

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005),
Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale"



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

Coordinatore: Chiar.mo Prof. F. Fazio

Curriculum: Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

**Caratterizzazione del microbiota fecale di suini di razza Nero
Siciliano alimentati con integrazione di siero di latte liquido fresco**

Tesi di:

Dott. Giuseppe Tardiolo

Docente Tutor:

Chiar.mo Prof. A. Zumbo

XXXV CICLO

Indice

1. Introduzione

- 1.1 Il suino di razza Nero Siciliano
- 1.2 Il microbiota intestinale
- 1.3 Struttura, funzioni e successione ecologica del microbiota intestinale suino
- 1.4 La metagenomica e l'approccio bioinformatico

2. Scopo del Lavoro

3. Materiali e Metodi

- 3.1 Management degli animali e disegno sperimentale dello studio
- 3.2 Protocolli per il campionamento delle feci e per la preparazione delle librerie per il sequenziamento su piattaforma Illumina
- 3.3 Pipeline per analisi statistica e bioinformatica

4. Risultati

- 4.1 Performance di crescita degli animali
- 4.2 Controllo di qualità delle sequenze
- 4.3 Composizione tassonomica del microbiota fecale
- 4.4 Correlazione della diversità microbica con le condizioni di alimentazione e con i punti temporali
- 4.5 Analisi differenziale dell'abbondanza dei generi microbici

5. Discussioni

6. Conclusioni

7. Bibliografia

8. Ringraziamenti

Abstract

Nel panorama scientifico lo studio del microbiota rappresenta un campo di ricerca di rilevante interesse in considerazione della sua importanza in molteplici processi fisiologici. Tra questi, il microbiota è coinvolto nella protezione contro agenti patogeni, nell'educazione del sistema immunitario e nella modulazione dello sviluppo del tratto gastrointestinale. In questo specifico settore la ricerca scientifica ha registrato una rapida ascesa, favorita dal superamento dei limiti tecnologici della microbiologia classica, attraverso la messa a punto di piattaforme per il sequenziamento di nuova generazione che hanno consentito lo studio simultaneo ad alta risoluzione delle comunità di microbiche. Il presente lavoro di tesi di dottorato si inquadra in un progetto di ricerca PON industriale e si è focalizzato sulla caratterizzazione del microbiota fecale di undici suini di razza Nero Siciliano alimentati con una dieta integrata con siero di latte liquido fresco utilizzando un approccio di metagenomica. L'alimentazione liquida rappresenta una pratica alternativa impiegata nell'allevamento suinicolo che consente sia il recupero di sottoprodotti liquidi a basso costo sia la riduzione dell'impatto ambientale. Questo tipo di alimentazione può influenzare positivamente la salute intestinale, il benessere e le prestazioni degli animali. In tale contesto, il siero di latte liquido, oltre ad essere un mangime appetibile, può rappresentare una risorsa per somministrare ingredienti funzionali per migliorare la salute dell'intestino, senza richiedere ulteriori processi di lavorazione a valle. Nel disegno sperimentale dello studio, cinque suini sono stati assegnati al gruppo di controllo e alimentati con una formulazione standard di mangime, mentre sei suini sono stati assegnati al gruppo sperimentale e alimentati con lo stesso mangime integrato con siero di latte liquido fresco. I campioni fecali sono stati raccolti da ogni individuo in diversi punti temporali, ovvero prima della somministrazione della dieta sperimentale (T0), e uno (T1) e due (T2) mesi dopo l'inizio della co-alimentazione. L'analisi tassonomica, basata sulla regione V3-V4 dell'rRNA batterico 16S, ha mostrato che le feci dei suini oggetto dello studio sono popolate da una complessa comunità microbica con una notevole abbondanza dei phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Spirochaetes* e dei generi *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Treponema*. Gli indici di *alfa* e *beta* diversity hanno rivelato che la dieta sperimentale non ha influenzato in

modo significativo la diversità microbica complessiva del microbiota fecale. Tuttavia, l'analisi differenziale dell'abbondanza, a livello di genere, dei punti temporali, ha rivelato una variazione significativa per diversi generi batterici, suggerendo così che la dieta sperimentale ha potenzialmente influenzato nel tempo l'abbondanza di alcuni generi batterici benefici della comunità microbica.

The study of the gut microbiome is considered a relevant tool due to the impact of this research field on host health, well-being and growth. In this field, the research has shown a rapid increase favoured by overcoming the technological limits of classical microbiology through the development of next-generation sequencing platforms that allowed the simultaneous study at a high resolution of the microbial communities. The present PhD thesis is part of an industrial PON research project aimed at characterizing the faecal microbiota profile of Nero Siciliano pigs after a dairy co-feed integration. Liquid feeding is an alternative practice employed in swine production that allows the recovery of low-cost liquid by-products to reduce the environmental impact. This type of feeding can positively affect an animal's gut health, well-being and performance. Liquid whey is a palatable feed, representing a resource to administer ingredients without additional costly processes. In this view, this study investigated the faecal microbiota of eleven pigs belonging to the Nero Siciliano breed after a liquid whey co-feed supplemented diet using a metagenomics approach. The administration of by-products as animal feed, especially in swine production, is a strategy to provide functional ingredients to improve gut health. Therefore, to explore the potential effect of a liquid whey-supplemented diet on the faecal microbiota, five pigs were assigned to the control group and fed with a standard formulation feed, and six pigs to the experimental group fed with the same feed supplemented with fresh liquid whey. Faecal samples were collected from each individual before the experimental diet (T0) and one (T1), and two (T2) months after the beginning of the co-feed integration. Taxonomic analysis based on the V3–V4 region of the bacterial 16S rRNA showed that pig faeces were populated by a complex microbial community with a remarkable abundance of *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Spirochaetes* phyla and *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Clostridium* and *Treponema* genera. Alpha and beta diversity values suggested that the experimental diet did not significantly affect the general faecal microbiota diversity. However, time points differential abundance analysis revealed significant variation for several bacterial genera, thus suggesting that the experimental diet potentially affected some genera of the microbial community over time.

1. Introduzione

1.1 Il suino di razza Nero Siciliano

Il suino Nero Siciliano è una delle sei razze suine autoctone italiane e viene allevato in Sicilia prevalentemente secondo il sistema “*en plein air*” nell’area dei Monti Nebrodi e delle Madonie. Questo animale è caratterizzato da un elevato tasso di rusticità ed è capace di vivere e riprodursi nei boschi più fitti e impervi nutrendosi di ciò che la natura offre. Tracce storiche come resti fossili e antichi testi scritti, ne rivelano la presenza in Sicilia sin dal periodo di dominazione greco e cartaginese (VII-VI secolo a.C.). Ciononostante, ancora oggi non esiste una ipotesi condivisa sull’origine ed evoluzione di questa razza. Infatti, l’origine di quella che viene definita popolazione Indigena Siciliana trova riscontro in molte ipotesi discordanti. Secondo alcune ricerche questa popolazione suina avrebbe origine da razze autoctone da cui, nel corso del tempo, si sarebbe ottenuta un’unica varietà suina (detta di Calascibetta), come suggerito da Romolotti nel 1929. Secondo il Faelli (1928), il suino Nero Siciliano deriverebbe da individui di razza napoletana introdotti in Sicilia. Al contrario, il Montanaro (1939), basandosi su criteri morfologici, identificò questa razza come rappresentante del biotipo morfologico dolicocefalo presente in Europa meridionale, discendente del suino tipo Iberico del Sanson. Il consistente numero di razze indigene anticamente registrate in Sicilia dipendeva probabilmente da una morfologia territoriale diversa rispetto a quella attuale, in quanto caratterizzata da una maggiore densità boschiva anche a livello delle zone più esterne dell’isola (Chicoli, 1870). Successivamente, la graduale riduzione delle aree boschive ha determinato la mancanza di numerose aree per il pascolo destinate all’allevamento degli animali allo stato brado o semi brado, con una conseguente diminuzione degli esemplari di suini autoctoni. La crescente riduzione del numero di esemplari di questa razza ha condotto la FAO a includere il Nero Siciliano nelle razze suine a rischio di estinzione. Tuttavia, per prevenire una graduale scomparsa della razza suina Nero Siciliano e del suo relativo patrimonio genetico, è stato avviato un programma di salvaguardia della biodiversità che, nel 2001, ha portato al riconoscimento della razza ed alla sua conseguente iscrizione nel registro anagrafico delle razze suine autoctone. Inoltre, nel

2003, è stato istituito il “*Consorzio di Tutela Suino Nero dei Nebrodi*”, promosso dall'Associazione Allevatori Regionali Siciliani della provincia di Messina, siti all'interno del Parco Naturale dei Nebrodi. L'attività del Consorzio è finalizzata alla protezione e alla diffusione del suino Nero Siciliano attraverso il riconoscimento della DOP che consente la valorizzazione della sua carne e dei suoi derivati. Secondo il registro anagrafico, figurano circa 13.600 capi, rappresentati da 8.400 scrofe e 90 verri, distribuiti in 135 aziende (ANAS, 2022). Di seguito vengono riportate le caratteristiche tipiche del suino Nero Siciliano per l’inserimento nello Standard di Razza, stabilito dall’ANAS nel Quadro C del Registro dei Tipi Genetici Autoctoni (D.M. 6485 del 30 maggio 2007):

- *morfologia*: colore nero ardesia della cute su cui si impiantano robuste setole nere che sul tratto cervicale, al garrese, sul dorso e sui lombi raggiungono la lunghezza di circa 10 cm, assumendo la forma di una criniera, tanto da ricordare l’aspetto del cinghiale. La testa si presenta con forma allungata con profilo fronto-nasale tendenzialmente dritto, con grugno appuntito e robusto. Le orecchie si presentano mediamente sviluppate e dirette obliquamente in alto con le punte orientate orizzontalmente in avanti. Collo di medio sviluppo, tronco non eccessivamente lungo, depresso ai lati, addome leggermente avallato, linea dorso-lombare convessa, groppa inclinata, arti lunghi robusti, unghie forti tipici dei gran pascolatori. Inoltre, alcuni individui di questa razza sono chiamati “*Faccioli*” per il loro muso parzialmente o totalmente bianco. Nella Tabella 1 sono riportate le informazioni relative alla morfologia corporea del suino Nero Siciliano.

Tabella 1. Tratti morfologici del suino Nero Siciliano adulto.

Tratti morfologici	Verro	Scrofa
Peso corporeo (kg)	150	130
Lunghezza (cm)	102	87
Morfologia dell’orecchio	piccola	piccola
Circonferenza toracica (cm)	127	115
Altezza al garrese (cm)	60-65	60-65

I parametri riportati sono espressi come valore medio.

- *fisiologia*: animale rustico e resistente alle malattie. Sia nei verri che nelle scrofe, la maturità sessuale viene raggiunta a circa 6-8 mesi di vita. Si possono verificare circa due parti l'anno concentrati, maggiormente, a fine inverno e inizio primavera, con circa 7-8 suinetti per parto che, grazie alle cure parentali caratterizzate dal notevole istinto materno della scrofa, arrivano tutti allo svezzamento. Il numero delle mammelle può variare da 10 a 12. I suinetti si alimentano con latte materno fino allo svezzamento, che avviene a circa 60 giorni, in cui iniziano a nutrirsi al pascolo con l'aggiunta di qualche integrazione nel caso di allevamenti più razionali. Il loro accrescimento risulta piuttosto lento. Infatti, al primo anno di età raggiungono mediamente i circa 50-60 kg di peso, presentando una scarsa massa muscolare compensata però da un notevole accumulo di grasso attorno al collo, al garrese, sul dorso e nei lombi. Il ciclo di accrescimento-ingrasso inizia appena dopo lo svezzamento e si prolunga per circa 4-5 mesi, fino ad ottenere soggetti da destinare al consumo diretto quando hanno raggiunto un peso medio di circa 60-70 kg. Per gli individui da destinare alla trasformazione della carne, l'allevamento si protrae per circa altri 4-5 mesi, al fine di ottenere individui aventi peso medio di circa 110 kg.

In precedenza, l'allevamento del Nero Siciliano si basava su metodologie essenzialmente estensive o semi-estensive. Questa tipologia di allevamento prevedeva che l'animale, vivendo libero all'interno dei boschi ricchi di querce, faggi, noccioli e castagni si nutrisse dei relativi frutti e di piccole piante erbacee o di animali. La scelta di questa metodologia di allevamento dipendeva sia dai forti caratteri di rusticità mostrati da questa razza, in grado di procacciarsi il cibo autonomamente in ambienti piuttosto rigidi, sia da una forte propensione al pascolamento, favorita dalla robustezza e dallo sviluppo degli arti e dal particolare temperamento dinamico mostrato da questo animale. Tuttavia, in tempi più recenti, l'allevamento si è orientato verso un sistema di tipo "*en plein air*", ovvero l'allevamento all'aperto in aree recintate le cui dimensioni variano in funzione del numero di individui presenti all'interno (mediamente 10-12 scrofe per ettaro di terreno). Tale approccio prevede, inoltre, l'inserimento in aree in cui gli animali possono liberamente abbeverarsi, alimentarsi, riposarsi e, per le scrofe in gestazione, sono anche previsti dei rifugi in stile capanna in cui poter partorire. Tale sistema di allevamento, garantendo all'animale la possibilità di esprimere i propri comportamenti tipici, ovvero la

possibilità di accedere al pascolo all'interno di un territorio piuttosto vasto in cui potersi procacciare autonomamente il cibo grufolando e socializzando con gli altri individui, determina il mantenimento di elevati standard di benessere dell'animale, consentendo inoltre una maggior razionalizzazione nello sfruttamento del territorio. Gli animali allevati con tale sistema vengono alimentati con una dieta a base di orzo e favino, o con mangime commerciale schiacciato o sotto forma di pellet, oltre a potersi cibare di ciò che la natura offre come ad esempio ghiande, tuberi, frutti di bosco, radici, ecc. Nella Figura 1 sono illustrati individui appartenenti alla razza Nero Siciliano.



(a)



(b)



(c)

Figura 1. Suini di razza Nero Siciliano con diversi colori del mantello rispettivamente verro (a), scrofa (b) e suino detto "facciolo" (c).

