



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

Coordinatore: Prof.ssa A. Ferlazzo

Curriculum: Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Caratterizzazione tassonomica e funzionale del microbiota intestinale di suini di razza Nero Siciliano mediante Shotgun Metagenome Sequencing.

Tesi di:

Dott. Letterio Giuffrè

Docente Tutor:

Prof. E. D'Alessandro

XXXII CICLO

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Il suino Nero Siciliano.....	1
1.2 Microbiota Intestinale.....	10
1.2.1 Microbiota intestinale nel maiale: successione ecologica, struttura e funzioni.....	13
1.3 Storia delle principali tecniche di analisi del microbiota.....	27
1.3.1 Strategie di analisi e approccio bioinformatico.....	31
2. Obiettivo del Lavoro	38
3. Materiali e Metodi	40
3.1 Estrazione del DNA.....	41
3.2 Library Preparation e Sequenziamento Parallelo Massivo.....	44
3.3 Analisi Bioinformatiche.....	47
3.3.1 Pulizia Reads.....	48
3.3.2 Classificazione Tassonomica delle Reads.....	48
3.3.3 Hierarchical clustering.....	49
3.3.4 Classificazione funzionale e ricerca dei pathway metabolici principali.....	51
4. Risultati	52
4.1 Sequenziamento e Pulizia delle reads.....	52
4.2 Classificazione Tassonomica delle Reads.....	53
4.2.1 <i>Bacteria</i>	54
4.2.2 <i>Archaea</i>	59
4.2.3 <i>Eukarya</i>	62

4.2.4 <i>Virus</i>	65
4.3 Hierarchical Clustering.....	67
4.4 Classificazione funzionale e ricerca dei pathway metabolici principali.	73
<u>5.Discussioni</u>	83
<u>6.Conclusioni</u>	92
<u>7.Bibliografia</u>	94
<u>8.Ringraziamenti</u>	116

1.Introduzione

1.1 Suino Nero Siciliano

Il suino nero siciliano è una razza autoctona siciliana allevata prevalentemente *en plain air* nell'area dei Monti Nebrodi e delle Madonie. Questi animali, caratterizzati da un elevato tasso di rusticità, sono capaci di vivere e riprodursi nei boschi più fitti e impervi, nutrendosi di ciò che la natura offre loro (bacche, radici, frutta, piante erbacee, arbusti, vermi, anfibi, insetti e piccoli roditori).



Fig. 1: Capi di suino Nero Siciliano allevati en plain air.

Resti fossili rinvenuti in Sicilia e antichi riferimenti scritti hanno permesso di datare la presenza del suino Nero Siciliano all'interno dell'isola già a partire dell'epoca del dominio greco cartaginese (VI – VII secolo a.C.). Tuttavia, ancora oggi non esiste un'ipotesi

globalmente condivisa riguardo l'origine e l'evoluzione di questa razza. Infatti, l'origine di quella che viene definita popolazione Indigena Siciliana trova molte ipotesi discordanti: per alcuni autori questa popolazione deriverebbe da razze autoctone da cui, nel corso del tempo, si sarebbe ottenuta un'unica varietà (varietà suina di Calascibetta) come anche suggerito da Romolotti nel 1929. Tuttavia, secondo Faelli il suino Nero Siciliano deriverebbe da suini di razza napoletana importati in Sicilia, viceversa Montanaro, basandosi su criteri morfologici, identifica questa razza come rappresentante del biotipo morfologico dolicocefalo presente in Europa meridionale, discendente del suino tipo Iberico del Sanson. L'elevato numero di razze indigene presenti in Sicilia in tempi passati (Chicoli, 1870) dipendeva probabilmente da una diversa morfologia territoriale rispetto a quella odierna, caratterizzata da una maggiore densità boschiva, principalmente di faggi, castagni e querce, anche a livello delle zone maggiormente perimetrali dell'isola. Tuttavia la graduale scomparsa delle aree boschive da queste zone dell'isola, ha determinato la riduzione di numerose aree di pascolo destinate all'allevamento degli animali allo stato brado o semi brado, e una conseguente diminuzione degli esemplari di suini autoctoni. Il numero ridotto di esemplari rappresentanti questa razza ha addirittura portato la FAO a

includere il suino nero siciliano nelle specie ad alto rischio di estinzione.

Per prevenire una graduale scomparsa della razza e del relativo patrimonio genetico, è stato avviato un programma di salvaguardia della biodiversità che ha portato nel 2001 al riconoscimento della razza suino nero siciliano e conseguente iscrizione al registro anagrafico delle razze autoctone. Inoltre, nel 2003 è stato istituito il Consorzio di Tutela Suino Nero dei Nebrodi, promossa 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 diffusione del maiale Nero Siciliano attraverso il riconoscimento della DOP che consente la valorizzazione della sua carne e dei suoi derivati.

Al censimento 2019 nel registro anagrafico figurano registrati circa 13600 capi rappresentati da 8400 femmine, 90 verri, distribuiti in 135 aziende (ANAS, 2019).

Si riportano di seguito i caratteri tipici che determinano l'aderenza dei soggetti di suino Nero Siciliano allo Standard di Razza, stabilito dall'ANAS nel Quadro C del Registro dei Tipi Genetici Autoctoni (D.M. 6485 del 30 maggio 2007):

Caratteri morfologici: colore nero ardesia della cute su cui si impiantano robuste setole nere che sul tratto cervicale, garrese,

dorso, lombi raggiungono la lunghezza di 10 cm circa, assumendo la forma di una criniera, tanto da richiamare l'aspetto del cinghiale. Altezza al garrese cm 60-65. Testa allungata con profilo fronto-nasale tendenzialmente diritto, grugno appuntito e robusto; orecchie mediamente sviluppate dirette obliquamente in alto con punte portate orizzontalmente in avanti. È tollerata, anche se non tipica della razza, la presenza di tette. Collo di medio sviluppo, tronco non eccessivamente lungo, depresso ai lati, addome leggermente avallato, linea dorso-lombare convessa, groppa inclinata, arti lunghi robusti, unghielli forti da gran camminatore.

