



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE**

Coordinatore Prof.ssa R. Laurà

*Curriculum: Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

**XXXIV° CICLO**

---

**Caratterizzazione del microbiota intestinale nell'Asino  
Ragusano.**

Tesi di:

**Dott.ssa Grazia GALEANO**

Docente Tutor: **Prof. A. ZUMBO**

---

**ANNO ACCADEMICO 2021-2022**

# Indice

<b>1. Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1 L'Asino Ragusano .....	1
1.2 L'asino Ragusano, Oggi .....	6
1.3 Aspetti morfologici e biometrici .....	10
<b>2. Il Microbiota Animale</b>	<b>13</b>
2.1 Il Microbiota intestinale nell'Asino .....	25
<b>3. Scopo della Tesi</b>	<b>33</b>
<b>4. Materiali e Metodi</b>	<b>35</b>
4.1 Preparazione dei campioni e sequenziamento parallelo massivo del DNA .....	38
4.2 Analisi bioinformatiche dei dati NGS.....	39
4.3 Pulizia delle sequenze (reads).....	40
4.4 Rimozione sequenze chimera, identificazione delle ASVs, e classificazione tassonomica .....	40
4.5 Predizione funzionale.....	42
<b>5. Risultati</b>	<b>43</b>
5.1 Metriche pre e post pulizia.....	43
5.2 Identificazione ASVs e classificazione tassonomica.....	44
5.2.1 Microbiota batterico .....	45
5.2.2 Microbiota eucariotico (fungino).....	53

5.3 Predizione funzionale del microbiota dell'asino ragusano .....	58
--	----

<b>6. Discussioni e Conclusioni</b>	<b>61</b>
-------------------------------------	-----------

<b>7. Bibliografia</b>	<b>71</b>
------------------------	-----------

<b>8. Ulteriori letture</b>	<b>95</b>
-----------------------------	-----------

<b>9. Ringraziamenti</b>	<b>96</b>
--------------------------	-----------

## 1. Introduzione

### 1.1 Asino Ragusano

L'asino ragusano (Fig. 1) è una delle razze autoctone più apprezzate in Sicilia. Originariamente, questa popolazione asinina era prevalente nei territori dei Comuni di Ragusa, Modica, Scicli e S. Croce Camerina, ma oggi, il rinnovato interesse per questo animale, ha fatto sì che il suo allevamento si sia esteso, a livello nazionale, anche in altre aree geografiche. Viene descritto come un animale rustico, caratterizzato da un temperamento nevriale ed energico, ma essenzialmente docile e per questo considerato anche un ottimo animale da compagnia.



**Figura 1.** (A) Esempolari di Asino Ragusano; (B) capi in paddock esterno.

La modalità di allevamento è simile a quella del cavallo, con la differenza che l'asino è molto più sobrio e quindi meno esigente (Baroncini, 1987). È infatti

in grado di resistere alla mancanza di acqua di abbeverata, di sopportare climi caldi, di affrontare lunghi periodi di digiuno e di accontentarsi di foraggiate di bassa qualità (Burden e Thiemann, 2015), inoltre, in condizioni climatiche favorevoli, può essere allevato allo stato semibrado, ovvero all'interno di ampie aree recintate e pascolabili, provviste di ricoveri notturni; la possibilità di foraggiare al pascolo, favorisce anche una maggiore eterogeneità nell'alimentazione perché gli consente di massimizzare la qualità del mangime piuttosto che la quantità (Mueller et al., 1998). Diversamente, se il pascolo non è disponibile, gli asini devono essere stabulati in ricoveri idonei con annesso spazio esterno recintato (paddock) (Fig. 1). Il paddock deve essere attrezzato di abbeveratoi, preferibilmente del tipo automatico a tazza, e mangiatoie per garantire il rifornimento quotidiano di acqua fresca e foraggio (<https://www.rivistadiagraria.org/articoli/anno-2012/gestione-e-allevamento-dell'asino/>).

Similmente agli altri asini, è un animale dalla spiccata socialità e con la naturale propensione a formare “legami di coppia” a lungo termine, inoltre, nel caso in cui l'asino debba essere stabulato, è preferibile formare dei gruppi nella stessa area contenitiva. Quest' ultimo aspetto è di fondamentale importanza per il welfare dell'asino, infatti, avendo uno spirito gregario, la separazione dai suoi compagni, lo sottoporrebbe ad un forte stress con conseguente stato di angoscia, sofferenza ("pining"),

alterazioni dell'umore e di inappetenza con possibilità di sviluppo di iperlipemia da stress (Leigh et al., 2013).

Dal punto di vista storico, l'asino ragusano è il più giovane tra i tipi genetici selezionati e discende dalle due razze più antiche presenti in Sicilia, l'Asino Pantesco e l'Asino Ferrante (o Grigio Siciliano). Queste due razze accoppiate tra loro e con un'altra rinomata razza italiana, l'Asino di Martina Franca, con qualche insanguamento dell'Asino Catalano, diedero origine a soggetti che possedevano delle buone caratteristiche di conformazione e sviluppo. A seguito di questi incroci, nelle località del ragusano cominciarono a diffondersi delle popolazioni asinine, riconducibili all'asino di Pantelleria e al Siciliano, dotate di robustezza e impiegate per il trasporto da sella e dei carichi da basto. Tenendo conto delle buone potenzialità che questi soggetti presentavano, il Regio Deposito Cavalli Stalloni di Catania volle ambire alla selezione di un asino con delle caratteristiche-tipo che tutt'oggi si possono riscontrare nell'asino Ragusano. Sebbene, già nel 1930 il capostipite "Pacifico", di razza Pantescia, inizia a lavorare nelle stazioni di monta selezionate sul territorio ragusano, tuttavia, soltanto nel 1942, il Regio Deposito Cavalli Stalloni di Catania avvia dei programmi di selezione per fissarne le caratteristiche morfologiche e di temperamento.

Per circa un decennio furono effettuati accoppiamenti in stretta consanguineità, con qualche insanguamento con l'asino di Martina Franca, al

fine d'imprimere i caratteri in maniera celere. Lo scopo di questo miglioramento genetico, infatti, era quello di ottenere un asino robusto, dal temperamento energico che fosse idoneo per il lavoro nei campi e per la produzione mulina. I capostipiti, Pacifico, Gagliardo e Folgore lavorarono nelle stazioni di monta selezionata di Ragusa, Scicli, S. Croce di Camerina (solo Folgore) e Scordia (solo Gagliardo). Il primo dal 1930 fino al 1952 per un totale di 1222 fattrici asinine coperte, il secondo dal 1937 fino al 1944 per un totale di 726 fattrici asinine coperte, il terzo dal 1935 al 1944, anche se dal 1952 fu impiegato solo per la produzione mulina selezionata. Tutti e tre ed alcuni loro figli, nel 1942, vennero utilizzati per coprire fattrici selezionate (asinine e cavalline) in tutta la Sicilia. Nel 1947, per diminuire la consanguineità e alzare la taglia, fu introdotta "Eva fattrice Martina Franca" e alla monta selezionata, Tabaccaio da Inpo (Pacifico), che ha successivamente lavorato fino al 1962 per un totale di 201 fattrici coperte. Grazie al lavoro dell'Istituto di Incremento Ippico di Catania che riuscì a stabilirne le caratteristiche-tipo, nel 1953 arrivò il riconoscimento ufficiale della razza Ragusana, nome attribuito dalla zona di maggiore produzione.

## **1.2 L'Asino Ragusano, oggi.**

In Sicilia, analogamente al resto dell'Italia e dell'Europa, l'andamento demografico della popolazione asinina autoctona, nel corso dei decenni, è

variato in funzione dello sviluppo sociale ed economico. Fin dall'antichità, gli asini hanno svolto un ruolo di primaria importanza, trovando pieno impiego sia nell'economia rurale che come mezzo di trasporto. Purtroppo, gli anni '50 hanno segnato una fase di declino in cui si è assistito ad una marcata contrazione nel numero di capi, infatti, l'introduzione dei mezzi meccanici nel settore agricolo e dei trasporti, nonché l'industrializzazione delle attività produttive, hanno determinato la completa sostituzione dell'asino con le macchine. La conseguenza di questa aumentata industrializzazione fu un forte calo demografico che portò, nell'arco di quarant'anni, alla quasi scomparsa di alcune razze autoctone, tra cui quella ragusana. Tuttavia, la forte vocazione zootecnica della provincia di Ragusa, nonché il lavoro di tutela dell'Istituto Incremento Ippico per la Sicilia, hanno permesso di conservare il patrimonio genetico di questa razza che oggi ha trovato una nuova collocazione economica. Infatti, sebbene l'asino ragusano rientri, insieme ad altre razze asinine italiane, nella "Risk Status Classification" della FAO (<https://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/en/>), negli ultimi anni, fortunatamente, si è osservato un trend positivo con un forte incremento del numero capi allevati. Attualmente, i dati di monitoraggio pubblicati in un recente report dell'Associazione Italiana Allevatori (A.I.A.) (2020), riportano un numero di 4.118 esemplari di razza ragusana ([Statistiche Report sistemaallevatore.it](http://Statistiche_Report_sistemaallevatore.it)). Tale stima rappresenta un grande risultato se si



considera che negli anni novanta del secolo scorso, questa razza contava poche decine di esemplari e rischiava seriamente l'estinzione.

La ragione dell'aumentata consistenza numerica è da imputare, principalmente, al fatto che molte le aziende agricole hanno ripreso ad allevare e valorizzare l'impiego di questa razza in nuovi settori di interesse sociale ed economico. Infatti, oggi, l'asino ragusano trova opportunità di impiego sia in fattorie didattiche ed attività ricreative come le escursioni e il trekking (onoturismo) (Malacarne et al., 2019) che in progetti con obiettivi terapeutici (onoterapia)

([https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_opuscoliPoster\\_276\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_opuscoliPoster_276_allegato.pdf)). A tal riguardo, quella degli interventi assistiti da animali (Animal Assisted Interventions AAI) è una pratica globalmente riconosciuta che merita un posto di spicco tra le più collaudate tecniche di psicoterapia e riabilitazione psicomotoria (Galardi et al., 2020). In Italia, come ha rivelato l'indagine statistica di De Santis e collaboratori, il supporto fornito dagli asini è importante tanto da essere la terza specie più utilizzata nell'AAI (De Santis et al., 2018). Infatti, grazie al loro carattere paziente ed empatico, gli asini costituiscono un valido ausilio in interventi di “pet therapy” per soggetti affetti da diverse tipologie di disagi fisici e psichici (Borioni et al., 2012; Gonzalez-De Cara et al., 2017). Inoltre, l'allevamento dell'asino ragusano è finalizzato alla produzione di latte, un prodotto conosciuto fin dall'antichità per le sue qualità nutrizionali e cosmetiche.

I dati sperimentali disponibili, dimostrano chiaramente che il latte d'asina, per le sue caratteristiche organolettiche e ipoallergeniche sovrapponibili a quelle del latte materno, non solo è un'eccellente alternativa per i bambini neonati intolleranti alle proteine del latte vaccino (Barni et al., 2018; Souroullas et al., 2018), ma anche un valido alimento in grado di soddisfare tutte quelle categorie di consumatori con esigenze nutrizionali completamente diverse dai lattanti (Aroua et al., 2019; Vincenzetti et al., 2021). Tali studi, oltre a confermare il valore nutrizionale del latte d'asina, hanno anche evidenziato i suoi potenziali benefici per la salute umana (Cunsolo et al., 2017; Li et al., 2019). Difatti, sembra che il latte d'asina, abbia proprietà antivirali, antinfiammatorie, antimicrobiche, migliori i meccanismi di difesa antiossidante, riduca l'iperglicemia, e nei modelli murini aumenti la diversità del microbiota intestinale (Martini et al., 2021). Le peculiarità salutistiche di questo latte, hanno fatto sì che venga considerato come un alimento con proprietà utili alla salute (o meglio un alimento che si suppone abbia proprietà positive sulla salute) “pharmafood” e pertanto lo hanno reso un prodotto commercialmente interessante, e ciò si è quindi tradotto in un'aumentata richiesta sul mercato da parte di varie categorie di consumatori.

La razza ragusana è stata, quindi, oggetto di crescente interesse per la sua buona attitudine alla produzione di latte. Infatti, in termini di rendimento, è interessante lo studio italiano che Malacarne e collaboratori (2019) hanno

condotto sulle razze asinine italiane. Tale confronto ha evidenziato che la razza ragusana ha una lunga lattazione, e, rispetto ad altre razze come l'Amiata e Martina Franca, risulta essere più produttiva nella fornitura giornaliera di latte (Malacarne et al., 2019).

In considerazione di ciò, appare piuttosto chiaro quanto sia importante il contributo della razza ragusana nei diversi settori sociali e commerciali. Pertanto, sensibilizzare gli allevatori ad investire su l'Asino Ragusano, avrebbe numerosi vantaggi non solo in termini economici ma avrebbe, anche, un impatto positivo sulla salvaguardia della biodiversità, con la tutela di una razza che è a rischio di estinzione.

### **1.3 Aspetti morfologici e biometrici.**

Allo scopo di salvaguardare la biodiversità animale e parallelamente tutelare le razze o popolazioni autoctone italiane, nel 1991, il Ministero dell'Agricoltura ha istituito presso l'Associazione Italiana Allevatori (A.I.A.) il "Registro Anagrafico delle razze equine ed asinine a limitata diffusione". Grazie alla regolamentazione delle norme tecniche e degli standard di razza, anche le razze asinine siciliane per la loro specificità geografica e per le loro peculiarità morfologiche sono state inserite nel "Registro Anagrafico delle razze equine ed asinine autoctone".

Il disciplinare prevede che l'ammissione di un soggetto a tale registro deve avvenire previa valutazione d' idoneità agli standard di razza da parte di un esperto dell'A.I.A. Gli "standard di razza" descrivono il fenotipo del soggetto, con riferimento al colore del mantello, alla conformazione e ai principali parametri biometrici ovvero altezza al garrese, circonferenza del torace e circonferenza dello stinco.

Riguardo alla razza ragusana, di seguito vengono annoverate le caratteristiche che definiscono l'attuale Standard di Razza, riconosciute ed ammesse al disciplinare del "Registro Anagrafico delle razze asinine autoctone italiane" (D.M. 9742 del 7 Maggio 2012 di cui all'art. 2 lett. b) ([www.cavallisicilia.it](http://www.cavallisicilia.it)).

#### **Caratteri morfologici:**

- *Mantello:* baio scuro, con ventre di biscia o di cervo, esteso anteriormente e posteriormente alle facce interne degli arti fino ai due terzi dell'avambraccio e della coscia, focatura agli occhi, muso grigio a peli rasati, ben delimitato fin sopra le narici con sfumature focate (tollerata la sfocatura), criniera e coda nere.
- *Testa:* non pesante, con bella espressione, a profilo quasi rettilineo, con fronte larga e piatta, orecchie ben portate e di giusta lunghezza, occhi grandi a fior di testa.
- *Collo:* ben attaccato alla testa ed alle spalle, muscoloso.
- *Spalla:* lievemente diritta e ben attaccata.

- *Garrese*: poco rilevato.
- *Linea: dorso-lombare*: diritta.
- *Lombi*: larghi e bene attaccati.
- *Groppa*: larga.
- *Petto*: largo.
- *Torace*: ben attaccato.
- *Arti*: avambraccio muscoloso, stinco e pastoja di media lunghezza, garretti larghi.
- *Articolazioni*: ampie, robuste.
- *Andature*: normali.
- *Appiombi*: regolari.
- *Piede*: ben conformato con unghia dura e nera.
- *Temperamento*: nevrile ed energico.

<b>Dati Biometrici (in cm)</b>	<b>Maschi</b>	<b>Femmine</b>
Altezza garrese	138	130
Circonferenza torace	150	142
Circonferenza stinco	18	17

## **2. Il Microbiota animale**

Il microbiota intestinale è l'insieme delle diverse comunità microbiche (Batteri, Archaea, Funghi, Alghe e Protisti) che, nel corso di migliaia di anni, si sono adattati a colonizzare il tratto gastrointestinale di molti, ma non di tutti, gli animali (Hammer et al., 2019).

Il termine “microbiota” si riferisce pertanto all'insieme dei microrganismi viventi che risiedono in un dato ambiente o ospite (Marchesi e Ravel, 2015; Berg et al., 2020). Da non confondere col termine di “microbioma” il quale indica, invece, una caratteristica comunità microbica, inclusi i suoi geni e genomi, che risiede in uno specifico habitat con definite caratteristiche chimico-fisiche (Marchesi e Ravel, 2015). Il termine microbioma, quindi, non considera solo i microbi, ma abbraccia anche il loro “teatro di attività” (Berg et al., 2020) poiché si basa sulla definizione di “bioma” (dal greco βίωω «vivere»), la quale prende in considerazione l'insieme di tutti i fattori biotici (materia vivente) e abiotici (che non hanno vita; materia inanimata) di un dato ecosistema (Berg et al., 2020). Tuttavia, l'inclusione di virus, batteriofagi, plasmidi ed altri elementi genetici, nel concetto di microbioma, è uno dei punti più controversi della sua definizione e, ad oggi, non esiste un ampio

consenso sul fatto che il DNA extracellulare, derivato da cellule morte, appartenga o meno al microbioma (Berg et al., 2020). Inoltre, poiché il microbiota è solitamente definito come l'intera comunità di microrganismi “*viventi*” presenti in uno specifico ambiente (Marchesi e Ravel, 2015), i virus, batteriofagi, plasmidi, prioni, viroidi e altri elementi di DNA libero, essendo considerati non viventi (Dupré e O'Malley, 2009), non appartengono al microbiota. Pertanto, in accordo alla recente rivisitazione del termine “microbioma”, tutti gli elementi genetici dei microrganismi, incluso il DNA extracellulare, dovrebbero essere integrati nella definizione del microbioma, anche se non fanno parte del microbiota (Berg et al., 2020).