Svariate ricerche sono state condotte per mettere in relazione la metodologia di allevamento del Nero Siciliano con le proprietà organolettiche delle relative produzioni (Zumbo et al., 2020). Tali ricerche hanno messo in evidenza un effetto significativo del regime di alimentazione sui livelli di composti volatili in lardo fresco e stagionato (Zumbo et al., 2007a) e sul profilo lipidico del grasso intramuscolare (Zumbo et al., 2007b). A tal proposito, studi condotti su campioni di Salame tipo Sant'Angelo di Brolo derivati da carne di suino Nero Siciliano hanno rivelato che la

caratterizzazione del profilo lipidico mostrava una grande abbondanza di acido oleico (C18:1), seguito dal palmitico (C16:0), dallo stearico (C18:0) e dal linoleico (C18:2) (Mondello et al., 2003). Considerate le notevoli caratteristiche organolettiche mostrate dagli insaccati ottenuti dalla carne del suino Nero Siciliano, in particolar modo dal prosciutto crudo, derivanti dal connubio tra il sistema di allevamento semi estensivo, le particolari tecniche di stagionatura del prodotto, e l'influenza del territorio nebroideo, nel 2018, l'Associazione per la tutela del prosciutto crudo e del salame di suino Nero dei Nebrodi ha presentato una istanza di riconoscimento della DOP per il prosciutto crudo (ai sensi del Reg. (UE) n. 1151/2012 e del D.M. 14 Ottobre 2013, alla Regione Siciliana, UO A5.02, riconoscimento e tutela dei prodotti di qualità).

1.2 Il microbiota intestinale

Nella recente decade è stato registrato un crescente interesse per lo studio del microbiota intestinale, ovvero una comunità complessa e dinamica costituita da specie microbiche che modulano collettivamente lo stato di salute e la fisiologia di una varietà di vertebrati, inclusi essere umani e suini (Cho et Blaser, 2012; Song et al., 2020; Patil et al., 2020). Il maiale domestico (*Sus scrofa domesticus*) è considerato una delle specie zootecniche più importanti al mondo non solo per ragioni storiche, culturali e socio-economiche (McGlone, 2013; Pappas, 2013; Cucchi et al., 2016) o per il valore nutrizionale delle sue carni e dei suoi derivati (Jiménez-Colmenero et al., 2010; Pugliese et Sirtori, 2012), ma anche per il suo ruolo rilevante in campo biomedico (Hryhorowicz et al., 2020). I maiali sono onnivori monogastrici con anatomia, morfologia e fisiologia del tratto digerente simili a quelle umane (Meurens et al., 2012). Questa somiglianza è stata ulteriormente enfatizzata dalla dimostrazione che i microbiomi fecali umani possono essere potenzialmente trapiantati nei maiali, aprendo interessanti prospettive alla generazione di modelli animali realistici del tratto gastrointestinale umano (Zhang et al., 2013). Inoltre, il suino e gli esseri umani mostrano suscettibilità e manifestazioni cliniche simili nei confronti di diversi agenti patogeni responsabili di varie malattie enteriche (Meurens et al., 2012; Zhang et al., 2013; Xiao et al., 2016; Patil et al., 2020). La struttura tassonomica dei microbiomi dei suini è considerata fondamentale per l'allevamento commerciale. Inoltre, l'influenza dei taxa microbici sull'idoneità dell'ospite e sul rischio di malattie può fornire

informazioni rilevanti per promuovere la salute degli animali e migliorare l'efficienza dei mangimi (Yang et al., 2017; Wang et al., 2019). Il microbiota intestinale suino può essere considerato un organo aggiunto con un ruolo cruciale nell'elaborazione dei nutrienti e nella gestione dell'energia ingerita (Xiao et al., 2016; Ramayo-Caldas et al., 2016; Fohse et al., 2016). Diversi studi hanno dimostrato associazioni di profili microbici distinti con parametri nutrizionali e di produttività (Canibe et al., 2005; Mach et al., 2015; Maltecca et al., 2020). In particolare, il microbiota intestinale metabolizza vari componenti alimentari, fornendo nutrienti all'ospite come prodotti finali della fermentazione e altri sottoprodotti, inclusi aminoacidi, vitamine e derivati dell'indolo (Muraca et al., 2015; Feng et al., 2018). Pertanto, il microbiota intestinale rappresenta un ambiente complesso costituito dall'insieme di microorganismi, quali batteri, funghi, virus e protisti, che, nel corso dell'evoluzione, si sono sviluppati ed adattati per colonizzare il tratto intestinale di svariati mammiferi creando, con essi, un mutualistico rapporto simbiotico (Knight et al., 2017). Tale comunità di microbi costituisce uno dei più importanti esempi di biodiversità. Si stima che il tratto digerente umano possa contenere fino a cento trilioni di microbi, a loro volta rappresentati da più di mille specie procariotiche e svariate specie sia eucariotiche che virali (Wekerle, 2017). Tale biodiversità microbica possiede un enorme patrimonio genetico composto approssimativamente da circa 9,9 milioni di geni che, definito con il termine di "*microbioma*", conferisce al suo ospite numerose capacità funzionali coinvolte nel metabolismo energetico, dei farmaci e degli xenobiotici, nel mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale, nella immunomodulazione e nella protezione dai patogeni (Li et al., 2014; Jandhyala et al., 2015). Sebbene tale comunità microbica mostri una particolare ricchezza in diversità di specie microbiche, la maggior parte di queste appartiene a quattro principali phyla batterici ovvero *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* che, nel complesso, arrivano a rappresentare fino al 99,9% delle specie colonizzanti l'apparato digerente (Hillman, 2017). La comunità di microorganismi che popola tale apparato nei mammiferi rappresenta un ecosistema capace di possedere una certa flessibilità e dinamicità. È noto che i distretti anatomici che compongono l'intestino dei mammiferi presentano delle caratteristiche chimico-fisiche specifiche che consentono la colonizzazione al loro interno di un numero variabile di microorganismi e la resilienza di una determinata

comunità microbica in ciascun distretto (Bik, 2009). Tuttavia, durante il ciclo vitale dell'ospite, il microbiota va incontro a condizioni che ne possono alterare la composizione fra cui condizioni legate alla genetica, all'età di sviluppo dell'apparato digerente, alla composizione della dieta, allo stress ed a patologie (Derrien et al., 2019). Svariate ricerche scientifiche nel settore hanno evidenziato che soggetti facenti parte dello stesso nucleo familiare, della stessa età o sottoposti a regime alimentare simile possiedono un profilo microbico intestinale con un elevato grado di similarità (Mitsuoka, 1992; Woodmansey, 2007; Flint et al., 2007; Turnbaugh et Gordon, 2009; Cho et Blaser, 2012; Lynch et Pedersen, 2016). Pertanto, in considerazione del gran numero di funzioni a cui il microbiota prende parte, appare evidente che il corretto funzionamento dell'apparato intestinale e, più in generale, il benessere dell'organismo siano correlati anche dal mantenimento dell'equilibrio ottimale del microbiota intestinale. Condizioni che comportano l'alterazione di questo delicato equilibrio possono dar luogo ad una condizione definita *disbiosi*, la quale sembrerebbe associata allo sviluppo di numerose patologie fra cui malattie infiammatorie intestinali croniche (Sheehan et Shanahan, 2017), steatosi epatica (Chassaing et al., 2014), obesità (Harakeh et al., 2016), diabete di tipo 2 (Sabatino et al., 2017), artrite reumatoide (Scher et Abramson, 2011), cancro (Bhatt et al., 2017), autismo (Mangiola et al., 2016), malattie cardiovascolari (Tang et al., 2017), renali (Armani et al., 2017), respiratorie (Shukla et al., 2017), della pelle (Williams et Gallo, 2015) ed allergie di vario tipo tra cui quelle alimentari (Blázquez et Berin, 2017). Il microbiota intestinale del suino, considerato molto vicino all'uomo, espleta numerose funzioni tra cui il miglioramento del metabolismo energetico, partecipa alla produzione di acidi grassi volatili, è coinvolto nella produzione di vitamina K, fermenta la cellulosa e, colonizzando le mucose intestinali, contrasta la resilienza e la proliferazione di batteri patogeni (Kim et Isaacson, 2012; Kim et Isaacson, 2015; Yang et al., 2017). La comprensione delle funzionalità poste in essere dal microbiota intestinale ha consentito la messa a punto di regimi alimentari o di integratori in grado di migliorare il benessere e le prestazioni dell'animale in tutte le diverse fasi di vita (Aluthge et al., 2019). In questa prospettiva, il miglioramento delle prestazioni dell'animale passerà attraverso una tipologia di allevamento razionale, volto a favorire la colonizzazione di

una comunità microbica stabile compatibile con il mantenimento del benessere dello stesso e, inoltre, in grado di soddisfare le esigenze di produzione degli allevatori.

1.3 Struttura, funzioni e successione ecologica del microbiota intestinale suino

Alla nascita dei suinetti, la colonizzazione dell'apparato gastroenterico ha luogo a seguito della naturale esposizione degli stessi ai microrganismi ambientali, o mediata attraverso il latte materno o il contatto con le feci della scrofa (Conway, 1997). In tale distretto corporeo, le specie colonizzatrici pioniere appartengono generalmente ai generi *Clostridium*, *Streptococcus* e alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Konstantinov et al., 2006; Petri et al., 2010; Fohse et al., 2016), le quali si insediano in un lasso di tempo brevissimo (entro circa 12 ore raggiungono 10⁹ CFU/grammo di colon) (Sword et al., 1993; Jensen et al., 1998). L'insediamento di tale comunità microbica instaura una vivace attività metabolica che esaurisce tutto l'ossigeno ivi presente rendendo pertanto l'ambiente anossico (Konstantinov et al., 2006; Petri et al., 2010; Fohse et al., 2016). Tale riduzione del contenuto di ossigeno si verifica entro circa tre giorni dal parto e sembrerebbe determinante nel promuovere la prima modifica della comunità microbica residente, dando luogo così a una sostituzione di gran parte della prima flora caratterizzata da microorganismi anaerobi facoltativi appartenenti principalmente ai generi *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacteroides* e *Lactobacillus* (Konstantinov et al., 2006; Petri et al., 2010; Fohse et al., 2016). Tale successione microbica avverrebbe in tutti i principali distretti del tratto gastrointestinale del suino, risultando fortemente associata ad una dieta a base di latte materno a cui i suinetti (detti anche lattoni) sono sottoposti (Petri et al., 2010). I fattori fondamentali nella selezione di un "core" microbico e nella diversificazione dello stesso sono attribuibili al regime alimentare a base di latte materno con cui i suinetti vengono alimentati durante il periodo dello svezzamento (Bian et al., 2016). Tuttavia, tale periodo ha inizio dopo circa tre/quattro settimane dalla nascita dei suinetti, il che comporta la variazione del regime alimentare dove l'introduzione di una dieta basata su alimenti solidi sostituisce di fatto la lattazione. L'evento dello svezzamento rappresenta per i suinetti un evento particolarmente traumatico soprattutto all'interno di un allevamento intensivo. Nel post svezzamento i suinetti vanno incontro a enormi fattori di stress evidenziati dall'innalzamento della frequenza

cardiaca e dall'aumento della secrezione di ormoni e peptidi sensibili allo stress che sono causati dal distacco precoce dalla madre, dal trasporto e dall'inserimento in un nuovo ambiente di allevamento (Melotti et al., 2011; Campbell et al., 2013; Sutherland et al., 2014). La combinazione di tali fattori insieme all'introduzione di una dieta basata su alimenti solidi, causano una perdita delle prestazioni del suino in svezzamento che può andare incontro ad un periodo di anoressia, di digiuno, di infiammazione del piccolo intestino, di riduzione del calibro dei villi intestinali e ad una aumentata permeabilità intestinale (Gresse et al., 2017). Tutti questi avvenimenti influenzano significativamente anche la composizione del microbiota intestinale (Lallès et al., 2007). In letteratura è stato documentato come il periodo di svezzamento contribuisca ad un sostanziale cambiamento del microbiota intestinale che, a livello di phylum, si evidenzia in una netta inversione dell'abbondanza dei *Bacteroidetes* rispetto ai *Firmicutes*. Infatti, se prima dello svezzamento l'abbondanza di questi ultimi può attestarsi intorno al 54%, dopo lo svezzamento l'abbondanza dei *Firmicutes* può raggiungere il 35,8% mentre quella dei *Bacteroidetes* può salire al 54% (Pajarillo et al., 2014). Di contro, Hinkle e colleghi (2012) descrivono una dinamica microbica inversa. Infatti, in base ai loro studi, i *Firmicutes* rappresentano il phylum più abbondante in tutte le fasi di vita dalla lattazione fino alla maturità, con un rilevante incremento durante lo svezzamento (87%). Viceversa, i *Bacteroidetes* mostrano una maggiore abbondanza durante il periodo di lattazione (26,4%), con una diminuzione successivamente allo svezzamento (14%) (Hinkle et al., 2012). Inoltre, la sostituzione con una dieta basata su alimenti solidi con conseguente abbandono del latte materno comporta un cambiamento del microbiota anche a livello di genere. Durante questo passaggio si verifica una graduale diminuzione dell'abbondanza dei generi *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Dorea*, *Blautia* e *Bacteroides* e ad un incremento dei generi *Clostridium* e *Prevotella* (Pajarillo et al., 2014). Tale cambiamento nella composizione microbica sembrerebbe dipendere dal nuovo regime alimentare a cui i suinetti vanno incontro. Infatti, il genere *Bacteroides* appare particolarmente abile nel metabolizzare monosaccaridi e oligosaccaridi provenienti dal latte materno, mentre microrganismi appartenenti al genere *Prevotella* risultano particolarmente abili nella digestione di composti ottenuti da una dieta ricca in derivati vegetali (Hayashi et al., 2007; De Filippo et al., 2010; Lamendella et al., 2011; Hinkle et al., 2012; Simpson et