Caratteri fisiologici: animale molto rustico e resistente alle malattie. La maturità sessuale è raggiunta, in entrambi i sessi, a circa 6-8 mesi. Possono aversi due parti l'anno con 7-8 suinetti per parto che, grazie al notevole istinto materno della scrofa, arrivano tutti allo svezzamento. Il numero delle mammelle varia da 10 a 12. Parti concentrati, maggiormente, a fine inverno e inizio primavera (www.ANAS.it). I suinetti si alimentano con latte materno fino allo svezzamento, che avviene a circa 60 giorni, in cui i suinetti cominciano a nutrirsi col pascolo con aggiunta di qualche integrazione nel caso di allevamenti più razionali. L'accrescimento dei suinetti risulta piuttosto lento: al primo anno di età gli animali raggiungono mediamente 50/60 kg di peso, presentano una scarsa

massa muscolare compensata da un notevole accumulo di grasso attorno al collo, garrese, dorso e lombi. Il ciclo di accrescimento-ingrasso inizia con animali appena svezzati (peso medio 15 kg) e si prolunga per 4-5 mesi per ottenere soggetti da destinare al consumo diretto quando hanno raggiunto peso medio 60-70 kg. Solo per i soggetti da destinare alla trasformazione l'allevamento si protrae per altri 4-5 mesi, per l'ottenimento di soggetti del peso medio di 110 kg. Tuttavia, il suino nero siciliano presenta delle performance in termini di accrescimento corporeo nettamente inferiori rispetto ad individui di razze selezionate.

In passato l'allevamento del suino nero siciliano era basato su metodologie essenzialmente estensive 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 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, da una forte propensione al pascolamento, favorita dalla robustezza e dallo sviluppo degli arti e dal particolare temperamento dinamico mostrato da questo animale. Inoltre anche il forte carattere familiare degli allevamenti e lo scarso sviluppo tecnologico

presente nel territorio hanno favorito questo tipo di allevamento. Tuttavia in tempi più recenti l'allevamento del suino nero siciliano si è spostato verso un sistema di tipo "en plein air", ovvero allevamento all'aperto in aree recintate le cui dimensioni variano in funzione del numero di capi presenti all'interno (mediamente 10/12 scrofe per ettaro di terreno), che prevedono inoltre l'inserimento di aree in cui gli animali possono liberamente abbeverarsi, alimentarsi, riposarsi e, per le scrofe in gestazione, sono previste delle capannine in cui partorire. Questo 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 socializzare con altri capi, determina il mantenimento di elevati standard di benessere dell'animale e consente inoltre una maggior razionalizzazione nello sfruttamento del territorio. Gli animali, oltre a cibarsi di ciò che la natura offre loro, (ghianda, tuberi, frutti di bosco, radici, melo selvatico, corbezzoli, ecc.), vengono alimentati con una dieta a base di orzo e favino, o con mangime commerciale schiacciato o pellettato. Un sistema di allevamento estensivo o semi estensivo, compreso quello del suino nero siciliano, sembrerebbe correlato a una migliore qualità delle

relative produzioni animali (Bonneau & Lebret, 2010), che risulterebbe invece del tutto compromessa quando gli animali vengono allevati in condizioni intensive e in sistemi confinati (Cava *et al.*, 2000a, Ventanas *et al.*, 2007). Numerosi studi sono stati condotti per mettere in relazione la metodologia di allevamento del suino nero siciliano con le proprietà organolettiche delle relative produzioni (Liotta *et al.*, 2002; Chiofalo V., 2002; Zumbo *et al.*, 2002; Pugliese *et al.*, 2004a,b ; Madonia *et al.*, 2007a,b; Di Rosa *et al.*, 2009; Di Rosa *et al.*, 2013). Questi studi hanno messo in evidenza un effetto significativo del regime di alimentazione (ghianda *vs* orzo) sui livelli di composti volatili in lardo fresco e stagionato (Zumbo *et al.*, 2007a) e sul profilo acidico del grasso intramuscolare (Zumbo *et al.*, 2007b). Nel sistema di allevamento estensivo a cui sono sottoposte le razze autoctone di suini fra cui anche il nero siciliano, sembrerebbe essenziale la presenza nella dieta dell'animale di cibi ad alto contenuto amidaceo quali ghiande e castagne. Infatti, campioni di grasso intramuscolare e dorsale provenienti da suini alimentati con ghiande hanno mostrato un profilo lipidico in cui la frazione di MUFA (Mono Unsaturated Fatty Acids, acidi grassi monoinsaturi) ha raggiunto livelli più elevati, al contrario la frazione di SFA (Saturated Fatty Acids, acidi grassi saturi) mostrava livelli più

bassi (Diaz *et al.*, 1996), in suino Iberico, in suino Nero Siciliano (Chiofalo B. *et al.*, 2007) e Cinta Senese (Pugliese *et al.*, 2005). Il sistema di allevamento semibrado o *en plein air*, consentendo agli animali la possibilità di accedere al pascolo e di procacciarsi il cibo autonomamente, favorirebbe lo sviluppo di un sottile strato di grasso all'interno della muscolatura del suino nero siciliano, rendendo la carne di questo animale particolarmente indicata per la produzione di insaccati quali prosciutto crudo e salame. Infatti, studi condotti su campioni di Salame tipo S. Angelo di Brolo derivati da carne di suino nero siciliano, la caratterizzazione del profilo lipidico mostrava una grande abbondanza di acido oleico (C18:1), seguito dall'acido palmitico (C16:10), dall'acido stearico (C18:0) e acido linoleico (C18:2) (Mondello *et al.*, 2003). Analisi sensoriali condotte su campioni di salame S. Angelo preparato con carne di suino nero siciliano hanno mostrato che il rapporto carne/grasso raggiungeva dei livelli ottimali (Liotta L. *et al.* 2003). Inoltre, lo stesso studio precedente ha messo in evidenza che il prodotto raggiungeva inoltre eccellenti risultati riguardo il grado di tenerezza, il colore della carne, la grana e la struttura della fetta (Liotta L. *et al.* 2003). Visti gli eccellenti parametri organolettici mostrati dagli insaccati derivati da suino nero siciliano, in maniera particolare dal prosciutto crudo, derivanti dal connubio tra il

sistema di allevamento semi estensivo, le particolare tecniche di stagionatura del prodotto, e l'influenza del territorio nebroideo, nell mese di agosto 2018, l'*Associazione per la tutela del Prosciutto Crudo ed il Salame di suino Nero dei Nebrodi* ha inoltrato istanza di riconoscimento della DOP per il Prosciutto crudo, ai sensi del Reg. (UE) n. 1151/2012 e D.M. 14 ottobre 2013, alla Regione Siciliana, UO A5.02 - Riconoscimento e tutela prodotti di qualità.

