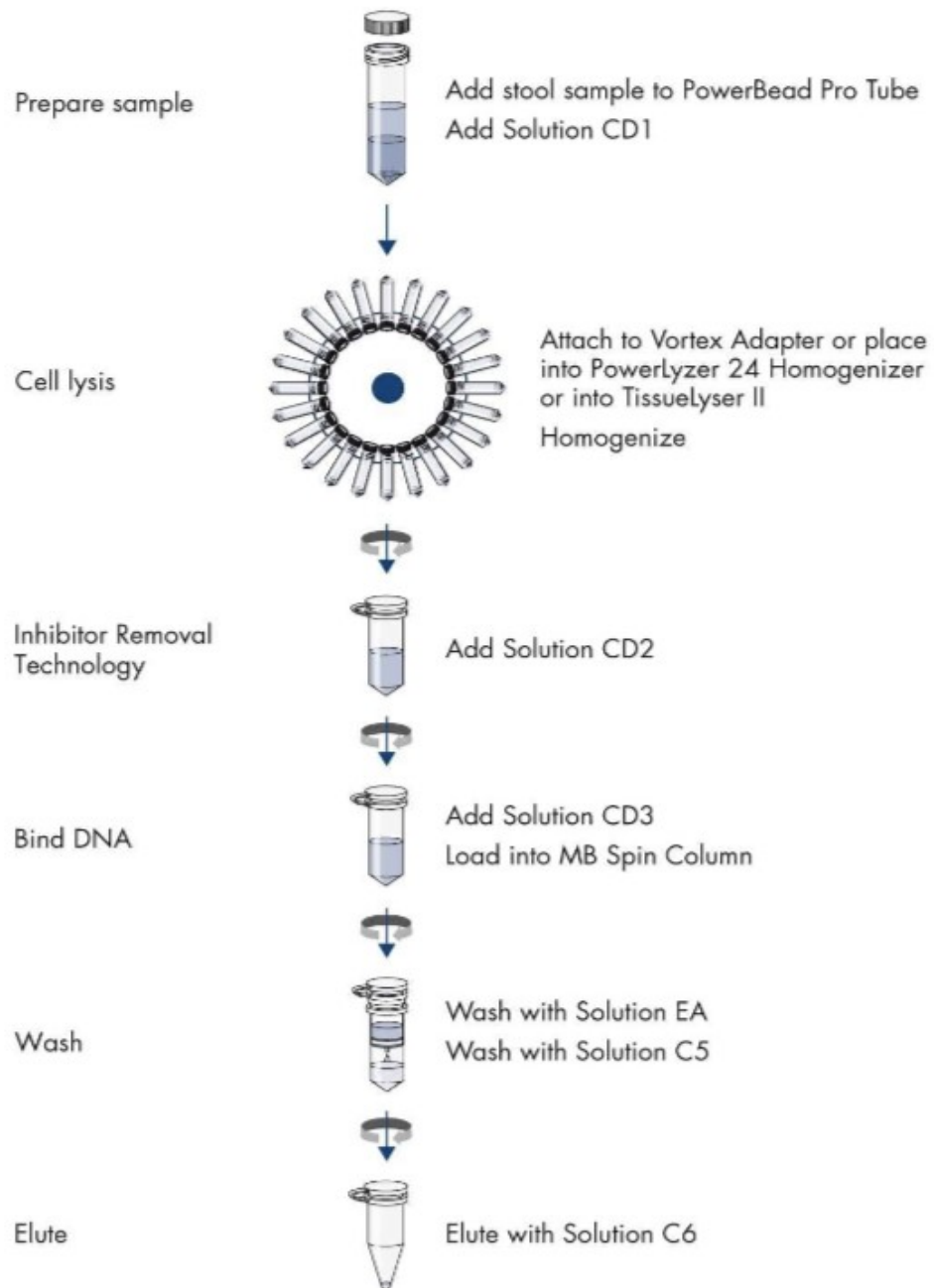


Figura 16. Diagramma di flusso della procedura per l'estrazione del DNA da liquido ruminale e feci (Fonte: Protocollo).

### 2.3.3 QUANTIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO

Per quantificare il DNA batterico estratto dalle tre matrici latte, feci e liquido ruminale si è ricorsi all'utilizzo del Qubit® Fluorometer (Invitrogen, ThermoFisher, USA). Questo tipo di quantificazione fluorimetrica si basa sulla capacità di una sostanza intercalante (ad esempio il *SYBR Green*) di legarsi ai frammenti di DNA a doppio filamento e quindi emettere fluorescenza, che sarà direttamente proporzionale alla quantità di dsDNA presente nel campione. Prima di effettuare la quantificazione di campioni ignoti, questo tipo di metodo di quantificazione richiede lo sviluppo di una curva di taratura servendosi di almeno due standard noti (forniti dal kit).

Le quantificazioni sono state condotte utilizzando il kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Life Technologies) su 1 µL di campione diluito in 198 µL di *dilution buffer* con 1 µL di intercalante.

## 2.4 COSTRUZIONE DELLE LIBRERIE PER IL SEQUENZIAMENTO

La costruzione delle librerie precede ogni sequenziamento che sfrutta tecnologie di seconda generazione, dove è richiesta l'amplificazione clonale dei frammenti da sequenziare. Questi vengono modificati alle estremità grazie ad una reazione enzimatica, in modo che vi si possano ligare degli adattatori necessari all'immobilizzazione su matrice solida in fase di sequenziamento e, quindi, all'amplificazione clonale. In alcuni casi – come in questo progetto di Tesi – vengono ligati ai frammenti anche dei *barcode*, oligonucleotidi identificativi utilizzati per associare le sequenze in output al campione d'origine in caso di sequenziamenti *multiplex* (più campioni processati insieme).

### 2.4.1 KIT UTILIZZATO E PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO

Le librerie sono state preparate utilizzando il kit Ion 16S™ Metagenomics (Ion Torrent®). Le quantità di reagenti e di campione sono state dimezzate in base a precedenti applicazioni del kit.

Come primo step sono state amplificate le regioni ipervariabili V2-4-8-e V3-6, 7-9 del rRNA 16S batterico con una prima PCR, quindi sono stati purificati i prodotti servendosi di biglie magnetiche Agencourt® AMPure® XP Reagent e la DynaMag™-2 ed è stata determinata la quantità di DNA amplificato con QuBit® secondo quanto descritto nel paragrafo 2.3.3. Si è poi proceduto con la preparazione vera e propria delle librerie, cominciando col trattare il prodotto di PCR con un enzima deputato a modificare le estremità dei frammenti di DNA per permettere la successiva ligazione degli adattatori e delle sequenze *barcode*. A questo punto la libreria è stata amplificata attraverso una PCR, purificata e quantificata.

#### 2.4.2 PROCEDURA

Per la costruzione delle librerie sono stati utilizzati 6 µL di campione, corrispondenti a una quantità di 2.5-5 ng di DNA.

##### *Amplificazione delle regioni ipervariabili del 16S*

Le regioni ipervariabili V2-4-8-e V3-6, 7-9 (abbreviate con V2 e V3) del rRNA 16S batterico sono state amplificate tramite una reazione di PCR. La PCR (*polymerase chain reaction*) è una rapida, specifica e sensibile tecnica di biologia molecolare che sfrutta l'attività enzimatica della polimerasi per amplificare il DNA senza la necessità di altri esseri viventi (in riferimento al clonaggio batterico) (Rahman et al., 2013). Questo richiede la presenza di un buffer di amplificazione, di primer *forward* e *reverse* che diano inizio alla replicazione del filamento, di una DNA polimerasi termoresistente (di solito si utilizza quella ricavata dal batterio *Thermophilus aquaticus*), di nucleotidi liberi e, ovviamente, del DNA stampo di partenza. La reazione si svolge all'interno di un termociclatore che controlla la temperatura e la durata dei cicli necessari. Le tre fasi fondamentali della PCR sono: (1) *denaturazione*, a circa 95°C quando il doppio filamento di partenza si separa; (2) *annealing*, a circa 50°C quando i primer si appaiano; (3) *estensione*, vera e propria replicazione dei filamenti di DNA. La tecnica è stata sviluppata nel 1983 dal premio Nobel Kary Mullis; ora rappresenta un comune ma importante



step della ricerca in moltissimi ambiti scientifici e ha apportato un'enorme svolta nel mondo della biologia (Rahman et al., 2013).

Nel dettaglio, la procedura per la costruzione delle librerie prevede:

1. Per l'amplificazione delle regioni ipervariabili viene usata la Mix di reazione descritta in Tabella 5. Per ogni campione vengono effettuate due reazioni, una per ogni set di primer (V2 e V3).

Tabella 5. Reagenti e volumi per preparare le Mix relativa alla PCR di amplificazione delle regioni ipervariabili del gene 16S.

Componente	Volume (x1)
2X Environmental Master Mix	7.5 µL
16S Primer Set [10X]*	1.5 µL
DNA (sample)**	6 µL
Totale	
	15 µL

\*V2-4-8 e V3-6, 7-9

\*\*2,5-5- ng di DNA batterico.

2. Il programma utilizzato per la reazione di PCR è descritto nella Tabella 6.

Tabella 6. Schema PCR per l'amplificazione delle regioni ipervariabili del 16S.

Fase	Temperatura	Tempo
Hold	95°C	10 min
18-25 cicli	95°C	30 sec
	58°C	30sec
	72°C	20sec
Hold	72°C	7 min
Hold	4°C	∞

#### Purificazione dei prodotti di PCR

In questa fase si sfruttano delle biglie magnetiche fornite dal Kit che hanno la capacità di legare esclusivamente le molecole di DNA. Attraverso una serie di lavaggi con etanolo, le librerie

vengono purificate scartando il surnatante che si origina dopo l'aggiunta. In tutto questo il DNA si mantiene legato fermamente alle biglie che rappresentano il pellet all'interno dei tubini. Un'ultima aggiunta di acqua sterile consente l'eluizione dei frammenti dalle biglie, che verranno attratte nuovamente verso il fondo dalla DynaMag™-96 in modo da poter prelevare il surnatante che questa volta contiene il DNA.

1. Aggiungere 27 µL di biglie magnetiche Agencourt® AMPure® XP Reagent in ogni pozzetto e risospendere accuratamente.
2. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.
3. Porre le strip nella piastra magnetica DynaMag™-96 Bottom Magnet per 3-5 minuti, fino a quando la soluzione nei pozzetti diventa limpida. Rimuovere accuratamente il surnatante senza disturbare il pellet di biglie.
4. Senza rimuovere le strip dalla piastra magnetica aggiungere 50 µL di etanolo al 70%, incubare per 30 secondi. Quando la soluzione sarà trasparente rimuovere il surnatante senza disturbare il pellet di biglie (ripetere questo passaggio 2 volte).
5. Lasciare le strip all'aria in modo che si asciughino per 4 minuti.
6. Rimuovere le strip dalla piastra magnetica e sospendere accuratamente le biglie in 15 µL di acqua sterile.
7. Riporre le strip nella piastra magnetica e per almeno un minuto, fino a quando la soluzione sarà trasparente.
8. Trasferire il surnatante contenente il DNA eluito in nuove strip senza disturbare il pellet di biglie.

I campioni sono stati quantificati con QuBit® come descritto al punto 2.3.3.

#### *Preparazione delle librerie – Modificazione estremità di frammenti*

A questo punto le due aliquote di DNA amplificato (una per i set di primer V2-4-8 e una per l'altro set V3-6, 7-9) vengono unite nello stesso tubino.

1. Per la reazione viene preparata la Mix riportata in Tabella 7.

Tabella 7. Reagenti e volumi per la soluzione impiegata per la modifica delle estremità dei frammenti amplificati.

Componente	Volume (x1)
Pool di ampliconi	39,5 µL*
5X End Repair Buffer	10 µL
End Repair Enzyme	0,5 µL
Totale 50 µL	

\*La quantità totale di DNA non deve essere superiore a 50ng. Nel caso di campioni poco concentrati si arriva a volume 39.5 µL con milliQ H<sub>2</sub>O.

2. Pipettare adeguatamente e lasciare a temperatura ambiente per 20 minuti.
3. Eseguire la purificazione descritta nel paragrafo *Purificazione dei prodotti di PCR* impiegando 90 µL di biglie, 150 µL di etanolo e 12.5 µL di acqua per eluire.

#### *Ligazione degli adattatori e dei barcode*

1. Per la reazione viene preparata la Mix riportata in Tabella 8.

Tabella 8. Reagenti e volumi per la Mix relativa allo step di ligazione degli adattatori e delle sequenze barcode.

Componente	Volume (x1)
DNA	12.5 µL
10X Ligase Buffer	5 µL
Ion P1 Adapter	1 µL
Ion Xpress™ Barcode	1 µL
dNTP Mix*	1 µL
Nuclease-free Water*	24,5 µL
Dna Ligase*	1 µL
Nick Repair Polymerase*	4 µL
Totale 50 µL	

2. Il programma utilizzato per la reazione di PCR è descritto nella Tabella 9.

Tabella 9. Schema PCR per la ligazione degli adattatori e barcode.

Fase	Temperatura	Tempo
Hold	25°C	15 min
Hold	72°C	5 min
Hold	4°C	-

3. Eseguire la purificazione descritta nel paragrafo *Purificazione dei prodotti di PCR* impiegando 70 µL di biglire, 150 µL di etanolo e 12.5 µL di acqua per eluire.

#### *Amplificazione della libreria*

1. Per la reazione viene preparata la Mix riportata in Tabella 10.

Tabella 10. Reagenti e volumi per la Mix relativa alla PCR per l'amplificazione della libreria.

Componente	Volume (x1)
Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity	50 µL
Library Amplification Primer Mix	2.5 µL
Libreria	12.5 µL
Totale	
	65 µL

2. Il programma utilizzato per la reazione di PCR è descritto in Tabella 11.

Tabella 11. Schema PCR per l'amplificazione della libreria.

Fase	Step	Temperatura	Tempo
Holding	Denaturazione	95°C	15 min
	Denaturazione	95°C	15 sec
5-7 cicli	<i>Annealing</i>	58°C	15 sec
	Estensione	70°C	1 min
Holding	-	4°C	Max 1 ora

3. Eseguire la purificazione descritta nel paragrafo *Purificazione dei prodotti di PCR* impiegando 97  $\mu\text{L}$  di biglie, 150  $\mu\text{L}$  di etanolo e 20  $\mu\text{L}$  di acqua per eluire.
4. Quantificare i campioni secondo quanto descritto nel punto 2.3.3.

La Figura 17 riporta il diagramma di flusso della procedura.