Campbell, 2015). Uno studio longitudinale condotto in diverse fasi dalla nascita al raggiungimento della taglia commerciale, volto a caratterizzare il microbiota intestinale dei diversi tratti dell'apparato digerente, ha riportato un forte cambiamento del microbiota in ogni distretto analizzato durante il periodo di svezzamento. In particolare, a 21 giorni dalla nascita nel colon si assiste ad un forte incremento della classe dei *Bacteroidales*, del genere *Prevotella*, e della famiglia *Ruminococcaceae* e, parallelamente, ad una forte diminuzione dell'abbondanza relativa della famiglia delle *Lachnospiraceae*, del genere *Dorea*, e della specie *Lactobacillus mucosae* rispetto a 10 giorni post partum (De Rodas et al., 2018). Post svezzamento, gli autori riportano un forte incremento dei generi *Prevotella*, *Coprococcus*, *Blautia*, *Roseburia*, *Lactobacillus*, *Campylobacter* e *Faecalibacterium* e una forte riduzione dei generi *Bacteroides*, *Oscillospira*, *Escherichia-Shigella*, *Clostridium* e *Desulfovibrio* (De Rodas et al., 2018). Questa seconda comunità microbica si manterrà costante fino al passaggio degli animali alla fase adulta, in cui alla dieta verranno introdotte una maggiore quantità di proteine di origine vegetale a dispetto di una diminuzione delle proteine da fonti animali (Aluthge et al., 2019). Questa variazione di regime alimentare determina un arricchimento medio del contenuto di microrganismi appartenenti al genere *Streptococcus* (Leser et al., 2002). Al raggiungimento della maturità somatica da parte degli animali, ovvero a circa 60-90 giorni post parto, le diverse comunità microbiche che popolano le regioni dell'apparato digerente del suino tenderanno ad assestarsi e subiranno normali variazioni dipendenti da fattori prettamente estrinseci (Ewing et Cole, 1994). Chiaramente, anche i fattori individuali permetteranno lo sviluppo di una comunità microbica specifica da soggetto a soggetto. Le differenti condizioni presenti in ogni distretto che costituisce l'apparato digerente selezionano sicuramente una determinata comunità microbica resiliente (Kim et Isaacson, 2012). Le comunità microbiche presenti a circa 77 giorni dalla nascita colonizzanti il colon e il ceco risultano entrambe dominate da *Bacteroidetes* e *Firmicutes* che insieme rappresentano più del 90% della flora totale. Al contrario, a livello dell'ileo, le condizioni chimico fisiche favoriscono l'insediamento di batteri appartenenti al phylum dei *Firmicutes*, che da soli superano il 90% delle specie totali (Kim et Isaacson, 2012). Nell'ileo si assiste a una tendenza simile a quella osservata da Kim et Isaacson

(2012), dove a circa 84 giorni dalla nascita ceco e colon mostrano una differenza nell'abbondanza dei *Bacteroidetes*, maggiore nel ceco piuttosto che nel colon (Looft et al., 2014). Tale differenza è collegata ad una maggiore abbondanza dei generi *Anaerobacter* e *Turicibacter* nel ceco, al contrario nel colon si assiste ad un incremento dei generi *Succinivibrio*, *Oscillibacter* e *Prevotella* (Looft et al., 2014). Uno studio condotto sul suino Iberico, animale con molte caratteristiche simili al suino Nero Siciliano, ha riportato una caratterizzazione tassonomica dei vari distretti anatomici dell'apparato digerente, evidenziando che nel duodeno e nel digiuno i generi più abbondanti erano quelli dei *Clostridium* e *Lactobacillus*. Al contrario, nell'ileo è stata osservata una maggiore abbondanza di microrganismi appartenenti al genere *Streptococcus* e alla famiglia delle *Clostridiaceae*. Nel colon, il genere *Prevotella* risultava quello più abbondante (Crespo-Piazuelo et al., 2018). In un altro studio condotto nei suini, Ramayo-Caldas et al. (2016) hanno osservato che dopo circa 60 giorni dal parto l'apparato digerente era popolato principalmente da due enterotipi microbici: il primo dominato dai generi batterici *Prevotella* e *Mitsuokella*, mentre il secondo dai generi dominanti *Ruminococcus* e *Treponema*. Tali enterotipi sono rispettivamente coinvolti nel metabolismo degli amminoacidi e del butirrato e nell'attivazione di percorsi metabolici inseriti nel metabolismo dei carboidrati (Ramayo-Caldas et al., 2016). Uno studio condotto da Lu et al. (2018) ha analizzato la comunità microbica in tre differenti stadi (allo svezzamento, a quindici settimane post svezzamento e durante la fase adulta), evidenziando che ciascun periodo mostra due enterotipi fase specifici, nessuno dei quali in comune con quanto descritto da Ramayo-Caldas et al. (2016). Nello stesso studio condotto da Lu et al. (2018) è stato osservato che durante lo svezzamento i suinetti hanno evidenziato due enterotipi definiti A e B differenziati dall'abbondanza di 41 generi, in particolare i generi *Clostridium* e *Prevotella* mostravano un'abbondanza differenziale rispettivamente negli enterotipi A e B. Inoltre, a quindici settimane post svezzamento e durante la fase adulta, la comunità microbica risultava rappresentata da quattro enterotipi distinti (C-D-E-F), due per ciascun periodo in analisi. Gli enterotipi C-D evidenziati dopo 15 settimane post svezzamento e quelli E-F presenti alla fine del periodo di monitoraggio dei suini si differenziavano per l'abbondanza specifica di 24 e 26 generi rispettivamente. In particolare, gli enterotipi C-D erano dominati dai generi *Clostridium* e *Turicibacter*,

viceversa gli enterotipi E-F mostravano una maggiore prevalenza dei generi *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

Alla luce di quanto descritto, in aggiunta alla descrizione del microbiota a livello tassonomico, sono state condotte ricerche inerenti alla caratterizzazione del patrimonio genico del microbiota e delle sue potenzialità funzionali. Tali potenzialità metaboliche espresse dal microbiota variano in funzione della sua stessa composizione a causa della maggiore predisposizione di particolari gruppi di microorganismi a metabolizzare specifici substrati. Diversi studi hanno evidenziato che la struttura in termini di composizione del microbiota intestinale del suino sembrerebbe influenzare le performance dell'animale producendo variazioni nell'aumento del peso medio e all'efficienza di conversione alimentare (Mach et al., 2015; Ramayo-Caldas et al., 2016). Il patrimonio genico che è alla base di questo potenziale metabolico è stato descritto globalmente in uno studio condotto su 287 suini provenienti da Francia, Danimarca e Cina che ha permesso di caratterizzare un patrimonio genico composto da 7.7 milioni di geni non ridondanti, codificanti proteine coinvolte in 6143 funzioni differenti (Xiao et al., 2016). Circa il 96% dei geni descritti da Xiao e colleghi e il 50% dei relativi pathway sono stati riscontrati anche nel microbioma umano, a dimostrazione dell'elevato grado di similarità mostrato da queste due specie di mammiferi (Xiao et al., 2016). Questo enorme capacità funzionale influenza anche la produttività animale. Infatti, Yang e colleghi, in un lavoro comparativo fra gruppi di suini che mostravano differenti performance alimentari, hanno identificato un totale di 3.452.610 differenti open reading frame di cui 4327 associate a geni coinvolti in 329 differenti pathway metabolici, di questi 18 risultavano associati a una migliore efficienza alimentare (Yang et al., 2017).

1.4 La metagenomica e l'approccio bioinformatico

La metagenomica è una scienza omica che studia simultaneamente comunità complesse di microorganismi presenti in un campione, evitando la crescita su terreni selettivi. Come è noto, la crescita su terreni di coltura permette di identificare circa l'1-3% dei microorganismi realmente presenti in campioni naturali, perdendo il 97-99% dell'informazione (Hugenholtz et al., 1998; Gordon, 2012), a causa delle loro particolari condizioni di crescita, come nutrienti specifici e condizioni di anaerobiosi. Il

superamento delle tecniche di microbiologia classica volte ad identificare i microorganismi prevede l'uso del DNA genomico totale estratto da una matrice di varia natura e il sequenziamento del 16S rDNA. In questo modo è possibile studiare le comunità batteriche che popolano habitat differenti. L'analisi metagenomica, che permette l'analisi simultanea di una comunità di microorganismi, ha reso possibile l'identificazione di ogni singolo microorganismo facente parte di tale comunità ma, soprattutto, permette di studiare come i vari microorganismi interagiscano tra loro e con l'ambiente e, non in ultimo, di studiare le funzioni specifiche di quella comunità. I campi di applicazione della metagenomica sono numerosi e possono spaziare dall'ambito ecologico, all'agro-alimentare e a quello igienico-sanitario.

Gli studi condotti nel campo della metagenomica descrivono la composizione delle comunità batteriche presenti, le interazioni tra di esse e con l'ambiente circostante o l'organismo che le ospita, al fine di comprendere il significato dei complessi processi biologici di cui fanno parte. L'avvento dei sequenziatori di nuova generazione ha permesso di ottenere una enorme mole di dati che ha ampliato enormemente le conoscenze riguardanti il microbiota intestinale e delle relative interazioni fra i microorganismi che lo costituiscono (Malla et al., 2019).

Le tecniche di sequenziamento di next-generation sono in continua evoluzione e sono state descritte in diversi studi (Shendure et al., 2008; Munroe et al., 2010). Il sequenziamento di sintesi è alla base di queste nuove tecnologie e prevede che i frammenti di DNA siano amplificati in clusters, denaturati e distribuiti in microarrays o in micropiastre che sono introdotte in una cella di flusso dove hanno luogo le reazioni di sequenziamento. Un primer è esteso ciclicamente da uno o alcuni nucleotidi alla volta e la sequenza è letta ad ogni fase della sintesi del DNA. Questa strategia differisce dal metodo di Sanger in cui un'intera gamma di copie parziali di molecole di DNA sono prima sintetizzate e poi analizzate. I vari metodi differiscono nella strategia usata per amplificare le sequenze, nella chimica usata e nella lunghezza delle stesse. Tuttavia, hanno però in comune la possibilità di sequenziare fino a svariati milioni di frammenti di DNA in parallelo (Delsenya et al., 2010). Come già accennato, i vantaggi derivanti dalle piattaforme di next-generation sequencing sono molteplici. Innanzitutto l'aumento di produttività, le macchine più moderne arrivano a una produttività maggiore di 100 Gbp per corsa, a confronto di 70-100 kbp delle prime

macchine di sequenziamento automatiche (Metzker, 2010). Questa capacità è stata incrementata grazie al sequenziamento in parallelo di centinaia di migliaia o milioni di campioni. Il secondo vantaggio è dato dall'eliminazione delle fasi di clonaggio antecedenti il sequenziamento, ora sostituiti con una semplice ligazione degli adattatori specifici e successiva amplificazione, quest'ultima eliminata a sua volta in alcune tecniche di sequenziamento più recenti che permettono così di ridurre ulteriormente gli errori introdotti dalla PCR. La riduzione del volume di reazione e la possibilità di sequenziare in parallelo hanno anche ridotto i volumi dei reagenti richiesti e quindi i costi. Nel loro insieme, le tecnologie di next-generation sequencing hanno semplificato la strategia di sequenziamento, ridotto gli artefatti, aumentato la velocità alla quale può essere sequenziato un genoma e ridotto il costo di sequenziamento di molti ordini di grandezza, permettendo così di analizzare molti più campioni. Dall'altra parte però troviamo anche per queste tecnologie all'avanguardia degli svantaggi e delle limitazioni che non ne permettono l'uso per ogni tipo di campione. Il primo punto a sfavore è la produzione di sequenze corte, questo implica la produzione di errori dal momento che nel genoma si incontrano sequenze ripetute e si ha la necessità di aumentare la copertura per assicurarsi di non compiere errori. Altra questione è la costruzione delle librerie, sebbene sia stata superata la fase di clonaggio con la produzione di librerie a inserto variabile, esistono ancora dei passaggi fondamentali ove è possibile il verificarsi di errori durante la frammentazione, il legame con gli adattatori, la purificazione, l'amplificazione della PCR e così via. In poche parole, ogni metodo ha le sue peculiarità positive e negative e deve essere accuratamente scelto in base alla sequenza da analizzare e al risultato che si vuole ottenere. Il gene ribosomiale 16S rRNA è costituito da 10 regioni conservate e da 9 regioni ipervariabili, ed è sottoposto a un basso tasso di evoluzione ed è presente in tutti i batteri. A causa delle restrizioni cui è soggetta la struttura dell'rRNA, come conseguenza del fatto che deve assumere una struttura secondaria definita e deve interagire con diverse proteine per formare un ribosoma funzionale, il tasso di variazione delle sequenze dei geni che codificano per l'rRNA è di gran lunga inferiore a quello degli altri geni, di conseguenza è possibile determinare le relazioni filogenetiche su ampie distanze evolutive. Pertanto, questo tipo di RNA funziona come un orologio molecolare e consente accurate determinazioni delle distanze

filogenetiche. Il prodotto genico del 16S rRNA è una regione che costituisce la subunità minore 30S dei ribosomi dei procarioti (Woese et al., 1977). La scelta dell'utilizzo del gene 16S rRNA come marcatore filogenetico per esaminare la diversità microbica e per identificare e classificare i microorganismi nasce dalla difficoltà nella coltivazione della maggior parte dei microorganismi presenti in ambienti naturali. Da quando Lane et al. (1985) hanno descritto per primi l'utilizzo del gene 16S rRNA per l'identificazione e la classificazione dei microorganismi non coltivabili dell'ambiente, l'amplificazione mediante PCR, il clonaggio e il sequenziamento sono state le tecnologie primarie impiegate per l'identificazione dei procarioti provenienti dai molteplici ecosistemi.