1.2 Microbiota Intestinale

Il microbiota intestinale è costituito da l'insieme di microrganismi (batteri, funghi, virus e protisti) che nel corso dell'evoluzione si sono adattati a colonizzare l'intestino di vari mammiferi instaurando con essi un rapporto simbiotico di tipo mutualistico (Knight et al., 2017). Questa comunità microbica rappresenta uno dei più importanti esempi di biodiversità esistenti: infatti si stima che l'apparato digerente umano contenga fino a cento trilioni di microrganismi, rappresentanti più di mille specie procariotiche e svariate specie eucariote e virali (Wekerle, 2017). Inoltre, questa grande biodiversità microbica possiede globalmente un enorme patrimonio genetico composto da circa 9,9 milioni di geni, definito microbioma (Li et al., 2014), che conferisce all'ospite numerose capacità funzionali coinvolte nel metabolismo energetico dell'ospite, nel metabolismo dei farmaci e degli xenobiotici, nel mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale, nell'immunomodulazione e nella protezione contro i patogeni (Jandhyala et al., 2015).

Nonostante questa comunità microbica sia particolarmente ricca di diverse specie di microrganismi, la maggior parte di questi appartiene a quattro principali phyla batterici, *Firmicutes*,

Bacteroidetes, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i quali nel complesso arrivano a rappresentare fino al 99,9% delle specie colonizzanti l'apparato digerente (Hiltman, 2017).

L'ecosistema microbico che risiede nell'apparato digerente dei mammiferi mostra una certa flessibilità e dinamicità: infatti, i vari distretti anatomici che compongono l'intestino dei mammiferi presentano delle caratteristiche chimico fisiche specifiche che permettono la colonizzazione al loro interno di un numero variabile di microrganismi e la resilienza di una determinata comunità microbica in ciascun distretto (Bik, 2009). Inoltre, nel corso vita di un individuo il microbiota è sottoposto ad alcune condizioni che possono alterarne la composizione fra cui condizioni genetiche, età, di sviluppo dell'apparato digerente, composizione della dieta, condizioni di stress e patologie (Derrien et al., 2019).

Infatti, diversi lavori scientifici hanno dimostrato che individui facenti parte dello stesso nucleo familiare, della stessa età o sottoposti ad regime alimentare simile mostrano un profilo microbico intestinale con un elevato grado di similarità (Turnbaugh et Gordon, 2009; Lynch et Pedersen, 2016; Flint et al., 2007; Mitsuoka, 1992; Woodmansey, 2007; Cho et Blaser, 2012).

Quindi, visto il gran numero di funzioni a cui il microbiota partecipa, risulta piuttosto evidente che il corretto funzionamento dell'apparato gastroenterico e, più in generale, il benessere dell'organismo dipendano anche dal mantenimento dell'equilibrio ottimale del microbiota intestinale. Infatti, l'alterazione di questo delicato equilibrio fra le diverse specie componenti il microbiota porta ad una condizione definita disbiosi, la quale sembrerebbe associata allo sviluppo di numerose patologie fra cui malattie infiammatorie intestinali croniche (Sheehan e Shanahan, 2017), steatosi epatica (Chassaing et al., 2014), obesità (Harakeh et al., 2016), diabete di tipo 2 (Sabatino et al., 2017), artrite reumatoide (Scher e 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), oftalmiche (Lu e Liu, 2016), della pelle (Williams e Gallo, 2015) ed allergie di vario tipo tra cui quelle alimentari (Blázquez e Berin, 2017).

Nel maiale, organismo molto vicino all'uomo, il microbiota intestinale svolge numerose funzioni tra cui migliora il metabolismo energetico, partecipa alla produzione di acidi grassi volatili, è coinvolto nella produzione di vitamina K, fermenta la cellulosa e, colonizzando le mucose intestinali, impedisce la

resilienza e la proliferazione di batteri patogeni (Isaacson et Kim, 2012; Kim et Isaacson 2015; Yang et al., 2017).

La conoscenza del ruolo svolto dal microbiota intestinale da un punto di vista funzionale, ha permesso lo sviluppo di diete o integratori in grado di massimizzare il benessere e le performance dell'animale in tutte le diverse fasi di vita (Aluthge et al., 2019). In quest'ottica, l'ottimizzazione delle performance dell'animale passerà attraverso una tipologia di allevamento razionale, volta a favorire la colonizzazione di una comunità microbica stabile compatibile col mantenimento del benessere animale e in grado di soddisfare le esigenze produttive dell'allevatore.

1.2.1 Microbiota intestinale nel maiale: successione ecologica, struttura e funzioni.

Il maiale alla nascita presenta un apparato gastroenterico privo di qualsiasi forma di vita microbica, tuttavia la colonizzazione risulta immediatamente successiva alla naturale esposizione dei suinetti ai microrganismi ambientali, o mediata attraverso il latte materno o il contatto con le feci della scrofa (Conway, 1997). Le specie colonizzatrici pioniere dell'apparato digerente dei suinetti appartengono generalmente ai generi *Clostridium*, *Streptococcus* e

alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Konstantinov et al., 2006; Fohse et al., 2016, Petri et al., 2010), le quali si insediano un intervallo di tempo brevissimo (entro 12 ore raggiungono 10^9 CFU/grammo di colon) (Sword et al., 1993; Jensen et al., 1998). Questa comunità microbica iniziale, grazie ad un intensa attività metabolica consuma tutto l'ossigeno ivi presente rendendo l'ambiente anossico (Konstantinov et al., 2006; Fohse et al., 2016, Petri et al., 2010). La diminuzione del contenuto di ossigeno insorge entro tre giorni dal parto e sembrerebbe determinante nel promuovere la prima modifica della comunità microbica residente, ovvero una sostituzione di gran parte della prima flora con microrganismi anaerobi facoltativi appartenenti principalmente ai generi *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (Konstantinov et al., 2006; Fohse et al., 2016, Petri et al., 2010). Questa successione microbica sembrerebbe avvenire in tutti i principali distretti dell'apparato digerente del suino e risulta fortemente associata ad una dieta a base latte materno a cui i suinetti sono sottoposti (Petri et al., 2010). La dieta a base di latte materno che viene somministrata ai suinetti durante il periodo dello svezzamento, la razza specifica dell'animale e l'attitudine materna sembrerebbero fattori fondamentali nella selezione di un "core" microbico e nella diversificazione dello stesso (Bian et al., 2016).