L'intestino degli animali, rappresenta il distretto corporeo con la maggiore biodiversità microbica e, in questo sito, si stima che la densità microbica raggiunga trilioni di cellule microbiche, rendendolo l'habitat corporeo più popolato (Rodrigues et al., 2016; Milani et al., 2017). Del resto, anatomicamente e funzionalmente, il tratto gastro-intestinale è diviso in sezioni con delle caratteristiche chimico-fisiche peculiari che modellano, in modo specifico, l'abbondanza e la diversità microbica in situ (Martinez-Guryn et al., 2019). Inoltre, questo complesso ecosistema di microrganismi è caratterizzato da milioni di geni microbici e codifica potenzialmente per migliaia di metaboliti, i quali apportano dei contributi vitali per l'ospite (Barko et al., 2018; Valdes et al., 2018.). Ad oggi, oltre 170 milioni di geni

batterici sono presenti all'interno dei "datasets" generati dai recenti studi metagenomici sul microbioma intestinale umano (Almeida et al., 2021), come se potessimo disporre di un numero enorme di genomi aggiuntivi (~204.938 genomi unici e non ridondanti da 4.644 specie procariotiche di cui 4,616 batteriche e 28 archaea) (Almeida et al., 2021), che ci permettono di considerare il microbiota intestinale come un vero e proprio "organo" aggiuntivo in grado di fornire un vasto "*répertoire*" di funzioni biochimiche essenziali. Infatti, recentemente, è stato dimostrato che il "microbioma" residente nell'intestino umano, specifica per oltre 625 milioni di proteine che sono state suddivise, in base a diversi livelli di identità amminoacidica (50, 90, 95 e 100%), in 5-171 milioni di "clusters", definendo così un nuovo database chiamato "Unified Human Gastrointestinal Protein" (UHGP), che insieme all' "Unified Human Gastrointestinal Genome (UHGG), rappresenta la risorsa scientifica più completa sul microbioma intestinale umano stabilita finora (Almeida et al., 2021).

Recentemente, la crescente attenzione per il ruolo svolto dal microbiota intestinale in diverse specie animali, ha assunto risvolti sempre più interessanti, direzionandosi verso la comprensione delle interazioni che si stabiliscono tra ospite e microrganismi (Bahrndorff et al., 2016). Infatti, a livello scientifico, sono numerose le prove sperimentali che hanno dimostrato il coinvolgimento del microbiota nella digestione e assorbimento degli



alimenti, nel metabolismo degli acidi grassi a catena corta (Ragonnaud et al., 2021) e nella produzione di vitamine (LeBlanc et al., 2013).

Oltre ad influenzare il metabolismo dei nutrienti, il microbiota ha un forte impatto su molti altri aspetti della fisiologia dell'ospite: supporta il mantenimento dell'integrità intestinale, contribuisce alla regolazione delle risposte immunitarie dell'ospite (Honda e Littman, 2016), contrasta la colonizzazione di specie patogene (Bäumler e Sperandio, 2016) ed è coinvolto nella comunicazione bidirezionale tra l'intestino e cervello (Clarke et al., 2013). Di conseguenza, viene considerato come un vero e proprio "organo" virtuale che gioca un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi dell'ospite (Bäckhed et al., 2005; Evans et al., 2013).

Nell'ultimo decennio, abbiamo assistito ad una vera e propria esplosione di studi scientifici sul microbioma umano che ha portato a una migliore comprensione della sua struttura, funzione e del suo ruolo in una miriade di diverse patologie quali ad esempio malattie infiammatorie intestinali, obesità, asma, artrite reumatoide e diabete (Bährndorff et al., 2016). Molto meno, però, è stato fatto su altre specie animali, anche se gli studi sul microbiota e l'immunità, e/o sulle malattie infettive, negli animali domestici potrebbero avvantaggiare anche gli esseri umani. Ciò è dovuto al fatto che la maggior parte degli studi sul microbiota intestinale degli animali sono, in genere, "guidati" da problemi economici (animali domestici) o di salute umana

(animali modello) (Pascoe et al., 2017). Ad oggi, infatti, soprattutto animali da fattoria, quali ad esempio i bovini (O'Hara et al., 2020), suini (Knecht et al., 2020; Giuffrè et al., 2021) o ovini (Mamun et al., 2020), sono stati ampiamente analizzati per la loro importanza in agricoltura (Zoelzer et al., 2021). Anche il microbiota di alcuni animali selvatici, quali specie ad alto rischio di estinzione come i rinoceronti neri (Gibson et al., 2019), i koala (Brice et al., 2019) e i diavoli della Tasmania (Cheng et al., 2015), o di animali utilizzati come modello nei sistemi sperimentali, quali topo (*Mus musculus*), zebrafish (*Danio rerio*), insetti (*Drosophila melanogaster*) e il calamaro “bobtail” hawaiano (*Euprymna scolopes*) (Kostic et al., 2013), è stato descritto in maniera più dettagliata rispetto ad altre specie animali (Zoelzer et al., 2021). Una recente revisione delle ricerche inerenti gli studi del microbiota in diverse specie animali (non-uomo) ha rivelato che su un totale 650 pubblicazioni scientifiche esaminate, la maggior parte riguardavano studi su animali domestici (48,2%), seguiti da animali modello (37,5%), mentre gli studi sugli animali selvatici erano relativamente pochi (14,3%).

La perturbazione del microbiota intestinale, ovvero l'alterazione sperimentale della componente microbica (disbiosi), in seguito ad interventi esterni quali somministrazione di probiotici, antibiotici etc, è fondamentale per capire come funziona questo complesso sistema di microrganismi, ed è stato scoperto che tale approccio è stato quello più utilizzato negli studi scientifici

sugli animali modello o domestici, se paragonato ai dati ottenuti da studi descrittivi osservazionali. Al contrario, nelle ricerche sugli animali selvatici erano favoriti gli studi osservazionali. Comunque, tutti gli studi condotti finora, si sono concentrati sull'analisi delle comunità batteriche del microbiota e, di questi, il 12,5% degli studi ha anche caratterizzato almeno un'altra comunità microbica: archaea (8,8%), funghi (4,3%), protozoi (2,8%) e virus (0,6%). Poco meno della metà (45,7%) degli studi che hanno esaminato il microbiota non batterico ha utilizzato un approccio descrittivo osservazionale; inoltre, circa la metà di tali studi ha preso in considerazione animali domestici (53,1%), seguiti da quelli selvatici (32,1%) e quelli utilizzati in campo biomedico come modello sperimentale (14,8%) (Pascoe et al., 2017). È interessante sottolineare che in quest'ultimi animali le perturbazioni, sperimentalmente indotte e controllate, sono state utilizzate per investigare le potenziali interazioni tra il microbiota intestinale e la salute dell'ospite. Ad esempio, topi mutanti (Casp-knockout), mancanti dell'enzima caspasi (aspartato cistein-proteasi che hanno un ruolo essenziale nell'apoptosi, nell' infiammazione e nel mantenimento dell'omeostasi intestinale), sono stati impiegati per comprendere il ruolo del microbiota nello stimolare la risposta immunitaria (Brinkman et al., 2011) oppure, l'impiego di terapie antibiotiche nei topi (Carvalho et al., 2012), sono state utilizzate per studiare il ruolo della modulazione del microbiota intestinale nell'insulino-resistenza. Inoltre, anche

se più raramente, è stato anche investigato il ruolo dell'interazione tra microbiota murino e integrità epiteliale nel rigetto cronico del trapianto intestinale (Li et al., 2011). Comunque, tutte queste ricerche sono state eseguite con l'obiettivo principale di porre le basi per una possibile traslazione delle scoperte negli esseri umani (Pascoe et al., 2017), mentre i pochi studi sulla modulazione del microbiota sugli animali selvatici, sono stati condotti per comprendere meglio le sue funzioni generali e i meccanismi di simbiosi con l'ospite; ad esempio esaminando l'effetto dei trattamenti dietetici sul microbiota delle giraffe catturate in natura (*Giraffa camelopardalis*) (Roggenbuck et al., 2014). Invece, gli studi osservazionali sugli animali selvatici sono stati principalmente eseguiti per comprendere la struttura e la funzione del loro microbiota "naturale".

Gli studi sperimentali sui roditori sono stati fondamentali per far progredire la nostra conoscenza sulla funzione del microbiota. Ad esempio, esperimenti nei ratti hanno dimostrato che il microbiota può essere utilizzato come biomarcatore per prevedere il rigetto del trapianto di fegato (Ren et al., 2013). Tuttavia, l'estrapolazione dei dati da animali da laboratorio ad altre specie, incluso l'uomo, ha dei limiti, poiché, le somiglianze nel microbiota tra roditori e umani sono estremamente ridotte oltre il livello di phyla (Nguyen et al., 2015). Inoltre, gli animali da laboratorio hanno un background genetico altamente consanguineo (Hufeldt et al., 2010) e sono esposti a condizioni

molto diverse da quelle vissute dall'uomo e dagli animali selvatici, ma che influenzano enormemente la composizione del microbiota, come ad esempio l'allevamento in cattività e fattori estrinseci costanti come dieta, condizioni abitative e altri stili di vita (Pascoe et al., 2017). In effetti, si ritiene che la notevole diversità tra animali da laboratorio e umani sia un importante fattore che potrebbe spiegare perchè le sperimentazioni sui farmaci hanno solitamente successo negli animali da laboratorio ma falliscono nelle successive sperimentazioni sull'uomo (Garner, 2014), e questa stessa mancanza di successo è probabile che si verifichi anche nella ricerca sul microbiota.

Finora, la maggior parte degli studi sul microbiota si è incentrata esclusivamente sulla caratterizzazione della componente batterica, e nonostante l'eterogeneità, le specie batteriche più abbondanti nell'apparato gastro-intestinale dell'uomo e di altri animali appartengono a due principali phyla: *Firmicutes* e *Bacteroides* (Bergmann et al., 2015; O' Donnell et al., 2017; Rinninella et al., 2019; Cholewińska et al., 2020).

Sebbene oltre il 10% degli studi finora pubblicati abbia esaminato la comunità microbica di specie non batteriche, di questi solo il 4,3% ha interessato i funghi e solo lo 0,6% ha studiato il viroma (Pascoe et al., 2017), nonostante le recenti prove scientifiche che i virus conferiscono una serie di tratti funzionali ai batteri (Ogilvie e Jones, 2015) e che i funghi forniscono un contributo

importantissimo alla salute dell'ospite (Lavrinienko et al., 2021). È probabile, quindi, che futuri studi complementari, che indaghino simultaneamente su più componenti del bioma intestinale, facciano luce sulla reale composizione e la funzionalità del microbiota. Pertanto, indagini altrettanto dettagliate andrebbero fatte anche per virus, archaea, e funghi. Quest'ultimi, benché siano presenti nell'intestino di diversi mammiferi tra cui uomo, topo, maiale e molti erbivori ruminanti e non ruminanti, sono stati poco caratterizzati rispetto ai batteri. Quindi, proprio per l'insufficienza di dati presenti in letteratura, risulta difficile ottenere delle stime dettagliate sulle comunità fungine intestinali (Nash et al., 2017). Molto probabilmente, la causa principale di ciò risiede nella loro bassa prevalenza a livello intestinale, e nelle difficoltà tecniche legate sia alla scelta della strategia di isolamento e/o di sequenziamento che alla mancanza di database di riferimento completamente annotati (Halwachs et al., 2017). Nonostante la bassa rappresentazione, circa lo 0,1% del "microbiota fecale", il microbiota è sicuramente una componente attiva nella fisiologia dell'ospite (Lavrinienko et al., 2021; Santus et al., 2021) e a tal proposito, molto interessante è lo studio effettuato da Jiang e collaboratori (2017) sui meccanismi di interazione tra il microbiota e la componente batterica e come i funghi intervengano nella modulazione delle risposte immunitarie dell'ospite (Jiang et al., 2017; Lai et al., 2019). Per tal motivo, molti ricercatori hanno focalizzato l'attenzione sul

microbiota al fine di chiarirne la capacità funzionale e delineare, così, un quadro più completo dei diversi ruoli dell'ecosistema microbico intestinale.

Qualunque sia l'abbondanza dei phyla microbici, la composizione strutturale del microbiota varia significativamente da individuo a individuo ed è correlata a diversi fattori tra cui: l'ambiente (He et al., 2018; Brown et al., 2022), le abitudini alimentari (Ang et al., 2020; De Angelis et al., 2020; Lavrinienko et al., 2021; Zoelzer et al., 2021), la genetica dell'ospite (Goodrich et al., 2014; Bahrndorff et al., 2016; Cholewińska et al., 2020) e l'età (Coman e Vodnar, 2020; Marrs et al., 2021). In effetti, questo ecosistema microbico mostra una certa flessibilità, dinamicità e resilienza (Dogra et al., 2020) in quanto viene acquisito alla nascita (Dominguez-Bello et al., 2010) e nell'adulto può mantenersi stabile per anni, oppure subire dei cambiamenti. Infatti, nel corso della vita, un individuo può essere sottoposto ad alcuni stress che possono alterare criticamente la composizione del suo microbiota fra cui: l'uso di antibiotici o altri farmaci (Wei et al., 2018; Wieërs et al., 2021), drastici cambiamenti nella dieta (Chen et al., 2021) o l'eventuale comparsa di uno stato patologico (Jangi et al., 2016; Sedighi et al., 2017; Vogt et al., 2017).

Quindi, risulta evidente che il corretto funzionamento dell'apparato gastroenterico e, più in generale, l'omeostasi dell'organismo dipendono dal mantenimento dell'equilibrio ottimale del microbiota intestinale; viceversa,

alterazioni di questo equilibrio portano ad una condizione di disbiosi (Morgan et al., 2012).

Nell'ultimo ventennio, a livello mondiale, sono stati finanziati una serie di progetti quali lo "Human Microbiome Project" (HMP), il "Metagenome of Human Intestinal Tract (MetaHIT) Project", l' "Australian Gut Project", l' "American Gut Project", il "British Gut Project", il "Canadian Microbiome Initiative", lo "Human MetaGenome Consortium Japan", il progetto "My NewGut" dell'Unione Europea e l' "International Human Microbiome Consortia", con lo scopo di investigare e comprendere la composizione e la funzione del microbiota intestinale umano. Gli innumerevoli studi trasversali sulle interazioni multilivello tra i vari microrganismi e tra i microrganismi e l'ospite stanno fornendo sempre più dati dettagliati sulla capacità funzionale del microbiota permettendo, così, di espandere i campi di ricerca sia in medicina umana che veterinaria (Guinane et al., 2013; Lloyd-Price et al., 2017). Tuttavia, ad oggi, il numero di ricerche incentrate sullo studio del ruolo del microbiota sulla salute animale è ancora molto ristretto (Pascoe et al., 2017) e quasi interamente limitato all'uomo (Bahrndorff et al., 2016). Ciononostante, in anni più recenti, c'è stata una enorme esplosione di ricerche che hanno trovato microbi su e in una vasta gamma di animali, avvalorando l'idea che tutti gli organismi macroscopici sono ospiti di simbionti microbici. Inoltre, in un certo numero di ospiti animali, i microrganismi simbionti hanno



dimostrato di svolgere ruoli critici, e spesso sorprendenti, nello sviluppo, nella fisiologia, nel comportamento e nella difesa da parte di agenti patogeni (Hammer et al., 2019). L'apparente ubiquità dei microbiomi, combinata con l'evidenza che i microbi simbiotici mediano determinati tratti in alcuni animali, dà l'impressione che il microbiota abbia influenze di vasta portata sulla biologia di tutti gli animali esistenti in natura (Hammer et al., 2019). Ma il paradigma che tutti gli animali dipendono da simbiotici microbici non sembra sia supportato da prove certe, poiché alcuni studi dimostrano che, in certi ospiti animali, i microbiomi potrebbero non esserci (Hammer et al., 2019). Infatti, esistono già prove scientifiche che uno stile di vita privo di microbiota non solo esiste, ma è ampiamente distribuito lungo l'albero evolutivo della vita animale. Infatti, sulla base di metodi molecolari, coltura-dipendenti e di microscopia, sono stati rilevati pochi o addirittura nessun microbo nell'intestino, o nell'intero corpo di alcuni animali (soprattutto insetti) quali: formiche, api solitarie, bruchi, scarafaggi erbivori, libellule, acari, ragni, gamberetti del fango, ostriche, vermi da vaso, mantidi predatrici, cimici d'acqua, alcuni granchi di terra e mosche detritivore (Hammer et al., 2019). Quindi, per quanto i microbi stessi coprano un continuum nella loro dipendenza dagli ospiti, gli animali variano nel grado in cui fanno affidamento sui microbi, da quelli che non possono sopravvivere senza simbiotici a quelli che sono completamente indipendenti (Hammer et al.,

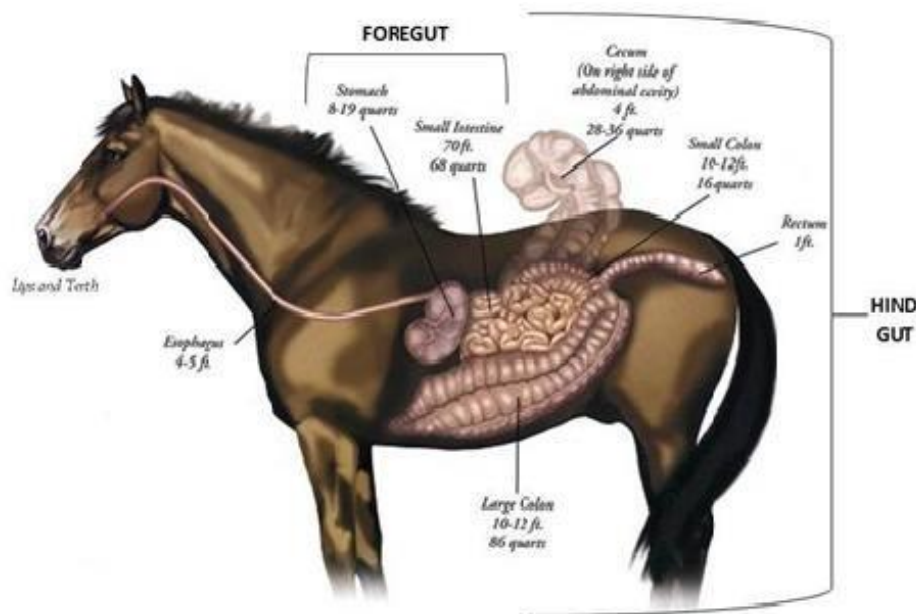
2019). Tale variazione è stata oscurata dal presupposto che la biologia di tutti gli animali sia condizionata dai microbiomi. Pertanto, la consapevolezza che non tutte le linee evolutive animali ospitano microbiomi residenti, e benèfici, mette a fuoco questioni scientifiche fondamentali circa la macroevoluzione dei microbiomi stessi. Ad esempio, quali fattori sono associati all'aumento e alla perdita della dipendenza microbica? Come avvengono le transizioni evolutive negli stati simbiotici? Queste transizioni influenzano la diversificazione animale? Rispondere a queste domande richiederà tempo, e soprattutto un quadro più completo sulla presenza (o meno) e sulla struttura del microbiota delle specie che popolano le specie animali. Le esplorazioni future trarranno vantaggio non solo dall'utilizzo di moderne tecnologie di analisi metagenomiche, ma anche dal mantenere una mente aperta ai diversi modi in cui gli animali interagiscono, o meno, con i microbi.