In filogenesi una "*Operational Taxonomic Unit*" (abbreviata in OTU) consiste in una definizione operativa tassonomica di una specie o di un gruppo di specie. L'assegnazione tassonomica si basa sulla sequenza delle 9 regioni ipervariabili del gene 16S rRNA. Specie, genere, famiglia e phylum sono convenzionalmente definiti con un valore di distanza filogenetica di 0.03, 0.05, 0.10 e 0.20 rispettivamente, basandosi sulla lunghezza intera (circa 1540 bp) della sequenza del gene 16S rRNA (Schloss et Handelsman, 2004). Tale metodo può creare, talvolta, incertezza nella corretta assegnazione tassonomica delle OTUs soprattutto se le differenze tra le sequenze geniche di diversi 16S rRNA non sono distribuite in modo eterogeneo lungo il gene 16S rRNA, ma sono concentrate soprattutto in alcune delle nove regioni ipervariabili (Stackebrandt et Goebel, 1994). Questo può accadere se l'analisi viene effettuata selettivamente solo su alcune regioni ipervariabili. È stato infatti dimostrato che alcune delle 9 regioni ipervariabili sono più informative di altre (Yu et Morrison, 2004; Youssef et al., 2009) consentendo, pertanto, una assegnazione tassonomica più affidabile (Wang et al., 2007; Liu et al., 2007, 2008). Le singole regioni ipervariabili sequenziate, sono raggruppate in OTUs, calcolando lo stesso valore di distanza convenzionale che si usa per la sequenza integrale del gene 16S. In alcuni studi, sono state comparate tra loro le singole regioni ipervariabili confrontandole con l'intera sequenza del gene per stimare le abbondanze relative rilevate (Dethlefsen et al., 2008; Huse et al., 2008; Claesson et al., 2009). Pertanto, la scelta della regione ipervariabile può incidere notevolmente sulla valutazione dell'abbondanza relativa delle OTUs se applicate a campioni biologici differenti. Nelle principali strategie di sequenziamento applicate ad un progetto di metagenomica le sequenze vengono comparate ad una

banca dati genetica che permette generalmente la ricostruzione tassonomica della comunità microbica fino a livello di genere. In linea generale, da un punto di vista metodologico, le fasi di preparazione del DNA al sequenziamento si concludono con la produzione di librerie geniche. Tale processo prevede inizialmente la frammentazione del DNA con metodi fisici o enzimatici per ridurre le dimensioni e renderlo adatto per il sequenziamento (Yohe et Thyagarajan, 2017). Successivamente, i frammenti di DNA vengono separati mediante gel elettroforetico e selezionati per dimensione (Yohe et Thyagarajan, 2017). Una volta che le estremità di ogni frammento sono state rese piatte, queste possono essere legate a specifiche molecole di DNA con sequenza nota definite con il termine di adattatori (Yohe et Thyagarajan, 2017). Una volta completate le fasi di preparazione, le librerie di DNA vengono caricate all'interno del sequenziatore e ivi fissate mediante il legame con una molecola di DNA con sequenza complementare a quella dell'adattatore (Yohe et Thyagarajan, 2017). Le sequenze di DNA fissate all'interno del sequenziatore sono sottoposte ad un processo di amplificazione clonale che consente di espandere esponenzialmente il numero di ogni sequenza in modo da facilitare la rilevazione del segnale prodotto in seguito all'incorporazione dei nucleotidi durante il sequenziamento. Infine, le sequenze amplificate verranno sottoposte al processo di sequenziamento. Ciascuna molecola di DNA legata alle celle del sequenziatore fungerà da stampo per la sintesi di una molecola complementare. I segnali che permettono il rilevamento della corretta incorporazione dei nucleotidi nel filamento in via di sintesi variano in funzione della tecnologia utilizzata e vanno dall'incorporazione del nucleotide, alla misura della variazione del pH base specifica del pozzetto in cui è legato il DNA, all'osservazione della variazione specifica del campo elettrico prodotta dall'incorporazione di uno specifico nucleotide. Alla fine del processo di sequenziamento, le sequenze ottenute verranno incorporate in un particolare tipo di file con estensione definita "FASTQ" che presenta al suo interno una precisa formattazione, come mostrato nella Figura 2.

```

1 @ERR000589.41 EAS139_45:5:1:2:111/1
2 CTTTCCTCCCTGCTTTCCTGGCCCCACCATTTCCAGGGAACATCTTGTGCAT
3 +
4 3IIIIIIIIIIII>1IIIF9BG08E00I%IG+&?(4)%00646.C1#&(
5 @ERR000589.42 EAS139_45:5:1:2:1293/1
6 AGTTGTTAAAAATCCAAGCCAATTAAGATAGTCTTATCTTTTTAAAAAGAAAT
7 +
8 IIIIIIGII.AIIII=?I9G-/II=+I=4?761BA2C9I+5A711+&>1$/I

```

Figura 2. Struttura di un file con estensione FASTQ.

Come mostrato nella Figura 2, le informazioni relative ad ogni sequenza vengono suddivise in quattro righe di testo in cui la prima riga che inizia sempre col simbolo @ rappresenta una indicazione della sequenza, la seconda riga contiene la sequenza di DNA (o RNA), la terza riga è definita spaziatore e contiene solo il simbolo + e, infine, la quarta riga, con lunghezza esattamente uguale alla seconda riga, presenta i punteggi di qualità (detti Phred-score) per ogni singola base presente nella seconda riga espressi secondo il codice ASCII.

2. Scopo dello studio

L'impiego di sottoprodotti nell'alimentazione animale è una pratica frequente nelle produzioni di filiera zootecnica, con l'intento di ridurre la competizione tra risorse alimentari destinate all'uso umano e il mangime per animali. Inoltre, poiché l'uso di antibiotici nella gestione degli allevamenti è stato fortemente limitato, ridotto o vietato in molti paesi, stiamo assistendo a una continua ricerca di possibili mangimi come promotori della crescita e della salute degli animali. L'impiego di materie prime non convenzionali ha destato l'interesse degli allevatori. Infatti, l'alimentazione liquida è considerata una strategia alternativa attraverso la quale gli stessi forniscono direttamente agli animali ingredienti funzionali senza ulteriori costi. In questa prospettiva, i sottoprodotti del latte sono considerati preziosi ingredienti per mangimi che possono essere utilizzati come materie prime per supportare un ambiente intestinale equilibrato. Tra questi, il siero di latte liquido fresco, ovvero un sottoprodotto del processo di caseificazione, può essere considerato un alimento prebiotico che rappresenta una preziosa fonte di lattosio e proteine digeribili che possono essere utilizzate dai batteri intestinali benefici. Sebbene tale sottoprodotto contenga preziose sostanze nutritive, di solito viene smaltito come prodotto di scarto, contribuendo così all'inquinamento ambientale. L'esatto profilo chimico del siero di latte liquido è influenzato dai processi di caseificazione. Tuttavia, il lattosio è il componente principale insieme ad altri composti del latte, come sali minerali, vitamine e proteine solubili. I dati disponibili nella letteratura scientifica riportano che l'integrazione di siero di latte negli animali produce effetti benefici favorevoli sulla crescita, sulla funzione immunitaria e sulla costituzione del microbiota intestinale. Nei suini, il suo uso ha migliorato una serie di parametri fisiologici, tra cui crescita, salute intestinale e immunità. La carenza di dati inerenti la somministrazione di siero di latte come co-mangime alternativo in razze suine autoctone, ci ha condotto ad esplorare il potenziale effetto di una dieta integrata con siero di latte liquido sul microbiota fecale di suini appartenenti alla razza Nero Siciliano. La composizione tassonomica del microbiota fecale è stata determinata sequenziando la regione ipervariabile V3-V4 del gene batterico 16S rRNA mediante un approccio di Next-Generation Sequencing da campioni fecali raccolti in tre punti temporali.

3. Materiali e Metodi

3.1 Management degli animali e disegno sperimentale dello studio

Il presente studio è stato condotto su una popolazione di suini composta da undici esemplari appartenente alla razza Nero Siciliano. Gli animali sono stati allevati al chiuso in un allevamento idoneo e situato nella provincia di Messina (Sicilia). L'attività di ricerca ha ricevuto l'approvazione da parte del *Comitato Etico della Sperimentazione Animale* dell'Università degli Studi di Messina (numero di autorizzazione 055_2021) ed è stata condotta secondo le linee guida europee per la cura e l'uso degli animali nella ricerca (Direttiva 2010/63/UE). Gli individui inclusi nello studio sperimentale erano clinicamente sani ed omogenei per sesso (esemplari femmine), per peso corporeo medio iniziale ($19,4 \pm 1,92$ kg), per età (58 ± 2 giorni) e per tipologia di allevamento. Gli animali all'interno di una porcilaia sono stati suddivisi in box individuali, ciascuno dotato di un abbeveratoio e di una mangiatoia in acciaio inossidabile e alimentati individualmente. Nel disegno sperimentale, i suini sono stati suddivisi come segue: cinque individui sono stati assegnati al gruppo di controllo e alimentati con un mangime in pellet, la cui composizione nutrizionale è riportata nella Tabella 2, razione in base al 3% del peso vivo, ed altri sei individui sono stati assegnati al gruppo sperimentale e alimentati con la stessa formulazione integrata con siero di latte liquido fresco con la quantità di 1,5 L/giorno/per suino. Il siero di latte utilizzato nella co-alimentazione degli individui derivava dallo stesso lotto di produzione, previamente suddiviso in aliquote e congelato prima dell'utilizzo. La quota di siero di latte liquido fresco, mantenuto in taniche previamente sterilizzate, è stata somministrata giornalmente agli animali come co-mangime fresco mediante l'uso di un abbeveratoio separato. Gli individui inclusi nello studio non presentavano ne malattie gastrointestinali ne esposizione agli antibiotici prima dell'inizio dell'indagine. Lo studio è stato condotto in un arco temporale di 60 giorni durante tutto il periodo dell'ingrasso, compreso un adattamento di 10 giorni alla dieta. Tutti i suini sono stati esposti a temperature e fotoperiodo ambientali naturali. I parametri termici e igrometrici, riportati nella Tabella 3, sono stati rilevati utilizzando un data logger (Gemini, UK) posizionato all'interno e all'esterno della porcilaia.

Tabella 2. Composizione nutrizionale della dieta sperimentale.

Ingredienti	g/kg di sostanza secca
Mais	550
Favino	125
Farina di pisello	110
Farina di girasole (38% proteine grezze)	80
Grano tenero	70
Carruba	30
Melassa di canna da zucchero	13
Componenti analitici	% su base umida
Proteine	17,4
Grassi	5,7
Fibre	4,5
Ceneri	5,3
Calcio	0,6
Fosforo	0,5
Sodio	0,2
Lisina	1,2
Metionina	0,4
Additivi	
Vitamina B1	1,0 mg
Vitamina B2	3,0 mg
Vitamina B6	1,5 mg
Vitamina B12	0,015 mg
Vitamina D3	(1.000 UI)
Vitamina E	20 mg
Vitamina K3	1,0 mg
Niacina	15,0 mg
Calcio-D	10,3 mg
Colina	200 mg

Cu	14,0 mg
Fe	89,8 mg
I	0,50 mg
Mn	39,9 mg
Se	0,15 mg
Zn	99,6 mg
Biotina	0,10 mg
DL-Metionina	0,12 mg
Lisina	500 mg
Composizione chimica del siero di latte	
Grassi	1,3 %
Proteine	2,7 %
Lattosio	4,5 %
Solidi senza grassi	7,5 %
Ca	47 mg/L
Mg	9 mg/L
Cl	38 mg/L
K	192 mg/L
Na	92 mg/L
NaCl	60 mg/L
pH	4,9
Densità	27,85

I dati riportati sono stati forniti dall'azienda suinicola.

Tabella 3. Parametri ambientali misurati all'interno e all'esterno della porcilaia.

Parametri ambientali	Periodo sperimentale					
	T0		T1		T2	
	Interno	Esterno	Interno	Esterno	Interno	Esterno
Temperatura (°C)	21,5 ± 1,2	22 ± 1,3	24,5 ± 1,5	25 ± 1,6	26 ± 1,3	26,5 ± 1,3
Umidità relativa (%)	61	62	61	62	53	55

I valori dei parametri riportati sono espressi come media delle misurazioni (media ± Deviazione Standard) .

3.2 Protocolli per il campionamento delle feci e per la preparazione delle librerie per il sequenziamento su piattaforma Illumina MiSeq

Il campionamento è stato eseguito in punti temporali diversi, iniziando prima dello studio sperimentale (T0, a maggio), e a uno (T1, a giugno) e a due (T2, a luglio) mesi dopo l'inizio dell'integrazione alimentare. Un totale di trentatré campioni fecali sono stati direttamente prelevati dall'ampolla rettale dei suini. Una volta raccolti, ciascun campione è stato trasferito in un contenitore sterile e conservato a 4 °C per il tempo necessario al trasporto in laboratorio con l'intento di evitare significative alterazioni della componente microbica. In seguito, il DNA genomico è stato estratto dai campioni fecali mediante il PowerLyzer™ PowerSoil® DNA Isolation Kit" (MO BIO laboratories inc.) facendo fede alle istruzioni del produttore. Purezza e quantità dello stesso sono state rispettivamente valutate mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% (w/v) e attraverso lo spettrofotometro Nanophotometer P330 (Implen, Germany). In seguito, l'amplificazione in vitro dei marcatori genetici mediante PCR, 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. I parametri per il processo di amplificazione consistevano in un riscaldamento iniziale a 95 °C per 5 minuti, seguito da 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 1 minuto, appaiamento a 55 °C per 1 minuto, estensione a 72 °C per 90 secondi 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). I campioni che presentavano una concentrazione di DNA di ~50 ng/µL e rapporti dei valori di assorbanza rispettivamente $\geq 1,8$ (A260/A280) e $\geq 1,9$ (A260/A230), sono stati sottoposti alla fase preliminare di allestimento delle librerie per il sequenziamento utilizzando il protocollo previsto per il servizio di "INVIEW Microbiome Profiling 3.0 2nd PCR, NGSelect Amplicon 2nd PCR", fornito dalla ditta Eurofins Genomics. In particolare, il primo step del protocollo sperimentale ha previsto l'amplificazione dei marcatori genetici procariotici con specifici primer ibridi costituiti sia dalle sequenze target dei marcatori V3-V4 (procarioti) che dalle sequenze degli adattatori di seguito riportate:

- sequenza dell'adattatore Illumina che è stata aggiunta all'estremità 5' del forward primer: 5'-ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTTCTCCGATCT-3';

- sequenza dell'adattatore Illumina che è stata aggiunta all'estremità 3' del reverse primer: 3'-GACTGGAGTTCAGAC GTGTGCTCTTCTCCGATCT-5'.

Infine, il controllo di qualità è stato eseguito mediante elettroforesi su gel di agarosio utilizzando 5 µl di prodotto della PCR. Successivamente, gli ampliconi sono stati purificati e 25 µl di ogni campione, etichettato con il relativo barcode, è stato inviato al fornitore del servizio di sequenziamento Eurofins Genomics (Ebersberg, Germania) per il sequenziamento in paired-end (2 x 300 bp) su piattaforma Illumina MiSeq.