Tuttavia, dopo circa tre/quattro settimane dalla nascita i suinetti cominciano il periodo di svezzamento, ovvero la variazione del regime alimentare in cui l'introduzione di una dieta basata su cibi solidi, essenzialmente cereali, sostituisce radicalmente la lattazione. Lo svezzamento, che in condizioni naturali avverrebbe dopo 17 settimane, rappresenta per il suinetto un evento particolarmente traumatico soprattutto all'interno di un allevamento intensivo: infatti, il distacco precoce dalla madre, il trasporto e l'inserimento in un nuovo ambiente rappresentano per l'animale enormi fattori di stress evidenziati dall'innalzamento della frequenza cardiaca e dall'aumento della secrezione di ormoni e peptidi sensibili allo stress (Sutherland et al., 2014; Campbell et al., 2013, Melotti et al., 2011). Questi fattori, insieme all'introduzione di una dieta basata su cibi solidi, comportano una perdita delle performance del suino in svezzamento che può andare incontro ad un periodo anoressia, digiuno, infiammazione del piccolo intestino, riduzione del calibro dei villi intestinali e una maggiore permeabilità intestinale (Gresse et al., 2017). Questa variazione dell'ambiente di vita e l'introduzione di una nuova dieta influenzano anche la composizione del microbiota intestinale (Lalles et al., 2017). Infatti è stato ampiamente riportato come il periodo di svezzamento comporti una sostanziale variazione del

microbiota intestinale, che a livello di phylum si evidenzia in una netta inversione dell'abbondanza relativa dei *Bacteroidetes* rispetto ai *Firmicutes* (Fig.2) infatti se prima dello svezzamento l'abbondanza di questi ultimi si attestava intorno al 54%, dopo lo svezzamento i *Firmicutes* raggiungono il 35,8% mentre l'abbondanza dei *Bacteroidetes* sale al 54% (Pajarillo et al., 2014).

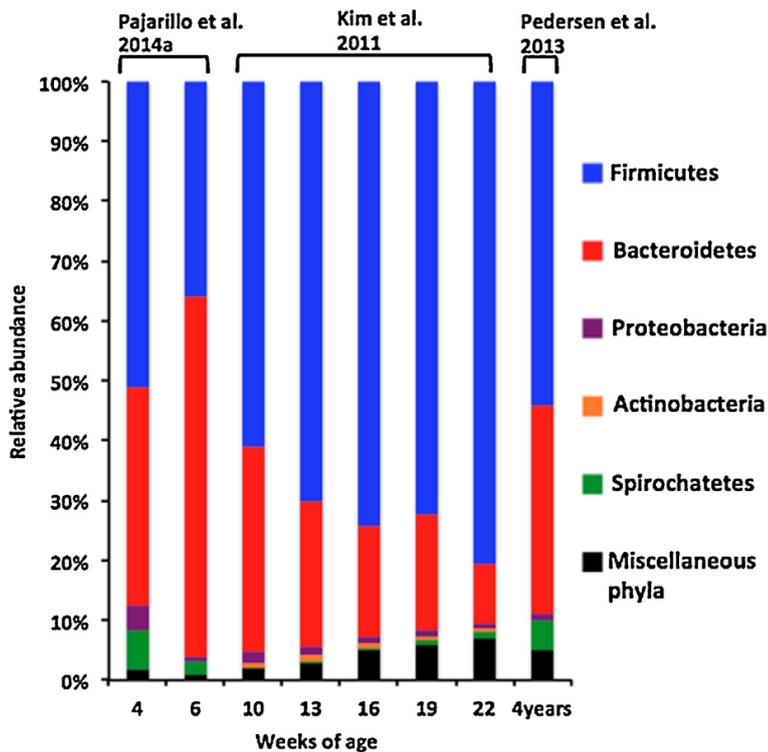


Fig. 2: Successione microbica in differenti periodi pre svezzamento e post svezzamento. Da Kim et al., 2011.

Tuttavia, Hinkle et al (2012) riportano una dinamica microbica inversa: i *Firmicutes* rappresentano il phylum più abbondante in tutte le fasi di vita dalla lattazione fino alla maturità, con un

importante 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). L'introduzione di una dieta basata su cibi solidi e il graduale abbandono del latte materno a cui il suinetto viene sottoposto, comportano una variazione del microbiota anche a livello di genere: infatti durante questa fase si assiste una graduale diminuzione dell'abbondanza dei generi *Bacteroides*, *Blautia*, *Dorea*, *Escherichia* e *Fusobacterium* e un incremento dei generi *Prevotella* e *Clostridium* (Pajarillo et al., 2014). Questo shift microbico sembrerebbe dipendere dal nuovo regime alimentare imposto ai suinetti, infatti il genere *Bacteroides* risulta particolarmente abile nel metabolizzare monosaccaridi e oligosaccaridi provenienti dal latte materno, viceversa microrganismi del genere *Prevotella* risultano particolarmente abili nella digestione di composti ottenuti da una dieta ricca in derivati vegetali (Hayashi et al., 2007; Lamendella et al., 2011, Hinkle et al., 2012, De Filippo et al., 2010; Simpson et Campbell, 2015). Inoltre, De Rodas et al. (2018), in uno studio longitudinale volto a caratterizzare il microbiota intestinale in diversi distretti dell'apparato digerente (piccolo intestino, ceco e colon) e in

diverse fasi comprese dalla nascita al raggiungimento della taglia commerciale hanno evidenziato una forte variazione 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 un 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). Viceversa, dopo lo svezzamento gli autori descrivono un forte aumento dei generi *Prevotella*, *Coprococcus*, *Blautia*, *Roseburia*, *Lactobacillus*, *Campylobacter* e *Faecalibacterium* e una forte diminuzione dei generi *Bacteroides*, *Oscillospira*, *Escherichia/Shigella*, *Clostridium*, e *Desulfovibrio* (De Rodas et al.,2018).

Questa seconda comunità microbica si manterrà costante fino al passaggio dei suini alla fase adulta, in cui alla dieta verranno inserite 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 (60/90 post parto) da parte

degli animali, le diverse comunità microbiche presenti nelle diverse 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 diverse condizioni che presenti in ogni distretto che costituisce l'apparato digerente selezionano sicuramente una determinata comunità microbica resiliente (Kim et Isaacson, 2011).