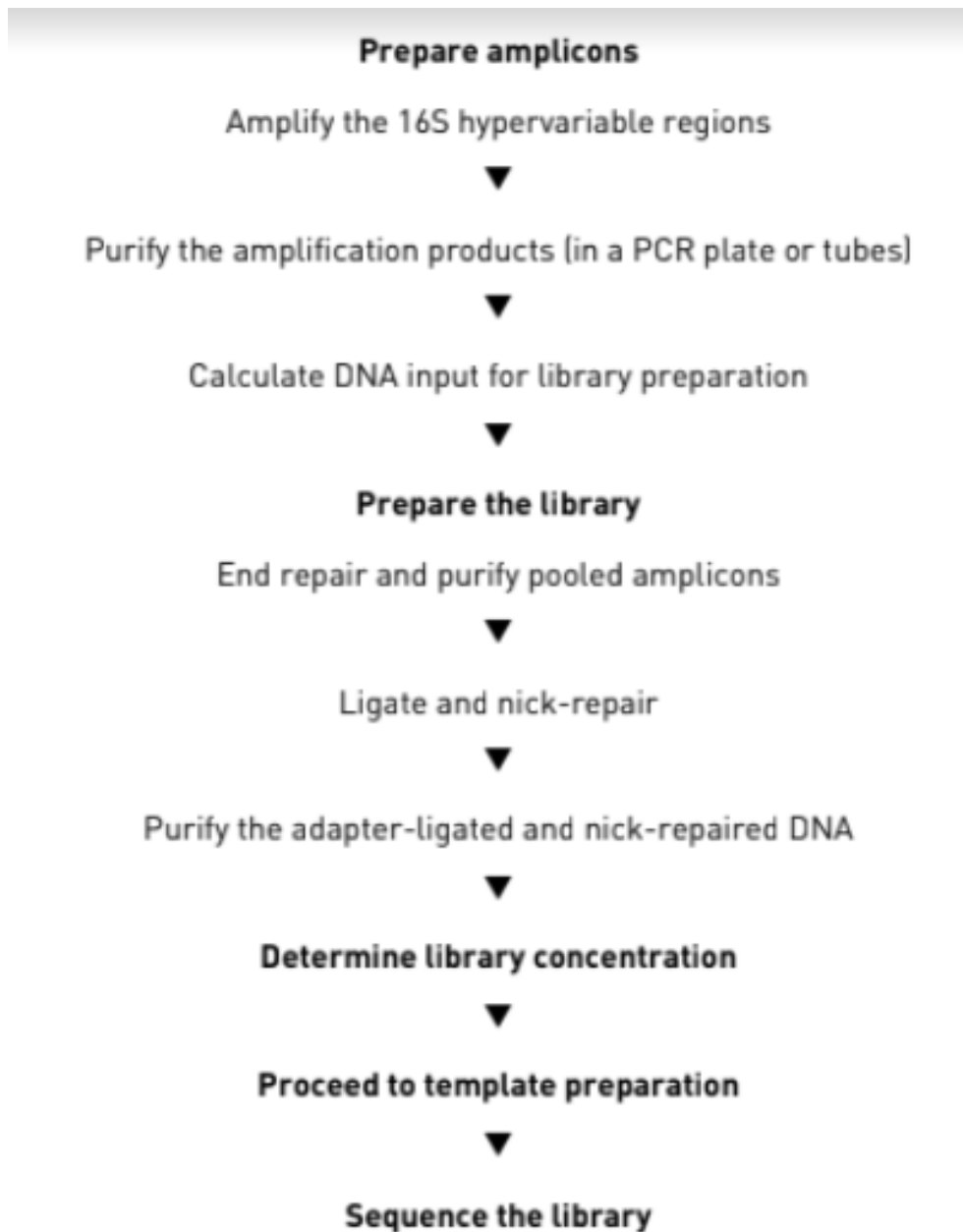


Figura 17. Diagramma di flusso della procedura per la preparazione delle librerie (Fonte: Protocollo).

## 2.5 SEQUENZIAMENTO CON TECNOLOGIA *ION TORRENT*

Una volta ottenute le librerie si procede con la loro amplificazione, seguita da una fase di arricchimento e infine il sequenziamento.

Il primo step prevede una *emulsion PCR*, ossia un'amplificazione che avviene all'interno di piccolissime gocce di acqua in un'emulsione di olio, che agiscono come dei bioreattori. I frammenti di DNA ottenuti dalle librerie presentano alle estremità degli adattatori, utili alla ligazione sulla superficie delle biglie (che presentano sequenze complementari a questi adattatori); gli adattatori contengono anche la sequenza complementare ai primer necessari all'amplificazione. I frammenti vengono quindi resi a singolo filamento in modo che possano appaiarsi alle sequenze complementari presenti sulla superficie delle biglie (la condizione ideale sarebbe quella dove su ogni biglia si legasse un solo frammento). Una volta ottenute le biglie "ricoperte" di frammenti di DNA amplificati queste vanno in contro a un processo di purificazione e arricchimento. Infine le sfere ottenute vengono caricate in un apposito *chip* fornito dal kit e verrà effettuato il sequenziamento degli ampliconi ottenuti grazie alla tecnologia Ion Torrent, già descritta in introduzione.

### *PCR in emulsione*

Le librerie dei diversi campioni vengono unite in un'unica provetta in quantità che variano a seconda della loro concentrazione di DNA, in modo da ottenere una soluzione unica con concentrazione pari a 100 pM. A questo punto si procede con la preparazione della soluzione di amplificazione utilizzando l'apposito kit Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2.

Più nel dettaglio il protocollo prevede:

1. Preparazione dei reagenti Ion S5™ Reagent Mix, Ion S5™ Enzyme Mix e Ion Sphere™ Particles (ISP) come da protocollo.
2. Diluire 25 µL di libreria con acqua sterile in modo da ottenere un volume finale di 100 µL e porre in ghiaccio.

3. Aggiungere al tubino contenete 2000  $\mu\text{L}$  di Ion S5™ Reagent Mix i reagenti elencati in Tabella 12 per raggiungere un volume finale di 2400  $\mu\text{L}$ .

Tabella 12. Reagenti e volumi relativi alla Mix per l'amplificazione clonale dei frammenti ottenuti dalle librerie.

Ordine	Reagente	Volume
1	Acqua sterile	80 $\mu\text{L}$
2	Ion S5™ Enzyme Mix	120 $\mu\text{L}$
3	Ion Sphere™ Particles	100 $\mu\text{L}$
4	Libreria diluita	100 $\mu\text{L}$
Totale		2400 $\mu\text{L}$

1. Vortexare alla massima velocità per 5 secondi la soluzione d'amplificazione.
2. Pipettare la soluzione e trasferirne 800  $\mu\text{L}$  nell'apposito spazio posto sul Ion OneTouch™ Reaction Filter (Figura 18, 1).
3. Ripete il punto 2 altri due volte in modo da trasferire tutta la soluzione sul Ion OneTouch™ Reaction Filter.
4. Aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di Ion OneTouch™ Reaction Oil nell'apposito spazio posto sul Ion OneTouch™ Reaction Filter.
5. Avviare lo strumento Ion Touch™ 2 (Figura 19).

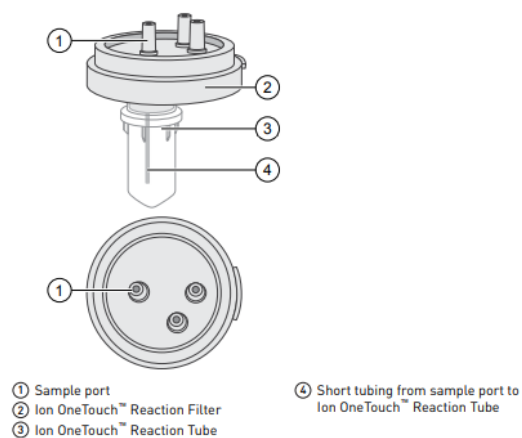


Figura 18. Rappresentazione del Ion OneTouch™ Reaction Filter.

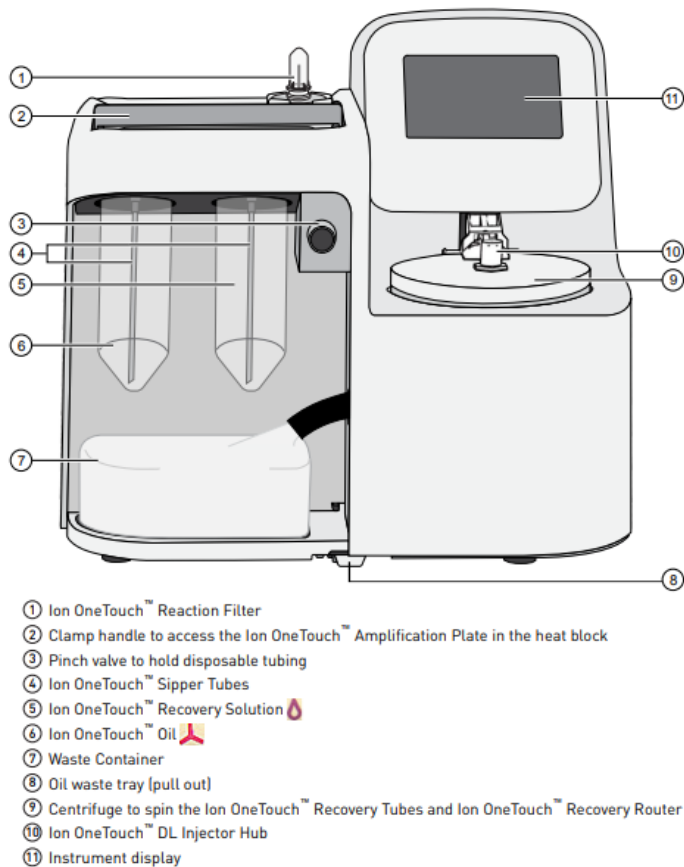


Figura 19. Descrizione dei principali componenti dello strumento Ion OneTouch™ 2.

Il prossimo passaggio consiste in un lavaggio delle sfere a cui sono ligati i frammenti di DNA.

1. Rimuovere 100 µL di Recovery Solution (Figura 20, 1) dai due IonTouch™ Recovery Tube.
2. Risospendere il pellet di sfere ISP (2) nella rimanente Recovery Solution.
3. Unire le due sospensioni in una nuova provetta da 1.5 ml.
4. Aggiungere 100 µL di acqua sterile in entrambi Recovery Tube per recuperare le sfere rimaste e unire il tutto alla sospensione di sfere.
5. Aggiungere 1 ml di acqua sterile.

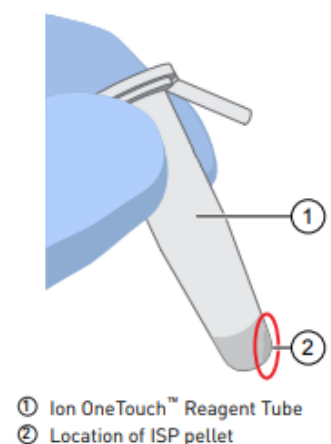


Figura 20. Tubo contenente le ISP su cui i frammenti sono stati amplificati.



6. Vortexare per 30 secondi in modo da risospendere completamente le sfere. Poi centrifugare per 2 secondi.
7. Centrifugare le sfere per 8 minuti a  $15.000 \times g$ .
8. Rimuovere tutto tranne 20  $\mu\text{L}$  di surnatante.
9. Aggiungere 80  $\mu\text{L}$  di IRS Resuspension Solution per portare a un volume di 100  $\mu\text{L}$  la sospensione di sfere.

La sospensione è stata conservata in ghiaccio.

### *Arricchimento e purificazione delle Ion Sphere™ Particles (ISP)*

Come da protocollo, si procede con lo step di arricchimento delle sfere ISP legate al DNA. Si comincia con il preparare la Melt-Off Solution unendo, in ordine, i reagenti elencati in Tabella 13:

*Tabella 13. Reagenti e volumi relativi alla preparazione della Melt-Off Solution.*

Ordine	Reagente	Volume
1	Tween™ Solution	280 $\mu\text{L}$
2	1 M NaOH	40 $\mu\text{L}$
-	Totale	320 $\mu\text{L}$

Il passaggio successivo prevede la risospensione e il lavaggio delle DynaBeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads:

1. Trasferire 100  $\mu\text{L}$  di DynaBeads™ in una nuova eppendorf da 1.5 ml.
2. Porre la provetta nel magnete DynaMag™-2 per 2 minuti, poi rimuovere il surnatante senza disturbare il pellet.
3. Aggiungere alle DynaBeads™ 1 ml di Ion OneTouch™ Washing Solution.
4. Rimuovere la provetta dal magnete e vortexare.
5. Porre la provetta nel magnete DynaMag™-2 per 2 minuti, poi rimuovere il surnatante senza disturbare il pellet.
6. Aggiungere 130  $\mu\text{L}$  di Ion OneTouch™ Beads Capture Solution alle DynaBeads™.

7. Rimuovere la provetta dal magnete e vortexare.

Si procede con il riempimento della strip (Figura 21):

1. Assicurarsi che la ISP Solution abbia mantenuto il volume di 100  $\mu$ L.
2. Posizionare la strip in modo che la linguetta quadrata sia a sinistra.
3. Trasferire, dopo aver pipettato 10 volte, l'intero volume (100  $\mu$ L) di ISP Solution nel pozzetto numero 1 della strip.
4. Riempire gli altri pozzetti come elencato in Tabella 14:

Tabella 14. Modalità di riempimento dei pozzetti della strip.

Pozzetto	Reagente
1	100 $\mu$ L di ISP Solution
2	130 $\mu$ L di DynaBeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads risospese in Ion OneTouch™ Beads Capture Solution
3	300 $\mu$ L di Ion OneTouch™ ES Wash Solution
4	300 $\mu$ L di Ion OneTouch™ ES Wash Solution
5	300 $\mu$ L di Ion OneTouch™ ES Wash Solution
6	Vuoto
7	300 $\mu$ L di Melt-Off Solution
8	Vuoto

5. Inserire un tubino da PCR da 0.2 ml e la strip nell'apposito spazio dello strumento Ion OneTouch™ ES Instrument e avviare lo strumento.
6. Alla fine della corsa rimuovere il tubino da PCR contenente le sfere ISP arricchite assicurandosi sia ben chiuso.

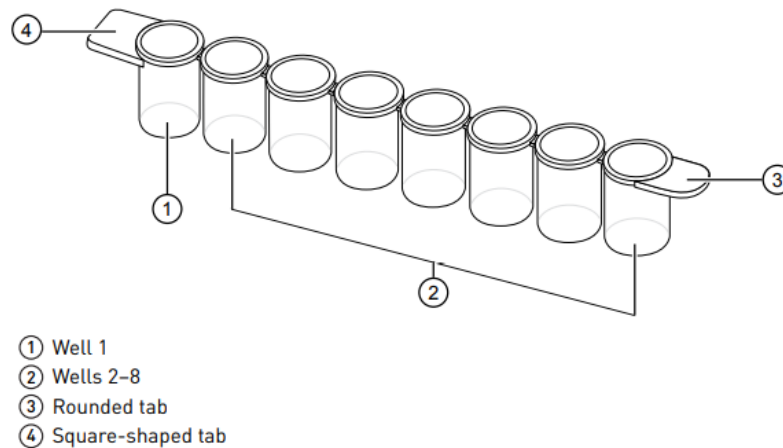


Figura 21. Rappresentazione della strip in cui le biglie verranno purificate dopo la emulsion PCR.