## **2.1 Il Microbiota intestinale nell'Asino**

Premesso che gli studi dedicati agli equini sono limitati e quelli riferibili alle specie asinine ancora meno frequenti, l'importanza del microbiota intestinale, per tutte le specie di mammiferi, è stata, ormai, supportata da numerose prove scientifiche. Questo complesso ecosistema è coinvolto in molteplici interazioni che influenzano lo stato di salute di molti erbivori monogastrici, compreso l'asino. Sebbene le stime indicano che gli asini ed i muli

(rispettivamente 46 milioni e 10 milioni di capi) rappresentano quasi la metà degli equini domestici del mondo (Edwards et al., 2020 b); le conoscenze sul microbiota intestinale equino riguardano, principalmente, cavalli e pony e di rimando vengono traslate su asini e muli. Questa omologazione non può essere accettabile, poiché, a parte le possibili diversità correlate alla specie, il tipo di dieta e il tempo di transito intestinale, che sono fattori chiave per l'attività del microbiota, differiscono tra cavalli, pony e asini. In aggiunta a questi, la differenza tra le specie risulta evidente anche per quanto riguarda la digeribilità della fibra alimentare, con gli asini che hanno una maggiore digeribilità della sostanza secca rispetto a cavalli e pony (Burden et al., 2015; Polidori e Vincenzetti, 2017).

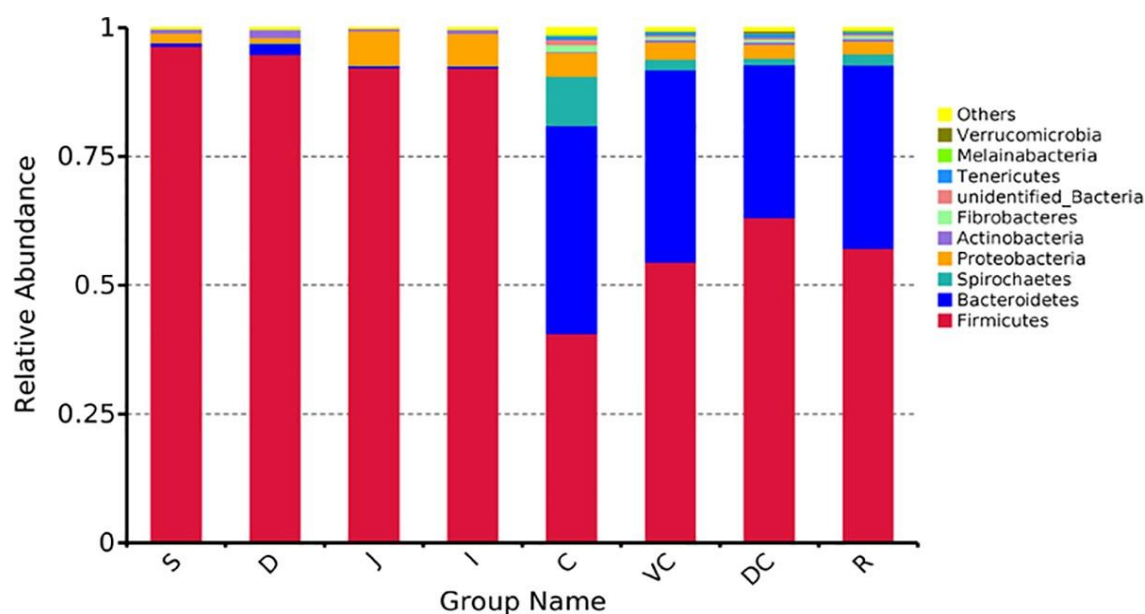
In termini anatomici, il tratto intestinale dell'asino è molto simile a quello del cavallo (Fig. 2); la sezione posteriore dell'intestino (hindgut) è ben sviluppata con una lunghezza di 4,5 metri ed un volume di 110 litri, ovvero circa 15,95 volte il volume dell'intestino anteriore (forgut) (Li et al., 2019).



**Figura 2.** Descrizione anatomica del tratto gastro-intestinale equino.

Questa conformazione dell'hindgut consente all'animale di digerire foraggi più ricchi di fibre poiché il tempo di transito del mangime nell'intestino è molto più lungo, di conseguenza, sarà maggiore, anche, il tempo d'esposizione all'attività degradativa di enzimi e del microbiota (Costa et al., 2015; Jullian e Grimm, 2015). In effetti, rispetto ai cavalli e ai pony, gli asini hanno aumentato la digeribilità delle fibre alimentari e diminuito l'assunzione di mangime, infatti, possiedono un microbiota intestinale specifico che consente loro di metabolizzare in modo ottimale la fibra alimentare, ed il principale sito in cui si svolge l'attività fermentativa è rappresentato dall'hindgut (Kauter et al., 2019), dove si stima che la produzione di acidi grassi volatili, ad opera di microrganismi anaerobici, sia pari al 50%-68% del fabbisogno energetico totale (Fliegerova et al., 2016). La composizione e la

struttura delle comunità microbiche, come è intuibile, differiscono in base al distretto anatomico considerato. A tal proposito lo studio sul microbiota intestinale dell'asino domestico di Dezhou, condotto da Liu e collaboratori, sottolinea questa differenza evidenziando una maggiore ridondanza di phyla batterici nell' hindgut rispetto a quella nel foregut; invece, a livello di phylum è stata riscontrata una percentuale prevalente di *Firmicutes* nell'intestino anteriore e un'abbondanza di *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nell'intestino posteriore (Liu et al., 2019) (Fig. 3).



**Figura 3.** Abbondanza a livello di phylum delle comunità batteriche presenti in diversi siti del tratto intestinale di cinque asini Da Liu et al., 2019.

In linea a quanto detto è, anche, lo studio proposto da Edwards e collaboratori, in cui sono state valutate le differenze tra il microbiota fecale di pony, asini e muli, sottoposti alla stessa dieta da foraggera. Il set di dati proposto, ha evidenziato una significativa differenza nella composizione delle

comunità batteriche e fungine tra i diversi tipi equini presi in esame, confermando la grande capacità dell'asino nel digerire la fibra. Questa evidenza è supportata dall'abbondanza riscontrata di due generi batterici in particolare, *Lachnoclostridium* 10, e un genere non coltivabile denominato "probable genus 10" della famiglia *delle Lachnospiraceae*.

Si tratta di batteri del ruminale dei bovini che hanno la capacità di degradare i polimeri presenti nella fibra vegetale, pertanto, la loro abbondanza, significativamente più alta nell'asino rispetto sia ai pony che ai muli, convalida quanto detto precedentemente sulla capacità dell'asino di degradare più efficacemente le fibre a livello dell'intestino posteriore. Inoltre, nello studio è stata indagata la composizione della comunità fungina, la quale è diversa tra i tipi equini con una maggiore diversità di funghi anaerobici nell'asino (Edwards et al., 2020 a). Da questo punto di vista tutti gli studi sopra citati sono congruenti, tuttavia, il numero esiguo di lavori presenti in letteratura dimostra quanto sia necessario, in futuro, arricchire le conoscenze su questi aspetti, poiché un miglioramento nell'utilizzo delle fibre alimentari, ridurrebbe la necessità di impiegare mangimi ad alto contenuto energetico, che sono stati, spesso, collegati a disbiosi del microbiota dell'intestino posteriore (Julliand e Grimm, 2015).

Analogamente ad altri mammiferi, anche, la composizione del microbiota intestinale asinino è strettamente correlata a diversi fattori come l'ambiente, la

dieta, l'età, l'utilizzo di farmaci. Tuttavia, il numero di studi a riguardo si riduce a pochissimi casi studio. A tal proposito, è molto interessante lo studio di Gao e collaboratori che hanno indagato sul microbiota dell'asino tibetano in cattività e su quello allo stato selvatico. Questo studio ha mostrato come l'ambiente ed il tipo di dieta, siano dei fattori determinanti che influiscono sulla composizione di questo ecosistema microbico intestinale. Infatti dalle analisi bioinformatiche, è stato osservato che la diversità microbica è significativamente più alta nella popolazione di asini selvatici tibetani, con una netta prevalenza del phylum *Bacteroidetes*, rispetto a quella degli individui in cattività, in cui si osserva, invece, una dominanza del phylum *Firmicutes e Actinobacteria*. Chiaramente, questa diversa composizione microbica riflette il tipo di alimentazione a cui l'animale è sottoposto, infatti, la somministrazione agli animali di mangimi standard, riduce la diversità microbica intestinale degli asini, aumentando il rischio di malattie a cui l'animale può andare incontro nel corso della vita. Viceversa, la possibilità di foraggiare su un pascolo eterogeneo promuove la selezione di comunità batteriche benefiche che contribuiscono al mantenimento di uno stato di salute sano (Gao et al., 2019).

Anche l'età costituisce un altro fattore che è stato indagato al fine di capire come i cambiamenti temporali influenzano lo sviluppo della composizione del microbiota dell'asino. Lo studio pionieristico di alcuni ricercatori ha fornito

un contributo notevole in tal senso; infatti, è stato osservato che il microbiota, nel corso della vita dell'animale, subisce, progressivamente, dei cambiamenti per poi assumere una composizione più stabile nell'intestino adulto. I risultati dello studio hanno indicato che il settimo mese rappresenta il periodo più critico poiché la struttura degli ecosistemi microbici intestinali dell'asino giovane, iniziano a convergere verso quello adulto, infatti, dal settimo mese in poi, la struttura del microbiota intestinale degli asini giovani era simile a quella degli adulti. Questo processo comporta la perdita dei primi microrganismi colonizzanti, come *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Odoribacter*, ottenuti con il latte materno, e l'acquisizione di batteri come *Prevotellaceae*, *Spirochete*, *Streptococcaceae* e *Lactobacillaceae*, tipici del microbiota intestinale dell'adulto e necessari per la digestione delle di fibre (Xing et al., 2020).

Conoscere informazioni di questo tipo, in termini di produzione animale, risulta utile, perché offre la possibilità di scegliere svezzamenti mirati volti a garantire la stabilità del microrganismo intestinale e, parallelamente, ridurre l'incidenza di patologie infettive correlate.

Sebbene lo studio del microbiota abbia aperto nuovi orizzonti nel campo della ricerca umana; tuttavia, le conoscenze relative al microbiota intestinale dell'asino, ad oggi, sono alquanto ridotte. Considerato che gli asini rappresentano quasi la metà degli equini domestici del mondo, un traguardo



ambizioso per la ricerca veterinaria, sarebbe quello di riuscire ad avere più informazioni possibili riguardo le interazioni esistenti tra microbiota e popolazione asinina. Infatti, una maggiore comprensione sia della composizione che del ruolo del microbiota potrebbe essere usata come strumento per valutare lo stato di salute o di malattia dell'animale e permetterebbe il miglioramento della eventuale performance terapeutica (Blaser et al., 2016; Kang et al., 2019).

### **3. Scopo della Tesi**

La Sicilia è una regione di straordinario interesse in termini di biodiversità, e tra le specie autoctone che compongono questo ricco patrimonio isolano, la popolazione asinina ragusana è una presenza di spiccato rilievo. Questa razza è la più giovane tra quelle autoctone siciliane e possiede dei caratteri fenotipici e comportamentali peculiari ed esclusivi. In questa prospettiva, l'interesse scientifico per il microbiota intestinale dell'asino ragusano nasce dalla necessità di fornire delle informazioni dettagliate a riguardo; infatti, una maggiore comprensione delle complesse relazioni tra le comunità microbiche colonizzanti il tratto intestinale e l'ospite può essere sfruttata per migliorare l'allevamento e le performance produttive di questi animali. L'utilizzo delle tecniche di "Next Generation Sequencing" (NGS), per la caratterizzazione del microbiota intestinale, rappresenta uno strumento efficiente in grado di offrire un profilo identificativo riguardo la composizione e l'abbondanza delle principali specie batteriche e fungine colonizzanti questo distretto corporeo. Pertanto, il principale obiettivo di questo studio è stato quello di effettuare una prima caratterizzazione del microbiota intestinale della razza asinina ragusana al fine di ottenere un set di dati nuovi e accurati, spendibili per la valorizzazione, tutela e salvaguardia di questa razza autoctona. Inoltre, come prospettiva futura, analogamente alle attuali tendenze della medicina umana, il nostro studio fornisce delle basi teoriche per ulteriori indagini su lo stato di

salute dell'animale. Infatti, il microbiota può trovare applicabilità come biomarcatore diagnostico e prognostico, quindi conoscendone la composizione si potrebbero sviluppare trattamenti individuali e mirati per alcuni tipi di malattie equine che sono correlate ad un certo tipo di composizione microbica come la malattia dell'erba equina, la laminite e la colite.

#### 4. Materiali e metodi

Il nostro studio è stato condotto su un numero complessivo di 18 esemplari di asini di razza ragusana (Tabella 1) tutte femmine, tutte ufficialmente iscritti al relativo Registro Anagrafico delle razze equine ed asinine.

<b>Tabella 1. Capi di Asino ragusano esaminati in questo studio</b>			
<b>Soggetto</b>	<b>Sesso</b>	<b>Età (anni)</b>	<b>Peso (Kg)</b>
1F	F	14	350
2F	F	15	300
3F	F	15	300
4F	F	14	300
5F	F	14	300
8F	F	17	300
9F	F	16	300
10F	F	15	300
11F	F	18	350
12F	F	16	350
13F	F	15	350
14F	F	17	350
15F	F	16	350
16F	F	18	300
17F	F	17	350
21F	F	14	300
22F	F	18	350
23F	F	15	350

Per uno studio più ampio sui profili funzionali delle comunità microbiche, abbiamo esteso il nostro campionamento ad una coorte asinina clinicamente sana, con un'età compresa tra 16 anni più o meno due, un peso vivo compreso tra 300 - 350 kg. Tutti gli asini provenivano da due aziende, site alle pendici orientali dell'Etna, allevati con condizioni di management simili. Il campionamento è stato effettuato nel periodo di febbraio del 2020 con

condizioni climatiche di temperatura media di 8 °C e con un'umidità relativa ambientale del 62%. La dieta degli asini prevedeva fieno polifita ed avena e nessun soggetto era stato sottoposto a somministrazione di farmaci antinfiammatori o antimicrobici nei sei mesi antecedenti il prelievo.

Per l'indagine sono state utilizzate le feci la cui validità (come espressione del microbiota intestinale) è accertata, inoltre costituiscono una modalità di campionamento etico non invasivo. Tutti i campioni sono stati prelevati nello stesso giorno direttamente dall'ampolla rettale, al fine di evitare contaminazioni con i microrganismi del suolo. Una volta raccolto, ciascun campione di feci è stato trasferito in un contenitore sterile, e conservato a 4° C per il tempo necessario al trasporto in laboratorio, in modo da evitare significative alterazioni alla componente microbica. I campioni fecali, prima della conservazione a lungo termine a -80° C, sono stati sospesi in una soluzione salina con l'aggiunta di glicerolo al 10% come crioprotettore (Costello et al., 2015) e suddivisi in aliquote, al fine di prevenire inutili cicli di congelamento-scongelo al momento dell'estrazione del DNA.

Il DNA genomico è stato estratto dai campioni fecali utilizzando il "PowerLyzer™ PowerSoil® DNA Isolation Kit" (MO BIO laboratories inc.) seguendo le istruzioni del produttore ed apportando qualche leggera modifica quando necessario.

La purezza e la quantità di DNA estratto sono state valutate mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% (w/v) e attraverso lo spettrofotometro Nanophotometer P330 (Implen, Germany). Infine, una prova di specificità dell'estrazione è stata effettuata amplificando in vitro il gene batterico dell'RNA ribosomiale 16S 27F-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG e 1492R-GGTTACCTTGTTACGACTT (Lane et al.,1991) e dell'ITS fungino ITS1-TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS4-TCCTCCGCTTATTGATAT (White et al.,1990).

L'amplificazione in vitro (Polymerase Chain Reaction; PCR) dei marcatori genetici, è stata eseguita utilizzando 25 µl di DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Italia), 1 µl di DNA genomico e 1 µl di ciascun primer per un volume totale di miscela di 50 µl. I parametri di amplificazione consistevano in un riscaldamento iniziale a 95°C per 5 min, seguito da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 55°C per 1 min, estensione a 72°C per 90 sec ed infine un unico step di estensione finale a 72°C per 10 minuti. Dopo la PCR, ogni amplicone è stato visualizzato su gel di agarosio 1,5% (w/v).

## 4.1 Preparazione dei campioni e sequenziamento parallelo massivo del DNA

I campioni che presentavano una concentrazione di DNA di  $\sim 50$  ng/ $\mu$ L e valori di assorbanza:  $A_{260/A280} \geq 1,8$  e  $A_{260/A230} \geq 1,9$ , sono stati sottoposti alla fase preliminare di allestimento delle librerie di sequenziamento NGS (library preparation) utilizzando il protocollo previsto per il servizio di "INVIEW Microbiome Profiling 3.0 2nd PCR, NGSelect Amplicon 2nd PCR", fornito dalla ditta Eurofins Genomics, Ebersberg, Germania (<https://eurofinsgenomics.eu>), a cui i campioni barcodati sono stati inviati per il sequenziamento in paired-end (2 x 300 bp) su piattaforma Illumina MiSeq. In particolare, il primo step del protocollo sperimentale ha previsto l'amplificazione dei marcatori genetici procariotici e fungini con specifici primers NGS ibridi costituiti sia dalle sequenze target dei marcatori V3-V4 (procarioti), o regione ITS (funghi), che dalle sequenze "adattatrici" di seguito riportate.

- Sequenza dell'adattatore Illumina che è stata aggiunta all'estremità 5' del forward primer (16SV3/V4-F oppure ITS-F): 5'-ACACTCTTTCCCTACA CGACGCTCTTCTCCGATCT-3'
- Sequenza dell'adattatore Illumina che è stata aggiunta all'estremità 5' del reverse primer (16SV3/V4-R oppure ITS-R): 5'-GACTGGAGTTCAGAC GTGTGCTCTTCTCCGATCT-3'.