Come mostrato in figura 3, a 77 giorni dalla nascita le comunità microbiche colonizzanti il colon e il ceco risultano entrambe dominate da *Firmicutes* e *Bacteroidetes* che insieme rappresentano più del 90% della flora totale, viceversa a livello dell'ileo, le condizioni chimico fisiche favoriscono la colonizzazione di batteri appartenenti al phylum dei *Firmicutes*, che da soli superano il 90% delle specie totali (Isaacson et Kim, 2012). Viceversa, a 84 giorni dalla nascita, mentre nell'ileo si assiste a una tendenza simile a quella illustrata da Isaacson et Kim, ceco e colon mostrano una differenza nell'abbondanza dei *Bacteroidetes*, maggiore nel ceco piuttosto che nel colon (Looft et al., 2014). Questa differenza dipende da una maggiore abbondanza dei generi *Anaerobacter* e *Turicibacter* nel ceco, al contrario nel colon si assiste ad un

incremento dei generi *Prevotella*, *Oscillibacter* e *Succinivibrio* (Looft et al., 2014).

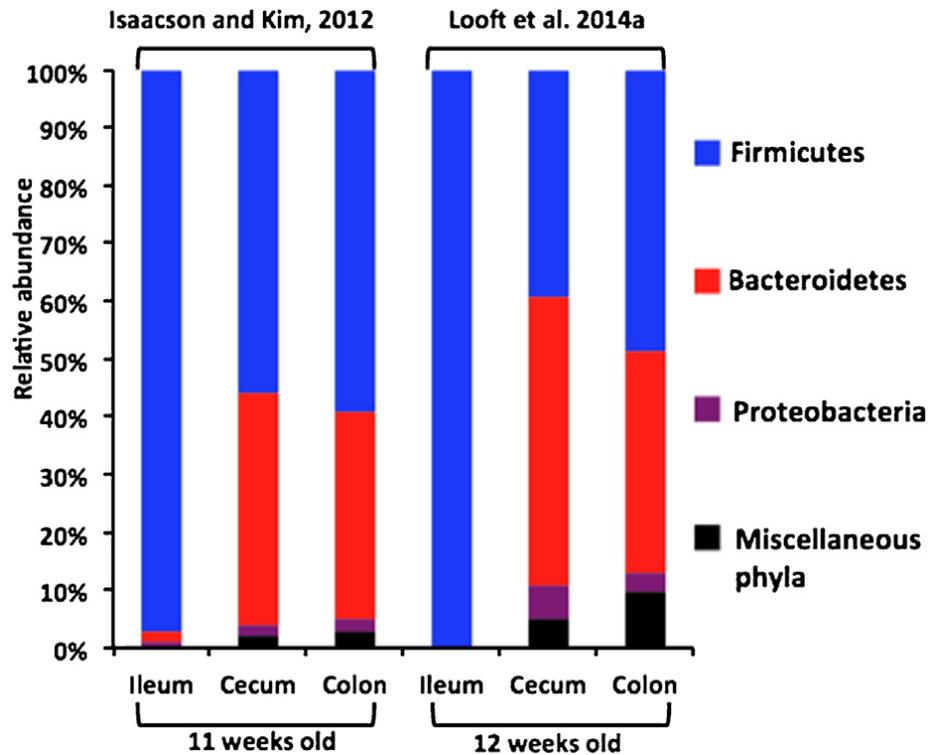


Fig. 3: Composizione del microbiota in diversi distretti anatomici dell'apparato digerente. Da Kim et Isaacson, 2011.

Recentemente, Crespo – Piazuolo et al hanno effettuato una caratterizzazione tassonomica dei vari distretti anatomici dell'apparato digerente del suino e hanno evidenziato che nel duodeno e nel digiuno i generi più abbondanti erano quelli dei *Lactobacillus* e *Clostridium*, viceversa nell'ileo si assisteva ad una maggiore abbondanza di microrganismi appartenenti al genere *Streptococcus* e alla famiglia delle *Clostridiaceae*, infine nel colon

Prevotella risultava il genere più abbondante (Crespo – Piazuolo, 2018).

Come già definito precedentemente, la comunità microbica che costituisce il microbiota risente di perturbazioni esterne che possono alterare la struttura di questo ecosistema. Tuttavia, recentemente sono stati effettuati numerosi lavori volti a determinare la struttura microbica generale del microbiota intestinale presente a varie età e in varie sezioni dell'apparato digerente. Ramayo – Caldas et al. (2016) riportano che l'apparato digerente di suini dopo circa sessanta giorni dal parto sono colonizzati principalmente da due enterotipi microbici, il primo è dominato dai generi batterici *Prevotella* e *Mitsuokella* (definito PEB), mentre il secondo da presenta *Ruminococcus* e *Treponema* (definito PEA) come generi dominanti (Ramayo – Caldas, 2016). Questi due enterotipi presentano ovviamente una diversa capacità funzionale: infatti l'enterotipo PEA mostra una spiccata abilità nel metabolismo degli amminoacidi e del butirrato, che potrebbe dipendere dalla presenza anche di generi quali *Clostridium*, *Blautia* e *Dorea* (Ramayo – Caldas, 2016). Viceversa, l'enterotipo PEA presenta una maggiore attivazione dei pathways inseriti nel metabolismo dei carboidrati (Ramayo – Caldas, 2016).

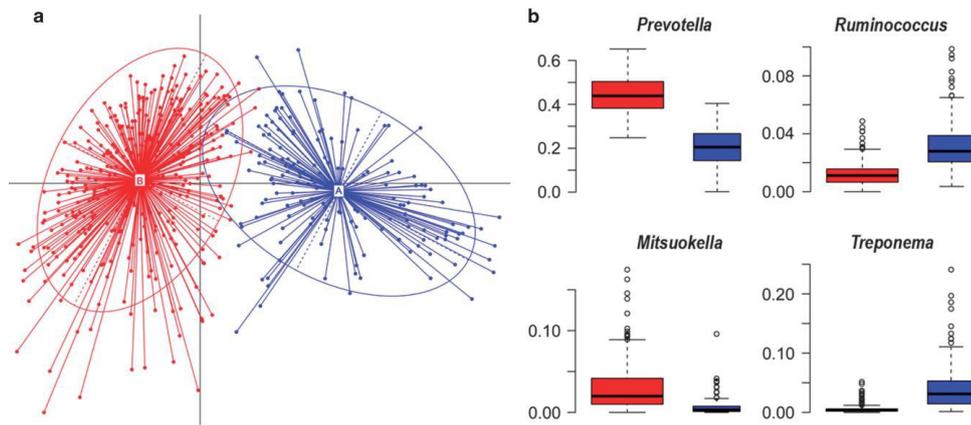


Fig. 4: Enterotipi PEA e PEB descritti da Ramayo – Caldas in suinetti a 60 giorni post parto. Da Ramayo- Caldas, 2016.