Ora la procedura prevede la rimozione e il lavaggio delle ISP arricchite:

1. Centrifugare la provetta contenente le ISP arricchite a  $15.500 \times g$  per 5 minuti.
2. Rimuovere tutto il surnatante tranne 10  $\mu\text{L}$  e aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di acqua sterile.
3. Pipettare per risospesondere il pellet.
4. Centrifugare la provetta a  $15.500 \times g$  per 5 minuti.
5. Se si nota la presenza di biglie in sospensione si esegue un secondo lavaggio come indicato nel Protocollo.

Una volta conclusa la preparazione del campione si avvia l'inizializzazione del sequenziatore, i cui passaggi sono descritti nella procedura *Ion 520™ & Ion 53™ Kit – OT2 Quick Reference*, pagina 7. Una volta terminata si procede con la preparazione delle sfere ISP e poi con il caricamento del *chip*:

1. Vortexare e centrifugare le Control Sphere™ Particles.
2. Aggiungere 5  $\mu\text{L}$  di Control Sphere™ Particles alle ISPs arricchite e pipettare.
3. Centrifugare la provetta contenente le ISPs arricchite a  $15500 \times g$  per 5 minuti.
4. Rimuovere tutto il surnatante tranne 10  $\mu\text{L}$ .
5. Aggiungere 15  $\mu\text{L}$  di Ion S5™ Annealing Buffer.
6. Aggiungere 20  $\mu\text{L}$  di Ion S5™ Sequencing Primer e controllare che il volume del surnatante sia pari a 45  $\mu\text{L}$ .

7. Vortexare e centrifugare brevemente per raccogliere le ISPs sul fondo della provetta.
8. Impostare nel termociclatore il programma che prevede 2 minuti a 95°C e 2 minuti a 37°C.
9. Ultimato il programma aggiungere 6 µL di Ion S5™ Sequencing Polymerase e 10 µL di Loading Buffer. Vortexare e centrifugare brevemente.
10. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.
11. Posizionare il *chip* in posizione orizzontale stabile.
12. Trasferire 40 µL di campione dall'interno dell'apposita entrata nel *loading port* e i rimanenti 20 µL nel *loading well*.
13. Inserire il *chip* nello spazio dedicato nel Ion Chip™ MiniFuge, mantenendo la parte scritta rivolta verso l'esterno. Collocare un *chip* usato nello spazio opposto per equilibrare.
14. Centrifugare per 5 minuti.
15. In un tubino da 1.5 ml unire 900 µL di Annealing buffer al 50% e 100 µL di Foaming Solution (10% Triton™-100).
16. Creare della schiuma nella soluzione pipettando vigorosamente.
17. Iniettare dal *loading port* del chip 100 µL di Foaming Solution e rimuovere il liquido di scarto che fuoriesce dall'altro lato del chip.
18. Cambiando sempre puntale ripetere il punto 17 tre volte.
19. Inserire dal *loading port* 100 µL di 50% Annealing Buffer e rimuovere il liquido di scarto.
20. Cambiando sempre puntale ripetere il punto 19 tre volte.
21. Inserire il chip nell'apposito spazio del sequenziatore e avviare la corsa.

## 2.6 ANALISI BIOINFORMATICA

Al termine del sequenziamento, il software dedicato ha sottoposto le *reads* ottenute al passaggio di *demultiplexing*, cioè sono state raggruppate tutte le sequenze con lo stesso *barcode* e quindi appartenenti allo stesso campione; inoltre sono state eliminate tutte le sequenze non biologiche derivate da primer e adattatori. Le analisi bioinformatiche sono state

condotte utilizzando il pacchetto DADA2 (Callahan et al., 2015) implementato in R studio. Le sequenze grezze sono state importate in formato FASTQ.

La *pipeline* prevede i seguenti passaggi:

- ✓ *Filtering e trimming*: consiste nel controllo e nell'eliminazione di sequenze (o parti di esse) di bassa qualità. Per esempio, la qualità tende a diminuire verso la fine delle reads e questo può portare ad allineamenti poco affidabili per cui spesso è possibile troncarle a una lunghezza fissa, migliorando così la qualità complessiva. Nello specifico sono stati eliminati i primi 15 nucleotidi, le sequenze sono state troncate a 200 bp e sono state eliminate quelle che presentano nucleotidi ambigui (N).
- ✓ *Dereplication*: consiste nel combinare tutte le sequenze identiche replicate in una "sequenza unica".
- ✓ *Stima dell'error rate*: in questo passaggio vengono stimati gli errori legati ad amplificazione e sequenziamento
- ✓ *Infer sequence variants*: tenendo conto dell'*error rate*, vengono ricavate le sequenze esatte, corrette, che vengono definite *amplicon sequence variants* (ASV). Normalmente in altri *workflow* si parla di OTUs (Unità tassonomiche operative), cioè gruppi in cui vengono unite *reads* con similarità >97%; in questo caso invece la similarità è più stringente e vengono raggruppate e convertite in un'unica sequenza corretta le *reads* che si differenziano al massimo per un nucleotide (Bardenhorst et al., 2022).
- ✓ *Creazione della sequence table*: viene prodotta una tabella di sequenze che è un analogo a più alta risoluzione della comune tabella delle OTUs. Si tratta di una tabella in cui viene riportato il numero di volte in cui ciascuna sequenza è stata osservata in ciascun campione.
- ✓ *Rimozione delle chimere*: consiste nel rimuovere quelle sequenze formate da due o più sequenze biologiche unite insieme, che talvolta si creano durante la PCR.
- ✓ *Assegnazione tassonomica*: in questa fase viene effettuato il confronto tra le sequenze ottenute e le sequenze di riferimento depositate in database specifici, al fine di ottenere

l'assegnazione tassonomica. In questo caso è stato utilizzato il database SILVA (Quast et al., 2012).

## 2.7 ANALISI STATISTICHE

### *Microbiota*

Per l'analisi della biodiversità del microbiota dei campioni analizzati è stato utilizzato il pacchetto Phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013) sempre implementato su R studio, che ha previsto la stima di *alpha diversity* e *beta diversity*, indici utilizzati in ecologia per valutare la diversità del microbiota. L'*alpha-diversity* descrive la struttura di una comunità microbica in base al numero di gruppi tassonomici rilevati e alle loro abbondanze relative all'interno del campione (Willis et al., 2019), mentre la *beta-diversity* rappresenta la diversità che sussiste tra le comunità microbiche di diversi campioni ([FROGS\\_phyloseq\\_10102016.pdf \(inra.fr\)](#)). In Figura 22 è rappresentato graficamente il significato di *alpha-diversity* e *beta-diverity*.

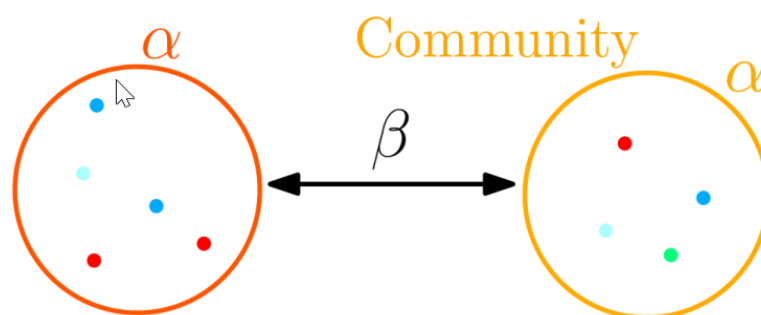


Figura 22. Rappresentazione visiva del significato dell'*alpha-diversity* e della *beta-diversity* nell'ambito delle comunità microbiche. Fonte: *Analysis of community composition data using phyloseq. Find Rapidly OTU with Galaxy Solution (inra.fr)*.

In questo studio l'*alpha diversity* è stata valutata misurando la *richness*, quindi la ricchezza che si basa sul numero di *taxa* trovati nei singoli campioni (indice Observed) e l'indice di Shannon, che descrive numericamente la diversità tassonomica di una comunità microbica in base al numero di *taxa* e all'omogeneità delle loro abbondanze (*evenness*) (Schloss e Handelsman, 2007). In seguito, è stata valutata la presenza di una differenza statisticamente significativa tra

gruppi sperimentali (T0A, T0B, T1A, T1B) in termini di *alpha-diversity* mediante l'utilizzo di un modello misto tramite il pacchetto lme4 (Bates et al, 2015) in R:

$$y_{ijk} = \mu + \text{gruppo sperimentale}_i + \text{ID}_j + e_{ijk}$$

dove:

- $y_{ijk}$  è il carattere osservato (Observed e Shannon *index*);
- $\mu$  è la media complessiva;
- gruppo sperimentale<sub>*i*</sub> è l'effetto fisso combinato tempo-dieta;
- ID<sub>*j*</sub> è l'effetto casuale dell'animale (replica temporale);
- $e_{ijk}$  è l'effetto residuo casuale.

La *beta-diversity* è stata calcolata applicando l'indice di dissomiglianza di Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957) che basandosi sulla conta delle OTUs (ASV in questo caso specifico) permette di valutare la diversità tra gruppi di campioni. Per verificare la presenza di una differenza statisticamente significativa tra gruppi è stata applicata l'analisi PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*) mediante l'utilizzo del pacchetto vegan (Oksanen et al., 2022) in R, un'analisi della varianza usata per matrici di distanze (Oksanen et al., 2022). In questo caso si è testato l'effetto dieta entro tempo sperimentale T1, concentrandosi solo sui gruppi T1A e T1B.

### *Composizione del latte*

I dati relativi alla produzione e alla composizione del latte raccolto dagli animali in corrispondenza alle date di campionamento del liquido ruminale sono stati analizzati da un punto di vista statistico al fine di ottenere le statistiche descrittive e valutare l'effetto del gruppo sperimentale sui caratteri raccolti. È stato testato anche il contenuto di cellule somatiche espresso come *Somatic Cell Score* (SCS), cioè la trasformata logaritmica del contenuto di cellule somatiche; viene ottenuto mediante l'applicazione della formula proposta da Ali and Shook (1980), in modo da garantire una distribuzione normale.

Per fare questo è stata eseguita un'analisi mediante l'utilizzo di un modello misto tramite il pacchetto lme4 (Bates et al., 2015) in R:

$$y_{ijk} = \mu + \text{gruppo sperimentale}_i + \text{ID}_j + e_{ijk}$$

dove:

- $y_{ijk}$  è il carattere osservato (produzione lattosio%, grasso%, proteina%, caseina%, SCC cell/ml);
- $\mu$  è la media complessiva;
- gruppo sperimentale<sub>*i*</sub> è l'effetto fisso combinato tempo-dieta;
- ID<sub>*j*</sub> è l'effetto casuale dell'animale (replica temporale);
- $e_{ijk}$  è l'effetto residuo casuale.



### 3. RISULTATI

#### *Estrazione del DNA, Resa delle librerie e Sequenziamento*

Il valore medio di concentrazione di DNA estratto dai campioni di liquido ruminale era 61.55 ng/μL, quindi idoneo per la costruzione delle librerie. La concentrazione finale media delle librerie ottenute dai singoli campioni corrisponde a 8.79 ng/μL. Il sequenziamento ha generato 1.5 Gb di basi, per un totale di 6.367.547 *reads* dalla lunghezza media di 236 bp (Figura 23).

Per ogni campione sono state ottenute in media 132.645 *reads*.

#### Run Summary

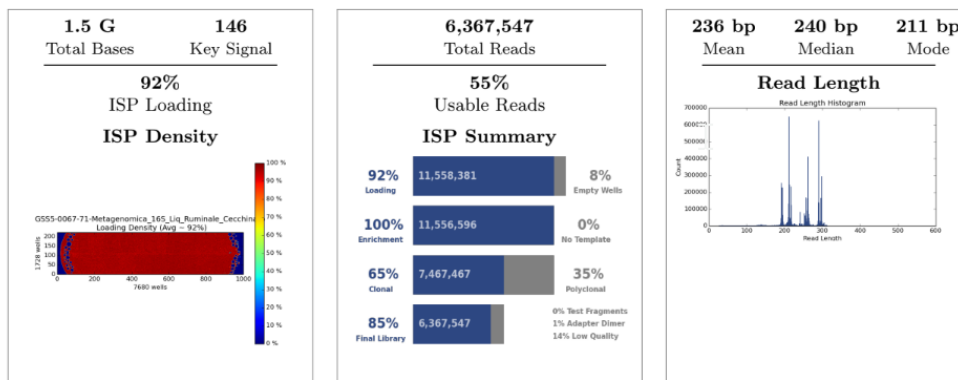


Figura 23. Riassunto dell'output del sequenziamento.

#### *Composizione del latte*

In Tabella 15 vengono riportati i risultati dell'analisi descrittiva per la produzione, la composizione standard e la quantità di cellule somatiche (*Somatic Cells Count, SCC*) del latte proveniente dagli animali dei quattro gruppi sperimentali:

Tabella 15. Statistiche descrittive riferite al latte proveniente dagli animali del gruppo T0A, T0B, T1A e T1B.

T0A					
Carattere	N	Media	DS	Min	Max
Produzione latte g/giorno	12	1730.50	520.07	778.00	2359.00
grasso %	12	5.43	0.87	3.94	7.04
proteina %	12	4.98	0.35	4.49	5.65
lattosio %	12	4.99	0.20	4.75	5.35
caseina%	12	3.82	0.31	3.34	4.41
SCC×103 cellule/mL	12	194.83	303.95	48.00	1058.00
SCS	12	2.02	0.42	1,68	3.02
T0B					
Carattere	N	Media	DS	Min	Max
Produzione latte g/giorno	12	1819.83	445.70	1339.00	2696.00
grasso %	12	5.49	0.66	4.56	6.60
proteina %	12	5.13	0.26	4.52	5.52
lattosio %	12	5.20	0.17	5.00	5.48
caseina%	12	3.97	0.23	3.45	4.30
SCC×103 cellule/mL	12	333.17	661.19	34.00	2337.00
SCS	12	2.1	0.53	1.53	3.37
T1A					
Carattere	N	Media	DS	Min	Max
Produzione latte g/giorno	12	1711.50	511.70	1022.00	2675.00
grasso %	12	5.20	0.68	4.20	6.39
proteina %	12	5.18	0.34	4.71	5.87
lattosio %	12	5.05	0.20	4.76	5.46
caseina%	12	3.92	0.31	3.47	4.53
SCC×103 cellule/mL	12	89.08	56.37	27.00	209.00
SCS	12	1.88	0.26	2.32	1.43
T1B					
Carattere	N	Media	DS	Min	Max

Produzione latte g/giorno	12	1777.83	440.50	1070.00	2416.00
grasso %	12	4.84	0.73	3.83	6.56
proteina %	12	5.22	0.37	4.40	6.04
lattosio %	12	5.12	0.26	4.78	5.63
caseina%	12	3.94	0.32	3.27	4.68
SCC×103 cellule/mL	12	165.17	312.14	23.00	1130.00
SCS	12	1.88	0.47	1.36	3.05

L'analisi statistica dell'effetto gruppo (T0A, T0B, T1A, T1B) nei confronti dei caratteri di composizione non ha dato alcun risultato significativamente statistico.