A seconda delle dimensioni dell'amplicone è possibile aspettarsi una sovrapposizione delle reads che è generalmente possibile per ampliconi inferiori a 570 bp (senza adattatore). Per regioni più lunghe, come nel nostro caso, la dimensione dell'amplicone è troppo grande e pertanto la sovrapposizione delle reads solitamente non si verificherà.

Il controllo di qualità è stato eseguito mediante elettroforesi su gel di agarosio utilizzando 5 µl di prodotto PCR. Successivamente gli ampliconi sono stati purificati e 25 µl di ogni campione è stato inviato al fornitore del servizio di sequenziamento Illumina (Eurofins Genomics, Germania).

#### **4.2 Analisi bioinformatiche dei dati NGS**

Dopo il sequenziamento, le sequenze di DNA (reads) sono state sottoposte ad un workflow bioinformatico che si divide in 3 fasi principali:

1. Valutazione della qualità e pulizia delle reads con basso “quality score”
2. Rimozione sequenze chimera, identificazione delle “Amplicon Sequence Variants” (ASVs) e classificazione tassonomica
3. Predizione funzionale

Tutte le analisi statistiche e computazionali, eseguite in questo studio, sono state condotte in accordo alle recenti linee guida pubblicate per gli studi e le ricerche sul microbioma (Qian et al., 2020).



### **4.3 Pulizia delle sequenze (reads)**

Le “raw reads” sequenziate sono state inizialmente ispezionate col software FastQC, al fine di valutare la qualità media delle reads e l’eventuale presenza di sequenze adapters contaminanti. Successivamente, le sequenze adattatrici, le reads e le basi di bassa qualità (phred-score <20) sono state rimosse mediante l’ausilio del software Trimmomatic (V.0.39; Bolger et al., 2014). Soltanto le reads con lunghezza non inferiore a 35 bp sono state mantenute per le successive analisi. Quindi, le reads “pulite” sono state unite mediante il software PEAR (Paired-End reAd mergeR) (Zhang et al., 2014); questo tool, riconoscendo il codice identificativo di ciascuna sequenza, permette di ricongiungere le reads provenienti dal sequenziamento dello stesso frammento qualora presentino una regione di sovrapposizione di sequenza di almeno 10 bp.

### **4.4 Rimozione sequenze chimera, identificazione delle ASVs, e classificazione tassonomica**

Dopo la fase di pulizia, le reads, prive di contaminanti e riunite a formare i frammenti originari, sono state importate all’interno del software qiime2 (v. 2021.8; Bolyen et al., 2019) che ha permesso la classificazione tassonomica di ciascuna sequenza. In particolare, il primo step del protocollo bioinformatico ha previsto il cosiddetto “denoising”, effettuato mediante il programma dada2

implementato in qiime2, che consiste nell'ispezione delle reads da parte del programma per la ricerca e la successiva rimozione di sequenze "ambigue", ovvero sequenze in "single-end" e sequenze chimera. Inoltre, lo stesso programma ha effettuato una riduzione della ridondanza delle sequenze in input e la correzione degli errori. Le features tables (files finali) prodotte da Dada2 al termine dell'analisi sono state ispezionate, per valutare la quantità di reads eliminate, e classificate a livello tassonomico mediante il tool Blast (Boratyn et al., 2013), utilizzando come reference i databases Silva 132 e Unite (release all 10/05/2021) per l'assegnazione rispettiva delle sequenze provenienti dal sequenziamento della regione variabile V3-V4 del 16S rDNA e dell'ITS. All'analisi sono stati applicati diversi filtri, fra cui un p-value di almeno  $1e^{-4}$  e tre diversi valori minimi di identità di sequenza (74%, 85% e 95%), necessari per l'assegnazione delle sequenze a diversi livelli tassonomici quali phylum, famiglie e generi. Al fine di eliminare eventuali sequenze contaminanti, in tutti i campioni, le reads provenienti dal sequenziamento della regione V3-V4 sono state filtrate per abbondanza relativa, ovvero tutti i taxa che presentavano un'abbondanza relativa inferiore allo 0,1% sono state filtrate; invece, per l'ITS la percentuale di abbondanza relativa minima imposta è stata dello 0,01%. Gli indici di alfa diversità (Observed, Chao1, Shannon, Simpson e Fisher) sono stati calcolati impiegando le abbondanze relative di ciascun campione ed il software phyloseq (McMurdie e Holmes,

2013 implementato in R ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)). I plot sono stati generati utilizzando il programma ggplot2 (Wickham, 2016), implementato in R ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)).

#### **4.5 Predizione funzionale**

In questo studio, inoltre, è stata anche effettuata la predizione funzionale del microbiota intestinale dell'asino ragusano. In particolare, le sequenze delle regioni V3-V4 di tutte le ASVs elaborate da Dada2 e la relativa “features table” sono state analizzate col software PICRUSt2 (Douglas et al., 2020). Nello specifico, PICRUSt2 ha inizialmente allineato le sequenze delle ASVs contro un database interno di sequenze del 16S rDNA, e successivamente elaborato un albero filogenetico per assegnare un'identità a ciascuna sequenza in input. Sulla base dell'identità assegnata a ciascuna sequenza e della relativa abbondanza di ciascuna di esse, PICRUSt2 ha ricostruito la mappa funzionale della comunità batterica calcolando le diverse famiglie geniche e i diversi “pathways” metabolici e funzionali riscontrati all'interno del microbiota intestinale dell'asino ragusano.

## **5. Risultati**

### **5.1 Metriche pre e post pulizia**

In questo studio, il sequenziamento parallelo massivo della regione variabile V3-V4 del gene 16S batterico, effettuato su piattaforma Illumina MiSeq, ha prodotto un totale di 7.114.860 raw reads ( $\sim 395.270 \pm 163.170$  per campione). Per la regione eucariotica ITS sono state sequenziate, invece, un totale di 4.988.508 raw reads ( $\sim 277.139 \pm 149.095$  per campione).

A seguito del processo di rimozione di adattatori e reads di bassa qualità (phred-score  $< 20$ ), e all'unione delle reads provenienti dal sequenziamento in paired-end dello stesso filamento, sono state ottenute un totale di 6.032.507 frammenti ( $\sim 167.570 \pm 82.252$  per campione) di cui 3.544.649 frammenti ( $\sim 196.925 \pm 81.032$  per campione) provenienti dalla regione V3-V4 del gene 16S rRNA e 2.487.858 frammenti ( $\sim 138.214 \pm 74.416$  per campione) ottenuti dalla pulizia e unione delle reads dell'ITS (Tabella 2).

<b>Tabella 2 Metriche di sequenziamento NGS</b>				
<b>Campione</b>	<b>Regione V3-V4</b>		<b>Regione ITS</b>	
	<b>Raw Reads</b>	<b>Merged</b>	<b>Raw Reads</b>	<b>Merged</b>
<b>01F</b>	502.878	249.980	305.492	152.319
<b>02F</b>	516.902	257.152	342.360	170.610
<b>03F</b>	558.130	277.561	505.556	251.997
<b>04F</b>	570.814	283.889	578.692	288.931
<b>05F</b>	589.198	293.147	551.324	275.224
<b>08F</b>	463.092	230.332	403.250	200.974
<b>09F</b>	535.694	266.096	394.728	196.886
<b>10F</b>	335.280	167.419	161.560	80.655
<b>11F</b>	205.720	102.759	193.970	96.853
<b>12F</b>	736.936	367.591	166.064	82.880
<b>13F</b>	256.894	128.311	192.504	96.156
<b>14F</b>	214.574	107.169	203.904	101.797
<b>15F</b>	275.456	137.537	127.934	63.684
<b>16F</b>	293.354	146.458	133.962	66.818
<b>17F</b>	231.310	115.498	197.112	98.430
<b>21F</b>	329.986	164.695	178.446	88.490
<b>22F</b>	234.718	117.228	186.916	93.149
<b>23F</b>	263.924	131.827	164.734	82.005
<b>Totale</b>	7.114.860	3.544.649	4.988.508	2.487.858
<b>Media</b>	~395.270	~196.925	~277.139	~138.214
<b>DS</b>	±163.170	±81.033	±149.095	±74.416
DS: Deviazione standard				

## 5.2 Identificazione ASVs e classificazione tassonomica

Successivamente, le reads unite col software PEAR sono state importate all'interno del software qiime2 per la rimozione di sequenze ambigue ad opera del pacchetto dada2; in particolare, un totale di 5.044.625 (~83,8%) frammenti ha superato il filtro imposto da dada2, di cui 2.570.633 (~72,5%) ottenuti dalla pulizia dei frammenti della regione V3V4 del gene 16S mentre le restanti 2.473.992 (~99,4%) provenivano della regione ITS (Tabella 3).

A partire dalle sequenze che hanno superato i filtri imposti, il software dada2 è stato in grado di identificare un totale di 17.246 ASVs delle quali 16.297 derivanti dal sequenziamento della regione V3V4 del gene procariotico codificante la subunità ribosomiale 16S, mentre le restanti 949 provenivano dalla regione eucariotica ITS.

**Tabella 3. Numero di frammenti che hanno superato il filtro dada2.**

Campione	Regione V3-V4		Regione ITS	
	Input Reads	Denoised, filtered, non chimera	Input Reads	Denoised, filtered, non chimera
<b>01F</b>	249.980	165.234	152.319	151.545
<b>02F</b>	257.152	158.697	170.610	169.564
<b>03F</b>	277.561	173.420	251.997	251.323
<b>04F</b>	283.889	164.093	288.931	287.996
<b>05F</b>	293.147	193.731	275.224	274.100
<b>08F</b>	230.332	152.132	200.974	199.731
<b>09F</b>	266.096	184.547	196.886	196.588
<b>10F</b>	167.419	135.215	80.655	80.312
<b>11F</b>	102.759	81.138	96.853	96.451
<b>12F</b>	367.591	319.226	82.880	82.456
<b>13F</b>	128.311	96.254	96.156	95.770
<b>14F</b>	107.169	87.845	101.797	101.304
<b>15F</b>	137.537	115.964	63.684	61.495
<b>16F</b>	146.458	122.910	66.818	65.597
<b>17F</b>	115.498	87.613	98.430	98.041
<b>21F</b>	164.695	130.513	88.490	87.319
<b>22F</b>	117.228	93.468	93.149	92.748
<b>23F</b>	131.827	108.633	82.005	81.652
<b>Totale</b>	3.544.649	2.570.633	2.487.858	2.473.992
<b>Media</b>	~196.925	~142.813	~138.214	~137.444
<b>DS</b>	±81.033	±56.702	±74.416	±743.74

DS: Deviazione standard

### 5.2.1 Microbiota batterico

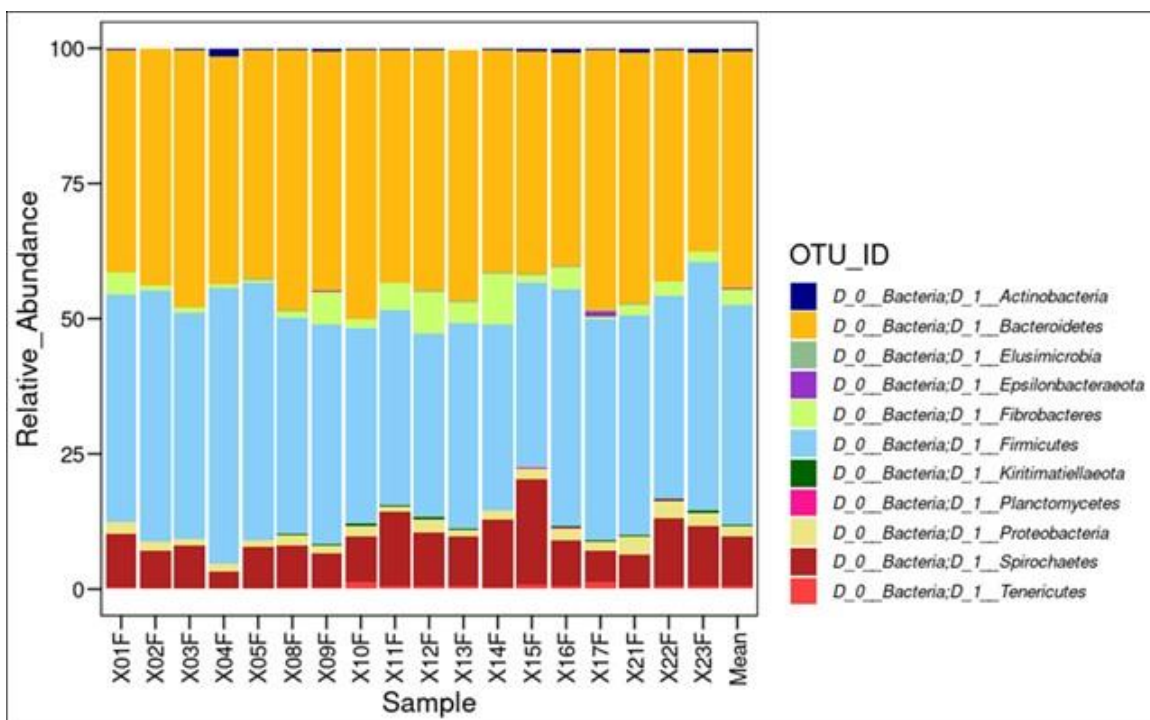
Successivamente, l'assegnazione tassonomica effettuata mediante BLAST (Boratyn et al., 2013), ha permesso di ricostruire e descrivere, per la prima

volta, l'insieme della comunità microbica colonizzante l'intestino di 18 esemplari di asino ragusano inclusi in questo studio.

Sebbene, la classificazione delle 16.297 ASVs procariotiche ricostruite da dada2 ha permesso di identificare un totale di 23 phyla, 190 famiglie e 350 generi con un tasso di identità pari almeno al 74%, 85% e 95% rispettivamente; tuttavia, di questi soltanto 11 phyla, 69 famiglie e 125 generi mostravano una percentuale di abbondanza relativa maggiore dello 0,1% (Tabella 4).

<b>Tabella 4. Assegnazione tassonomica</b>						
<b>Campione</b>	<b>Regione V3-V4</b>			<b>Regione ITS</b>		
	<b>Phylum</b>	<b>Family</b>	<b>Genus</b>	<b>Phylum</b>	<b>Family</b>	<b>Genus</b>
<b>01F</b>	7	60	101	5	34	36
<b>02F</b>	6	56	104	5	32	35
<b>03F</b>	6	62	93	8	43	47
<b>04F</b>	6	54	110	6	36	37
<b>05F</b>	8	65	100	6	31	37
<b>08F</b>	9	67	101	7	40	42
<b>09F</b>	9	47	107	6	33	36
<b>10F</b>	9	60	98	6	35	42
<b>11F</b>	8	59	103	6	35	35
<b>12F</b>	10	62	105	5	33	38
<b>13F</b>	8	56	103	6	21	24
<b>14F</b>	8	61	99	7	29	32
<b>15F</b>	8	66	103	6	28	29
<b>16F</b>	10	58	95	5	29	33
<b>17F</b>	10	60	109	6	33	37
<b>21F</b>	8	61	102	6	37	44
<b>22F</b>	10	61	104	7	29	32
<b>23F</b>	8	57	79	6	20	24
<b>Totale</b>	11	69	125	8	58	69

A livello di phylum, mediamente, il più abbondante si è rivelato essere quello dei *Bacteroidetes* (~44%) seguito da *Firmicutes* (~40,8%), *Spirochaetes* (~8,9%), *Fibrobacteres* (~3,2/%) e *Proteobacteria* (~2%) (Fig. 4).



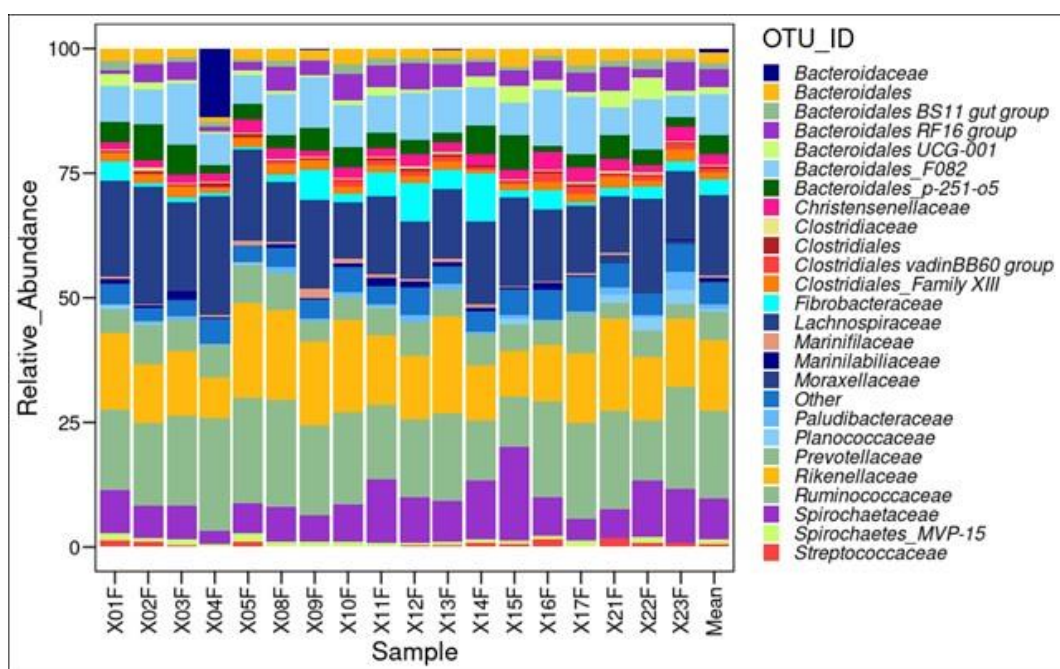
**Figura 4:** Barplot delle abbondanze relative della comunità batterica a livello di phylum.

Tuttavia, analizzando i vari campioni, questo trend non è sempre confermato; infatti, per esempio, nei campioni 01F, 02F, 04F, 05F, 16F e 23F il phylum più abbondante risulta essere quello dei *Firmicutes*, con una percentuale compresa tra il ~42% e il ~51%, viceversa i phylum *Spirochaetes* e *Actinobacteria* risultano maggiormente presenti rispettivamente nei campioni 11F, 14F, 15F e 22F il primo, e nel campione 04F il secondo, dove questo phylum mostra una maggiore abbondanza relativa (~1,5%) rispetto alla media



del totale dei campioni (~0,4%), permettendogli di rappresentare il quinto phylum più abbondante.