Lu et al. (2018) analizzando la comunità microbica in tre differenti fasi, svezzamento, quindici settimane post svezzamento e durante la fase adulta, hanno evidenziato che ciascun periodo mostra due enterotipi fase specifici, nessuno dei quali in comune con quanto descritto da Ramayo – Caldas (Le et al., 2018).

In particolare 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. 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* (Lu et al., 2018).

Nonostante la componente batterica costituente il microbiota sia stata largamente studiata, attualmente sono pochi gli studi che hanno cercato di descrivere la componente fungina e virale che risiedono nell'intestino del suino. La mancanza di lavori volti a determinare la struttura del microbioma e del viroma intestinale del suino dipendono sicuramente dalla loro bassa prevalenza all'interno dell'intestino (rappresentano insieme circa 1% della biodiversità del microbiota intestinale) e dalla scelta della strategia di sequenziamento utilizzata per descrivere il microbiota, che molto spesso ricade nell'amplicon sequencing utilizzando il gene ribosomiale codificante il 16S procariotico come target discriminativo (Enaud et al., 2018). Benché la caratterizzazione del microbioma umano stia fornendo informazioni molto utili inerenti il ruolo svolto dalla componente fungina all'interno dell'ecosistema microbico intestinale (El-Jurdi et al., 2017; Nash et al., 2017), nel suino attualmente sono state descritte solo 17 specie fungine appartenenti ai generi *Kazachstania*, *Galactomyces*, *Candida*,

Issatchenkia, *Pichia*, *Rhodotorula*, e *Trichosporon* (Hillman et al., 2017). Tuttavia, in uno studio di caratterizzazione del microbiota intestinale del suino nero siciliano effettuato con metodiche coltura dipendenti sono state isolate sette specie fungine differenti di cui due, *Clavispora lusitaniae* e *Pichia kudriavzevii*, mai riportate in precedenza (Giuffrè et al., 2018).

Viceversa, maggiore interesse ha riscontrato la descrizione del viroma intestinale del suino, probabilmente anche a causa delle infezioni virali che colpiscono il suinetto durante il periodo di svezzamento (Svensmark et al., 1989). Attualmente, all'interno del viroma intestinale suino sono stati descritti prevalentemente famiglie virali batteriofaghe quali i *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Microviridae* che svolgono una funzione spesso regolatoria sulla componente batterica intestinale, impedendo la colonizzazione di patogeni e favorendo anche il trasferimento genico orizzontale (Hillman et al., 2017). Inoltre, all'interno del microbiota del suino sono stati descritti virus con elevato potenziale patogenico appartenenti alle famiglie degli *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae* (Wang et al., 2019; Johnson et al., 2017; Denner, 2017; Allen et al., 2011).

Tuttavia, oltre alla descrizione del microbiota a livello tassonomico, sono stati effettuati studi riguardanti la caratterizzazione del patrimonio genico del microbiota, e delle potenzialità funzionali da esso mostrate.

Ovviamente, come abbiamo già visto precedentemente, le potenzialità metaboliche espresse dal microbiota variano in funzione della sua stessa composizione a causa della maggiore predisposizione di particolari gruppi di microrganismi a metabolizzare specifici substrati.

Infatti, da studi recenti è emerso che la composizione del microbiota intestinale del maiale sembrerebbe influenzare le performance dell'animale producendo variazioni nell'aumento del peso medio e all'efficienza di conversione alimentare (Mach et al, 2015; McCormack et al., 2017; Ramayo – Caldas, 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 et al. e il 50% dei relativi pathways 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 et al., in un lavoro comparativo fra gruppi di maiali che mostravano differenti performance alimentari, hanno identificato un totale di 3.452.610 differenti open reading frame (ORF) di cui 4327 associate a geni coinvolti in 329 differenti pathways metabolici, di questi 18 risultavano associati a una migliore efficienza alimentare (Yang et al., 2017).

Inoltre, recentemente McCormack et al. (2017) riportarono l'esistenza di una correlazione fra generi microbici ed efficienza alimentare: in particolare gli autori associarono i generi *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Butyrivibrio* e la specie *Defluviitaleaceae incertae sedis* a bassi valori RFI (residual feed intake), trovarono nove pathways metabolici con un'abbondanza differenziale fra animali con alto e basso indice RFI (McCormack et al., 2017).

1.3 Storia delle principali tecniche di analisi del microbiota.

Col termine microbiota si intende genericamente l'insieme delle popolazioni microbiche colonizzanti un dato ambiente, come un sedimento marino, una porzione di suolo o di una radice o un particolare sito anatomico di qualunque mammifero (Lederberg et McCray, 2001).

La consapevolezza che il numero delle cellule componenti la comunità microbica colonizzante il nostro organismo superasse di almeno dieci volte quello delle nostre stesse cellule, e che la maggioranza di questi microrganismi risiedesse nel nostro intestino risale a più di quaranta anni fa (Savage, 1977).