### *Analisi del 16S*

#### *Analisi delle Abbondanze Relative*

Tutti i valori riportati nel testo e nelle didascalie fanno riferimento alla media dei valori ottenuti dalle abbondanze relative di tutti e quattro i gruppi sperimentali.

I tre *phyla* predominanti nei campioni di liquido ruminali sono risultati essere Bacteroidota (49.44% delle *reads*), Proteobacteria (35.29%) e Firmicutes (10.07%) seguiti da Verrucomicrobiota (1.48%), Fibrobacterota (1.43%), Spirochaetota (0.83%), Cyanobacteria (0.75%) e altri (riportati in Tabella 16). La Figura 24 riporta graficamente le abbondanze relative a livello di *phylum*.

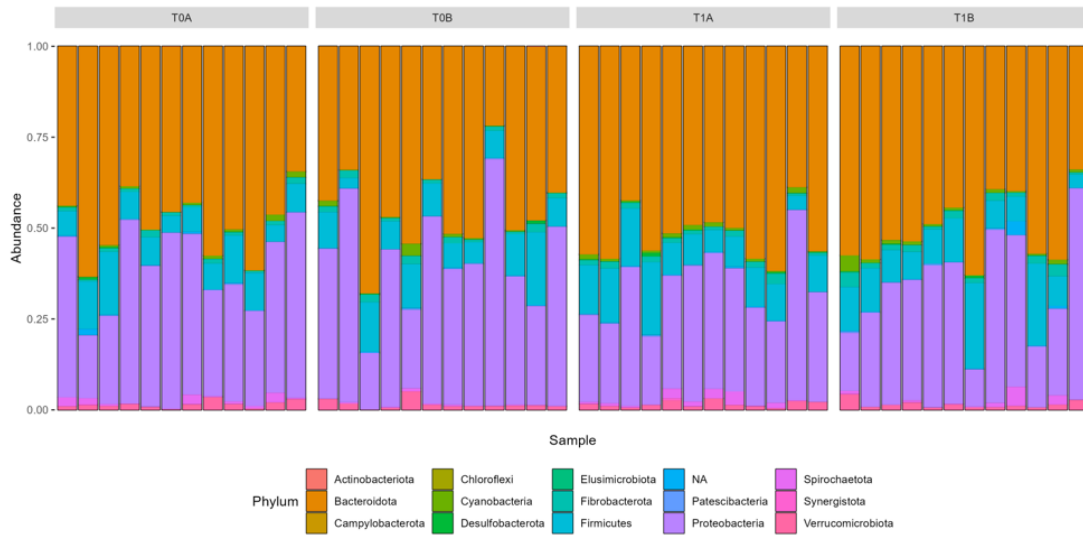


Figura 24. Rappresentazione grafica delle abbondanze relative a livello di phylum nei quattro gruppi sperimentali.

A livello di classe, Bacteroidia è la più presente (49.44%); a seguire si pongono in ordine le classi Gammaproteobacteria (34.84 %), Clostridia (4.90%), Negativicutes (3.18%). Le altre classi rappresentate da più dell'1% delle ASV sono i bacilli (1.95%), Kiritimatiellae (1.44%) e Fibrobacteria (1.43%). La Figura 25 riporta graficamente le abbondanze relative a livello di classe.

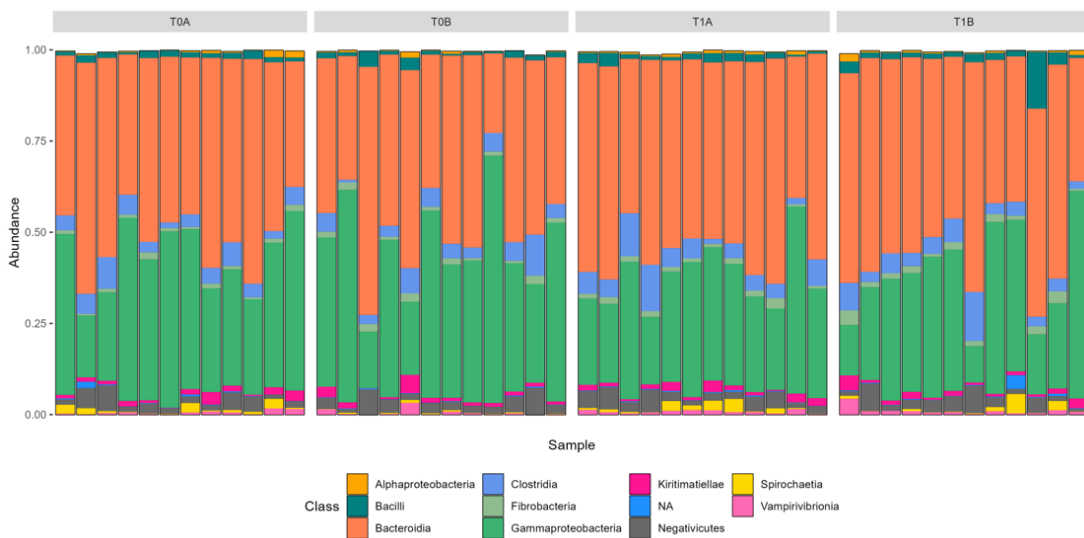


Figura 25. Rappresentazione grafica delle abbondanze relative a livello di classe nei quattro gruppi sperimentali. Sono rappresentate solo le classi presenti almeno all'1%.

Gli ordini più rappresentati in tutti e quattro i gruppi sono Bacteroidales (49.33%) e Enterobacterales (34.64%); proseguendo, il 2.68% delle ASV è stato associato all'ordine Oscillospirales, il 2.41% agli ordini Veillonellales-Selenomonadales, l'1.91% a Lachnospirales e l'1,58% di ASV non sono state assegnate (NA). Dopo di queste, si osserva l'1.44% di ASV assegnate all'ordine WCHB1-41, l'1.43% a Fibrobacterales e l'1.04% all'ordine Erysipelotrichales. La Figura 26 riporta graficamente le abbondanze relative a livello di ordine.

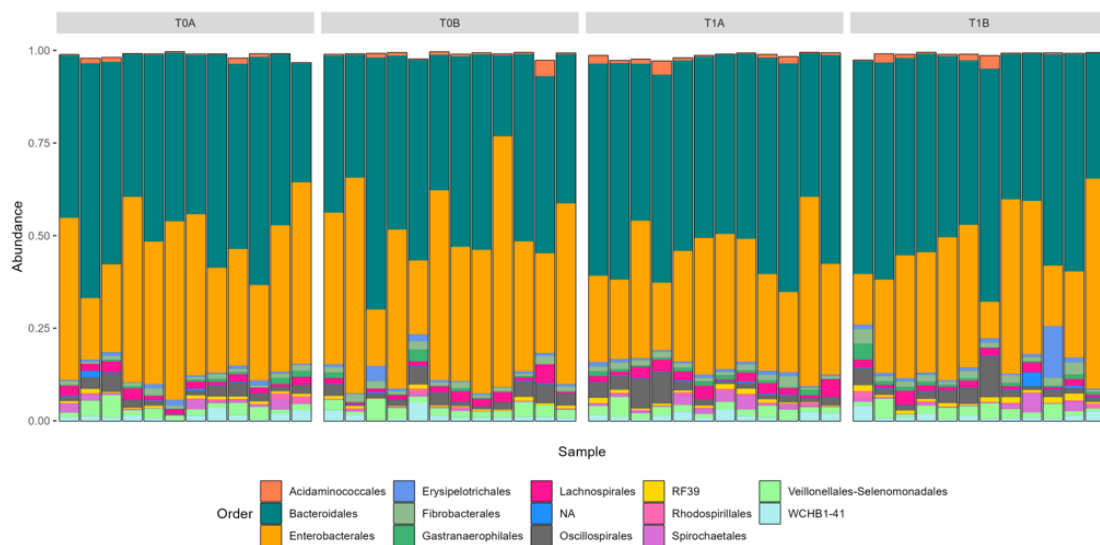


Figura 26. Rappresentazione grafica delle abbondanze relative a livello di ordine nei quattro gruppi sperimentali. Sono rappresentati solo gli ordini presenti almeno all'1%.

Per quanto riguarda le famiglie, si osserva una predominante abbondanza relativa di Prevotellaceae (36.18 %) e Succinivibrionaceae (34.53%) in tutti i campioni, seguite da ASVs non assegnate (11.16%) e Bacteroidales RF16 group (7.74%). Rikenellaceae, Selenomonadaceae, Lachnospiraceae, Oscillospiraceae e Fibrobacteraceae corrispondono rispettivamente al 2.45%, 2.41%, 1.91%, 1.84% e 1.43% delle ASV assegnate. La Figura 27 riporta graficamente le abbondanze relative a livello di famiglie.

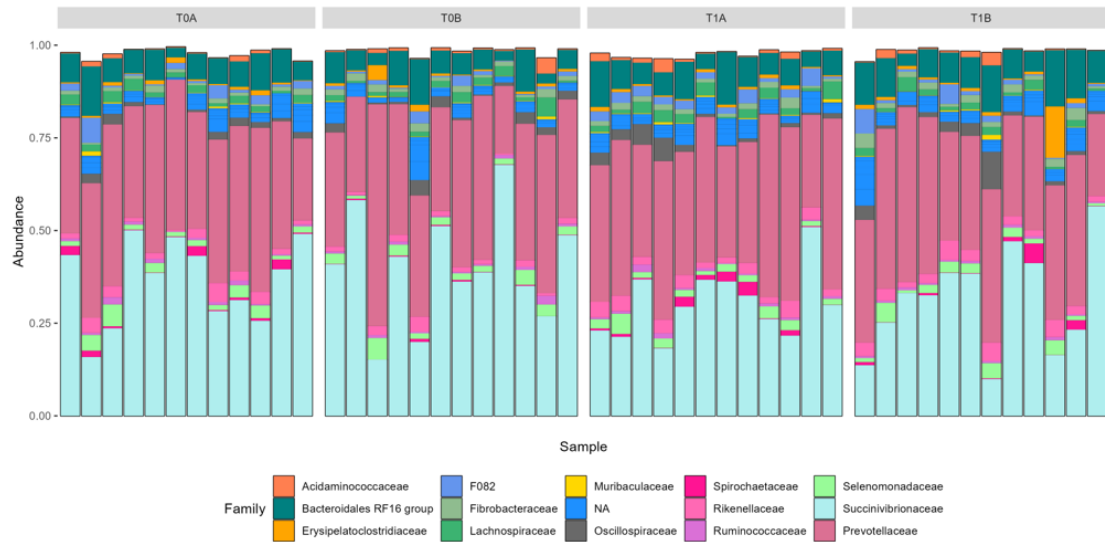


Figura 27. Rappresentazione grafica delle abbondanze relative a livello di famiglia nei quattro gruppi sperimentali. Sono rappresentate solo le famiglie presenti almeno all'1%.

Per quanto riguarda i generi batterici, in tutto ne sono stati rilevati 139, oltre al 46.79 % delle ASV non assegnate ad alcun genere. Il genere preponderante è rappresentato da *Prevotella* (29.71%), seguito da Succinivibrionaceae UCG-002 (13.74 %) e *Succinivibrio* (9.75 %). Gli altri generi rappresentati da più dell'1% delle ASV corrispondono a Succinivibrionaceae UCG-001 (2.77%), Rikenellaceae RC9 gut group (2.40%), *Ruminobacter* (2.05%), *Fibrobacter* (1.43%), *Succinimonas* (1.38%), Prevotellaceae UCG-001 (1.33%), e Prevotellaceae UCG-003 (1.23%). La Figura 28 riporta graficamente le abbondanze relative a livello di genere.

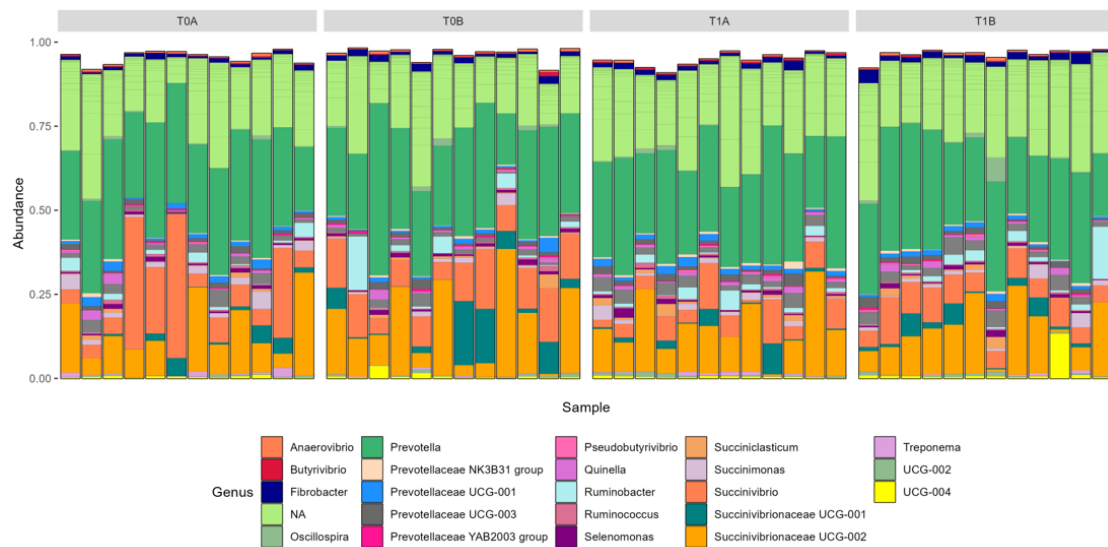


Figura 28. Rappresentazione grafica delle abbondanze relative a livello di generi batterici. Sono rappresentati solo i generi presenti almeno all'1%.

Tutti i *taxa* rilevati sono riportati nella Tabella 16 insieme alle rispettive abbondanze relative nei quattro gruppi sperimentali. Quelli presenti in misura minore dello 0.1% sono stati raggruppati sotto la voce "Others".

Tabella 16. Abbondanze relative di tutti i *taxa* rilevati nei quattro gruppi sperimentali. Quelli rappresentati da meno dello 0,1% delle reads sono raggruppati sotto la voce "Others".