3.3 Pipeline per analisi statistica e bioinformatica

Il controllo di qualità delle raw reads Illumina è stato eseguito utilizzando il software FastQC (Andrews, 2010), mentre il software Trimmomatic versione 0.39 (Bolger, 2014) è stato utilizzato per filtrare gli adattatori e le letture di bassa qualità (punteggio Phred ≤ 20). L'analisi bioinformatica è stata eseguita utilizzando la pipeline metagenomica GAIA, messa a disposizione da Sequentia Biotech SL, azienda partner del progetto PON industriale, che permette di analizzare i dati di sequenziamento di next-generation sequencing come da workflow descritto da Paytuví et al. (2019) e costituita da diversi script basati su Python, Java, Bash e Rstudio. La mappatura delle letture di alta qualità è stata eseguita mediante la comparazione delle stesse rispetto a database personalizzati creati da sequenze NCBI (Database NCBI), in cui le letture sono classificate nel livello tassonomico più specifico utilizzando un algoritmo *Lowest Common Ancestor* interno alla pipeline, ed applicando soglie minime di identità per classificare le letture a livello di specie, genere, famiglia, ordine, classe, phylum e dominio (Paytuví et al., 2019). Per quanto riguarda l'analisi statistica e la visualizzazione grafica dei dati, le stesse sono state condotte mediante l'uso del software Rstudio (R Core Team, 2020). Il downstream delle immagini e dei grafici è stato eseguito mediante l'utilizzo del pacchetto Phyloseq (McMurdie et Holmes, 2013), mentre il pacchetto Vegan è stato utilizzato per produrre la curva di rarefazione di tutti i campioni analizzati (Oksanen et al., 2020). Il pacchetto Phyloseq (McMurdie et Holmes, 2013) è stato utilizzato per stimare gli indici di *alfa* diversity in base alle Specie osservate (Observed) e agli indici Chao1 e Shannon. Tali indici vengono utilizzati per stimare la ricchezza, l'abbondanza e l'uniformità della diversità microbica all'interno del pool dei campioni. L'indice di *beta* diversity, che misura la dissimilarità

ovvero la dissomiglianza tra i campioni (ovvero quanto sono distanti in termini di generi presenti all'interno dei campioni), è stato stimato utilizzando l'indice di Bray-Curtis (Bray et Curtis, 1957). L'analisi delle coordinate principali (PCoA) è stata elaborata sulla base della distanza di Bray-Curtis (Bray et Curtis, 1957) utilizzando il pacchetto ggplot2 (Wickham, 2016). I test statistici di Wilcoxon (Wilcoxon, 1945) e Kruskal-Wallis (Kruskal et Wallis, 1952) sono stati calcolati per stimare differenze significative tra gli indici di *alfa* diversity per identificare eventuali significatività tra le condizioni di alimentazione e tra i punti temporali. L'analisi differenziale dell'abbondanza dei generi batterici nei punti temporali è stata eseguita mediante il pacchetto DESeq2 (Love et al., 2014), basato su un modello lineare generalizzato binomiale negativo e sulla statistica di Wald. Infine, un valore di *p*-adjusted $\leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4. Risultati

4.1 Performance di crescita degli animali

Per quanto concerne la performance di accrescimento degli animali, il peso medio giornaliero registrato è stato di 305 g/capo/giorno nei suini del gruppo di controllo e di 310 g/capo/giorno nei suini del gruppo trattato. Il tasso di conversione del mangime registrato è stato rispettivamente di 2,80 e 2,77 kg/kg nei suini di controllo e trattati.

4.2 Controllo qualità delle reads

Per quanto riguarda il controllo di qualità delle sequenze, dal sequenziamento Illumina è stata ottenuta una media di 104.275 raw reads, mentre, dopo la fase di trimming, sono state conservate un totale di 101.252 di sequenze pulite utilizzate per l'analisi a valle. La curva di rarefazione di tutti i campioni, che associa la dimensione del campione alle OTUs a livello di genere riscontrate tra tutti i campioni fecali, mostra che è stata raggiunta una profondità di sequenziamento adeguata (Figura 3).

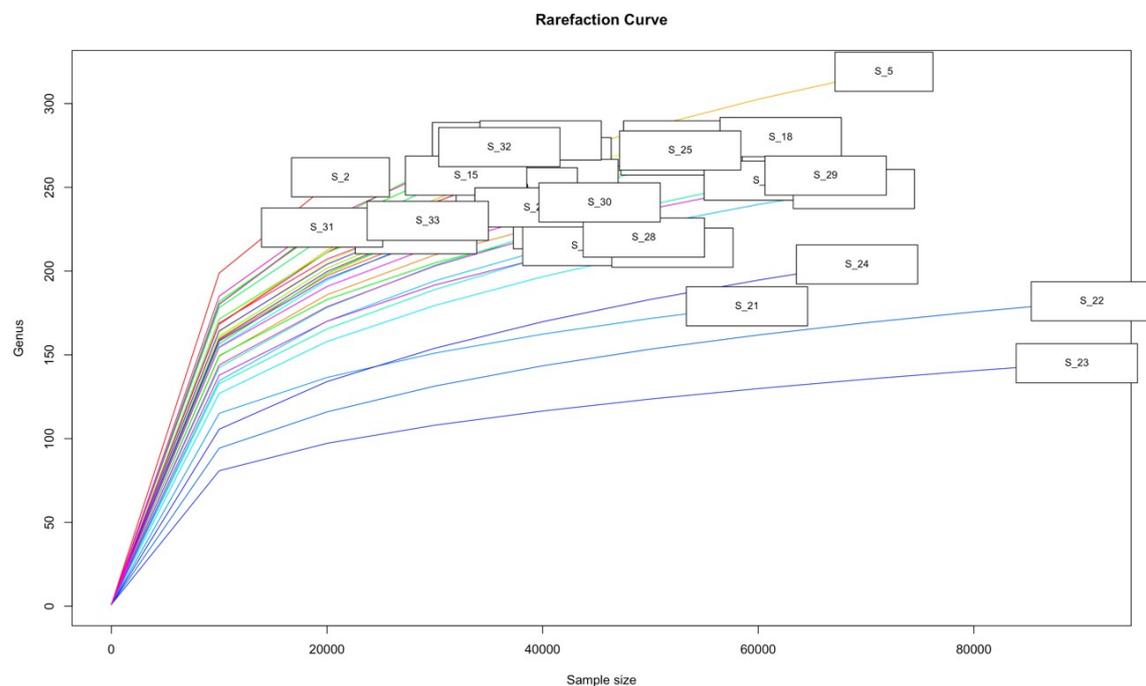


Figura 3. Curva di rarefazione dei campioni presi in esame nello studio.

4.3 Composizione tassonomica del microbiota fecale

Per quanto riguarda la composizione tassonomica del microbiota fecale, come descritto in precedenza, la regione V3-V4 dell'rRNA 16S è stata sequenziata utilizzando il DNA batterico estratto da trentatré campioni di feci raccolti in tre diversi punti temporali. Le sequenze sono state elaborate e filtrate utilizzando la pipeline metagenomica GAIA che ha identificato un totale di 856 OTUs a livello di genere tra tutti i campioni presi in esame. A livello di phylum, *Firmicutes* (47%) e *Bacteroidetes* (38%) erano quelli più abbondanti mentre *Spirochaetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* erano quelli meno rappresentati tra i campioni (6%, 4% e 3%, rispettivamente). A livello di famiglia, *Prevotellaceae* (30%), *Ruminococcaceae* (14%) e *Spirochaetaceae* (9%) sono state le famiglie batteriche più abbondanti rilevate nel pool di campioni. Infine, a livello di genere, i più rappresentati sono stati *Prevotella* (24%), *Lactobacillus* (10%), *Clostridium* (8%) e *Treponema* (7%).

Le relative abbondanze e rispettive medie, espresse in percentuale, a livello di phylum, famiglia e genere sono depositate nell'archivio supplementare disponibile al seguente link <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21802380.v1>. Di seguito, nelle Figure 4, 5 e 6, sono rispettivamente riportati i barplot delle abbondanze a livello di phylum, famiglia e genere.

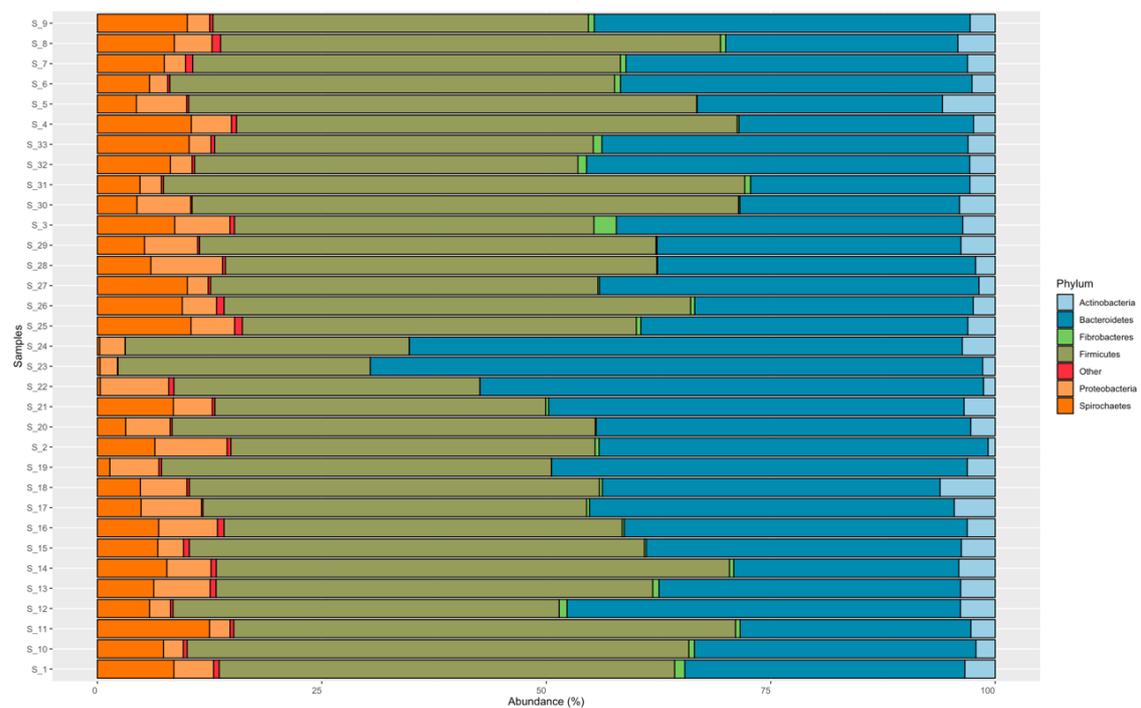


Figura 4. Barplot che riporta l'abbondanza dei phylum identificati nei campioni fecali.

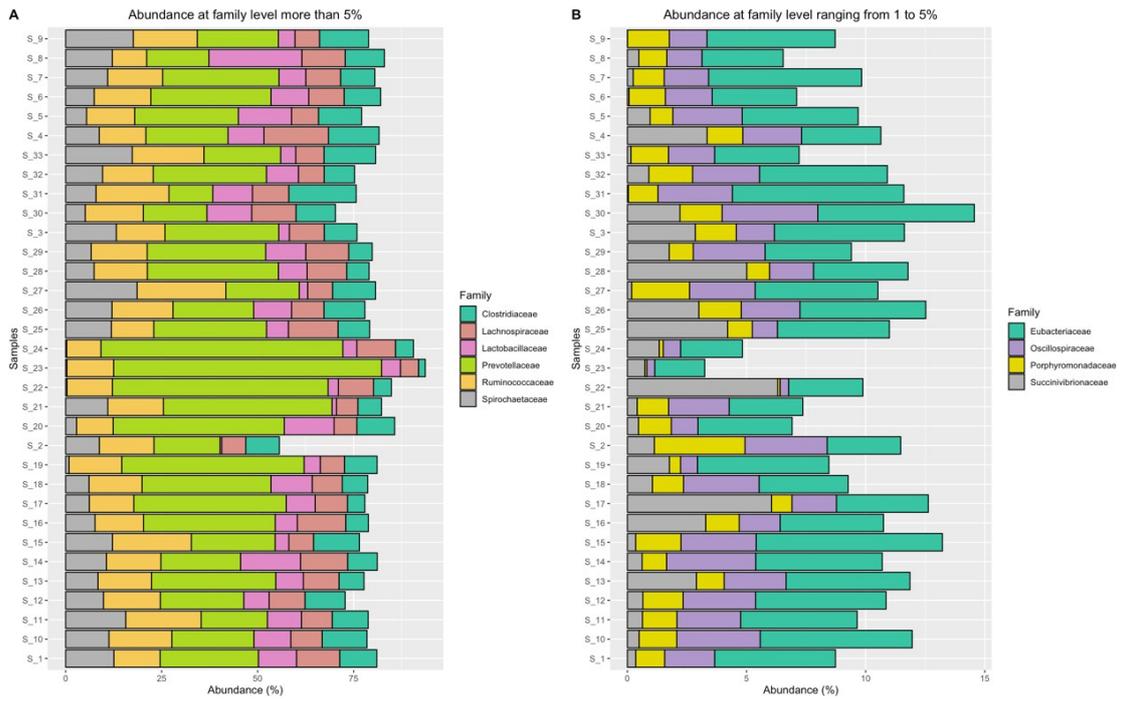


Figura 5. Barplot che mostra l'abbondanza delle famiglie riscontrate nei campioni fecali.