Tuttavia, in passato la caratterizzazione di quella che una volta veniva chiamata flora microbica intestinale veniva effettuata mediante tecniche coltura dipendenti: i campioni in analisi, successivamente a una serie di diluzioni seriali utili ad un abbattimento della carica microbica, venivano seminati in terreni di coltura selettivi. Dopo l'incubazione in diverse condizioni di temperatura e pressione parziale di CO₂, le colonie cresciute venivano sottoposte ad un processo di identificazione presuntiva basato sull'osservazione di una serie di caratteristiche fenotipiche,

come la morfologia macroscopica e microscopica, le caratteristiche fisiologiche e biochimiche (O'Sullivan, 2000, Domig et al., 2003; Hao et Lee, 2004; Tannock, 2002; Tannock, 2001). Tuttavia questo metodo, oltre a richiedere un'enorme quantità di lavoro e di conoscenze fenotipiche, sottostima di molto la biodiversità dei campioni in quanto circa il 60% delle specie componenti il microbiota intestinale risulta non coltivabile (Pei et al., 2004; Verhelt et al., 2004; Zhou et al., 2004, Aas et al 2005; Bik et al., 2006), e, inoltre, altera enormemente le proporzioni fra le specie coltivabili. Successivamente, con l'invenzione del termociclatore e l'introduzione della clonazione di frammenti di nostro interesse all'interno di vettori di clonaggio, la caratterizzazione del microbiota si spostò verso un approccio basato su metodologie molecolari. Infatti, attorno agli anni 2000 vennero riportati dei lavori di caratterizzazione di comunità microbica basati su un approccio metagenomico, in cui il DNA microbico veniva estratto direttamente dal campione senza una fase colturale preliminare, e quindi veniva utilizzato per la creazione di librerie di cloni che sarebbero state successivamente sequenziate (Handelsman et al., 1998). L'approccio metagenomico, sorpassando la fase colturale, ha permesso di caratterizzare anche la larga fetta di microrganismi

non coltivabili e ha fornito delle proporzioni fra i generi maggiormente realistiche.

L'avvento della rivoluzione genomica favorito dallo sviluppo dei sequenziatori di seconda generazione avvenuta tra il 2005 e il 2006 ha ulteriormente modificato le metodiche utilizzate nella caratterizzazione del microbiota, fornendo degli strumenti in grado di ampliare enormemente le nostre conoscenze sull'interazione microbiota – ospite.

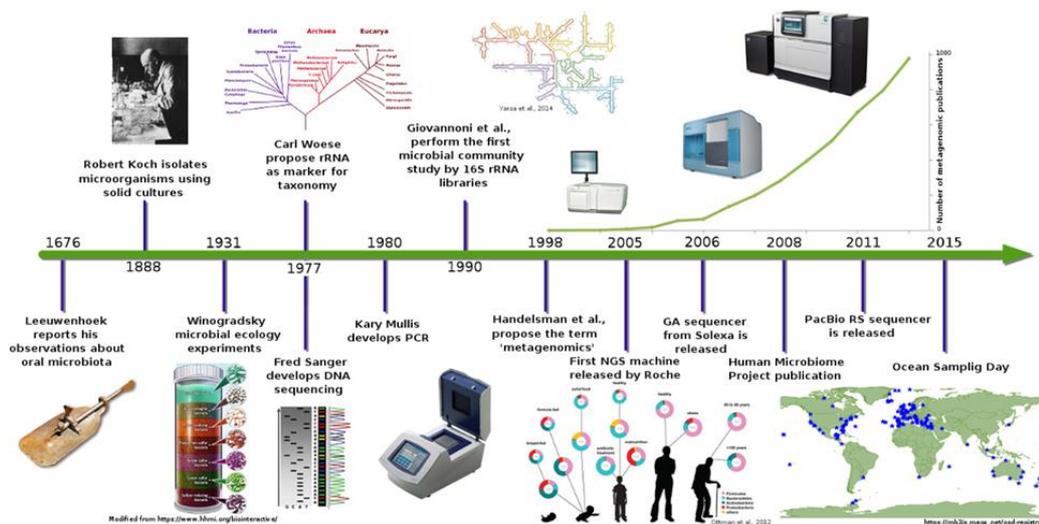


Fig. 5: Sequenza di eventi che mostra i progressi temporali fatti negli studi di comunità microbiche da Leeuwenhoek alle moderne tecnologie di sequenziamento parallelo massivo (NGS). Da Escobar-Zepeda et al., 2015

Il principale vantaggio fornito dai sequenziatori di seconda generazione è stato quello di poter ottenere un elevatissimo numero di sequenze, nell'ordine di centinaia di migliaia o talvolta anche decine di milioni in un'unica corsa di sequenziamento. Questa enorme mole di dati generati ha incentivato la ricerca delle

cosiddette scienze -omiche, in cui è sicuramente inserita la metagenomica.

Infatti, la figura 3 evidenzia come la Next Generation Sequencing abbia incentivato enormemente la ricerca nell'ambito della caratterizzazione del microbiota. In data 30/08/2019, ricercando le parole chiave "microbiota gut" sulla banca dati PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) si ottengono 21518 articoli scientifici, di cui 6019 review. Inoltre, l'approccio metagenomico contestualmente alla disponibilità di sequenziatori di seconda generazione ha fatto sì, che nel corso del tempo, la nostra conoscenza relativa alle diverse specie componenti il microbiota intestinale si sia accresciuta in maniera esponenziale rispetto al 1% - 3% che era noto grazie ai metodi colturali (Gordon, 2012).

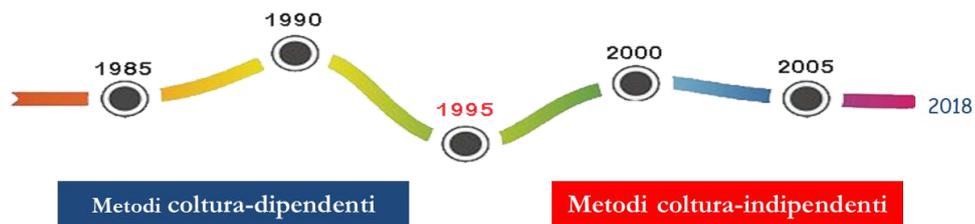
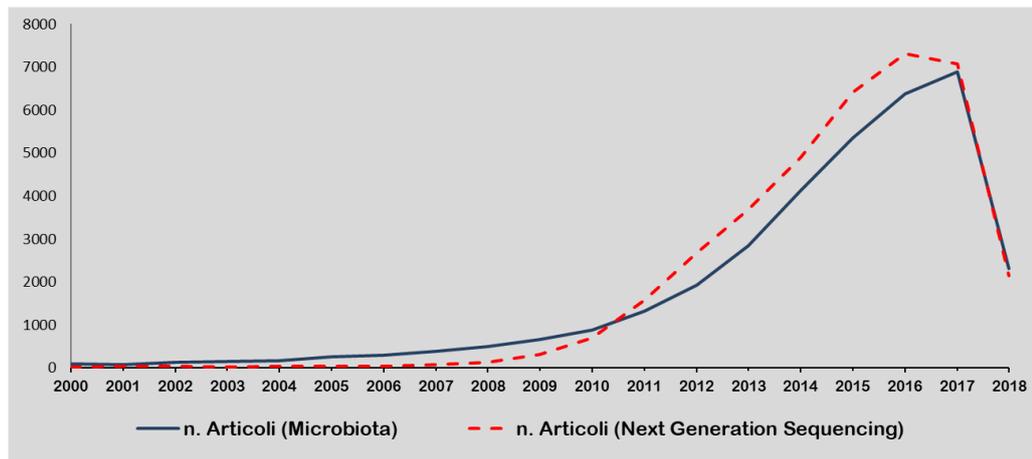


Fig. 6: Relazione fra numero di articoli pubblicati dal 2000 ad oggi contenuti la parola Microbiota e “Next Generation Sequencing”.