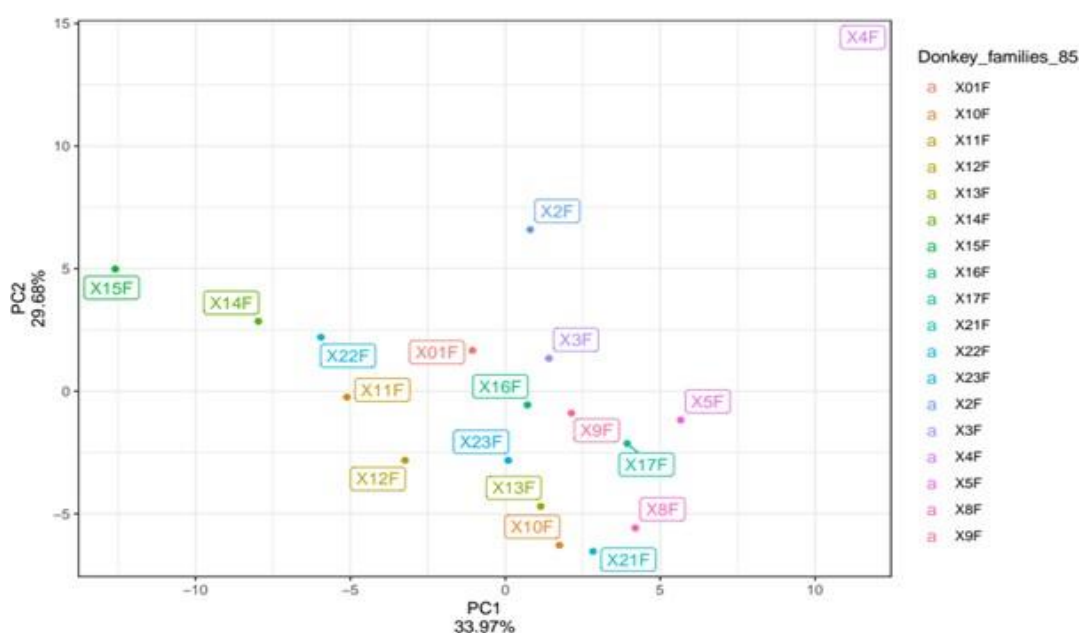
In questo studio, l'analisi bioinformatica condotta sul sequenziamento della regione V3-V4 del 16S rDNA ha permesso di identificare, con una percentuale di abbondanza relativa maggiore dello 0,1%, un totale di 69 diverse famiglie batteriche di cui 18 condivise fra tutti i campioni. Il maggior numero di famiglie (67) sono state identificate nel campione 08F; invece soltanto 47 diverse famiglie sono state descritte per il campione 09F.



**Figura 5.** Abbondanze relative di comunità batteriche a livello di famiglia.

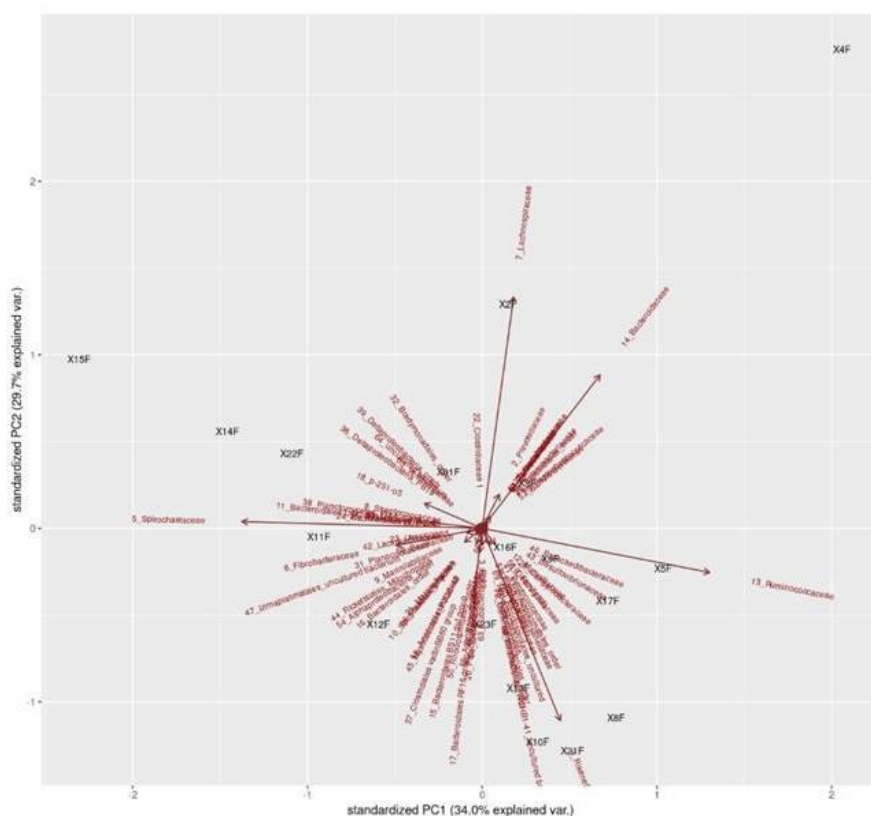
La famiglia *Ruminococcaceae* (~17,4%) rappresenta, mediamente, il gruppo microbico più abbondante riscontrato all'interno del microbiota fecale degli esemplari di asino ragusano esaminati, con una percentuale che oscilla dal

~10,1% al ~22,5%, seguito da altre famiglie/gruppi tassonomici quali *Lachnospiraceae* (~16%), *Rikenellaceae* (~14,3%), *Spirochaetaceae* (~8,4%), *Bacteroidales* F082 (~8,2%), *Prevotellaceae* (~5.7%), *Bacteroidales* p-251-05 (~3.8%), *Bacteroidales* RF16 group (~3.5%), *Fibrobacteraceae* (~3%), *Christensenellaceae* (~2.1%), *Clostridiales* family XIII (~1.6%), *Bacteroidales* UCG-001 (~1.6%), e *Bacteroidales* BS11 gut group (~1.1%) (Fig. 5). In funzione dei rispettivi profili metagenomici ottenuti, la distribuzione dei campioni mostra delle sostanziali differenze in alcuni esemplari (Fig. 6). Infatti, dal grafico dell'analisi delle componenti principali (PCA) si evince che, sebbene la maggior parte dei campioni mostrino delle comunità a livello di famiglia piuttosto sovrapponibili, i campioni 02F, 04F, 14F e 15F presentano una distribuzione piuttosto divergente (Fig. 7).



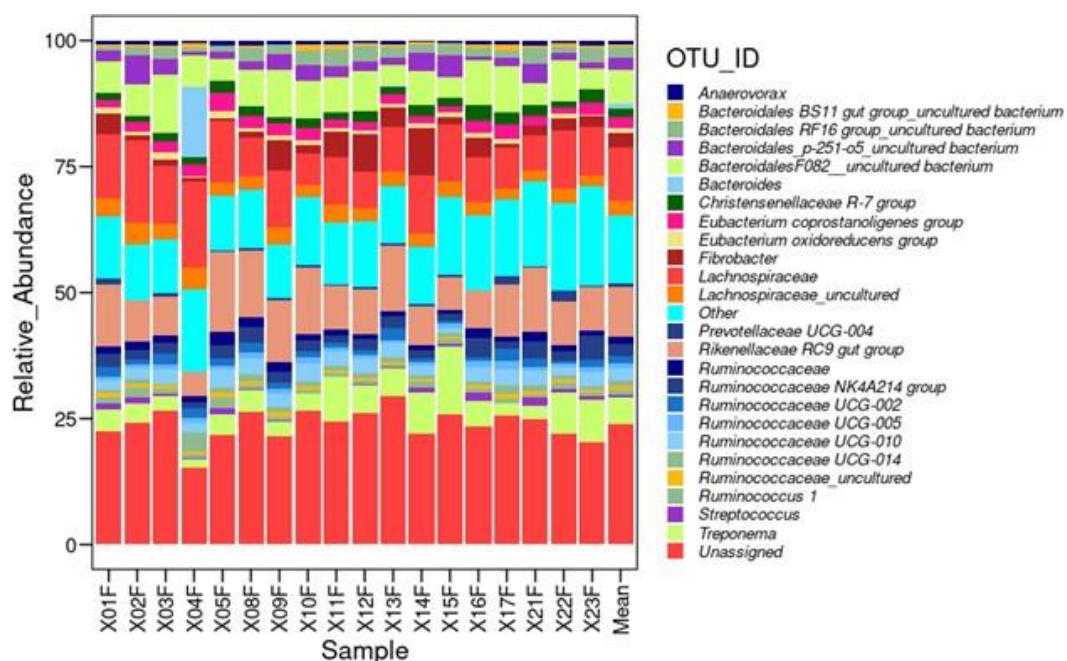
**Figura 6.** PCA di abbondanza relativa delle famiglie per ciascun campione in cui si nota una distribuzione piuttosto divergente per i campioni 2F, 4F, 14F, 15F.

Dall' analisi di abbondanza relativa delle famiglie per ciascun campione, emergono delle sostanziali differenze rispetto al dato medio; nei campioni 02F e 04F, quella delle *Lachnospiraceae* è la famiglia più abbondante, in particolare nel campione 04F la famiglia *Bacteroidaceae* risulta significativamente arricchita rispetto al resto degli esemplari. Inoltre, è interessante notare che nei campioni 14F e 15F, la maggiore abbondanza relativa delle famiglie *Rikenellaceae* e *Spirochaetaceae* e *Bacteroidales p-251-o5* determina una distribuzione più staccata (divergente) di questi due esemplari (Fig 7).



**Figura 7.** PCA Biplot raffigurante la distribuzione dei generi batterici identificati all'interno del microbiota intestinale dei campioni in analisi.

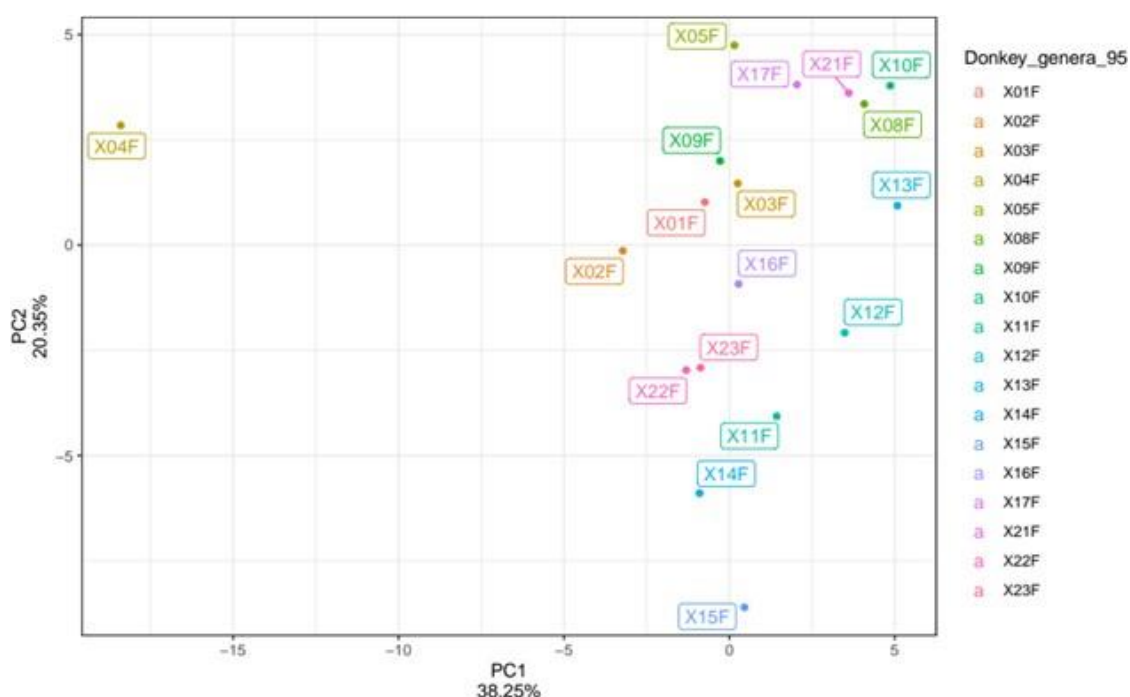
In totale sono stati identificati 125 generi batterici unici di cui 28 condivisi fra tutti i campioni; in termini di biodiversità osservata, il campione 04F risulta essere quello con il maggior numero di generi descritti (110), viceversa il 23F presentava la comunità meno ricca in termini di genere (79) (Fig. 8).



**Figura 8.** Abbondanze relative delle comunità batteriche identificate a livello di genere.

Mediamente, fra tutti i campioni il genere più abbondante risulta appartenere alla famiglia delle *Lachnospiraceae* (~10,5%) seguito da *Rikenellaceae RC9 gut group* (~10%), *Bacteroidales F082 uncultured bacterium* (~6,86%), *Treponema* (~5,3%), *Fibrobacter* (~3%), *Lachnospiraceae uncultured* (~2,9%), *Ruminococcaceae UCG-010* (~2,6%), *Bacteroidales p-251-o5 uncultured bacterium* (~2,4%), *Ruminococcaceae NK4A214 group* (~2,4%), *Eubacterium coprostanoligenes group* (~2,1%), *Bacteroidales RF16 group*

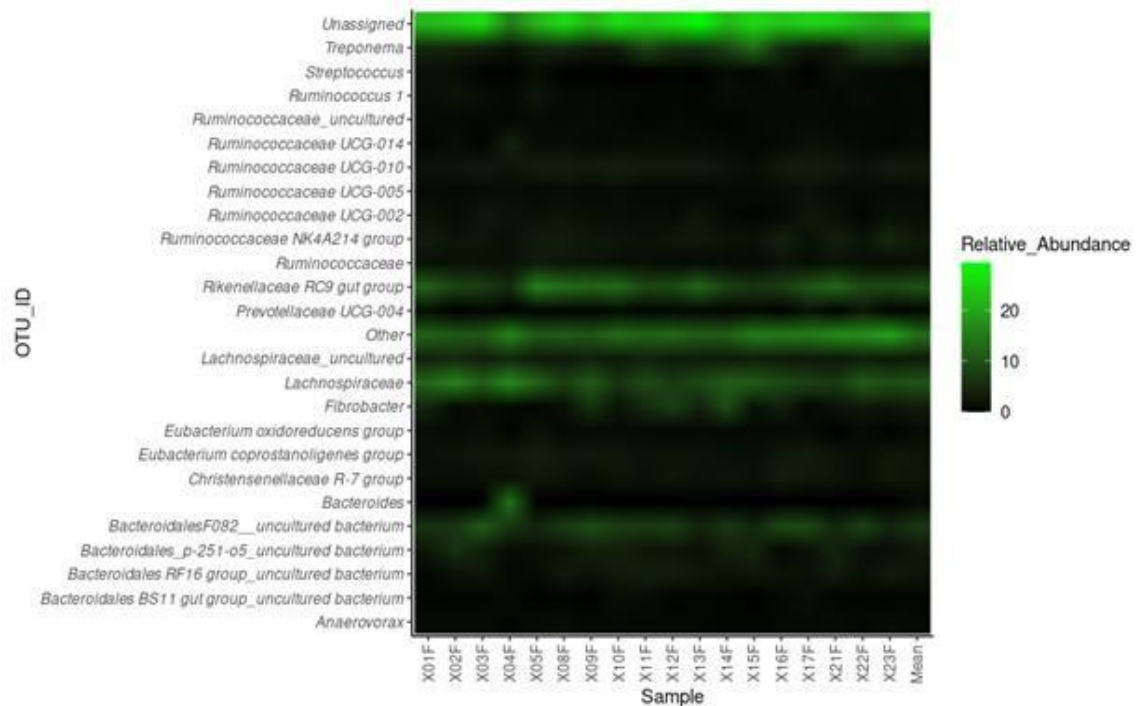
uncultured bacterium (~2%), *Christensenellaceae R-7* group (~1,9%), *Ruminococcaceae* (~1,4%), *Ruminococcaceae UCG-002* (~1,4%), *Ruminococcaceae UCG-014* (~1,1%), tuttavia a causa dell'elevato valore soglia di identità imposto, il numero delle reads non classificate risulta piuttosto elevato (~23,8%) (Fig. 9).



**Figura 9.** PCA di abbondanza relativa a livello di genere, i campioni 04F e 15F risultano particolarmente eterogenei.

Come evidenziato dalla PCA, anche a livello di genere i campioni 04F e 15F si discostano particolarmente rispetto al resto degli esemplari analizzati (Fig. 10). In effetti, il campione 04F, oltre a presentare “*Rikenellaceae RC9* gut group” come genere più abbondante, si differenzia anche per l’elevata percentuale con cui viene identificato il genere *Bacteroides* (~13,8%); quest’ultimo genere, infatti, rappresenta un gruppo quasi del tutto esclusivo

per questo campione poiché è stato identificato solo nell'esemplare 13F e con una percentuale di gran lunga inferiore (~0,2%). Invece, il campione 15F presenta i generi *Treponema* e *Rikenellaceae* *hoa5-07d05* gut group particolarmente arricchiti rispetto al resto degli esemplari analizzati.