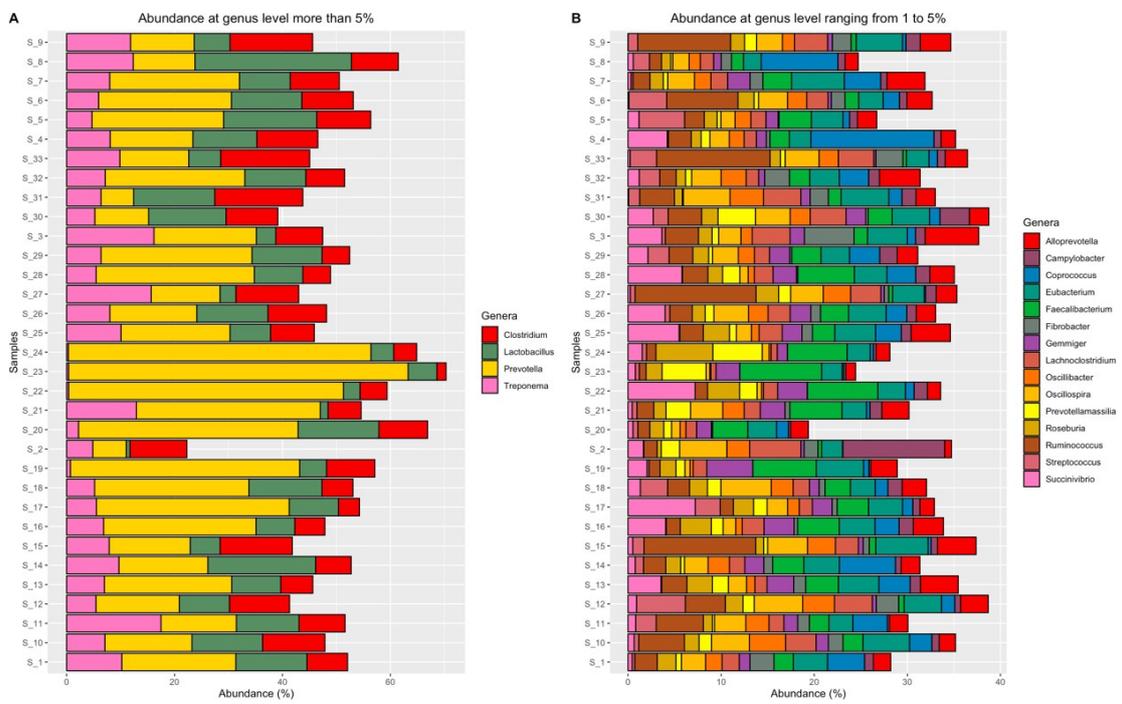


Figura 6. Barplot che mostra l'abbondanza a livello di genere riscontrata nei campioni fecali.

4.4 Correlazione della diversità microbica con le condizioni di alimentazione e con i punti temporali

L'*alfa* diversity è stata stimata per verificare se la diversità microbica del microbiota fecale dei suini fosse influenzata dalla dieta sperimentale. La Figura 6 illustra il plot che riporta i valori degli indici di *alfa* diversity per tutti i campioni. Per quanto riguarda le condizioni di alimentazione, l'indice delle specie osservate Observed (Figura 7A) non differiva tra il controllo e il gruppo sperimentale (p -value = 0,99), e risultati simili sono stati osservati anche per l'indice Chao1 (p -value = 0,79) e di Shannon (p -value = 0,51) (Figura 7B e C), rispettivamente. Inoltre, non sono state osservate differenze significative degli indici di *alfa* diversity tra i tre punti temporali (Figura 7D, E e F). Per quanto riguarda la *beta* diversity, la distanza di Bray-Curtis ha indicato che non vi era una marcata dissomiglianza tra i campioni, come si può osservare nella heatmap illustrata nella Figura 8. Inoltre, le metriche della *beta* diversity, rappresentate dalla PCoA (Figura 9), non hanno evidenziato una significativa correlazione tra i gruppi in base al regime alimentare e ai punti temporali.

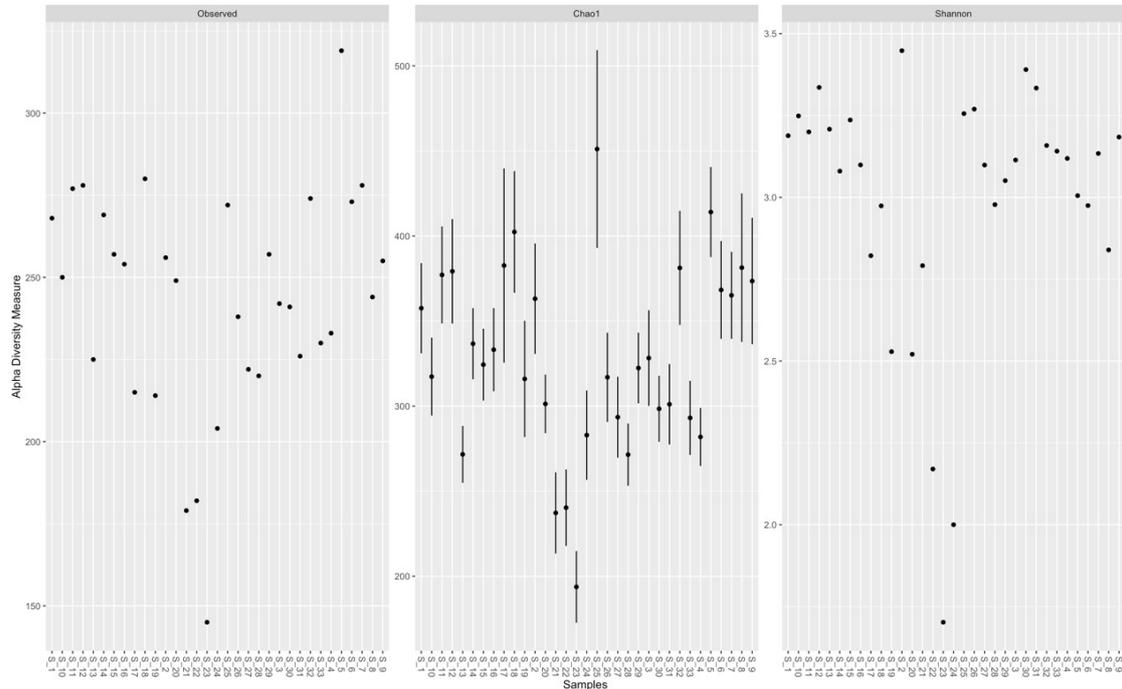


Figura 6. Plot degli indici di diversità *alfa*.

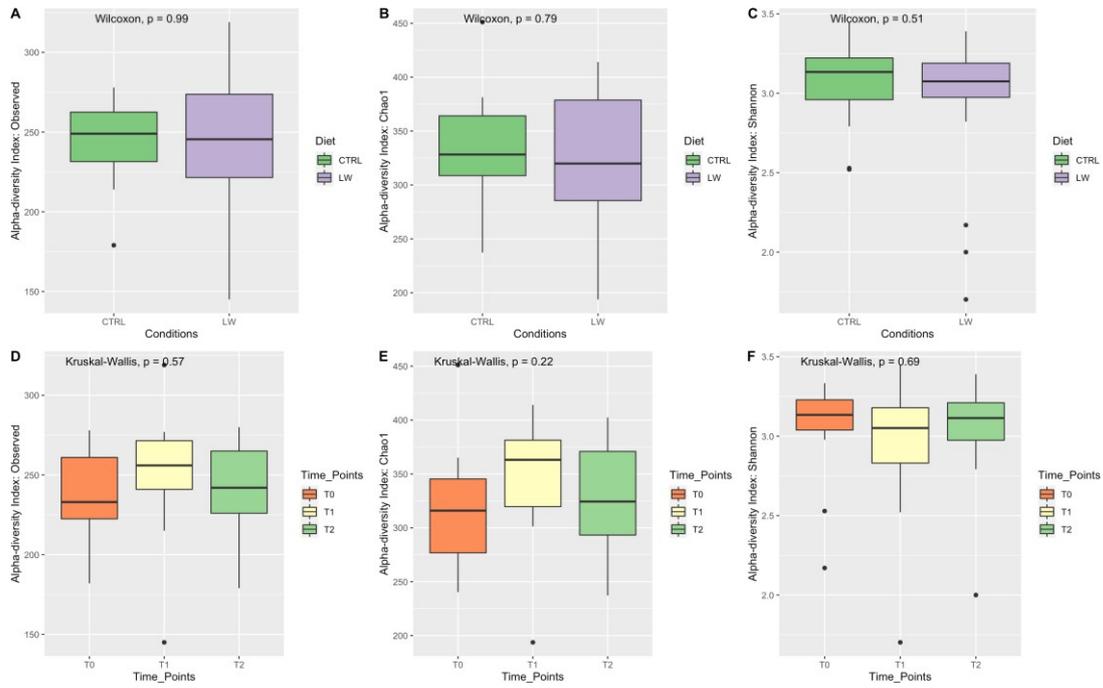


Figura 7. Box plot degli indici di *alfa* diversità correlati alle condizioni di alimentazione e ai punti temporali. Ciascun box rappresenta l'intervallo interquartile mentre la linea che divide il riquadro in due parti rappresenta la mediana.

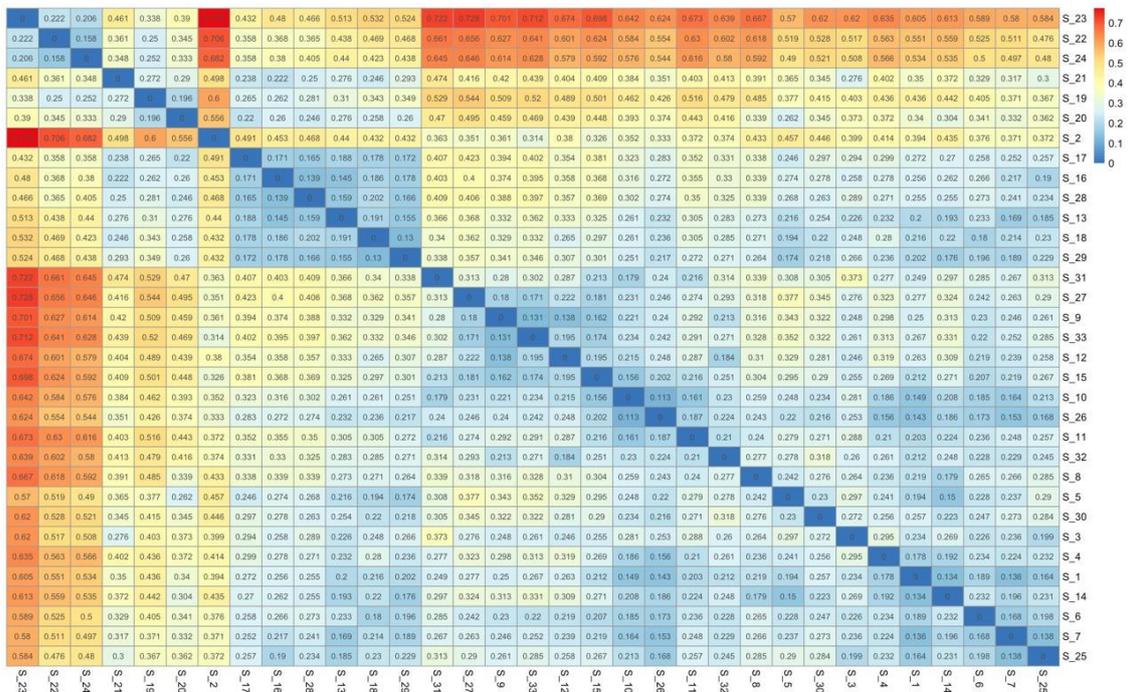


Figura 8. Heatmap dei valori di *beta* diversità basati sulla distanza di Bray-Curtis.

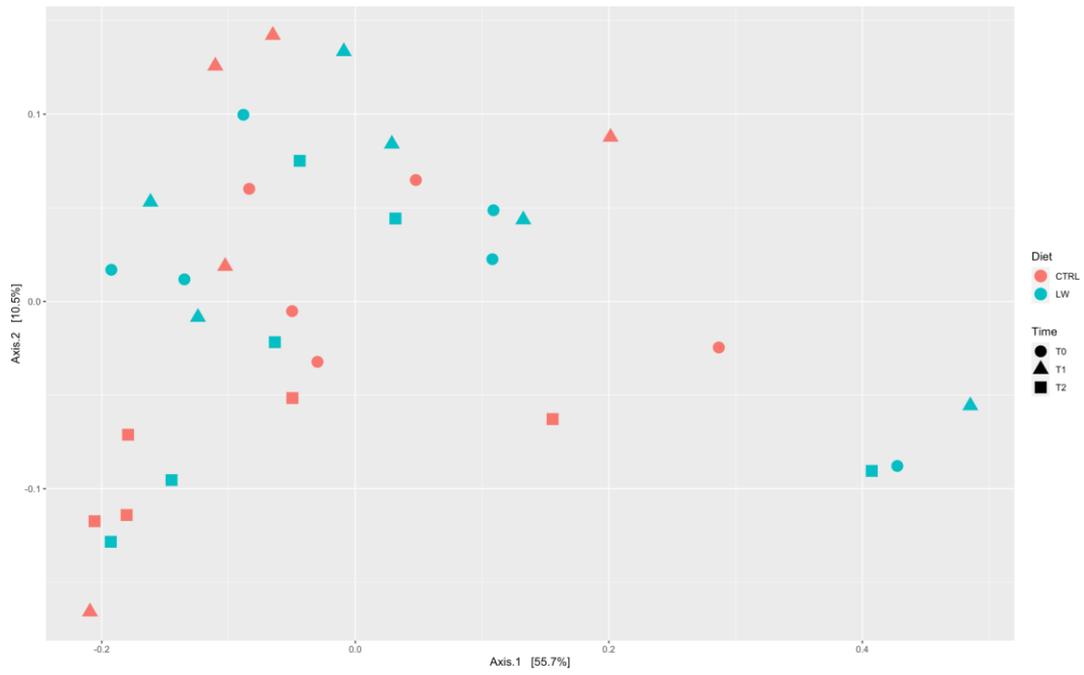


Figura 9. Grafico della PCoA basato sulla distanza di Bray-Curtis della comunità microbica fecale.

4.5 Analisi differenziale dell'abbondanza dei generi microbici

L'analisi dell'abbondanza differenziale è stata condotta per valutare i cambiamenti nell'abbondanza a livello di genere nel microbiota fecale dei suini. Differenze significative sono state osservate tra i punti temporali considerati. Come si può osservare nella Tabella 4, diversi generi sono stati differenzialmente rappresentati nel tempo, con *Oxalobacter* e *Parasutterella* tra i generi più positivamente modulati. Al contrario, *Duodenibacillus* e *Mogibacterium* erano i generi tra quelli regolati più negativamente. È interessante notare che i generi *Corynebacterium* e *Mogibacterium*, noti per includere specie patogene, risultavano tra i generi meno abbondanti.