<i>Phylum</i>	T0A	T0B	T1A	T1B
Bacteroidota	49.13	45.59	52.38	50.68
Proteobacteria	37.30	40.66	31.19	32.04
Firmicutes	8.84	9.50	10.82	11.13
Verrucomicrobiota	1.46	1.49	1.52	1.46
Fibrobacterota	1.02	1.46	1.40	1.84
Spirochaetota	1.02	0.23	1.16	0.92
Cyanobacteria	0.59	0.59	0.82	1.03

NA	0.30	0.14	0.20	0.50
Desulfobacterota	0.15	0.15	0.25	0.15
Patescibacteria	0.10	0.12	0.12	0.16
<i>Others</i>	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Class	T0A	T0B	T1A	T1B
Bacteroidia	49.13	45.59	52.38	50.68
Gammaproteobacteria	36.81	40.33	30.72	31.53
Clostridia	4.42	4.62	5.70	4.90
Negativicutes	2.93	3.30	3.31	3.21
Bacilli	1.47	1.56	1.75	3.00
Kiritimatiellae	1.44	1.44	1.49	1.41
Fibrobacteria	1.02	1.46	1.40	1.84
Spirochaetia	1.02	0.23	1.16	0.92
Vampirivibrionia	0.58	0.58	0.81	1.02
Alphaproteobacteria	0.48	0.28	0.45	0.48
NA	0.34	0.21	0.29	0.56
Desulfovibrionia	0.09	0.11	0.21	0.11
Saccharimonadia	0.09	0.11	0.10	0.16
<i>Others</i>	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Order	T0A	T0B	T1A	T1B
Bacteroidales	48.87	45.48	52.34	50.63
Enterobacterales	36.58	40.18	30.45	31.38
Oscillospirales	2.19	2.54	3.04	2.95
Veillonellales-Selenomonadales	2.44	2.54	2.31	2.39
Lachnospirales	1.89	1.79	2.33	1.67



NA	1.73	1.26	1.79	1.58
WCHB1-41	1.44	1.44	1.49	1.41
Fibrobacterales	1.02	1.46	1.40	1.84
Erysipelotrichales	0.69	0.93	0.70	1.87
Spirochaetales	1.02	0.23	1.16	0.92
Acidaminococcales	0.49	0.76	1.00	0.82
RF39	0.62	0.56	0.76	1.05
Gastranaerophilales	0.58	0.58	0.81	1.02
Rhodospirillales	0.45	0.26	0.42	0.46
Acholeplasmatales	0.15	0.07	0.28	0.07
Desulfovibrionales	0.09	0.11	0.21	0.11
Burkholderiales	0.16	0.09	0.16	0.10
Saccharimonadales	0.09	0.11	0.10	0.16
Christensenellales	0.13	0.09	0.12	0.05
<i>Others</i>	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Family	T0A	T0B	T1A	T1B
Prevotellaceae	36.01	35.51	37.85	35.36
Succinivibrionaceae	36.40	40.16	30.25	31.33
NA	10.41	9.23	12.14	12.87
Bacteroidales RF16 group	7.46	6.49	7.71	9.34
Rikenellaceae	2.27	1.57	2.92	3.05
Selenomonadaceae	2.43	2.54	2.31	2.39
Lachnospiraceae	1.89	1.79	2.33	1.67
Oscillospiraceae	1.34	1.66	2.12	2.27
F082	1.80	106	2.37	1.73

Fibrobacteraceae	1.02	1.46	1.40	1.84
Erysipelatoclostridiaceae	0.67	0.92	0.69	1.85
Spirochaetaceae	1.02	0.23	1.16	0.92
Acidaminococcaceae	0.49	0.76	1.00	0.82
Ruminococcaceae	0.77	0.72	0.76	0.57
Muribaculaceae	0.25	0.20	0.29	0.23
Acholeplasmataceae	0.15	0.07	0.28	0.07
Desulfovibrionaceae	0.09	0.11	0.21	0.11
Bacteroidales BS11 gut group	0.27	0.03	0.14	0.07
p-251-o5	0.19	0.07	0.17	0.05
Saccharimonadaceae	0.09	0.11	0.10	0.16
Christensenellaceae	0.13	0.09	0.12	0.05
<i>Others</i>	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
<i>Genus</i>	T0A	T0B	T1A	T1B
NA	43.31	43.49	49.61	50.75
<i>Prevotella</i>	29.93	29.82	30.07	29.03
<i>Succinivibrionaceae</i> UCG-002	12.65	15.65	13.99	12.69
<i>Succinivibrio</i>	14.11	11.03	6.33	7.54
<i>Succinivibrionaceae</i> UCG-001	1.80	5.26	1.75	2.30
<i>Rikenellaceae</i> RC9 gut group	2.22	1.54	2.87	2.99
<i>Ruminobacter</i>	1.34	2.52	1.76	2.58
<i>Fibrobacter</i>	1.02	1.46	1.40	1.84
<i>Succinimonas</i>	2.03	0.78	1.36	1.36
<i>Prevotellaceae</i> UCG-001	1.51	1.02	1.63	1.18
<i>Prevotellaceae</i> UCG-003	1.07	1.01	1.41	1.45

UCG-004	0.45	0.73	0.50	1.65
<i>Selenomonas</i>	0.77	0.93	0.82	0.81
<i>Quinella</i>	0.78	0.67	0.84	0.81
<i>Succiniclasticum</i>	0.49	0.76	1.00	0.82
<i>Oscillospira</i>	0.34	0.53	0.35	0.94
<i>Prevotellaceae NK3B31 group</i>	0.35	0.39	0.73	0.48
<i>Ruminococcus</i>	0.49	0.48	0.54	0.36
UCG-002	0.29	0.45	0.54	0.53
<i>Treponema</i>	0.62	0.18	0.47	0.26
<i>Anaerovibrio</i>	0.35	0.43	0.27	0.39
<i>Butyrivibrio</i>	0.22	0.25	0.36	0.23
<i>Prevotellaceae YAB2003 group</i>	0.22	0.35	0.21	0.24
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.15	0.17	0.26	0.27
<i>Asteroleplasma</i>	0.19	0.14	0.17	0.17
<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	0.19	0.14	0.19	0.12
<i>Prevotellaceae UCG-004</i>	0.16	0.14	0.21	0.13
V9D2013 group	0.15	0.00	0.41	0.03
<i>Anaeroplasma</i>	0.11	0.06	0.24	0.06
NK4A214 group	0.14	0.07	0.19	0.08
<i>Desulfovibrio</i>	0.07	0.10	0.19	0.10
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	0.09	0.11	0.10	0.16
<i>Lachnospiraceae AC2044 group</i>	0.09	0.16	0.10	0.08
<i>Veillonellaceae UCG-001</i>	0.12	0.10	0.08	0.10
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	0.13	0.09	0.12	0.05
<i>Others</i>	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%

## Alpha diversity

L'analisi dell'*alpha diversity*, quindi della ricchezza e diversità interna al campione, è stata condotta basandosi sul numero di ASVs osservate (indice Observed) e sull'indice di Shannon (Figura 29). I campioni sono divisi in due subset, a seconda che appartengano al gruppo bassa medica o alta medica, i colori invece sono in accordo con il tempo di campionamento (T0, T1). Dai grafici si evince che in termini di ricchezza microbica i campioni risultano essere molto eterogenei; per l'indice di Shannon si notano valori maggiori per i campioni trattati con alta medica al T1. I risultati dell'analisi ANOVA, nella quale è stato testato l'effetto del gruppo sperimentale (T0A, T0B, T1A, T1B) hanno infatti evidenziato un trend ( $p$ -value  $<0,1$ ) nel confronto tra la media degli animali nutriti con la dieta a basso quantitativo di erba medica (3 dei 4 gruppi di animali – T0A, T0B, T1B – considerati i controlli) e il gruppo sottoposto alla dieta con alto contenuto di erba medica (che rappresenta il quarto gruppo T1A), con valori di *Least Squares Means* rispettivamente di 5.35 e 5.64, confermando un aumento dell'indice di Shannon per quest'ultimo gruppo ( $\Delta = +5.08\%$ ). I valori dell'indice Observed non hanno fatto evidenziare nessuna significatività statistica.

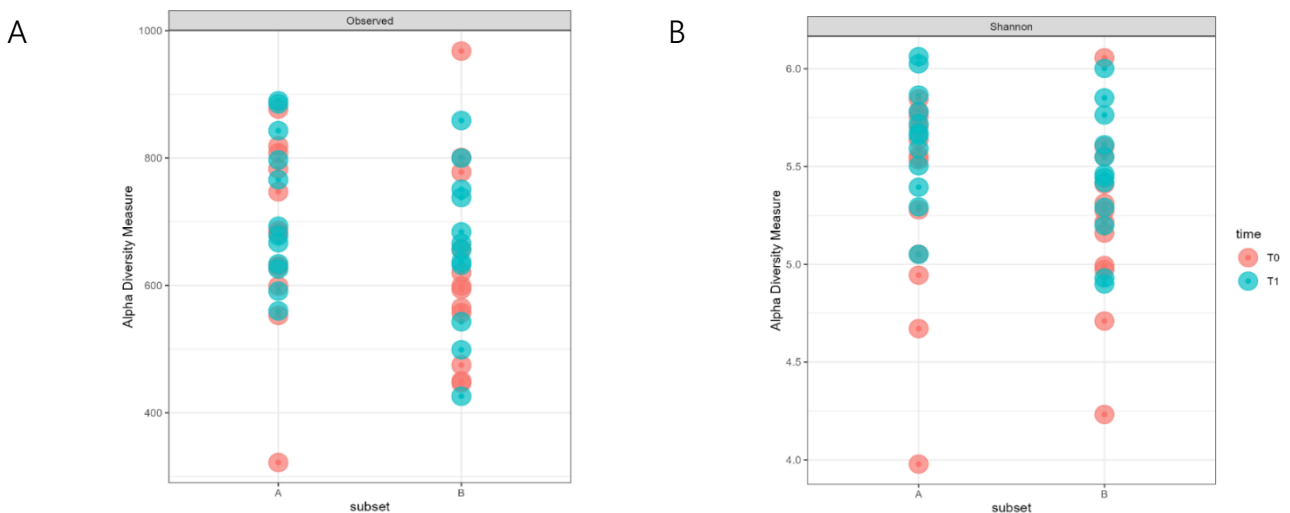


Figura 29. Alpha-diversity rappresentata dall'indice Observed (A) e l'indice di Shannon (B).

## Beta-diversity

L'analisi della *beta-diversity* ha permesso di valutare le differenze di composizione microbica presenti tra diversi campioni. È stata creata una matrice di distanze basata sull'indice di Bray-Curtis, come indicato su Materiali e Metodi, ed è stata rappresentata mediante una PCoA (*Principal Coordinate Analysis*) (Figura 30). Nel grafico A sono stati rappresentati tutti i campioni, con colori diversi a seconda del gruppo sperimentale; nel grafico B sono stati rappresentati solo i campioni al T1, confrontando i due gruppi di animali che come unica variabile presentano la dieta; più i campioni sono vicini più sono simili. In entrambi i casi la varianza espressa dagli assi (A- 15,2 % e 10,1%; B- 16,5% e 10,3%) non permette di visualizzare dei *cluster* di campioni e quindi un possibile effetto della dieta.

L'analisi PERMANOVA ha confermato l'assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni sottoposti a diete diverse.

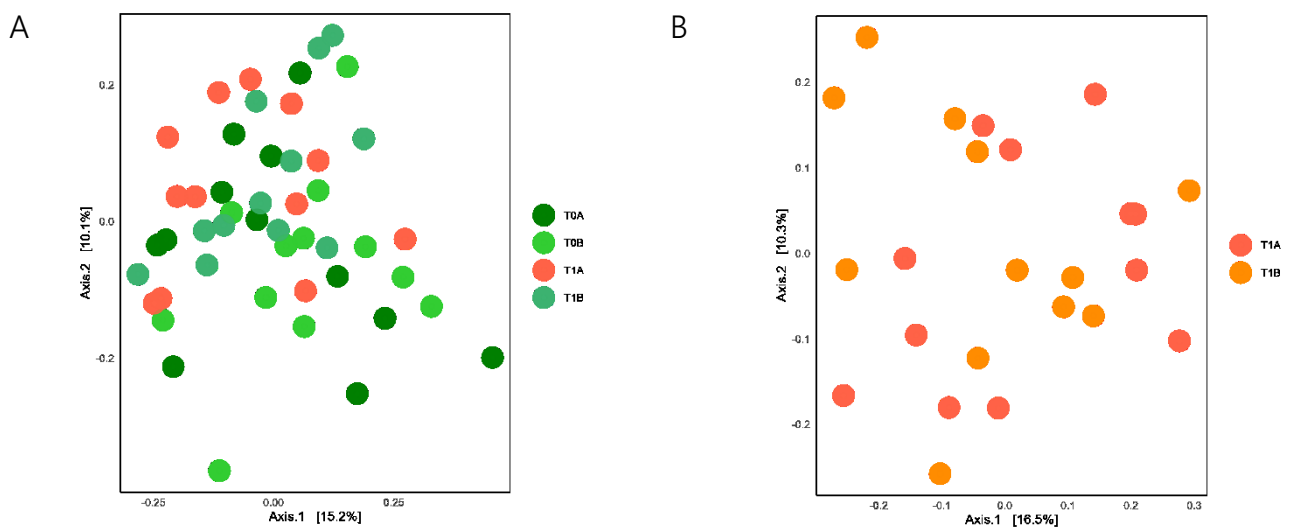


Figura 30. PCoA basata sulla distanza di Bray-Curtis. Il grafico A mostra i risultati del confronto tra i gruppi di controllo (T0A + T0B + T1B) e il gruppo trattato con alta medica (T1A); il grafico B mostra i risultati del confronto dei gruppi del T1 (T1A, T1B).

## 4. DISCUSSIONE

Lo scopo del presente progetto di Tesi consisteva nell'analizzare l'effetto di una dieta ad alto contenuto di erba medica (*Medicago sativa*) sulle comunità microbiche ruminali di pecore di razza Sarda. Le analisi di caratterizzazione e diversità microbica descritte nel capitolo precedente non hanno messo in luce alcuna differenza significativa tra il gruppo di animali trattati con questa dieta e il gruppo di controlli. L'unico trend ( $p$ -value  $<0,1$ ) che si osserva si riferisce ad una differenza dell'indice di Shannon tra la media dei tre gruppi di controllo (T0A+T0B + T1B) e il valore del gruppo trattato (T1A), risultato che suggerisce una possibile influenza della dieta sulla composizione del microbiota.