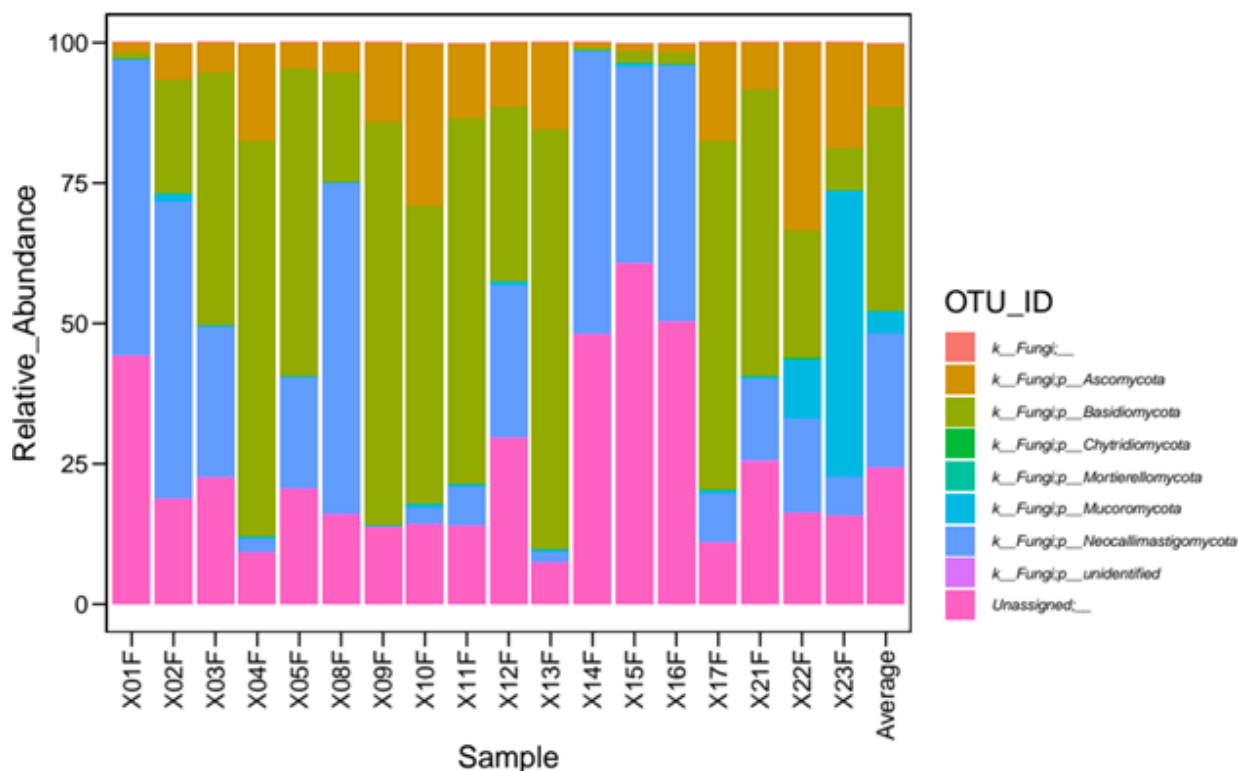
**Figura 10.** HEATMAP a livello di genere. I campioni 04F e 15F risultano particolarmente eterogenei rispetto al resto degli esemplari analizzati. Il 04F differenzia per l'elevata percentuale DEL1 genere *Bacteroides*, 15F presenta una maggiore percentuale dei generi *Treponema* e *Rikenellaceae* *hoa5-07d05* gut group.

### 5.2.2 Microbiota eucariotico (fungino)

La ricostruzione del microbiota intestinale dell'asino ragusano è stata effettuata mediante sequenziamento della regione ITS e classificazione delle reads risultanti attraverso il tool BLAST (Boratyn G.M. et al., 2013), utilizzando come reference il database eucariotico Unite (release all

10/05/2021). L'analisi condotta da BLAST ha permesso di identificare un totale di 11 phyla, 125 famiglie e 165 generi fungini di cui 9 phyla, 59 famiglie e 70 generi presentavano una percentuale di abbondanza relativa superiore allo 0,01%. Nel caso dell'ITS, la percentuale di reads che non hanno trovato alcun match contro il database fungino Unite, risulta particolarmente più alta in tutti i livelli tassonomici analizzati. Questo potrebbe dipendere sia dalla scarsa profondità dei database, dovuta ai pochi studi riguardanti la caratterizzazione della componente fungina colonizzante l'apparato intestinale di diversi mammiferi, sia alla presenza di DNA, all'interno dei nostri campioni, proveniente da materiale non digerito o da cellule intestinali dell'asino ragusano. In termini di biodiversità osservata, il microbiota intestinale del campione 03F rappresenta quello col maggior numero di generi osservati (43), viceversa nel campione 23F si osserva il numero più basso di generi identificati (24). A livello di phylum, i *Basidiomycota* rappresentano mediamente il gruppo più abbondante (~36,6%) seguiti da *Neocallimastigomycota* (~24%), *Ascomycota* (~11,3%), *Mucoromycota* (~3,7). Inoltre, è stato osservato che nei campioni 01F, 02F, 08F, 14F, 16F il phylum maggiormente rappresentativo risulta essere quello dei *Neocallimastigomycota* con una percentuale di abbondanza relativa compresa tra il 59% e il ~45,6%; invece, nei campioni 22F e 23F rispettivamente i gruppi degli *Ascomycota* e *Mucormycota* costituivano i

principali 55 rappresentati della componente fungina con un'abbondanza relativa pari al ~33,1% e ~50,7% (Fig. 11).



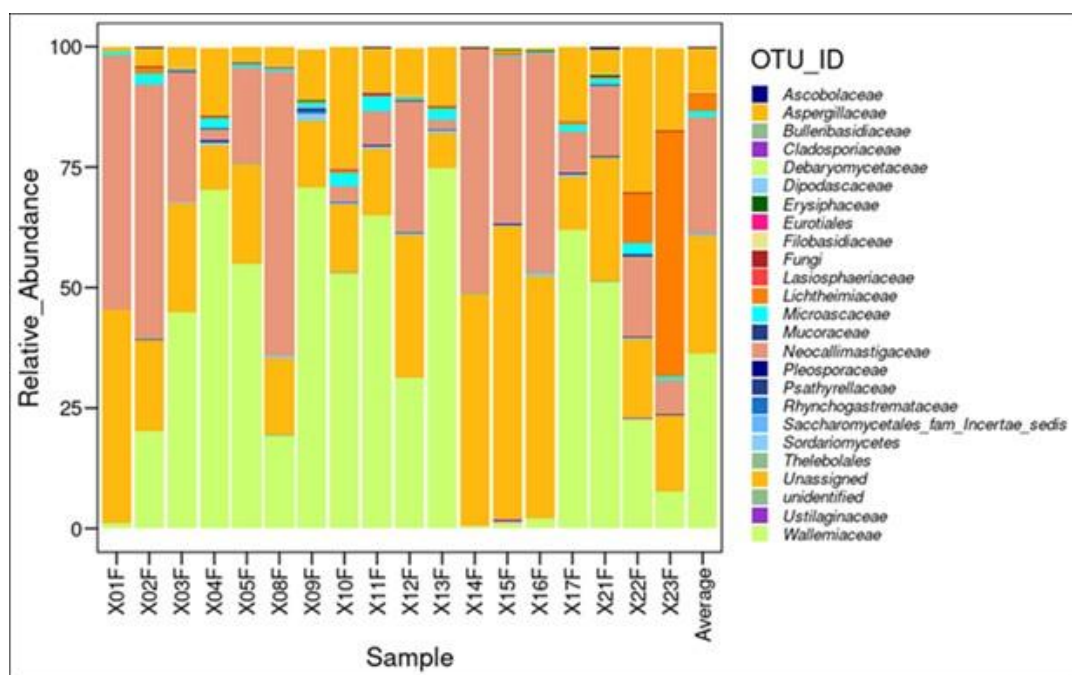
**Figura 11** abbondanze relative di comunità fungine a livello di phylum

A livello di famiglia, fra i campioni, il gruppo maggioritario è rappresentato *Wallemiaceae* (~36,3%) seguiti dalle *Neocallimastigaceae* (~24%), *Aspergillaceae* (~9,2%), *Lichtheimiaceae* (~3,6%), *Microascaceae* (~1,2%), *Sordariomycetes* (~0,3%), *Rhynchogastremataceae* (~0,1%). La percentuale di ASVs non assegnate a questo livello tassonomico è mediamente del ~24,3% con un picco del ~60,8% nel campione 15F. Il campione 03F rappresenta quello in cui sono state descritte il maggior numero di famiglie



(47), viceversa l'esemplare 23F mostra la minore ricchezza in termini di famiglie fungine osservate (24) (Tabella 4).

Delle 58 famiglie fungine uniche identificate, quella delle *Wallemiaceae* è componente la maggioritaria nei campioni 03F, 04F, 05F, 09F, 10F, 11F, 12F, 13F, 17F, 21F con percentuali comprese tra il ~74,8% e il ~31,2%. Diversamente, per i campioni 01F, 02F, 08F, 14F, 15F, 16F la famiglia delle *Neocallimastigaceae* risulta essere la componente principale, invece nei campioni 22F e 23F le *Aspergillaceae* e le *Lichtheimiaceae* costituiscono le famiglie dominanti (Fig.12).

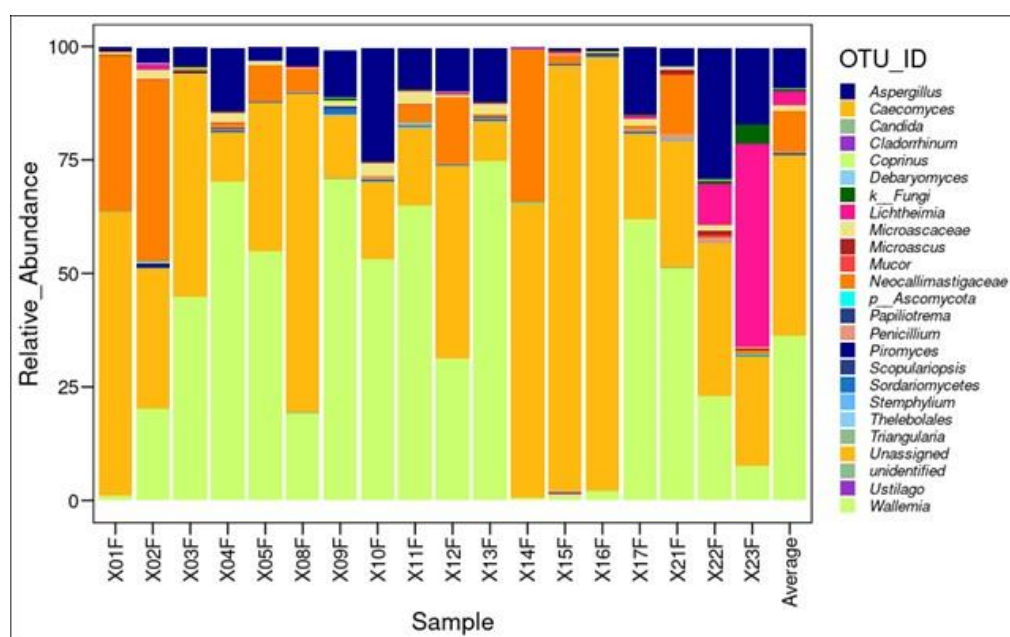


**Figura 12:** Abbondanze relative di comunità fungine a livello di famiglie.

A livello di genere, all'interno del database Unite, numerose ASVs non hanno trovato un riscontro che soddisfacesse i valori soglia di identità ( $\geq 95\%$ )

imposti per questo livello tassonomico. Infatti, la percentuale di reads non classificate in questo livello tassonomico è pari al ~39,6%, percentuale in cui rientrano valori compresi tra il ~10,6% del campione 04F e ~95,4% del campione 16F. Mediamente, *Wallemia* (~36,3%) risulta essere il genere maggioritario seguito da *Aspergillus* (~9%), *Neocallimastigaceae* (~8,9%), *Lichtheimia* (~3,2%) e *Microascaceae* (~1%).

Dall'analisi sono emerse, anche, delle differenze proporzionali a livello di generi, con alcuni campioni che si discostano da quelle medie; in particolare, nei campioni 01F, 02F e 14F un genere appartenente alla famiglia delle *Neocallimastigaceae* risulta essere il principale descritto; invece, negli esemplari 22F e 23F la componente significativamente più abbondante, all'interno microbiota intestinale, è costituita rispettivamente dai generi *Aspergillus* e *Lichtheimia* (Fig.13).



**Figura 13:** Abbondanze relative di comunità fungine a livello di genere.

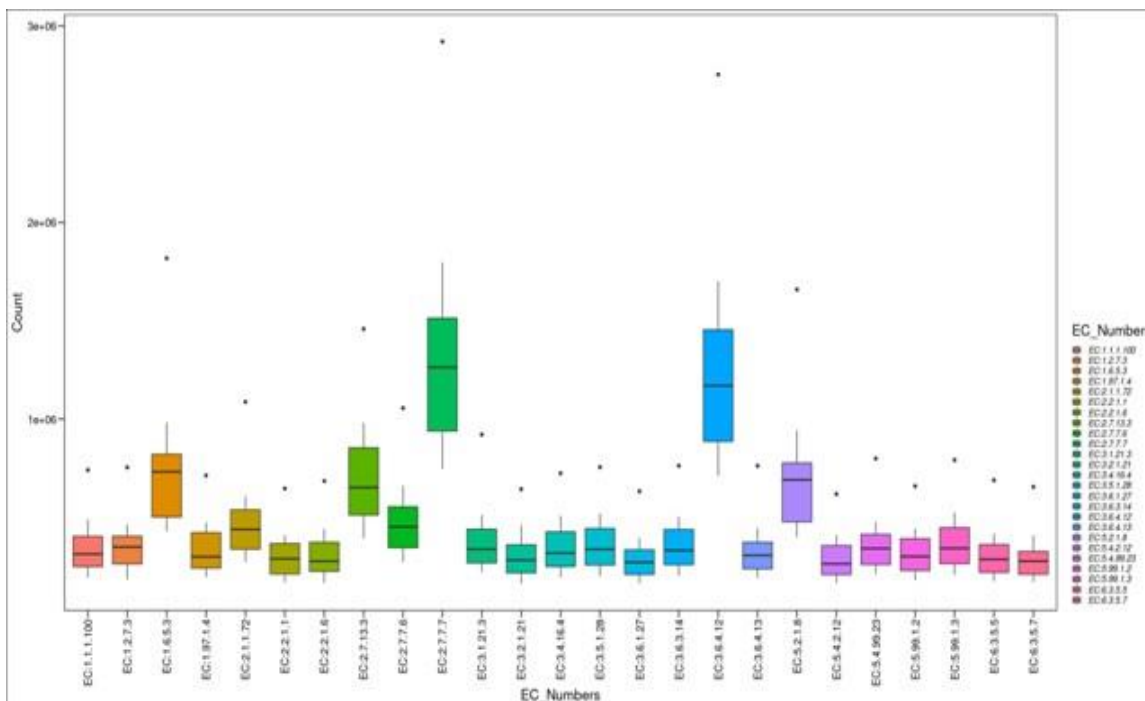
### 5.3 Predizione funzionale del microbiota dell'asino ragusano

In questo studio, sulla base delle sequenze delle ASVs e della composizione delle comunità batteriche, utilizzando il tool PICRUST2 è stato possibile effettuare, anche, la predizione funzionale del microbiota intestinale dell'asino (Douglas et al., 2020). In totale sono state identificate 2073 classi enzimatiche coinvolte in 404 pathways metabolici (Tabella 5).

<b>Campione</b>	<b>Enzyme Classification Numbers</b>	<b>Pathways</b>
<b>01F</b>	1795	363
<b>02F</b>	1608	321
<b>03F</b>	1757	353
<b>04F</b>	1754	352
<b>05F</b>	1774	348
<b>08F</b>	1818	368
<b>09F</b>	1628	326
<b>10F</b>	1691	334
<b>11F</b>	1652	329
<b>12F</b>	1730	351
<b>13F</b>	1724	343
<b>14F</b>	1680	343
<b>15F</b>	1799	359
<b>16F</b>	1584	317
<b>17F</b>	1640	326
<b>21F</b>	1855	374
<b>22F</b>	1818	363
<b>23F</b>	1769	361
<b>Totale</b>	2073	404

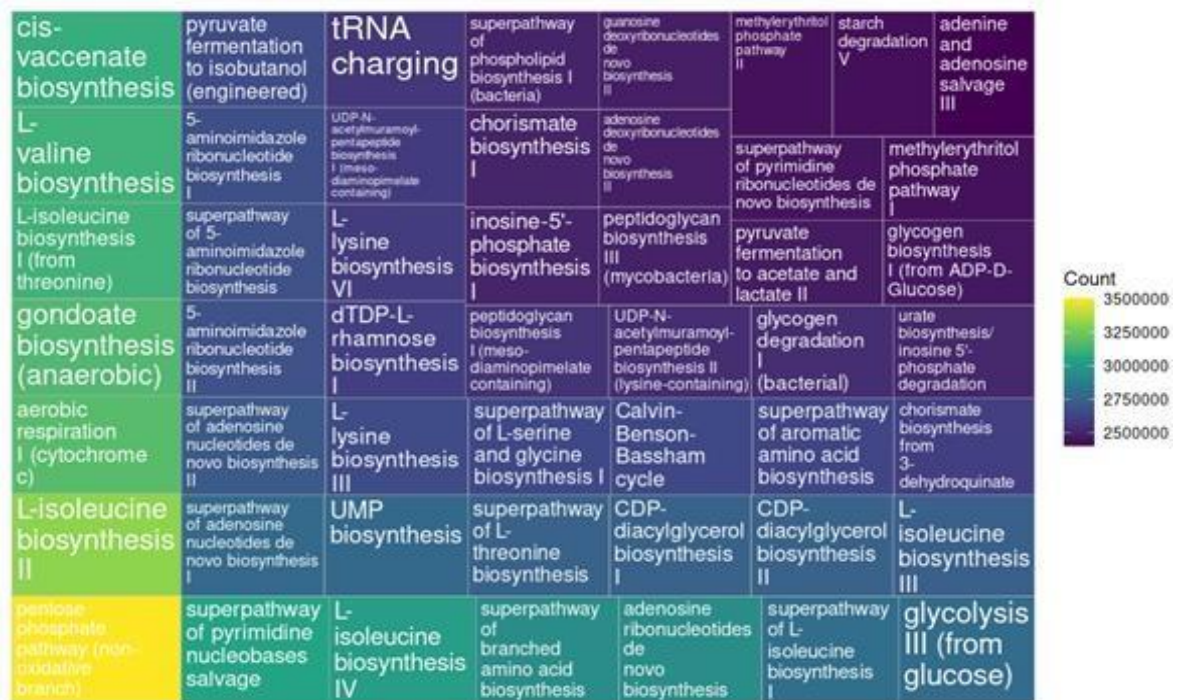
Dall'analisi si evince che la classe enzimatica maggiormente identificata nei 18 esemplari di asino ragusano in esame è stata quella DNA-directed DNA polymerase (EC:2.7.7.7) seguita da DNA helicase (EC:3.6.4.12), NADH:ubiquinone reductase (H(+)-translocating) (EC:1.6.5.3), Histidine

kinase (EC:2.7.13.3), Peptidylprolyl isomerase (EC:5.2.1.8), DNA-directed RNA polymerase (EC:2.7.7.6) (Fig. 14).