Tabella 4. Panoramica dell'analisi dell'abbondanza differenziale che riporta la variazione significativa a livello di genere nei periodi di tempo considerati nella sperimentazione.

Phylum	Famiglia	Genere	Log2 Fold Change*	p-value	p-adj
Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	1.79	2.78e-04	4.93e-03
	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	-1.35	4.81e-03	4.02e-02
	<i>Atopobiaceae</i>	<i>Olsenella</i>	-2.34	1.21e-04	2.87e-03
	<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Slackia</i>	-1.78	2.23e-03	2.43e-02
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	-1.11	6.28e-03	4.69e-02
	<i>Clostridiales Family XIII. Incertae Sedis</i>	<i>Mogibacterium</i>	-2.45	7.37e-07	5.24e-05
		<i>Blautia</i>	-0.97	6.66e-03	4.73e-02
		<i>Cellulosilyticum</i>	1.97	3.74e-03	3.31e-02
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Coprococcus</i>	-2.36	2.00e-04	4.06e-03
		<i>Lachnospira</i>	-1.62	2.64e-03	2.68e-02
		<i>Lachnotalea</i>	1.79	1.63e-03	2.19e-02
		<i>Anaeromassilibacillus</i>	-2.05	9.01e-04	1.42e-02
	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Harryflintia</i>	0.07	6.77e-08	9.62e-06
		<i>Ruminococcus</i>	1.41	4.77e-05	1.35e-03
	<i>Saccharofermentans</i>	2.24	1.87e-03	2.22e-02	
	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	1.62	3.78e-05	1.34e-03
Proteobacteria	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Oxalobacter</i>	5.87	1.69e-03	2.19e-02
	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Duodenibacillus</i>	-2.64	2.94e-03	2.78e-02
		<i>Parasutterella</i>	3.99	1.31e-06	6.19e-05
	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Actinobacillus</i>	-0.22	5.18e-03	4.09e-02

* i cambiamenti nell'abbondanza a livello di genere fanno riferimento al confronto tra il T2 rispetto al T0.

6. Discussioni

Il presente progetto di dottorato ha esplorato il potenziale effetto di una dieta sperimentale integrata con siero di latte liquido sulla comunità batterica fecale di undici suini appartenenti alla razza Nero Siciliano. Da quanto si evince dalla letteratura scientifica, questo studio rappresenta il primo report che descrive il microbiota fecale di suini Nero Siciliano allevati al chiuso in un allevamento commerciale, contribuendo così a fornire nuove informazioni su questo specifico argomento. Al tempo della stesura di questo studio, nella letteratura scientifica non erano disponibili dati relativi al potenziale effetto di una dieta integrata con siero di latte liquido sul microbiota fecale di razze suine autoctone. Inoltre, la letteratura non fornisce informazioni sufficienti sull'utilizzo del siero di latte liquido nei suini come co-mangime, specialmente nell'alimentazione di razze autoctone. La composizione chimica e microbiologica del siero di latte può essere influenzata da molteplici fattori, inclusa la gestione dei processi di caseificazione (Sattin et al., 2016). Ciononostante, gran parte della carica batterica iniziale del microbiota del latte può rimanere nel siero liquido dopo il suo trattamento (Sattin et al., 2016). L'approccio di sequenziamento del gene 16S rRNA ha permesso di identificare un totale di 856 OTUs a livello di genere, indicando che le feci del suino Nero Siciliano sono popolate da una complessa comunità di batteri, fornendo pertanto ulteriori informazioni sulla struttura dell'ecosistema della sezione rettale. Un precedente studio, basato però sul sequenziamento shotgun dell'intero metagenoma del microbioma fecale della razza suina Nero Siciliano, è stata riportata da Giuffrè et al. (2021). Da un punto di vista strettamente tassonomico i risultati riportati in questo studio, sebbene forniscano una visione più dettagliata sulla composizione della comunità batterica fecale, globalmente, sono comparabili con quelli precedentemente riportati da Giuffrè et al. (2021). Tuttavia, i risultati del presente studio suggeriscono che la combinazione del siero di latte liquido fresco nella dieta dei suini non abbia influenzato gli indici di *alfa* diversity del microbiota fecale. In particolare, i valori di Wilcoxon e Kruskal-Wallis non hanno indicato differenze significative nella composizione batterica in termini di ricchezza e uniformità tra le condizioni di alimentazione e i tre punti temporali (Figura 7). Tale risultato è anche supportato dall'indice di *beta* diversity (Figura 8) e dall'analisi

della PCoA (Figura 9). Risultati simili sono stati ottenuti da Miragoli et al. (2021) in uno studio dove gli autori hanno valutato l'effetto di altri feed come co-mangime supplementare in suini ibridi commerciali.

Da un punto di vista biologico, questi risultati potrebbero essere spiegati dal fatto che diverse comunità microbiche sono responsabili del mantenimento della stabilità e della resistenza anche di fronte a disturbi e cambiamenti ambientali (Ives et Carpenter, 2007), come appunto l'introduzione di un co-feed alternativo nella dieta. Alla luce di quanto emerso dalla precedente analisi, basata sugli indici di *alfa* e *beta* diversity della comunità microbica fecale, la raccolta dei campioni eseguita in diversi punti temporali ci ha condotto a chiederci se si potesse verificare un potenziale effetto della dieta sperimentale sul microbiota fecale nel tempo. In effetti, i dati ottenuti dall'analisi differenziale dell'abbondanza nei punti temporali hanno supportato la nostra ipotesi poiché venti generi batterici hanno mostrato una diversa modulazione in termini di abbondanza nel tempo (Tabella 4).

Tra questi, i generi *Bifidobacterium*, *Cellulosilyticum*, *Lachnotalea*, *Ruminococcus*, *Saccharofermentans*, *Phascolarctobacterium*, *Oxalobacter* e *Parasutterella* sono risultati essere quelli modulati positivamente. Diverse specie all'interno di alcuni di questi generi (ad esempio, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* e *Oxalobacter*), sono spesso impiegate come probiotici e nella produzione di additivi per mangimi per prevenire la diarrea o per migliorare le performance di crescita nei mammiferi (Miller et al., 2016; Nishiyama et al., 2021). Pertanto, l'uso di un co-mangime come il siero di latte liquido potrebbe potenzialmente migliorare il microbiota fecale dei suini aumentando i batteri benefici e riducendo il numero dei potenziali *taxa* dannosi. Inoltre, la notevole abbondanza del genere *Cellulosilyticum*, noto come simbionte coinvolto nella degradazione della fibra alimentare nell'ultimo stadio di crescita dei suini, potrebbe essere utile nel favorire i processi digestivi intestinali (Han et al., 2019). Un altro risultato interessante del presente studio inerisce la minore abbondanza di batteri appartenenti ai generi *Corynebacterium* e *Mogibacterium*, solitamente associati a stati patogeni. Questi generi sono risultati essere meno abbondanti nel tempo, suggerendo così che la co-alimentazione potrebbe aver influenzato la loro presenza nelle feci. Va comunque notato che alcune specie appartenenti al genere *Corynebacterium* (ad esempio, *C. diphtherium*), un potenziale patogeno opportunista,

sono state riportate in letteratura per essere associate a malattie intestinali sia nell'uomo che nei suini (Percy et al., 1966; Bernard, 2012; Kim et al., 2021). Inoltre, è stato dimostrato che il genere *Mogibacterium* aumenta nel microbiota associato alla mucosa di pazienti affetti da cancro del colon (Chen et al., 2012) e diminuisce nelle feci di suinetti alimentati con formulazioni prebiotiche (Berding et al., 2016). Inoltre, è stata osservata un'elevata abbondanza relativa di questo genere sia nei campioni ottenuti da raschiamento della mucosa che nei campioni luminali di suini affetti da dissenteria (Burrough et al., 2017).

Pertanto, sulla base dei risultati ottenuti in questo studio di caratterizzazione del microbiota fecale del suino Nero Siciliano e del potenziale impatto di una co-alimentazione mediante l'uso di siero di latte liquido, possiamo ipotizzare che una sua integrazione nella dieta abbia influenzato nel tempo l'abbondanza di questi generi.

6. Conclusioni

Il presente progetto di dottorato rappresenta il primo report disponibile nella letteratura scientifica che ha esplorato la composizione della comunità batterica fecale della razza suina autoctona Nero Siciliano alimentata con l'integrazione di un feed alternativo come il siero di latte liquido. Sebbene l'integrazione del sottoprodotto lattiero-caseario non abbia influito sulla diversità microbica, la sua integrazione nel tempo ha contribuito a modulare l'abbondanza di diversi generi benefici della comunità batterica. Pertanto, sulla base dei risultati ottenuti, possiamo presumere che una dieta integrata con un sottoprodotto caseario a basso costo come il siero di latte liquido può essere impiegata nell'allevamento di suini con lo scopo di migliorare il benessere degli animali. Alla luce di quanto riportato, ulteriori studi sono incoraggiati con l'intento di ampliare le nostre conoscenze sulle interazioni ospite/microbiota.

8. Bibliografia

Aluthge ND, van Sambeek DM, Hinkle EEC, Li YS, Fernando SC, Burkey TE. The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health. *J. Anim. Sci.* **2019**, skz208.

ANAS—Italian Pig Breeders Association **2020**. Available online: <http://www.anas.it/Normative/Norme001> (accessed on 30 July 2022).

Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. **2010**, Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Armani RG, Ramezani A, Yasir A, Sharama S, Canziani MEF, Raj DS. Gut Microbiome in Chronic Kidney Disease. *Curr. Hypertens. Rep.* **2017**, 19, 29.

Berding, K.; Wang, M.; Monaco, M.H.; Alexander, L.S.; Mudd, A.T.; Chichlowski, M.; Waworuntu, R.V.; Berg, B.M.; Miller, M.J.; Dilger, R.N. et al. Prebiotics and bioactive milk fractions affect gut development, microbiota, and neurotransmitter expression in piglets. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, 63, 688–697.

Bernard, K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, 50, 3152–3158.

Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, <https://doi.org/10.3322/caac.21398>

Bian G, Ma S, Zhu Z, Su Y, Zoetendal EG, Mackie R, Liu J, Mu C, Huang R, Smidt H, Zhu W. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environ. Microbiol.* **2016**, 18, 5, 1566–1577.

Bik EM. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr. Rev.* **2019**, 67, S164–S171.

Blázquez AB, Berin MC. Microbiome and food allergy. *Transl. Res.* **2017**, 179, 199–203.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, btu170.

Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **1957**, 27, 325–349.

Burrough, E.R.; Arruda, B.L.; Plummer, P.J. Comparison of the Luminal and Mucosa-Associated Microbiota in the Colon of Pigs with and without Swine Dysentery. *Front. Vet. Sci.* **2017**, 4, 139.

Canibe N, Højberg O, Højsgaard S, Jensen BB. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastro-intestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.* **2005**, 83, 1287–1302.

Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2013**, 4, 1, 19.

Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Gewirtz AT. Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology* **2014**, 59, 328–339.

Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* **2012**, 7, e39743.

Chicoli N. Riproduzione, Allevamento e Miglioramento Degli Animali Domestici in Sicilia. Stamperia di G. Lorsnaider: Palermo, Italy, **1870**.

Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, 13, 260–270.

Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkila J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O'Toole PW. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS ONE* **2009**, 4, e6669.

Conway PL. Development of intestinal microbiota. Gastrointestinal microbes and host interactions. In: Mackie R. I., Whyte, B. A and Isaacson R.E., eds. *Gastrointestinal Microbiol.*, vol.2, **1997**, Chapman and Hall London.

Crespo-Piazuelo D, Estellé J, Revilla M, Criado-Mesas L, Ramayo-Caldas Y, Óvilo C, Fernández AI, Ballester M, Folch JM. Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 1, 12727.

Cassella, P. Il Maiale: Razze, Allevamento, Ingrassamento, Malattie; Battiato, T.F., Ed.; Battiato: Catania, Italy, **1921**.

Cucchi T, Dai L, Balasse M, Zhao C, Gao J, Hu Y, Yuan J, Vigne JD. Social Complexification and Pig (*Sus scrofa*) Husbandry in Ancient China: A Combined Geometric Morphometric and Isotopic Approach. *PLoS One* **2016**, 11, 1–20.

Database resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Resource Coordinators. *Nucleic Acids Research.* **2016**, 44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 14691–14696.

Delsenya M, Hanb B, Hsingc Y. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science* **2010**, 179, 407–422.

Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol.* **2019**, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>

De Rodas B, Youmans BP, Danzeisen JL, Tran H, Johnson TJ. 2018. Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. *J. Anim. Sci.* **2018**, 96, 1778–1794.

Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* **2008**, 6, e280.

Ewing WN, Cole DJA. The microbiology of the gastrointestinal tract. In the living gut. An introduction to microorganism in nutrition, pp 45–65, Ewing WN and Cole DJA, eds. Context, Ireland, UK, **1994**.

Faelli, F. Razze Bovine, Equine, Suine, Ovine, Caprine. Hoepli, M., Ed.; G. B. Paravia e C.: Torino, Italy, **1928**.

FAO: <https://www.fao.org/agriculture/animal-production-and-health/en>

Feng W, Ao H, Peng C. Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines. *Front. Pharmacol.* **2018**, 9, 1354.

Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.* **2007**, 9, 1101– 1111.

Fouhse JM, Zijlstra RT, Willing BP. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Anim. Front.* **2016**, 6, 30–36.

Giuliani, R. Suinicoltura italiana. *Rivista Di Zootecnia* **1940**, 1, 1–12.

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 J. of Anim. Sci.* **2021**, 20, 1147–1155.

Gordon JI. Honor thy gut symbionts redux. *Science* **2012**, 336, 1251–1253.

Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* **2017**, 25, 10, 851–873.

Han GG, Lee JY, Jin GD, Park J, Choi YH, Kang SK, Chae BJ, Kim EB, Choi YJ. Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 1, 6012.

Harakeh SM, Khan I, Kumosani T, Barbour E, Almasaudi SB, Bahijri SM, et al. I. Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, 6, 95.

Hayashi H, Shibata K, Sakamoto M, Tomita S, Benno Y. *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, 57, 941–946.

Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ.* **2017**, 32, 4, 300–313.

Hinkle EE, Fernando S, Burkey TE. Differences in core microbiota between P1 and P3 dams and their progeny. In: 12th Int. Symp. Dig. Phys. Pigs, Keystone, CO USA, **2012**.