Il *phylum* predominante all'interno dei 48 campioni di liquido ruminale è risultato essere Bacteroidota, seguito da Proteobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobiota e Fibrobacter (Tabella 16). In riferimento allo studio di McLoughlin et al. (2020) i due *phyla* preponderanti nel microbiota ruminale di pecore erano rappresentati da Bacteroidota (o Bacteroidetes) e Firmicutes, seguiti da Proteobacteria e Actinobacteria; il *phylum* Fibrobacter presentava un'abbondanza relativa maggiore negli animali a bassa efficienza, risultato che può essere affiancato a quello ottenuto in questo studio che mostra un'abbondanza relativa maggiore dell'1% di questo *phylum* (Fibrobacter): le 24 pecore considerate erano, infatti, tutte a bassa attitudine casearia, facendo pensare che questo gruppo di batteri sia correlato a peggiori *performance* generali delle pecore. Anche Zhang et al. (2021) riportano che i due *phyla* maggiormente rappresentati erano Bacteroidota e Firmicutes, seguiti da Proteobacteria e Fibrobacter. Un microbiota ruminale sano è caratterizzato dalla dominanza di batteri anaerobi obbligati appartenenti ai *phyla* Bacteroidota e Firmicutes (Zhang et al., 2021). I primi esprimono un esteso set di geni codificanti enzimi per il metabolismo dei carboidrati, che quindi promuovono la degradazione dei polisaccaridi complessi. Inoltre, fermentano gli amminoacidi generando acetato (Zhang et al., 2021). I Firmicutes presenti nel rumine sono rappresentati principalmente da generi cellulitici e fibrolitici, abili a degradare emicellulosa e lignina (Malik et al., 2022). Come affermano gli autori Zhang et al. (2021), un incremento del rapporto Firmicutes/Bacteroidetes indicherebbe una migliore *performance* a livello di efficienza di

conversione, permettendo all'ospite di assorbire più energia dalla dieta; nel presente progetto di Tesi questi rapporti tra il gruppo nutrito a bassa medica al T1 e quello nutrito ad alta medica sempre al T1 equivalgono rispettivamente a 0.229 e 0.217, indicando che, debolmente e non significativamente, una miglior efficienza di conversione caratterizzerebbe il gruppo nutrito con basso contenuto di erba medica. Eseguendo invece il rapporto tra la media dei Firmicutes e la media dei Bacteroidota al T0 e quelle al T1 si ottiene rispettivamente  $(F/B)_{T0} = 0.201$  e  $(F/B)_{T1} = 0.223$ , mettendo in luce un incremento alla fine del tempo di esposizione alla dieta. Essendo stati considerati indistintamente gli animali trattati e non, non è però possibile correlare alla dieta l'aumento di questo rapporto. Un risultato che si trova in disaccordo con gli studi citati (McLoughlin et al., 2020; Zhang et al., 2021; Glendinning et al., 2021; Malik et al., 2022, Martinez B. et al., 2021), dove i primi due *phyla* risultano essere sempre Bacteroidota e Firmicutes, è la così marcata presenza del *phylum* Proteobacteria, un ampio gruppo di batteri che fermentano carboidrati ed etanolo e che sono coinvolti nella formazione di biofilm (Zhang et al., 2021). Kang et al. (2013) sostengono che i Proteobacteria possiedono un ruolo nel metabolismo dei ruminanti molto sottovalutato; sarebbe quindi interessante indagare come una così aumentata presenza di questo *phylum* emersa dai risultati di questa Tesi possa aver influenzato il metabolismo delle pecore coinvolte nell'esperimento. Xue et al. (2019), ad esempio, ha osservato che questo *phylum* era significativamente più presente in vacche caratterizzate da alta resa del latte e alto contenuto di proteine, facendo pensare ad un'associazione positiva tra il metabolismo di questi batteri e le più importanti caratteristiche tecnologiche del latte. Sorprende anche il decremento del *phylum* Fibrobacterota (o Fibrobacteres) nel gruppo trattato con alta medica al T1 (1.41%) rispetto al gruppo di controllo allo stesso tempo (1.85%). Solitamente, questo gruppo di batteri è predominante nel rumine di animali nutriti con foraggi, come quelli considerati nell'esperimento (Zhang et al., 2021).

Come affermano Chaucheyras-Durand and Ossa (2014) *Prevotella* è un genere molto importante nella comunità microbica ruminale, infatti risulta essere il genere più presente (esclusi i generi non assegnati) nei campioni di tutti e quattro i gruppi di animali. Questo risultato appare in accordo anche con lo studio di McLoughlin et al. (2020) dove il genere

*Prevotella* è stato il più ritrovato (abbondanza relativa del 70% sia nella frazione solida sia in quella liquida) nel rumine di 26 agnelli sperimentali. In particolare, il genere *Prevotella\_1* è risultato essere più abbondante del gruppo di agnelli a bassa efficienza, misurata in FCR, *feed conversion ratio*. Nonostante ciò, è stata osservata un'associazione positiva tra il genere *Prevotella\_1* e la FCR (sebbene ci fosse stato un incremento di questo genere negli animali a bassa efficienza di conversione, *low feed efficiency*). In effetti, come sostengono gli autori stessi, diverse specie di questo genere sono state associate – nel corso di vari progetti di ricerca – sia ad alta sia a bassa efficienza di conversione alimentare in vacche e pecore, che oltretutto sembra essere influenzata anche dalla tipologia di *feed* (concentrato VS foraggi, Ellison et al., 2017). Ad esempio, Martinez B. et al. (2021) hanno osservato una significativa correlazione negativa tra il genere *Prevotella* e alcuni tratti del latte come contenuto di grasso, di proteina, di caseine e di acidi grassi saturi. Xue et al. (2019) riporta invece la correlazione positiva osservata tra questo genere e la quantità di acidi grassi volatili nel rumine. Le specie appartenenti a questo genere sono note per essere grandemente coinvolte nella degradazione di diverse matrici alimentari, dagli amidi all'emicellulosa fino a peptidi e proteine, contribuendo in misura rilevante all'efficienza di conversione dei ruminanti. La presenza preponderante a livello di genere di *Prevotella* e *Succinivibrio* emersa negli animali considerati in questo progetto di Tesi è in accordo con quanto ottenuto da McLoughlin et al. (2020), anche se in quest'ultimo studio le pecore seguivano una dieta a base di concentrati. Zhang et al. (2021) avevano osservato che la famiglia delle *Prevotellaceae* era sempre più abbondante negli animali ad alto RFI (*residual feed intake*, a bassa efficienza), fatto che farebbe pensare ad una bassa efficienza di conversione anche delle pecore utilizzate per questo progetto di Tesi, dove questo *taxon* è il più rappresentato entro il livello tassonomico *Famiglia*. È noto che i generi appartenenti a questa famiglia sono coinvolti e facilitano la degradazione di fibre e proteine della dieta, componenti di cui l'erba medica è ricca. Sempre in base ai risultati dello studio di Zhang et al. (2021), il genere *Succinivibrio* era associato significativamente a pecore a basso RFI (*residual feed intake*, quindi ad alta efficienza), aspetto che rende contrastanti i risultati di questa Tesi, dove *Prevotella* è il genere più rappresentato, seguito da *Succinivibrionaceae* UCG-002 e *Succinivibrio*. *Succinivibrionaceae* non identificate sono state correlate da Martinez B. et



al. (2021) a minore presenza di cellule somatiche nel latte di vacca, mentre Xue et al. (2019) aveva osservato una correlazione positiva tra il genere *Succinivibrio* e il contenuto di proteine nel latte, suggerendo che questo gruppo di batteri possa esercitare un'influenza positiva sulle *performance* produttive in generale dei ruminanti. In riferimento alla riflessione fatta da McLoughlin et al. (2020) sulle diverse correlazioni osservate di *Prevotella* con alta e bassa efficienza di conversione, è lecito pensare che la caratterizzazione di questo genere a livello di abbondanza relativa delle diverse specie aiuterebbe a chiarire questo aspetto, andando a delucidare quale specie sia effettivamente più associata all'alta o alla bassa efficienza delle pecore. È noto che animali caratterizzati da alta efficienza di conversione consumano meno *feed*, andando ad influenzare positivamente i costi legati a questo aspetto dell'allevamento. Allo stesso tempo questi animali mantengono gli stessi standard produttivi, dando origine minori quantità di metano e letame legate alla minor quantità di cibo consumato (Kenny et al., 2018). Anche McLoughlin et al. (2020) riconoscono la mancanza di studi relativi al microbiota ruminale delle pecore, nonostante questa specie rappresenti un ottimo modello di ruminante dovuto all'economicità e alla praticità dell'allevamento e al raggiungimento precoce della maturità rispetto alle vacche, specie principale su cui vengono svolte le analisi sul microbiota. Chaucheyras-Durand e Ossa (2014) riportano inoltre che i generi *Ruminococcus* e *Fibrobacter*, sebbene siano ritenuti i maggiori responsabili della fermentazione delle fibre presentando centinaia di enzimi deputati alla degradazione dei carboidrati (Chaucheyras-Durand e Ossa, 2014), non sembrano essere i predominanti nella comunità ruminale. Come mostrano i risultati di questo progetto di Tesi, il 46% dei generi rilevati non sono stati assegnati, valore che aumenta nei gruppi al T1 trattati e non con la dieta ad alto contenuto di erba medica. L'affermazione degli autori si può quindi adattare a questa situazione, perchè in effetti i due generi *Ruminococcus* e *Fibrobacter* sono discretamente rappresentati ma non costituiscono la parte dominante di questo livello tassonomico, attualmente sconosciuta.

Esistono dei limiti in questo studio che possono aver portato all'assenza di significatività tra le differenze in termini di composizione del microbiota prima e dopo la dieta. Si consideri innanzitutto che i presenti risultati si integreranno con quelli delle analisi metagenomiche

riferite ai campioni di latte e di feci, i quali potranno contribuire a fornire un quadro più completo. Anche il numero di campioni relativamente basso potrebbe costituire un limite data la variabilità del microbiota (Weimer et al., 2015). Lo studio di Liu et al. (2016) ha osservato inoltre come variasse la composizione microbica ruminale di vacche in un arco di tempo di 48 ore dopo l'ingestione di determinati alimenti (tra cui alfalfa), eseguendo nel frattempo diversi campionamenti. È emerso che le abbondanze relative variavano notevolmente da un tempo di incubazione ad un altro, supportando l'evidenza che gli eventi di colonizzazione microbica variano molto velocemente all'interno del rumine (Weimer et al., 2015). Considerato che la pecora è anch'essa un ruminante, è possibile quindi che nel momento in cui sono stati prelevati i campioni di liquido ruminale le comunità batteriche non fossero diversificate a livelli significativi. Questo potrebbe suggerire la necessità di avere diversi prelievi ripetuti per una valutazione più accurata. Come citato nella parte introduttiva, in fase di campionamento ruminale, è importante considerare la frazione liquida tanto quanto quella solida, che sembra essere la più coinvolta nella degradazione delle matrici alimentari nel rumine (McLoughlin et al., 2020). Se, quindi, il campionamento non è stato efficace nel prelevare una porzione sufficiente di frazione solida, la presenza di determinati batteri potrebbe non essere stata rilevata. Altro aspetto da non sottovalutare è la risoluzione tassonomica, che in questo progetto di Tesi è ridotta al genere batterico. Se fosse stato possibile caratterizzare il microbiota a livello di specie, le probabilità di far emergere differenze significative sarebbero state maggiori, ma questo costituisce uno dei più grandi limiti dell'*amplicon sequencing*, strategia (consapevolmente) adottata per questo progetto. Alla luce di ciò, si rendono necessari ulteriori approfondimenti per quanto riguarda l'effetto di una dieta ad alto contenuto di erba medica sul microbiota ruminale della pecora.

## 5. CONCLUSIONI

Le comunità microbiche che popolano il rumine dei ruminanti giocano un ruolo fondamentale nell'alimentazione dell'ospite, degradando componenti della dieta come fibre e carboidrati e sintetizzando acidi grassi volatili e proteine microbiche, sostanze che rappresentano la principale forma di energia per l'animale. Inoltre, il microbiota ruminale esercita un'influenza sulla produttività e sulle condizioni di salute dei ruminanti (Henderson et al., 2013). Le prospettive di manipolazione delle fermentazioni associate alla comunità ruminale per migliorare le *performance* produttive dei ruminanti di maggior rilievo zootecnico (vacche, pecore, capre) attraggono considerevolmente l'attenzione dei ricercatori in campo animale; una delle strategie maggiormente implementate (e studiate) per raggiungere questo obiettivo è rappresentata dalla dieta e dalle sue relative caratteristiche. Questo progetto di Tesi si poneva l'obiettivo di indagare come una dieta ad alto contenuto di erba medica (*Medicago sativa*) esercitasse un'influenza sulle comunità microbiche ruminali attraverso un'analisi NGS, sequenziando il gene batterico 16S. Il microbiota ruminale degli animali trattati e degli animali di controllo non ha fatto emergere differenze statisticamente significative nella sua struttura; l'unico trend osservato ( $p < 0.1$ ) si riferiva all'indice di Shannon calcolato tra i tre gruppi di controllo (nutriti a basso contenuto di erba medica, due prima dell'inizio del periodo di dieta – T0A e T0B – e quello finale che ha continuato a seguire la dieta "bassa medica" T1B) e quello sottoposto alla dieta ad alto contenuto di medica (T1A). Dai risultati è emersa una notevole abbondanza del *phylum* Proteobacteria (secondo rispetto al *phylum* preponderante Bacteroidota) che risulta in disaccordo con la maggior parte degli studi citati; a livello di genere, quello più rappresentato corrisponde a *Prevotella*, seguito da Succinovibraceae non identificate e *Succinivibrio*. Questi risultati rispecchiano quelli ottenuti da altri autori, che correlano *Succinivibrio* ad alta efficienza di conversione alimentare nella specie *Ovis aries*, mentre risulta alquanto ambigua l'influenza esercitata dalle diverse specie di *Prevotella* sull'efficienza di conversione in questi animali. Il numero ridotto di animali, il numero limitato di prelievi (due tempi sperimentali), il momento e il metodo di campionamento, la risoluzione tassonomica che si è ridotta al genere ed eventuali problemi nel sequenziamento potrebbero

aver contribuito a non mettere in luce differenze significative tra le comunità microbiche ruminali degli animali trattati e quelle dei controlli. Tuttavia questo studio ha contribuito ad aumentare la conoscenza sulle relazioni tra dieta e microbiota ruminale nelle pecore, argomento che sta recentemente attraendo particolare interesse. La caratterizzazione del microbiota fecale e del latte potrebbe fornire ulteriori informazioni che contribuiranno a corredare un quadro più completo ai fini del miglioramento dell'attitudine casearia e della sostenibilità dell'allevamento ovino.

## BIBLIOGRAFIA

Albenzio, M., & Santillo, A. (2011). Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 33-40.

Ali, A. K. A., & Shook, G. E. (1980). Correction factors for somatic cell concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, 63 (Suppl. 1).

Araújo-Rodrigues, H., Tavarina, F. K., dos Santos, M. T. P., Alvarenga, N., & Pintado, M. M. (2020). A review on microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: An ovine raw milk cheese. *International Dairy Journal*, 100, 104561.

Arinze, E. A., Schoenau, G. J., Sokhansanj, S., & Adapa, P. (2003). Aerodynamic separation and fractional drying of alfalfa leaves and stems—a review and new concept. *Drying Technology*, 21(9), 1669-1698.

Balthazar, C. F., Pimentel, T. C., Ferrão, L. L., Almada, C. N., Santillo, A., Albenzio, M., ... & Cruz, A. G. (2017). Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(2), 247-262.

Bardenhorst, S. K., Vital, M., Karch, A., & Rübsamen, N. (2022). Richness estimation in microbiome data obtained from denoising pipelines. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 508-520.

Bates d., Maechler M., Bolker B., Walker S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48.

Battacone, G., Nudda, A., & Pulina, G. (2010). Effects of ochratoxin A on livestock production. *Toxins*, 2(7), 1796-1824.

Belanche, A., Kingston-Smith, A. H., Griffith, G. W., & C. J. (2019). A multi-kingdom study reveals the plasticity of the rumen microbiota in response to a shift from non-grazing to grazing diets in sheep. *Frontiers in microbiology*, 10, 122.