**Figura 14.** Boxplot raffigurante la distribuzione delle principali classi enzimatiche riscontrate all'interno dei campioni presi in esame.

Per quanto concerne i pathway, invece, l'analisi di predizione ha permesso di identificarne 404 unici, i più abbondanti sono risultati essere il pathway del pentoso fosfato (non-oxidative branch), biosintesi dell'isoleucine, respirazione aerobica (citocromo c), biosintesi in anaerobiosi del gondoato, L-biosintesi dell'isoleucine (dalla treonina), biosintesi della L-valine, biosintesi del cis-vaccenato, superpathway di biosintesi di nucleotidi pirimidinici (riciclo nucleotidi) (Fig.15).



**Figura 15.** Trimap dei principali pathway biochimici identificati in questo studio.

## **6. Discussioni e Conclusioni**

Il grande interesse per la salvaguardia e la valorizzazione delle razze asinine autoctone della Sicilia, rappresenta una sfida significativa per la ricerca in campo medico veterinario e zootecnico in particolare, e biotecnologico in generale. Questa consapevolezza offre ricche opportunità d'indagine, infatti, ampliando le conoscenze scientifiche a riguardo, si possono fornire strumenti sempre più avanzati a servizio della tutela e preservazione della biodiversità isolana.

Negli ultimi decenni, grazie al sequenziamento degli acidi nucleici di nuova generazione e ai progressi bioinformatici da esso derivati, lo studio del microbiota ha aperto nuovi scenari e cambiato le prospettive sul modo di intendere le interazioni che si stabiliscono tra i microrganismi e loro ospiti (Bäckhed et al., 2005; Kostic et al., 2013; Zoelzer et al., 2021). A livello globale, ormai, il termine "microbiota" è diventato un concetto familiare anche al grande pubblico, e, visto il grande interesse suscitato, esso rappresenta il punto di partenza per numerose iniziative accademiche sia nel settore umano che in quello veterinario (Blaser et al., 2016). In particolare, il microbiota intestinale è oggetto di continui studi poiché rappresenta un vero e proprio organo che gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi dell'animale (Evans et al., 2013), pertanto, comprendere, prevedere e sfruttare la funzione di questo complesso ecosistema microbico può servire a migliorare lo stato di

salute dell'animale (Kang et al., 2019). In letteratura è presente una cospicua produzione scientifica riguardante lo studio del microbiota in diverse specie animali (Pascoe et al., 2019). Sebbene, gli asini costituiscano quasi la metà degli equini domestici nel mondo, le conoscenze relative al loro microbiota intestinale, ad oggi, sono ridotte a pochi casi studio (Edwards et al., 2020 b) e nessun dato è attualmente presente nella letteratura scientifica sulla razza Ragusana.

L'asino ragusano è un animale ben caratterizzato, di colore scuro, con ventre bianco, muso grigio ed altezza al garrese compresa tra 130 e 140 cm. Il peso corporeo medio delle femmine adulte è di circa 300-350 kg (Malacarne et al., 2019). Oggi è inserito tra le razze autoctone siciliane a rischio di estinzione e grazie alla riscoperta dell'uso del latte d'asina negli ultimi 20 anni e al suo interesse sociale ed economico dovuto all' onoterapia ed all' onoturismo, la popolazione di questo animale ha mostrato un ragguardevole aumento del numero di individui 4118

([http://www.sistemaallevatore.it/anagrafe/statistiche\\_report\\_report.php](http://www.sistemaallevatore.it/anagrafe/statistiche_report_report.php))

L'animale è utilizzato principalmente per la produzione di latte e carne oltre che per attività ricreative, per il trekking e per terapia (Malacarne et al., 2019). Pertanto, considerato il ruolo che l'asino ragusano ricopre in diversi settori sociali ed economici, risulta chiaro quanto sia necessario fornire informazioni utili volte a migliorare il welfare di questo animale.

Il nostro studio si colloca in questo ambito di ricerca e rappresenta un primo contributo tecnologico, utile ad ottenere il miglioramento di tali obiettivi, attraverso la descrizione, per la prima volta, della struttura del microbiota (batterico e fungino) intestinale dell'asino ragusano. Nella nostra indagine abbiamo studiato l'abbondanza, incluso il potenziale ruolo funzionale, della comunità microbica che popola l'intestino di una piccola popolazione locale di asini ragusani, basandoci sul sequenziamento NGS del marcatore genetico 16S rDNA (per la componente batterica) e la regione ITS (per la componente eucariotica/fungina) per l'identificazione tassonomica e le analisi filogenetiche delle comunità microbiche. Per quanto riguarda i procarioti, sono stati identificati 11 phyla, 69 famiglie e 125 generi nel microbiota fecale degli animali esaminati. A livello di phyla, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres* e *Proteobacteria* sono risultati quelli maggiormente riscontrati nei nostri campioni fecali. In particolare, i due phyla nettamente dominanti sono stati *Bacteroidetes* (~44%) e *Firmicutes* (~40,8%) (F/B ratio: 0,92) che insieme rappresentano oltre l'80% delle ASVs identificate. Comunque, questo trend non è stato confermato in tutti i campioni poiché, ad esempio, nei campioni 01F, 02F, 04F, 05F, 16F e 23F il phylum più abbondante è risultato essere quello dei *Firmicutes*, con una percentuale compresa tra il ~42% e il ~51%.



È da rilevare che i *Firmicutes* rappresentano il principale phylum microbico coinvolto nella degradazione delle fibre nel tratto gastro-intestinale degli erbivori, differentemente, il phylum *Bacteroidetes*, contiene principalmente taxa coinvolti nella digestione dei carboidrati in questi animali (Liu et al., 2019). La maggiore abbondanza di quest' ultimi nell'intestino degli asini ragusani, conferma quanto precedentemente riportato in letteratura e sottolinea che l'hindgut (intestino posteriore) è il principale sito corporeo in cui si svolge l'approvvigionamento energetico negli asini e cavalli (Fliegerova et al., 2016; Liu et al., 2019).

Le abbondanze da noi riscontrate sono perfettamente coerenti con quanto riportato da Liu e collaboratori (2019) sulla diversità microbica nel tratto digestivo degli asini di Dezhou (Liu et al., 2019) e con lo studio comparativo del microbiota intestinale negli asini selvatici tibetani e negli asini domestici dell'altopiano del Qinghai-Tibet (Liu et al., 2020). Inoltre, come nel nostro studio, dove un terzo (6/18) degli animali mostrava una maggiore abbondanza di *Firmicutes* rispetto ai *Bacteroidetes*, simili proporzioni sono state recentemente riportate anche in asini Dezhou (Xing et al., 2020; Zhang et al., 2021) suggerendo che, sia nella razza ragusana che in quella Dezhou della provincia Shandong in Cina, il rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* può essere variabile. Tale variazione è stata anche riportata in altri animali incluso uomo, ovini, bovini, cani e gatti (Jami et al., 2014; Deng e Swanson, 2015;

Cholewińska et al., 2021) e sembra che un alto rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) sia associato all'obesità e alla produzione di SCFAs come butirrato e propionato (Zhang et al., 2021). Comunque, in un recente studio su asini Dezhou, sottoposti a due diversi regimi alimentari (diete ad alto e a basso contenuto energetico) (Zhang et al., 2021), è stato dimostrato che negli animali con dieta ipercalorica il rapporto F/B si riduceva significativamente con l'aumento della ricchezza di *Bacteroidetes* i quali possono degradare i carboidrati nella dieta e produrre gli SCFAs (Cockburn e Koropatkin, 2016), metaboliti che regolano anche l'assunzione di mangime e lo stato immunitario dell'ospite (Zhang et al., 2021).

Pertanto, la diversità microbica osservata nel nostro studio, rispecchia il tipo di alimentazione a cui gli animali sono sottoposti. Chiaramente, foraggiare su un pascolo eterogeneo garantisce all'animale una maggiore probabilità di acquisire comunità batteriche benefiche che contribuiscono al mantenimento di uno stato di salute sano dell'animale. Infatti, Gao et al. (2019), nel loro studio avevano riscontrato che gli asini tibetani selvatici presentavano una maggiore abbondanza di *Bacteroidetes* rispetto agli asini in condizioni di cattività (Gao et al., 2019). Questo è coerente con il dato ottenuto anche nella nostra indagine e riflette pienamente la modalità di allevamento dei capi di asino ragusano da noi indagati. Infatti, le aziende site alle pendici dell'Etna,

offrono ampi prati circostanti su cui gli animali sono lasciati pascolare liberamente per diverse ore della giornata.

Per quanto riguarda la composizione batterica a livello di famiglie, il nostro studio mostra che il gruppo tassonomico più abbondante (>5%) risulta appartenere alla famiglia delle *Ruminococcaceae* seguito da *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae*, *Spirochaetaceae*, *Bacteroidales* F082, e *Prevotellaceae*. Si tratta di comunità microbiche presenti, anche, nel rumine dei bovini che hanno la capacità di degradare i polimeri presenti nella fibra vegetale. L'abbondanza di suddetti gruppi tassonomici riflette una maggiore capacità dell'asino di digerire più efficacemente le fibre rispetto ad altri equidi a livello dell'hindgut. Il dato da noi riportato trova riscontro nello studio che Edwards e collaboratori (2020 a) hanno condotto sulle differenze del microbiota fecale nelle specie equine addomesticate (Edwards et al., 2020 a). Inoltre, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* e *Rikenellaceae* rappresentano le famiglie batteriche più abbondanti recentemente descritte anche in asini Dezhou con diversi regimi alimentari (Zhang et al., 2021). Tuttavia, nel nostro studio, alcuni esemplari (02F, 04F, 14F e 15F) hanno mostrato una distribuzione delle famiglie e generi microbici piuttosto divergente rispetto al microbiota "core" identificato nel resto degli animali analizzati suggerendo che, probabilmente, la variabilità microbica presente all'interno della popolazione di asini ragusani dovrà essere studiata in maniera

più approfondita poiché il numero limitato di campioni non consente di trarre delle conclusioni definitive. Saranno pertanto necessarie ulteriori analisi metagenomiche, su un numero maggiore di capi, provenienti anche da differenti aree geografiche della Sicilia dove sono viene allevata questa interessante razza asinina.

Per quanto concerne, invece, la composizione della componente fungina (microbiota), come premesso, la probabile bassa rappresentazione di tali microrganismi nell'intestino, non consente un'identificazione massiva di un profilo fungino univoco come per i batteri. Ciò potrebbe esser dovuto sia alla scelta della strategia di sequenziamento che alla mancanza di specifici database di riferimento contenenti sequenze completamente annotate (Halwachs et al., 2017). Tuttavia, in termini di composizione fungina, il microbiota fecale dell'asino ragusano sembra essere caratterizzato da un totale di 9 phyla, 59 famiglie e 70 generi.

A livello di phylum, i *Basidiomycota* rappresentano mediamente il gruppo più abbondante seguiti da *Neocallimastigomycota*, *Ascomycota* e *Mucoromycota*. Questi phyla sono stati riportati come i principali gruppi fungini che caratterizzano il microbiota intestinale di asini e cavalli (Kauter et al., 2019; Mach et al., 2022). Invece, a livello di famiglia, fra tutti campioni esaminati, il gruppo tassonomico più rappresentato è stato quello delle *Wallemiaceae*,

seguiti dalle *Neocallimastigaceae*, *Aspergillaceae*, *Lichtheimiaceae*, *Microascace*, e *Rhynchogastremataceae*. Si tratta per lo più di popolazioni fungine che svolgono un'attività di degradazione delle fibre e ciò consente agli asini di utilizzare il materiale vegetale fibroso in modo più efficace rispetto ad altri animali. La famiglia delle *Wallemiaceae*, contiene un solo genere, *Wallemia*, con poche specie finora descritte ma che sono state riscontrate come taxa dominanti nei micobiomi intestinali di diversi animali tra cui maiali (Arfken et al., 2019), insetti (*Harmonia axyridis*; coccinella arlecchino) (Huang et al., 2022), uomo e topo (Skalski et al., 2018). È interessante notare che le specie di *Wallemia* spp., sono state recentemente riportate come principali taxa del microbiota fungino del rinofaringe di cavalli sani (Rodríguez et al., 2021) e che molte delle famiglie fungine identificate (*Wallemiaceae*, *Neocallimastigaceae*, e *Aspergillaceae*) in questo studio sono state anche riscontrate essere tra i più abbondanti miceti che colonizzano il tratto gastro-intestinale di cavalli deceduti in seguito alla cosiddetta “malattia dell'erba equina”, una neuropatia multisistemica dei cavalli al pascolo di eziologia sconosciuta (McGorum et al., 2021).

Purtroppo, l'insufficienza di dati riguardanti la struttura tassonomica del microbiota degli asini non permette una comparazione completa dei risultati ottenuti in questo studio con altri lavori presenti in letteratura. Nel nostro studio abbiamo, anche, effettuato la predizione funzionale del microbiota che ha

permesso di comprendere come le comunità microbiche influenzano le vie metaboliche dell'ospite. Infatti, i numerosi “pathways” individuati dimostrano come le comunità microbiche residenti presentino un grande potenziale metabolico che arricchisce l'ospite attraverso il metabolismo delle principali macromolecole biologiche e nella sintesi di metaboliti secondari i quali svolgono numerose azioni benefiche nei confronti dell'asino. Particolarmente interessante è l'arricchimento di pathways molecolari coinvolti nella biosintesi di acidi grassi monoinsaturi a catena lunga, come l'acido gondoico e vaccenico (Fig.15), i quali favoriscono la salute e il benessere generale dell'ospite. L'acido gondoico, il componente principale dell'olio di jojoba, è un acido grasso con 20 atomi di carbonio e appartiene al gruppo degli omega-9 mentre l'acido vaccenico è un acido grasso monoinsaturo a 18 atomi di carbonio presente nei ruminanti, in particolare nel latte della vacca, da cui deriva il nome. Uno studio sull'uomo, ha dimostrato che l'acido vaccenico è positivamente associato alla ridotta velocità di filtrazione glomerulare, un importante indicatore della funzione renale (Block et al., 2012).

Nel complesso, i risultati riportati in questo studio hanno fornito una prima panoramica delle comunità microbiche (batteriche e fungine) colonizzanti il tratto intestinale dell'asino ragusano, mostrando come gli animali da noi indagati presentino un microbiota ricco, diversificato e multifunzionale. Studi di questo tipo, sulle interazioni multilivello tra i vari microrganismi e tra i

microrganismi e l'ospite, offrono uno strumento innovativo e all'avanguardia per lo sviluppo di soluzioni ottimali sulla modalità di allevamento e gestione dell'animale, nonché possono risultare utili per eventuali programmi di monitoraggio per la salvaguardia e la valorizzazione della razza ragusana. I risultati del nostro studio sono incoraggianti e possono fungere da punto di partenza per indagini future sul microbiota della razza ragusana.

## 7. Bibliografia

Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, Lawley TD, Finn RD. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*. 2019;568:499-504.

Ang QY, Alexander M, Newman JC, Tian Y, Cai J, Upadhyay V, Turnbaugh JA, Verdin E, Hall KD, Leibel RL, Ravussin E, Rosenbaum M, Patterson AD, Turnbaugh PJ. Ketogenic Diets Alter the Gut Microbiome Resulting in Decreased Intestinal Th17 Cells. *Cell*. 2020; 181:1263-1275.e16.

Arfken AM, Frey JF, Ramsay TG, Summers KL. Yeasts of Burden: Exploring the Mycobiome-Bacteriome of the Piglet GI Tract. *Front Microbiol*. 2019;10:2286.

Aroua M, Jemmali B, Said SB, Kbaier HBH, Mahouachi M. Physicochemical properties of north African donkey milk. *Agric. Res. Technol*. 2019;21:556155.

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307:1915-20.



Bahrndorff S, Alemu T, Alemneh T, Lund Nielsen J. The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *Int J Genomics*. 2016;2016:5304028.

Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med*. 2018;32:9-25.

Barni S, Sarti L, Mori F, Muscas G, Belli F, Pucci N, Novembre E. Tolerability and palatability of donkey's milk in children with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018;29:329331.

Baroncini R. "L'asino il mulo e il bardotto". Calderini Edagricole. 1987.

Bäumler AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016;535:85-93.

Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MC, Charles T, Chen X, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8:103.

Bergmann GT, Craine JM, Robeson MS 2nd, Fierer N. Seasonal Shifts in Diet and Gut Microbiota of the American Bison (*Bison bison*). *PLoS One*. 2015;10:e0142409.

Blaser MJ, Cardon ZG, Cho MK, Dangl JL, Donohue TJ, Green JL, Knight R, Maxon ME, Northen TR, Pollard KS, Brodie EL. Toward a Predictive Understanding of Earth's Microbiomes to Address 21st Century Challenges. *mBio*. 2016;7:e00714-16.

Block R, Kakinami L, Liebman S, Shearer GC, Kramer H, Tsai M. Cis-vaccenic acid and the Framingham risk score predict chronic kidney disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2012;86:175-82

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114-20.

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 2019;37:852-57.

Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezhuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J, Zaretskaya I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:29-33.

Borioni N, Marinaro P, Celestini S, Del Sole F, Magro R, Zoppi D, Mattei F, Dall'Armi V, Mazzarella F, Cesario A, Bonassi S. Effect of equestrian therapy and onotherapy in physical and psycho-social performances of adults with intellectual disability: a preliminary study of evaluation tools based on the ICF classification. *Disabil Rehabil.* 2012;34:279-87.

Brice KL, Trivedi P, Jeffries TC, Blyton MDJ, Mitchell C, Singh BK, Moore BD. The Koala (*Phascolarctos cinereus*) faecal microbiome differs with diet in a wild population. *PeerJ.* 2019;7:e6534.

Brinkman BM, Hildebrand F, Kubica M, Goosens D, Del Favero J, Declercq W, Raes J, Vandenabeele P. Caspase deficiency alters the murine gut microbiome. *Cell Death Dis.* 2011;2:e220.

Brown MD, Shinn LM, Reeser G, Browning M, Schwingel A, Khan NA, Holscher HD. Fecal and soil microbiota composition of gardening and non-gardening families. *Sci Rep.* 2022;12:1595.

Burden F, Thiemann A. Donkeys Are Different. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2015;35:376-82.

Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DML, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, Dias JC, Kubota LT, Carvalheira JBC, Saad MJA. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 2012;55:2823-34.