Heinonen J. Personal communication, **2000**. Università della Calabria, CIRASAIA, Arcavacata, Cosenza, Italy.

Hryhorowicz M, Lipiński D, Hryhorowicz S, Nowak-Terpiłowska A, Ryczek N, Zeyland J. Application of Genetically Engineered Pigs in Biomedical Research. *Genes* **2020**, 11, 670.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology* **1998**, 180, 18, 4765–4774.

Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet.* **2008**, 4, e1000255.

Ives AR, Carpenter, S.R. Stability and diversity of ecosystems. *Science* **2007**, 317, 58–62.

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, 21, 29, 8787–803. <https://doi.org/0.3748/wjg.v21.i29.8787>

Jensen BB. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* **1998**, 89, 175–188.

Jiménez-Colmenero F, Ventanas J, Toldrá F. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Sci.* **2010**, 84, 585–593.

Kim HB, Isaacson RE. The intestinal microbiome of the pig. *Anim. Health Res. Rev.* **2012**, 13, 1, 100–109.

Kim HB, Isaacson RE. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet. Microbiol.* **2015**, 177, 3-4, 242–251.

Kim H, Cho JH, Song M, Cho JH, Kim S, Kim ES, Keum GB, Kim HB, Lee JH. Evaluating the Prevalence of Food-borne Pathogens in Livestock Using Metagenomics Approach. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 31, 1701–1708.

Knight R, Callewaert C, Marotz C, Hyde ER, Debelius JW, McDonald D, Sogin ML. The Microbiome and Human Biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2017**, 18, 65–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022438>

Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, Akkermans AD, Smidt H, de Vos WM. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.* **2006**, 8, 1191–1199.

Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J. American Stat. Ass.* **1952**, 47, 583–621.

Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes C.H. Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livestock Science* **2007**, 108, 82–93.

Lamendella R, Domingo JW, Ghosh S, Martinson J, Oerther DB. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiol.* **2011**, 11, 103.

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, 82, 6955–6959.

Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Moller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 673–690.

Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, Arumugam M, Kultima JR, Prifti E, Nielsen T, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 8, 834–841. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>

Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD, Knight R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, e120.

Liu Z, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, e120.

Looft T, Allen HK, Cantarel BL, Levine UY, Bayles DO, Alt DP, Henrissat B, Stanton TB. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J.* **2014**, 8, 1566– 1576.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **2014**, 15, 550.

Lu D, Tiezzi F, Schillebeeckx C, McNulty NP, Schwab C, Shull C, Maltecca C. Host contributes to longitudinal diversity of fecal microbiota in swine selected for lean growth. *Microbiome* **2018**, 6, 1, 4.

Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *New Engl. J. Med.* **2016**, 375, 2369–2379.

Malla MA, Dubey A, Kumar A, Yadav S, Hashem A, Abd Allah EF. Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Front. Immunol.* **2019**, 9, 2868.

Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Faggioli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J. Gastroenterol.* **2016**, 22, 361–368.

Mach N, Berri M, Estellé J, Levenez F, Lemonnier G, Denis C, Leplat JJ, Chevaleyre C, Billon Y, Doré J. et al. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes: role of early-life gut microbiome on pigs' health. *Environ. Microbiol. Rep.* **2015**, 7, 554–569.

Maltecca C, Bergamaschi M, Tiezzi F. The interaction between microbiome and pig efficiency: a review. *J. Anim. Breed. Genet.* **2020**, 137, 4–13.

Marchi, E. Il Maiale. Hoepli, M., Ed.; Libraio della Real Casa: Milano, Italy, **1897**.

Marchi E, Pucci C. Il Maiale. Hoepli, M., Ed.; Libraio della Real Casa: Milano, Italy, **1923**.

Melotti L, Oostindjer M, Bolhuis JE, Held S, Mendl M. Coping personality type and environmental enrichment affect aggression at weaning in pigs. *Applied Animal Behaviour Science* **2011**, 133, 144–153.

Metzker ML. Sequencing technologies. The next generation. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, 11, 31–46.

Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdtts V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* **2012**, 20, 50–57.

McGlone JJ. The Future of Pork Production in the World: Towards Sustainable, Welfare-Positive Systems. *Animals* **2013**, 3, 401–415.

McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* **2013**, 8, e61217.

Miller AW, Oakeson KF, Dale C, Dearing MD. Microbial Community Transplant Results in Increased and Long-Term Oxalate Degradation. *Microb. Ecol.* **2016**, 72, 470–478.

Miragoli F, Patrone V, Prandini A, Sigolo S, Dell'Anno M, Rossi L, Senizza A, Morelli L, Callegari ML. Implications of Tributyrin on Gut Microbiota Shifts Related to Performances of Weaning Piglets. *Microorganisms* **2021**, 9, 584.

Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.* **1992**,50, 438–446.

Mondello L, Costa R, Chiofalo B, Chiofalo V, Liotta L, Dugo P, Dugo G. Caratteristiche della frazione lipidica delle carni di suino Nero siciliano mediante GC ultraveloce. In *Qualità e Sicurezza degli Alimenti*, Marchelli R. (ed.), Morgan Edizioni Tecniche, Milano, **2003**, pp. 439–441.

Muraca M, Putignani L, Fierabracci A, Teti A, Perilongo G. Gut microbiota-derived outer membrane vesicles: under-recognized major players in health and disease? *Discov. Med.* **2015**, 19, 343–348.

Montanaro G. Per il miglioramento della suinicoltura siciliana. *Crit. Zootec.* **1939**, 8, 303–319.

Munroe DJ, Harris TJR. Third-generation sequencing fireworks at Marco Island. *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 426–428.

Nishiyama K, Yokoi T, Sugiyama M, Osawa R, Mukai T, Okada N. Roles of the Cell Surface Architecture of Bacteroides and Bifidobacterium in the Gut Colonization. *Front. Microbiol.* **2021**, 12, 754819.

Oksanen J, Guillaume Blanchet F, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P. et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5–7. **2020**. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Pajarillo EA, Chae J, Balolong MP, Kim HB, Kang D. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2014**, 60, 140–146.

Patil Y, Gooneratne R, Ju XH. Interactions between host and gut microbiota in domestic pigs: a review. *GutMicrobes* **2020**, 11, 310–334.

Paytuví A, Battista E, Scippacercola F, Aiese Cigliano R, Sanseverino W. GAIA: an integrated metagenomics suite. *bio-Rxiv* **2019**, 804690.
<https://doi.org/10.1101/804690> – License CC BY-NC-ND 4.0

Pappas G. Socio-economic, industrial and cultural parameters of pig-borne infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, 19, 605–610.

Percy DH, Ruhnke HL, Soltys MA. A case of infectious cystitis and pyelonephritis of swine caused by *Corynebacterium suis*. *Can. Vet. J.* **1966**, 7, 291–292.

Petri D, Hill JE, Van Kessel AG. 2010. Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. *Livestock Sc.* **2010**, 133, 107–109.

Pino N. Il patrimonio suino della Sicilia e la sua etnologia alla luce di ricerche biometriche su alcuni caratteri razziali. *Zootec. E Veterinaria. La Fecond. Artif.* **1947**, 1, 1–15.

Pugliese C, Sirtori F. Quality of meat and meat products produced from southern European pig breeds. *Meat Sci.* **2012**, 90, 511–518.

Ramayo-Caldas Y, Mach N, Lepage P, Levenez F, Denis C, Lemonnier G, Leplat JJ, Billon Y, Berri M, Dore J. et al. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J* **2016**, 10, 2973–2977.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, **2020**.

Romolotti A. L'allevamento del Suino Nell'agricoltura Siciliana. Casa Editrice, F.lli De Magistris e C., Ed.; De Magistris: Palermo, Italy, **1929**.

Sabatino A, Regolisti G, Cosola C, Gesualdo L, Fiaccadori E. Intestinal Microbiota in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Curr. Diab. Rep.* **2017**, 17, 16.

Sattin E, Andreani NA, Carraro L, Lucchini R, Fasolato L, Telatin A, Balzan S, Novelli E, Simionati B, Cardazzo B. A Multi-Omics Approach to Evaluate the Quality of Milk Whey Used in Ricotta Cheese Production. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1272.

Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2011**, *7*, 569–578.

Schloss PD, Handelsman J. Status of the microbial census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 686–691.

Shendure Li H. Next generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 2008, *26*, 1135–1145.

Sheehan D, Shanahan F. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **2017**, *46*, 143–154.

Shukla SD, Budden KF, Neal R, Hansbro PM. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin. Transl. Immunol.* **2017**, *6*, e133.

Siegwald L, Touzet H, Lemoine Y, Hot D, Audebert C, Caboche S. Assessment of Common and Emerging Bioinformatics Pipelines for Targeted Metagenomics. *PLoS One* **2017**, *12*, 1, e0169563.

Simpson HL, Campbell BJ. Review article: dietary fibre-microbiota interactions. *Aliment. Pharm. Ther.* **2015**, *42*, 158–179.

Song SJ, Sanders JG, Delsuc F, Metcalf J, Amato K, Taylor MW, Mazel F, Lutz HL, Winker K, Graves GR. et al. Comparative Analyses of Vertebrate Gut Microbiomes Reveal Convergence between Birds and Bats. *mBio* **2020**, *7*, 1–14.

Sutherland MA, Backus BL, McGlone JJ. Effects of Transport at Weaning on the Behavior, Physiology and Performance of Pigs. *Animals* **2014**, *4*, 4, 657–669.

Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1994**, *44*, 846–849.

Swords WE, Wu CC, Champlin FR, Buddington RK. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol. Neonate*. **1993**, 63, 3, 191–200.

Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ. Res.* **2017**, 120, 1183–1196.

Tucci F. L'allevamento del Maiale. Tipografia Costanzo, R., Ed.; Costanzo: Palermo, Italy, **1908**.

Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.* **2009**, 587, 4153–4158.

Wang C, Li P, Yan Q, Chen L, Li T, Zhang W, Li H, Chen C, Han X, Zhang S. et al. Characterization of the Pig Gut Microbiome and Antibiotic Resistome in Industrialized Feedlots in China. *mSystems* **2019**, 4, 1–10.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 5261–5267.

Wekerle H. Brain Autoimmunity and Intestinal Microbiota: 100 Trillion Game Changers. *Trends Immunol.* **2017**, 38, 7, 483–497.

Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag (NY) **2016**.

Wilcoxon, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* **1945**, 1, 80–83.

Williams MR, Gallo RL. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Curr. Allergy Asthma. Rep.* **2015**, 15, 65.

Woese C, Fox G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, 74, 11, 5088–5090.

Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, 102, 1178–1186.

Xiao L, Estellé J, Kiilerich P, Ramayo-Caldas Y, Xia Z, Feng Q, Liang S, Pedersen AØ, Kjeldsen NJ, Liu C. et al. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nat. Microbiol.* **2016**, 1, 16161.

Yang H, Huang X, Fang S, He M, Zhao Y, Wu Z, Yang M, Zhang Z, Chen C, Huang L. Unraveling the Fecal Microbiota and Metagenomic Functional Capacity Associated with Feed Efficiency in Pigs. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 1555.

Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2017**, 141, 11, 1544–1557.

Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najjar FZ, Roe BA, Elshahed MS. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 5227–5236.

Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 4800–4806.

Zhang Q, Widmer G, Tzipori S. A pig model of the human gastrointestinal tract. *GutMicrobes* 2013, 4, 193–200.

Zumbo A, Di Rosa AR, Lo Presti V, Pruiti V, Piccolo D. Analysis of the volatile composition of fresh and seasoned lard in “Nero Siciliano” pigs in relation of fattening diet. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig*, Messina, (pp. 194–197). Capo d'Orlando, Italy, **2007a** (October 11–13).

Zumbo A, Lo Presti V, Di Rosa AR, Pruiti V, Di Marco V, Piccolo D. Fatty acid profile of intramuscular fat of “Nero Siciliano” fattening pigs fed with different diets. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig*, Messina, (pp. 224–227). Capo d'Orlando, Italy, **2007b** (October 11–13).

Zumbo A, Sutera AM, Tardiolo G, D'Alessandro E. Sicilian Black Pig: An Overview. *Animals* **2020**, 10, 12, 2326. <https://doi.org/10.3390/ani10122326>

8. Ringraziamenti

Ringrazio Dio e la mia famiglia per avermi supportato durante il percorso dottorale non privo di difficoltà legate soprattutto alla pandemia da COVID-19.

Esprimo la mia gratitudine al mio tutor Chiar.mo Prof. Alessandro Zumbo per la sua costante presenza, coerenza, onestà e impegno messi a disposizione per l'elaborazione di questo progetto PON industriale.

Ringrazio le aziende partner del progetto PON industriale la RiConnexIA Srl e il Sequentia Biotech SL per il loro supporto tecnico/scientifico offerto rispettivamente dal Chiar.mo Prof. Filippo Giarratana e dal direttore scientifico Dott. Riccardo Aiese Cigliano. Ringrazio inoltre il Dott. Marco Di Marsico e il Prof. Dott. Andreu Paytuví-Gallart del Sequentia Biotech SL per il loro supporto tecnico/scientifico nell'ambito dell'analisi bioinformatica e statistica.

Ringrazio il Dipartimento di Scienze Veterinarie e la Coordinatrice del corso di Dottorato Chiar.ma Prof.ssa Rosaria Laurà per l'impegno e la disponibilità mostrata durante tutto il percorso didattico del dottorato.

Un sentito ringraziamento alla Chiar.ma Prof.ssa Cristina Cravana per la costante disponibilità mostrata durante il percorso dottorale.

Ringrazio il Chiar.mo Prof. Francesco Fazio, la Dott.ssa Anna Maria Sutera e la Dott.ssa Francesca Arfuso per il loro supporto umano e tecnico/scientifico messo a disposizione durante lo svolgimento delle attività di campo e del dottorato.

Ringrazio sentitamente il Chiar.mo Prof. Orazio Romeo per il supporto scientifico e il Dott. Enrico D'Alessandro per il supporto tecnico/amministrativo profuso durante le attività di campo e nello sviluppo del progetto.

Infine, ringrazio l'azienda zootecnica "*La Quercia*" per tutta la disponibilità offerta durante le attività di campo inerenti al management dei suini.