- Bencini, R., Atzori, A. S., Nudda, A., Battacone, G., & Pulina, G. (2010). Improving the quality and safety of sheep milk. In *Improving the Safety and Quality of Milk* (pp. 347-401). Woodhead Publishing.
- Bencini, R., & Pulina, G. (1997). The quality of sheep milk: a review. *Australian journal of experimental agriculture*, *37*(4), 485-504.
- Bharti, R., & Grimm, D. G. (2021). Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in bioinformatics*, *22*(1), 178-193.
- Bittante, G., Penasa, M., & Cecchinato, A. (2012). Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of dairy science*, *95*(12), 6843-6870.
- Bogdanovičová, K., Skočková, A., Št'ástková, Z., Koláčková, I., & Karpíšková, R. (2015). The bacteriological quality of goat and ovine milk. *Potravinárstvo: Scientific Journal for Food Industry*, *9*(1), 72-76.
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs*, *27*(4), 326-349.
- Brown, D. (2018). Optimising rumen health and the effect this will have on ketosis. *Livestock*, *23*(4), 174-178.
- Brown, J. R. (2007). *Comparative genomics: basic and applied research*. CRC press.
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, *6*(1), 1-14.
- Caboni, P., Manis, C., Ibba, I., Contu, M., Coroneo, V., & Scano, P. (2017). Compositional profile of ovine milk with a high somatic cell count: A metabolomics approach. *International Dairy Journal*, *69*, 33-39.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2015). DADA2: High resolution sample inference from amplicon data. *BioRxiv*, 024034.

- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 330-339.
- Chaucheyras-Durand, F., & Ossa, F. (2014). The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist*, 30(1), 1-12.
- Chen, K., & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS computational biology*, 1(2), e24.
- Chen, X., Su, X., Li, J., Yang, Y., Wang, P., Yan, F., ... & Wu, S. (2021). Real-time monitoring of ruminal microbiota reveals their roles in dairy goats during subacute ruminal acidosis. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 1-14.
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., & Bittante, G. (2012). Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6806-6819.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS microbiology letters*, 228(1), 45-49.
- Dale, J. W., Von Schantz, M., & Plant, N. (2011). From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology. Edizione Italiana a cura di E. Ginelli. Copyright©2013, EdiSES S.r.l. – Napoli.
- Di Liberto, A., & Pau, S. (2022). *ECONOMIA DELLA SARDEGNA 29° Rapporto 2022* (p. 14). Arkadia Editore.
- Durazzi, F., Sala, C., Castellani, G., Manfreda, G., Remondini, D., & De Cesare, A. (2021). Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.

- Ellison, M. J., Conant, G. C., Lamberson, W. R., Cockrum, R. R., Austin, K. J., Rule, D. C., & Cammack, K. M. (2017). Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*, *156*, 12-19.
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., & Sanchez-Flores, A. (2015). The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in genetics*, *6*, 348.
- Esteban-Blanco, C., Gutiérrez-Gil, B., Puente-Sánchez, F., Marina, H., Tamames, J., Acedo, A., & Arranz, J. J. (2020). Microbiota characterization of sheep milk and its association with somatic cell count using 16s rRNA gene sequencing. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *137*(1), 73-83.
- Ferapontova, E. E. (2020). Electrochemical assays for microbial analysis: How far they are from solving microbiota and microbiome challenges. *Current Opinion in Electrochemistry*, *19*, 153-161.
- Fernando, S. C., & Purvis, H. T. II, Najar, FZ, Sukharnikov, LO, Krehbiel, CR, Nagaraja, TG, et al. (2010). Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol*, *76*, 7482-7490.
- Fouhy, F., Clooney, A. G., Stanton, C., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations-impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC microbiology*, *16*(1), 1-13.
- Garrido-Cardenas, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2017). The metagenomics worldwide research. *Current genetics*, *63*(5), 819-829.
- Gebreyesus, G., Difford, G. F., Buitenhuis, B., Lassen, J., Noel, S. J., Højberg, O., ... & Sahana, G. (2020). Predictive ability of host genetics and rumen microbiome for subclinical ketosis. *Journal of dairy science*, *103*(5), 4557-4569.
- Gilbert, R. A., Kelly, W. J., Altermann, E., Leahy, S. C., Minchin, C., Ouwerkerk, D., & Klieve, A. V. (2017). Toward understanding phage: host interactions in the rumen; complete genome sequences of lytic phages infecting rumen bacteria. *Frontiers in microbiology*, *8*, 2340



- Gleason, C. B., Settlage, R. E., Beckett, L. M., & White, R. R. (2021). Characterizing effects of ingredients differing in ruminally degradable protein and fiber supplies on the ovine rumen microbiome using Next-Generation sequencing. *Front. Anim. Sci*, *2*, 745848.
- Glendinning, L., Genç, B., Wallace, R. J., & Watson, M. (2021). Metagenomic analysis of the cow, sheep, reindeer and red deer rumen. *Scientific reports*, *11*(1), 1-10.
- Goswami, K., & Sanan-Mishra, N. (2022). RNA-seq for revealing the function of the transcriptome. In *Bioinformatics* (pp. 105-129). Academic Press.
- Guo, H., Zhou, G., Tian, G., Liu, Y., Dong, N., Li, L., ... & Yang, Y. (2021). Changes in Rumen microbiota affect metabolites, immune responses and antioxidant enzyme activities of sheep under cold stimulation. *Animals*, *11*(3), 712.
- He, Y., Niu, W., Qiu, Q., Xia, C., Shao, T., Wang, H., ... & Cao, B. (2018). Effect of calcium salt of long-chain fatty acids and alfalfa supplementation on performance of Holstein bulls. *Oncotarget*, *9*(3), 3029
- Henderson, G., Cox, F., Kittelmann, S., Miri, V. H., Zethof, M., Noel, S. J., ... & Janssen, P. H. (2013). Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PloS one*, *8*(9), e74787.
- Henning, P. H., Horn, C. H., Steyn, D. G., Meissner, H. H., & Hagg, F. M. (2010). The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Animal feed science and technology*, *157*(1-2), 13-19.
- Hitch, T. C., Edwards, J. E., & Gilbert, R. A. (2019). Metatranscriptomics reveals mycoviral populations in the ovine rumen. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(13), fnz161
- Hodkinson, B. P., & Grice, E. A. (2015). Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research. *Advances in wound care*, *4*(1), 50-58.
- Huang, Q., Holman, D. B., Alexander, T., Hu, T., Jin, L., Xu, Z., ... & Wang, Y. (2018). Fecal microbiota of lambs fed purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Archives of microbiology*, *200*(1), 137-145

- Hwang, J., Hodis, H. N., & Sevanian, A. (2001). Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract. *Journal of agricultural and food chemistry*, *49*(1), 308-314.
- Idda, L., Furesi, R., & Pulina, P. (2010). *Economia dell'allevamento ovino da latte. Produzione, trasformazione, mercato: Produzione, trasformazione, mercato*. FrancoAngeli.
- Ji, S., Jiang, T., Yan, H., Guo, C., Liu, J., Su, H., ... & Li, S. (2018). Ecological restoration of antibiotic-disturbed gastrointestinal microbiota in foregut and hindgut of cows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *8*, 79
- Kamke, J., Kittelmann, S., Soni, P., Li, Y., Tavendale, M., Ganesh, S., ... & Attwood, G. T. (2016). Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a Sharpea-enriched microbiome characterised by lactic acid formation and utilisation. *Microbiome*, *4*(1), 1-16
- Kenny, D. A., Fitzsimons, C., Waters, S. M., & McGee, M. (2018). Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle—the current state of the art and future challenges. *animal*, *12*(9), 1815-1826.
- Khan, A. R., Pervez, M. T., Babar, M. E., Naveed, N., & Shoaib, M. (2018). A comprehensive study of de novo genome assemblers: current challenges and future prospective. *Evolutionary Bioinformatics*, *14*, 1176934318758650.
- Kim, S., & Dale, B. E. (2003). Cumulative energy and global warming impact from the production of biomass for biobased products. *Journal of Industrial Ecology*, *7*(3-4), 147-162.
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., ... & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, *31*(9), 814-821.
- Lee, H., Gurtowski, J., Yoo, S., Nattestad, M., Marcus, S., Goodwin, S., ... & Schatz, M. C. (2016). Third-generation sequencing and the future of genomics. *BioRxiv*, 048603.

- Li, F., Lin, H. L., & Chang Sh, H. (2007). Energy evaluation on the cropping mode and the cropping-breeding coupled mode in the ecotone between farming and cropping areas. *Acta Agrestia Sinica*, 15, 322-326.
- Li, Z., Chen, Y., Mu, D., Yuan, J., Shi, Y., Zhang, H., ... & Fan, W. (2012). Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap–layout–consensus and de-bruijn-graph. *Briefings in functional genomics*, 11(1), 25-37.
- Liu, C., Qu, Y. H., Guo, P. T., Xu, C. C., Ma, Y., & Luo, H. L. (2018). Effects of dietary supplementation with alfalfa (*Medicago sativa* L.) saponins on lamb growth performance, nutrient digestibility, and plasma parameters. *Animal Feed Science and Technology*, 236, 98-106.
- Liu, J., Zhang, M., Xue, C., Zhu, W., & Mao, S. (2016). Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9668-9681
- Liu, K., Zhang, Y., Yu, Z., Xu, Q., Zheng, N., Zhao, S., ... & Wang, J. (2021). Ruminal microbiota–host interaction and its effect on nutrient metabolism. *Animal Nutrition*, 7(1), 49-55
- Lv, W., Liu, X., Sha, Y., Shi, H., Wei, H., Luo, Y., ... & Pu, X. (2021). Rumen Fermentation—Microbiota—Host Gene Expression Interactions to Reveal the Adaptability of Tibetan Sheep in Different Periods. *Animals*, 11(12), 3529
- Malik, P. K., Trivedi, S., Kolte, A. P., Sejian, V., Bhatta, R., & Rahman, H. (2022). Diversity of rumen microbiota using metagenome sequencing and methane yield in Indian sheep fed on straw and concentrate diet. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(8), 103345
- Mani, S., Aiyegoro, O. A., & Adeleke, M. A. (2022). Association between host genetics of sheep and the rumen microbial composition. *Tropical Animal Health and Production*, 54(2), 1-16
- Mamun, M. A. A., Sandeman, M., Rayment, P., Brook-Carter, P., Scholes, E., Kasinadhuni, N., ... & Greenhill, A. R. (2020). The composition and stability of the faecal microbiota of Merino sheep. *Journal of applied microbiology*, 128(1), 280-291.

- Mao, D. P., Zhou, Q., Chen, C. Y., & Quan, Z. X. (2012). Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC microbiology*, *12*(1), 1-8.
- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature protocols*, *12*(2), 213-218.
- Martinez Boggio, G., Meynadier, A., Daunis-i-Estadella, P., & Marie-Etancelin, C. (2021). Compositional analysis of ruminal bacteria from ewes selected for somatic cell score and milk persistency. *Plos one*, *16*(7), e0254874.
- Marutsova, V., & Marutsov, P. (2018). Subclinical and clinical ketosis in sheep—relationships between body condition scores and blood  $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE and non-esterified fatty acids concentrations. *Tradition Modernity Veterinary Med*, *3*(1), 30-36.
- Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2019). The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut microbes*, *10*(2), 115-132.
- McLoughlin, S., Spillane, C., Claffey, N., Smith, P. E., O'Rourke, T., Diskin, M. G., & Waters, S. M. (2020). Rumen microbiome composition is altered in sheep divergent in feed efficiency. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1981.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, *8*(4), e61217.
- Moraïs, S., & Mizrahi, I. (2019). The road not taken: the rumen microbiome, functional groups, and community states. *Trends in Microbiology*, *27*(6), 538-549.
- Namonyo, S., Wagacha, M., Maina, S., Wambua, L., & Agaba, M. (2018). A metagenomic study of the rumen virome in domestic caprids. *Archives of virology*, *163*(12), 3415-3419.
- Nazir, A. (2016). Review on metagenomics and its applications. *Imp J Intersd Res*, *2*(10).
- Newbold, C. J., & Ramos-Morales, E. (2020). Ruminal microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. *Animal*, *14*(S1), s78-s86.

- Niedringhaus, T. P., Milanova, D., Kerby, M. B., Snyder, M. P., & Barron, A. E. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical chemistry*, *83*(12), 4327-4341.
- Nudda, A., Atzori, A. S., Correddu, F., Battacone, G., Lunesu, M. F., Cannas, A., & Pulina, G. (2020). Effects of nutrition on main components of sheep milk. *Small Ruminant Research*, *184*, 106015.
- Nudda, A., Battacone, G., Boaventura Neto, O., Cannas, A., Francesconi, A. H. D., Atzori, A. S., & Pulina, G. (2014). Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *43*, 445-456.
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., ... & Szoecs, E. *Vegan: Community Ecology Package; R Package Version 2.6-2*. 2022.
- Park, T., Wijeratne, S., Meulia, T., Firkins, J., & Yu, Z. (2018). Draft macronuclear genome sequence of the ruminal ciliate *Entodinium caudatum*. *Microbiology Resource Announcements*, *7*(1), e00826-18.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research*, *68*(1-2), 88-113.
- Pazzola, M., Dettori, M. L., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Bittante, G., & Vacca, G. M. (2014). Phenotypic factors affecting coagulation properties of milk from Sarda ewes. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 7247-7257
- Pirisi, A., Lauret, A., & Dubeuf, J. P. (2007). Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small ruminant research*, *68*(1-2), 167-178
- Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., & Watson, M. (2018). The madness of microbiome: attempting to find consensus "best practice" for 16S microbiome studies. *Applied and environmental microbiology*, *84*(7), e02627-17.
- Porcheddu, D. (2006). economia e storia dell'allevamento in sardegna attraverso un manoscritto inedito dell'economista gavino alivia (1886-1959). *Rivista di Storia dell'Agricoltura», x/vi*, 117-154.

- Pulina, G., Nudda, A., Battacone, G., & Cannas, A. (2006). Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Animal Feed Science and Technology*, *131*(3-4), 255-291.
- Pulino, D., Spanu, S., & Tidore, C. (2018). Pratiche innovative di uso della terra in Sardegna: tra produzione di cibo e nuove presenze sociali. *Sociologia urbana e rurale*.
- Qin, W., Song, P., Lin, G., Huang, Y., Wang, L., Zhou, X., ... & Zhang, T. (2020). Gut Microbiota plasticity influences the adaptability of wild and domestic animals in co-inhabited areas. *Frontiers in microbiology*, 125.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D590-D596.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, *37*(5), 664-698.
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*, *35*(9), 833-844.
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, *4*(1), 30-36.
- Reinemann, D. J. (2017). Milking Machine Management. In: D. K. Beede (Ed.), Large Dairy Herd Management (pp. 599 853-866). Champaign, IL, USA: American Dairy Science Association,
- Rong, Y., Yuan, F., & Johnson, D. A. (2014). Addition of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to lamb diets enhances production and profits in northern China. *Livestock Research for Rural Development*, *26*(224).
- Rosati, R., Militello, G., Boselli, C., Giangolini, G., Amatiste, S., Brajon, G., ... & Fagiolo, A. (2005). Cellule somatiche nel latte ovino e caprino: definizione del valore medio nazionale e del valore fisiologico. *Sci. Tecn. Latt.-Cas*, *56*(3), 161-181.

- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., ... & Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, *475*(7356), 348-352.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., & Morgavi, D. P. (2007). PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *animal*, *1*(7), 939-944.
- Samac, D. A., Jung, H. J. G., & Lamb, J. F. (2016). Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) as a feedstock for production of ethanol and other bioproducts. In *Alcoholic fuels* (pp. 79-98). CRC Press.
- Sampelayo, M. S., Chilliard, Y., Schmidely, P., & Boza, J. (2007). Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, *68*(1-2), 42-63.
- Sanjuan, S., Rúa, J., & García-Armesto, M. R. (2003). Microbial flora of technological interest in raw ovine milk during 6 C storage. *International journal of dairy technology*, *56*(3), 143-148.
- Saro, C., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., & Carro, M. D. (2014). Influence of forage type in the diet of sheep on rumen microbiota and fermentation characteristics. *Livestock Science*, *160*, 52-59.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2007). The last word: books as a statistical metaphor for microbial communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, *61*, 23-34.
- Schriefer, A. E., Cliften, P. F., Hibberd, M. C., Sawyer, C., Brown-Kennerly, V., Burcea, L., ... & Head, R. D. (2018). A multi-amplicon 16S rRNA sequencing and analysis method for improved taxonomic profiling of bacterial communities. *Journal of microbiological methods*, *154*, 6-13.
- Selvaggi, M., D'Alessandro, A. G., & Dario, C. (2017). Environmental and genetic factors affecting milk yield and quality in three Italian sheep breeds. *Journal of Dairy Research*, *84*(1), 27-31.
- Selvaggi M, Laudadio V, Dario C & Tufarelli V. (2014). Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: a useful tool for dairy production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(15), 3090–3099.

- Seol, D., Lim, J. S., Sung, S., Lee, Y. H., Jeong, M., Cho, S., ... & Kim, H. (2022). Microbial Identification Using rRNA Operon Region: Database and Tool for Metataxonomics with Long-Read Sequence. *Microbiology Spectrum*, *10*(2), e02017-21.
- Sevi, A. (2007). Ewe welfare and ovine milk and cheese quality. *Italian Journal of Animal Science*, *6*(sup1), 521-526.
- Shabana, I. I., Albakri, N. N., & Bouqellah, N. A. (2021). Metagenomic investigation of faecal microbiota in sheep and goats of the same ages. *Journal of Taibah University for Science*, *15*(1), 1-9.
- Shabat, S. K. B., Sasson, G., Doron-Faigenboim, A., Durman, T., Yaacoby, S., Berg Miller, M. E., ... & Mizrahi, I. (2016). Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME journal*, *10*(12), 2958-2972.
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science*, *5*, 209.
- Starke, R., Pylro, V. S., & Morais, D. K. (2021). 16S rRNA gene copy number normalization does not provide more reliable conclusions in metataxonomic surveys. *Microbial ecology*, *81*(2), 535-539.
- Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Wisner, A. H., Press, M. O., Langford, K. W., ... & Watson, M. (2018). Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nature communications*, *9*(1), 1-11.
- Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Walker, A. W., Roehe, R., & Watson, M. (2019). Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. *Nature biotechnology*, *37*(8), 953-961.
- Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., De Riccardis, F., Leitz, R., & Oleszek, W. (2001). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(2), 753-758.



- Su, M., Hao, Z., Shi, H., Li, T., Wang, H., Li, Q., ... & Ma, Y. (2022). Metagenomic Analysis Revealed Differences in Composition and Function Between Liquid-Associated and Solid-Associated Microorganisms of Sheep Rumen. *Frontiers in microbiology*, *13*.
- Tamime, A. Y., Wszolek, M., Božanić, R., & Özer, B. (2011). Popular ovine and caprine fermented milks. *Small Ruminant Research*, *101*(1-3), 2-16.
- Tanca, A., Fraumene, C., Manghina, V., Palomba, A., Abbondio, M., Deligios, M., ... & Uzzau, S. (2017). Diversity and functions of the sheep faecal microbiota: A multi-omic characterization. *Microbial biotechnology*, *10*(3), 541-554.
- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., ... & Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, *210*, 103534.
- Vacca, G. M., Cipolat-Gotet, C., Paschino, P., Casu, S., Usai, M. G., Bittante, G., & Pazzola, M. (2019). Variation of milk technological properties in sheep milk: Relationships among composition, coagulation and cheese-making traits. *International dairy journal*, *97*, 5-14.
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, *30*(9), 418-426.
- Viti, C., Bellabarba, A., Daghigho, M., Mengoni, A., Mele, M., Buccioni, A., ... & Pini, F. (2021). Alfalfa for a sustainable ovine farming system: Proposed research for a new feeding strategy based on alfalfa and ecological leftovers in drought conditions. *Sustainability*, *13*(7), 3880.
- Wang, B., Luo, Y., Su, R., Yao, D., Hou, Y., Liu, C., ... & Jin, Y. (2020). Impact of feeding regimens on the composition of gut microbiota and metabolite profiles of plasma and feces from Mongolian sheep. *Journal of Microbiology*, *58*(6), 472-482.
- Wang, Q., Wang, Y., Wang, X., Dai, C., Tang, W., Li, J., ... & Zhu, M. (2020). Effects of dietary energy levels on rumen fermentation, microbiota, and gastrointestinal morphology in growing ewes. *Food Science & Nutrition*, *8*(12), 6621-6632.

- Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS one*, *4*(10), e7401.
- Ward, S. M., Holden, N. M., White, E. P., & Oldfield, T. L. (2016, September). The "Circular Economy" applied to the agriculture (livestock production) sector—Discussion paper'. In *Proceedings of the workshop on the sustainability of the EU's livestock production systems, European Commission, DG Agriculture and Rural Development, Brussels, Belgium* (pp. 14-15).
- Weimer, P. J. (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in microbiology*, *6*, 296.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2407.
- Xue, M. Y., Sun, H. Z., Wu, X. H., Guan, L. L., & Liu, J. X. (2019). Assessment of rumen bacteria in dairy cows with varied milk protein yield. *Journal of dairy science*, *102*(6), 5031-5041.
- Yang, B., He, B., Wang, S. S., Liu, J. X., & Wang, J. K. (2015). Early supplementation of starter pellets with alfalfa improves the performance of pre-and postweaning Hu lambs. *Journal of Animal Science*, *93*(10), 4984-4994.
- Yang, F., Yang, F., Zhai, Z. H., Wang, S. Q., Zhao, L., Zhang, B. L., ... & Wang, Y. Q. (2022). Effects of alfalfa saponins on the production performance, serum biochemical factors, and immune factors in Small-Tailed Han sheep. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*.
- Ye, C., Hill, C. M., Wu, S., Ruan, J., & Ma, Z. S. (2016). DBG2OLC: efficient assembly of large genomes using long erroneous reads of the third generation sequencing technologies. *Scientific reports*, *6*(1), 1-9.
- Yoshihara, Y., & Ogawa, Y. (2021). Handling stress-induced ruminal microbiota changes reduce grass hay degradability in sheep. *J. Anim. Feed Sci*, *30*, 159-164.
- Zein-Eldin, M. M., Ghanem, M. M., El-Raof, A. Y., El-Attar, H. M., & El-Khaiat, H. M. (2014). Clinical, haematobiochemical and ruminal changes during the onset and recovery of induced lactic acidosis in sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry*, *30*(4), 647-659.

Zhang, Y. K., Zhang, X. X., Li, F. D., Li, C., Li, G. Z., Zhang, D. Y., ... & Wang, W. M. (2021). Characterization of the rumen microbiota and its relationship with residual feed intake in sheep. *Animal*, 15(3), 100161.

## SITOGRAFIA

ANSA, 21/05/2022.

[https://www.ansa.it/canale\\_terraegusto/notizie/mondo\\_agricolo/2022/05/21/biodiversita-in-sardegna-resistono-12-razze-autoctone\\_e51a37ed-66b6-48a4-aaa4-4645ffa1542f.html](https://www.ansa.it/canale_terraegusto/notizie/mondo_agricolo/2022/05/21/biodiversita-in-sardegna-resistono-12-razze-autoctone_e51a37ed-66b6-48a4-aaa4-4645ffa1542f.html)

ANSA, 23/9/22. [https://www.ansa.it/sardegna/notizie/2022/09/23/cresce-export-sardegna-ma-bilancia-commerciale-negativa\\_2e96c212-0783-49f6-86aa-1fbde3be5813.html](https://www.ansa.it/sardegna/notizie/2022/09/23/cresce-export-sardegna-ma-bilancia-commerciale-negativa_2e96c212-0783-49f6-86aa-1fbde3be5813.html)

Centro Studi l'Uomo e l'Ambiente, 2014.

<http://www.scienzaegoverno.org/sites/default/files/PRECISIONE.pdf>

Dati sull'allevamento ovino, caprino e bovino da latte in Sardegna - 2019. Agenzia Regionale per lo sviluppo in Agricoltura (Laore), 2020.

<https://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=413001&v=2&c=6039&vd=1>

Istat 2022, consultazione del 20/10/2022. [Latte e prodotti lattiero caseari \(istat.it\)](https://www.istat.it/it/temi/latte-e-prodotti-lattiero-caseari)

IZS Sardegna. [https://www.izs-sardegna.it/quaderni/all\\_ovino1.pdf](https://www.izs-sardegna.it/quaderni/all_ovino1.pdf)

Nazioni Unite - World Population Prospects: The 2017 Revision

<https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2017-revision.html>

Report Ismea - Tendenze Latte e derivati ovocaprini - n.1/2022 (Luglio 2022).

<https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/12224>

Scheda di settore, Ismea 2022 - Latte e derivati Ovocaprini.

<https://www.ismeamercati.it/lattiero-caseari/latte-derivati-ovicaprini>

VetInfo, Anagrafe Nazionale Zootecnica – Statistiche 2022 (dati elaborati il 30/06/2022).  
[https://www.vetinfo.it/j6\\_statistiche/#/report-pbi/29](https://www.vetinfo.it/j6_statistiche/#/report-pbi/29)

Figura 10: <https://towardsdatascience.com/genome-assembly-using-de-bruijn-graphs->

## BIBLIOGRAFIA IMMAGINI

Figura 3: Marsh, S. (Ed.). (2007). Pyrosequencing® Protocols. *Methods in Molecular Biology*™, vol 373. Totowa, NJ: Humana Press.

Figura 4: Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.

Figura 12: Chierico, F. D., Ancora, M., Marcacci, M., Camma, C., Putignani, L., & Conti, S. (2015). Choice of next-generation sequencing pipelines. In *Bacterial Pangenomics* (pp. 31-47). Humana Press, New York, NY.

Figura 13: Gray, M. W., Sankoff, D., & Cedergren, R. J. (1984). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 12(14), 5837-5852.

Figure 18, 19, 20, 21: *Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 – Instructions for template preparation, chip loading, and sequencing* ([Ion 520 & Ion 530 Kit – OT2 User Guide \(Pub. No. MAN0010844 E.0\) \(thermofisher.cn\)](#))

Figura 22: Analysis of community composition data using phyloseq - [FROGS\\_phyloseq\\_10102016.pdf \(inra.fr\)](#)

## RINGRAZIAMENTI

L'università non è una passeggiata, anzi, è un lungo percorso che può sembrare infinito, che può presentare tratti in salita e che a volte può fare paura, ma allo stesso tempo è un'esperienza che cambia la vita.

Per me l'Università rappresenta un elemento che ha apportato grandi cambiamenti nel mio essere, dilatando le mie prospettive di futuro, facendomi sviluppare la capacità di guardare le cose da un punto di vista critico, insegnandomi l'importanza di andare a fondo, di essere sempre curiosi, di mettersi alla prova, di non sottovalutarsi, di saper accettare i propri limiti, di saper dare una pacca sulla spalla a sé stessi quando serve. Questi due anni di magistrale sono stati per me un grande sfida, avendo scelto un percorso di studi parecchio distante da quella che era la mia preparazione triennale. Non so come descrivere la sensazione che provavo mentre ascoltavo le prime lezioni del primo anno, su Zoom, quando sentivo per la prima volta nella mia vita tantissime parole, nozioni, argomenti che ero sicura non avrei mai imparato. Adesso invece ho appena discusso la mia tesi di laurea, tesi che ho portato avanti in questi mesi con enorme impegno e curiosità. Aver partecipato concretamente ad un progetto di ricerca come questo significa per me aver raggiunto un grande obiettivo, cosa che non si sarebbe realizzata senza la partecipazione e l'impegno delle persone che sto per ringraziare. Il mio primo pensiero va alla Dott.ssa – non che correlatrice della tesi – Alice Vanzin che mi ha seguito passo dopo passo nello svolgimento del tirocinio e nella stesura della tesi, insegnandomi tantissime cose, dandomi dritte, togliendomi dubbi. Senza di lei non sarebbe stata la stessa cosa. Non posso fare a meno di ringraziare la Dott.ssa Giulia Zardinoni che è stata fondamentale per quanto riguarda l'esperienza in laboratorio, dove con pazienza mi ha mostrato e insegnato le procedure di analisi che stanno alla base del progetto e che in generale

contribuiranno alla mia formazione da biotecnologa. Aver avuto la possibilità di sequenziare del DNA (e di imparare come farlo) credo sia per me il risultato più prezioso di tutta quest'esperienza. Ringrazio anche il Dott. Alessandro Toscano e tutti i ragazzi del gruppo di ricerca della relatrice Professoressa Sara Pegolo che mi hanno sempre fatta sentire a mio agio, rendendo il periodo di tirocinio un momento che ricorderò con serenità. Ringrazio tutti i miei compagni di corso che purtroppo ho potuto davvero conoscere di persona solo il secondo anno, ma con cui si è sempre fatta squadra e che ci sono sempre stati nel momento del bisogno. Ringrazio tutti i miei amici e i miei colleghi che specialmente negli ultimi mesi hanno sopportato le mie continue paranoie sulla tesi, sull'ultimo esame di inglese, sul giorno della discussione ecc. Ringrazio i miei genitori e mia nonna che durante l'università mi hanno sostenuta sempre in tutto e infine, perché più importante, ringrazio mia sorella Irene che più di tutti ho assillato per i più disparati motivi in questi anni. Lei è stata fondamentale per l'aiuto che mi ha dato quando mi sono trovata a dover studiare cose di cui non avevo le minime basi, non si è mai arresa nello spiegarmi la stessa cosa cento volte quando non la capivo e mi ha sempre incoraggiata quando ne avevo bisogno. Se non fosse stato per lei io non sarei qui adesso, così. Mi ci sarebbero voluti mesi in più e un risultato peggiore di quello che sono riuscita ad ottenere anche grazie a lei. Ed ora, forse per la prima vera volta nella mia vita, dico grazie a me stessa, per avercela fatta, per essere riuscita a farmi sentire fiera di me e per aver imparato, appunto, a darmi quella pacca sulla spalla che ora so di meritarmi.