Chen RY, Mostafa I, Hibberd MC, Das S, Mahfuz M, Naila NN, Islam MM, et al. A Microbiota-Directed Food Intervention for Undernourished Children. *N Engl J Med*. 2021;384:1517-28.

Cheng Y, Fox S, Pemberton D, Hogg C, Papenfuss AT, Belov K. The Tasmanian devil microbiome-implications for conservation and management. *Microbiome*. 2015;3:76.

Cholewińska P, Wołoszyńska M, Michalak M, Czyż K, Rant W, Janczak M. Evaluation of Changes in the Levels of Firmicutes and Bacteroidetes Phyla of Sheep Feces Depending on the Breed. *Animals (Basel)*. 2020;10:1901.

Cholewińska P, Wołoszyńska M, Michalak M, Czyż K, Rant W, Smoliński J, Wyrostek A, Wojnarowski K. Influence of selected factors on the *Firmicutes*, *Bacteroidetes* phyla and the *Lactobacillaceae* family in the digestive tract of sheep. *Sci Rep.* 2021;11:23801.

Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry.* 2013;18:666-73.

Cockburn DW, Koropatkin NM. Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease. *J. Mol. Biol.* 2016;428:3230-52.

Coman V, Vodnar DC. Gut microbiota and old age: Modulating factors and interventions for healthy longevity. *Exp Gerontol.* 2020; 141:111095.

Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, Weese JS. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet J.* 2015;205:74-80.

Cunsolo V, Saletti R, Muccilli V, Gallina S, Di Francesco A, Foti S. Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. *Food Res Int.* 2017;99:41-57.

De Angelis M, Ferrocino I, Calabrese FM, De Filippis F, Cavallo N, Siragusa S, Rampelli S, et al. Diet influences the functions of the human intestinal microbiome. *Sci Rep.* 2020;10:4247.

De Santis M, Contalbrigo L, Simonato M, Ruzza M, Toson M, Farina L. Animal assisted interventions in practice: mapping Italian providers. *Vet Ital.* 2018;54:323-32.

Deng P, Swanson KS. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br J Nutr.* 2015;113:6-17.

Dogra SK, Doré J, Damak S. Gut Microbiota Resilience: Definition, Link to Health and Strategies for Intervention. *Front Microbiol.* 2020;11:572921.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:11971-5.

Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol.* 2020;38:685-88.

Dupré JO, O'Malley MA. Varieties of living things: life at the intersection of lineage and metabolism. In: Normandin S, Wolfe C, editors. *Vitalism and the Scientific Image in Post-Enlightenment Life Science; History, Philosophy and Theory of the Life Sciences.* Dordrecht: Springer; 2009; pp. 1800-2010.

Edwards JE, Schennink A, Burden F, Long S, van Doorn DA, Pellikaan WF, Dijkstra J, Saccenti E, Smidt H. Domesticated equine species and their derived hybrids differ in their fecal microbiota. *Anim Microbiome.* 2020a;2:8.

Edwards JE, Shetty SA, van den Berg P, Burden F, van Doorn DA, Pellikaan WF, Dijkstra J, Smidt H. Multi-kingdom characterization of the core equine fecal microbiota based on multiple equine (sub)species. *Anim Microbiome.* 2020b; 2:6.

Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol.* 2013;218:37-47.

Fliegerova K, Mura E, Mrázek J, Moniello G, A comparison of microbial profiles of different regions of the equine hindgut, *Livestock Science*. 2016; 190:16-19,

Galardi M, Contalbrigo L, Toson M, Bortolotti L, Lorenzetto M, Riccioli F, Moruzzo R. Donkey assisted interventions: A pilot survey on service providers in North-Eastern Italy. *Explore (NY)*. 2022;18:10-16.

Gao H, Chi X, Qin W, Wang L, Song P, Cai Z, Zhang J, Zhang T. Comparison of the gut microbiota composition between the wild and captive Tibetan wild ass (*Equus kiang*). *J Appl Microbiol*. 2019;126:1869-78.

Garner JP. The significance of meaning: why do over 90% of behavioural neuroscience results fail to translate to humans, and what can we do to fix it? *ILAR J*. 2014;55:438-56.

Gibson KM, Nguyen BN, Neumann LM, Miller M, Buss P, Daniels S, Ahn MJ, Crandall KA, Pukazhenti B. Gut microbiome differences between wild and captive black rhinoceros - implications for rhino health. *Sci Rep*. 2019;9:7570.



Giuffrè L, Giosa D, Galeano G, Aiese Cigliano R, Paytuví-Gallart A, Sutera AM, Tardiolo G, Zumbo A, Romeo O, D'Alessandro E. Whole-metagenome shotgun sequencing of pig faecal microbiome, Italian Journal of Animal Science. 2021;20:1147-55.

Gonzalez-De Cara CA, Perez-Ecija A, Aguilera-Aguilera R, Rodero-Serrano E, Mendoza FJ. Temperament test for donkeys to be used in assisted therapy Appl Anim Behav Sci. 2017;186:64-71.

Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, Spector TD, Clark AG, Ley RE. Human genetics shape the gut microbiome. Cell. 2014;159:789-99.

Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. Therap Adv Gastroenterol. 2013;6:295-308.

Halwachs B, Madhusudhan N, Krause R, Nilsson RH, Moissl-Eichinger C, Högenauer C, Thallinger GG, Gorkiewicz G. Critical Issues in Mycobiota Analysis. Front Microbiol. 2017;8:180.

Hammer TJ, Sanders JG, Fierer N. Not all animals need a microbiome. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366:fnz117.

He Y, Wu W, Zheng HM, Li P, McDonald D, Sheng HF, Chen MX, et al. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models. *Nat Med.* 2018;24:1532-35.

Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ.* 2017;32:300-13.

Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature.* 2016;535:75-84.

Hufeldt MR, Nielsen DS, Vogensen FK, Midtvedt T, Hansen AK. Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to both genetic and environmental factors. *Comp Med.* 2010;60:336-47.

Huang Z, Zhu L, Lv J, Pu Z, Zhang L, Chen G, Hu X, Zhang Z, Zhang H. Dietary Effects on Biological Parameters and Gut Microbiota of *Harmonia axyridis*. *Front Microbiol.* 2022;12:818787.

Jami E, White BA, Mizrahi I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS One*. 2014;9:e85423.

Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2016;7:12015.

Jiang TT, Shao TY, Ang WXG, Kinder JM, Turner LH, Pham G, Whitt J, Alenghat T, Way SS. Commensal Fungi Recapitulate the Protective Benefits of Intestinal Bacteria. *Cell Host Microbe*. 2017;22:809-816.e4.

Julliand V, Grimm P. The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *J Anim Sci*. 2016;94:2262-74.

Kang DW, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, Caporaso JG, Krajmalnik-Brown R. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep*. 2019;9:5821.

Kauter A, Epping L, Semmler T, Antao EM, Kannapin D, Stoeckle SD, Gehlen H, Lübke-Becker A, Günther S, Wieler LH, Walther B. The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. *Anim Microbiome*. 2019;1:14.

Knecht D, Cholewinska P, Jankowska-Makosa A, Czyz K. Development of swine's digestive tract microbiota and its relation to production indices, a review. *Animals*. 2020;10:527.

Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev*. 2013;27:701-18.

Lai GC, Tan TG, Pavelka N. The mammalian mycobiome: A complex system in a dynamic relationship with the host. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2019;11:e1438.

Lane DJ. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, Eds. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. John Wiley and Sons, New York. 1991;115-175.

Lavrinenko A, Scholier T, Bates ST, Miller AN, Watts PC. Defining gut mycobiota for wild animals: a need for caution in assigning authentic resident fungal taxa. *Anim Microbiome*. 2021;3:75.

LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24:160-8.

Leigh M.A. Murray, Katharine Byrne, Richard B. D' Eath Pair-bonding and companion recognition in domestic donkeys, *Equus asinus*. *Applied Animal Behaviour Science*. 2013;143:67-74.

Li Q, Zhang Q, Wang C, Tang C, Zhang Y, Li N, Li J. Fish oil enhances recovery of intestinal microbiota and epithelial integrity in chronic rejection of intestinal transplant. *PLoS One*. 2011;6:e20460.

Li Y, Fan Y, Shaikh AS, Wang Z, Wang D, Tan H. Dezhou donkey (*Equus asinus*) milk a potential treatment strategy for type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2020;246:112221.

Liu G, Bou G, Su S, Xing J, Qu H, Zhang X, Wang X, Zhao Y, Dugarjaviin M. Microbial diversity within the digestive tract contents of Dezhou donkeys. PLoS One. 2019;14:e0226186.

Liu H, Zhao X, Han X, Xu S, Zhao L, Hu L, Xu T, Zhao N, Zhang X, Chen D, He F, Chen X. Comparative study of gut microbiota in Tibetan wild asses (*Equus kiang*) and domestic donkeys (*Equus asinus*) on the Qinghai-Tibet plateau. PeerJ. 2020;8:e9032.

Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, Brady A, Creasy HH, McCracken C, Giglio MG, McDonald D, Franzosa EA, Knight R, White O, Huttenhower C. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. Nature. 2017;550:61-66.

Mach N, Midoux C, Leclercq S, Pennarun S, Le Moyec L, Rué O, Robert C, Sallé G, Barrey E. The first horse gut microbiome gene catalog reveals that rare microbiome ensures better cardiovascular fitness in endurance horses bioRxiv. 2022. doi:10.1101/2022.01.24.477461.

Malacarne M, Criscione A, Franceschi P, Bordonaro S, Formaggioni P, Marletta D, Summer A. New Insights into Chemical and Mineral

Composition of Donkey Milk throughout Nine Months of Lactation. *Animals (Basel)*. 2019;9:1161.

Mamun MAA, Sandeman M, Rayment P, Brook-Carter P, Scholes E, Kasinadhuni N, Piedrafita D, Greenhill AR. Variation in gut bacterial composition is associated with *Haemonchus contortus* parasite infection of sheep. *Anim Microbiome*. 2020;2:3.

Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31.

Marrs T, Jo JH, Perkin MR, Rivett DW, Witney AA, Bruce KD, Logan K, et al. Gut microbiota development during infancy: Impact of introducing allergenic foods. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147:613-621.e9.

Martinez-Guryn K, Leone V, Chang EB. Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2019;26:314-324.

Martini M, Altomonte I, Tricò D, Lapenta R, Salari F. Current Knowledge on Functionality and Potential Therapeutic Uses of Donkey Milk. *Animals (Basel)*. 2021;11:1382.

McGorum BC, Chen Z, Glendinning L, Gweon HS, Hunt L, Ivens A, Keen JA, Pirie RS, Taylor J, Wilkinson T, McLachlan G. Equine grass sickness (a multiple systems neuropathy) is associated with alterations in the gastrointestinal mycobiome. *Anim Microbiome*. 2021;3:70.

McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*. 2013;8:e61217.

Medhammar E, Wijesinha-Bettoni R, Stadlmayr B, Nilsson E, Charrondiere UR, Burlingame B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *J Sci Food Agric*. 2012;92:445-74.

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017;81:e00036-17.

Ministero della Salute. Interventi Assistiti con gli Animali (IAA). 2015. [www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_opuscoliPoster\\_276\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_opuscoliPoster_276_allegato.pdf)



Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13:79.

Mueller PJ, Protos P, Houpt KA, Van Soest PJ. Chewing behavior in the domestic donkey (*Equus asinus*) fed fibrous forage. *Applied animal behaviour science.* 1998;60:241.

Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, Stewart CJ, Metcalf GA, Muzny DM, Gibbs RA, Ajami NJ, Petrosino JF. The gut microbiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome.* 2017; 5:153.

Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech.* 2015;8:1-16.

O' Donnell MM, Harris HMB, Ross RP, O'Toole PW. Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *Microbiologyopen.* 2017;6:e00509.

O'Hara E, Neves ALA, Song Y, Guan LL. The role of the gut microbiome in cattle production and health: driver or passenger? *Annu Rev Anim Biosci.* 2020;8:1999-2220.

Ogilvie LA, Jones BV. The human gut virome: a multifaceted majority. *Front Microbiol.* 2015;6:918.

Pascoe EL, Hauffe HC, Marchesi JR, Perkins SE. Network analysis of gut microbiota literature: an overview of the research landscape in non-human animal studies. *ISME J.* 2017;11:2644-51.

Pérez JC. Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance. *Int J Med Microbiol.* 2021;311:151490.

Polidori P, Vincenzetti S. Farm Management and Feeding Strategies for Donkey Milk Production. In: Gorawala P, Mandhatri S, Eds. *Agricultural Research Updates.* Nova Science Publishers. 2017:93-111.

Qian XB, Chen T, Xu YP, Chen L, Sun FX, Lu MP, Liu YX. A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and

bioinformatics analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133:1844-55.

Ragonnaud E, Biragyn A. Gut microbiota as the key controllers of "healthy" aging of elderly people. *Immun Ageing*. 2021;18:2.

Ren Z, Cui G, Lu H, Chen X, Jiang J, Liu H, He Y, Ding S, Hu Z, Wang W, Zheng S. Liver ischemic preconditioning (IPC) improves intestinal microbiota following liver transplantation in rats through 16s rDNA-based analysis of microbial structure shift. *PLoS One*. 2013;8:e759.

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*.2019;7:14.

Rodrigues Hoffmann A, Proctor LM, Surette MG, Suchodolski JS. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet Pathol*. 2016;53:10-21.

Rodríguez N, Whitfield-Cargile CM, Chamoun-Emanuelli AM, Hildreth E, Jordan W, Coleman MC. Nasopharyngeal bacterial and fungal microbiota in normal horses and horses with nasopharyngeal cicatrix syndrome. *J Vet Intern Med.* 2021;35:2897-2911.

Roggenbuck M, Sauer C, Poulsen M, Bertelsen MF, Sørensen SJ . The giraffe (*Giraffa camelopardalis*) rumen microbiome. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014;90:237-46.

Salimei E, Fantuz F. Equid milk for human consumption, *International Dairy Journal.* 2012;24:130-42.

Santus W, Devlin JR, Behnsen J. Crossing Kingdoms: How the Mycobiota and Fungal-Bacterial Interactions Impact Host Health and Disease. *Infect Immun.* 2021;89:e00648-20.

Sedighi M, Razavi S, Navab-Moghadam F, Khamseh ME, Alaei-Shahmiri F, Mehrtash A, Amirmozafari N. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microb Pathog.* 2017;111:362-69.

Skalski JH, Limon JJ, Sharma P, Gargus MD, Nguyen C, Tang J, Coelho AL, Hogaboam CM, Crother TR, Underhill DM. Expansion of commensal fungus *Wallemia mellicola* in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. PLoS Pathog. 2018;14:e1007260.

Souroullas K, Aspri M, Papademas P. Donkey milk as a supplement in infant formula: Benefits and technological challenges. Food Res Int. 2018;109:416-25.

Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. BMJ. 2018;361:2179.

Vincenzetti S, Santini G, Polzonetti V, Pucciarelli S, Klimanova Y, Polidori P. Vitamins in Human and Donkey Milk: Functional and Nutritional Role. Nutrients. 2021;13:1509.

Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, Carlsson CM, Asthana S, Zetterberg H, Blennow K, Bendlin BB, Rey FE. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. Sci Rep. 2017;7:13537.

Wei S, Mortensen MS, Stokholm J, Brejnrod AD, Thorsen J, Rasmussen MA, Trivedi U, Bisgaard H, Sørensen SJ. Short- and long-term impacts of azithromycin treatment on the gut microbiota in children: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *EBioMedicine*. 2018;38:265-272.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. 1990;315-322.

Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. 2016. <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Wieërs G, Verbelen V, Van Den Driessche M, Melnik E, Vanheule G, Marot JC, Cani PD. Do Probiotics During In-Hospital Antibiotic Treatment Prevent Colonization of Gut Microbiota With Multi-Drug-Resistant Bacteria? A Randomized Placebo-Controlled Trial Comparing *Saccharomyces* to a Mixture of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces*. *Front Public Health*. 2021;8:578089.

Xing J, Liu G, Zhang X, Bai D, Yu J, Li L, Wang X, Su S, Zhao Y, Bou G, Dugarjaviin M. The Composition and Predictive Function of the Fecal

Microbiota Differ Between Young and Adult Donkeys. *Front Microbiol.* 2020;11:596394.

Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics.* 2014;30:614-20.

Zhang C, Zhang C, Wang Y, Du M, Zhang G, Lee Y. Dietary Energy Level Impacts the Performance of Donkeys by Manipulating the Gut Microbiome and Metabolome. *Front Vet Sci.* 2021;8:694357.

Zoelzer F, Burger AL, Dierkes PW. Unraveling differences in fecal microbiota stability in mammals: from high variable carnivores and consistently stable herbivores. *Anim Microbiome.* 2021;3:77.

## 8. Ulteriori letture

- [1] <https://www.agraria.org/>
- [2] <https://www.asinomania.com/2021/01/05/lasino-dalle-stalle-alle-stelle/>
- [3] <https://www.corasher.it/2021/07/14/asino-ragusano-nella-storia/>
- [4] <http://www.aia.it/CMSContent/DM%20RA%20modifiche%20disc%20e%20norme%20tecniche%202012-Asino%20viterbese-knabstrupper.pdf>
- [5] <https://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/u%252Fn%252Fi%252FD.6c73301b1c39c8244882/P/BLOB%3AID%3D9580/E/pdf>
- [6] <https://www.thedonkeysanctuary.org.uk/>



## **9. Ringraziamenti**

Si ringrazia il Prof. Alessandro Zumbo, mio tutor dottorale per il costante supporto durante l'elaborazione di questo progetto.

Si ringrazia, inoltre, il Dipartimento di Scienze Veterinarie e il Coordinatore del corso di Dottorato, la Prof.ssa Rosaria Laurà per l'impegno e la disponibilità mostrata alla prosecuzione del dottorato.

Si ringrazia il Prof. Enrico D'alessandro per la disponibilità mostrata nell'arco del triennio.

Si ringrazia inoltre la Dot.ssa Cristina Cravana per la grande disponibilità mostrata nell'arco del triennio.

Si ringrazia il laboratorio di "Genetica", afferente al Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali (ChiBioFarAm), in particolar modo il Prof. Orazio Romeo per supporto umano e l'indispensabile contributo tecnico scientifico, e il Prof. Giuseppe Criseo per il continuo supporto umano e scientifico.

Si ringrazia il Dott. Letterio Giuffrè per il contributo umano e tecnico fornito.