1.3.1.Strategie di analisi e approccio bioinformatico

L'avvento dei sequenziatori di seconda generazione ha permesso di ottenere una enorme mole di dati che ha ampliato enormemente le conoscenze inerenti il microbiota intestinale e delle relative interazioni fra i microrganismi che lo costituiscono e il nostro organismo (Malla et al., 2019).

Fondamentalmente, le principali strategie di sequenziamento applicate ad un progetto metagenomico sono due: la prima è Target Sequencing che si basa sull'amplificazione e successivo sequenziamento di geni utili all'identificazione dei vari

microrganismi presenti all'interno del campione. L'amplificazione avviene mediante l'uso di primers universali fiancheggiati da specifici marker molecolari che sono il 16S per i procarioti e l'ITS o il 18S negli eucarioti. Le sequenze vengono comparate ad una banca dati genetica e permette generalmente la ricostruzione tassonomica della comunità microbica fino a livello di genere. Inoltre, amplificando solo degli specifici marcatori codificanti informazioni utili solo a scopo filogenetico, questa metodica non fornisce alcuna informazione relativa al contenuto genico della comunità. Tuttavia, mediante alcuni tool bioinformatici è possibile predire una ipotetica struttura metabolica del microbiota basandosi sulla struttura della comunità microbica e sull'abbondanza relativa di ciascun genere.

Il secondo metodo di analisi è lo Shotgun Metagenome Sequencing. In questo approccio il DNA metagenomico viene frammentato e sequenziato senza nessuna amplificazione preliminare di specifici target molecolari. Verranno dunque sequenziati frammenti nucleotidici random dei vari genomi microbici contenuti nel campione in analisi che, successivamente una comparazione contro un database nucleotidico, permetteranno dapprima di ricostruire completamente la comunità microbica, includendo *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya* e *Virus*, fino a livello di

specie. Inoltre, mediante l'identificazione delle regioni codificanti sequenziate, sarà possibile effettuare un'annotazione del metagenoma per predire il contenuto genico e i relativi pathways metabolici.

Da un punto di vista metodologico, ciò che accomuna queste strategie di sequenziamento è sicuramente le fasi di preparazione del DNA al sequenziamento che si conclude con la produzione di librerie geniche: questo processo prevede inizialmente la frammentazione del DNA con metodi fisici o enzimatici per ridurre le dimensioni e renderlo sequenziabile (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 adattatori (Yohe et Thyagarajan, 2017). Una volta completata la fase di library preparation, 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

permette 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. Le sequenze amplificate verranno infine sottoposte al processo di sequenziamento: ciascuna molecola di DNA legata alle celle del sequenziatore fungerà da stampo per la sintesi di una molecola complementare, il segnale che permette di rilevare la corretta incorporazione dei nucleotidi nel filamento in via di sintesi variano in funzione della tecnologia utilizzata e vanno dalla rilevazione di un segnale luminoso base specifico emesso all'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 reads (sequenze) verranno incorporate in un particolare tipo di file definito FASTQ che presenta una precisa formattazione.

```

1  @ERR000589.41 EAS139_45:5:1:2:111/1
2  CTTTCCTCCCTGCTTTCCTGGCCCCACCATTTCCAGGGAACATCTTGTCAT
3  +
4  3IIIIIIIIIIII>IIIIFF9BG08E00I%IG+&?(4)%00646.C1#&(
5  @ERR000589.42 EAS139_45:5:1:2:1293/1
6  AGTTGTAAAAATCCAAGCCAATTAAGATAGTCTTATCTTTTTAAAAAGAAAT
7  +
8  IIIIIIGII.AIIII=?I9G-/II=+I=4?761BA2C9I+5A711+&>1$/I

```

Fig. 7: Esempio di File .fastq

Infatti le informazioni relative a ogni sequenza vengono suddivise in quattro righe di testo in cui la prima riga che comincia sempre col simbolo @ rappresenta un'indicazione della reads (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 (phred – score) per ogni singola base presente nella seconda riga espressi secondo il codice ASCII.

In un progetto metagenomico esistono essenzialmente due diverse strategie di analisi bioinformatica del dato di sequenziamento (Siegwald et al., 2016; Breitwieser, et al., 2017):

Nella strategia clustering first, le reads vengono dapprima sottoposte ad un processo di pulizia chiamato trimming, in cui si effettua la rimozione delle sequenze adattatrici e di quelle di bassa qualità. Successivamente le reads vengono clusterizzate in un processo definito binning in gruppi tassonomici definiti OTU in funzione di caratteristiche genetiche quali frequenza tetranucleotidica, contenuto in GC, etc. Una volta effettuato il binning, le OTU vengono classificate a livello tassonomico attraverso la comparazione di queste con banche dati di sequenze. Infine, successivamente all'assegnazione tassonomica, viene

analizzata l'abbondanza di ciascuna OTU e definito la struttura del microbiota (Siegwald et al., 2016; Breitwieser, et al., 2017).

Viceversa nel classified first, dopo il trimming, le reads vengono immediatamente utilizzate per l'assegnazione tassonomica oppure assemblate in frammenti di grandezza superiore (contigs) mediante un processo definito assembly, o meta-assembly in un esperimento metagenomico, basato sulla sovrapposizione delle sequenze. I contigs ottenuti dal processo di assembly potranno essere classificati a livello tassonomico. Inoltre, per dati di sequenziamento ottenuti con l'approccio dello shotgun metagenome sequencing, le sequenze nucleotidiche o i contigs possono essere anche analizzate per la ricerca del contenuto genico e la ricostruzione funzionale del microbioma. (Siegwald et al., 2016)

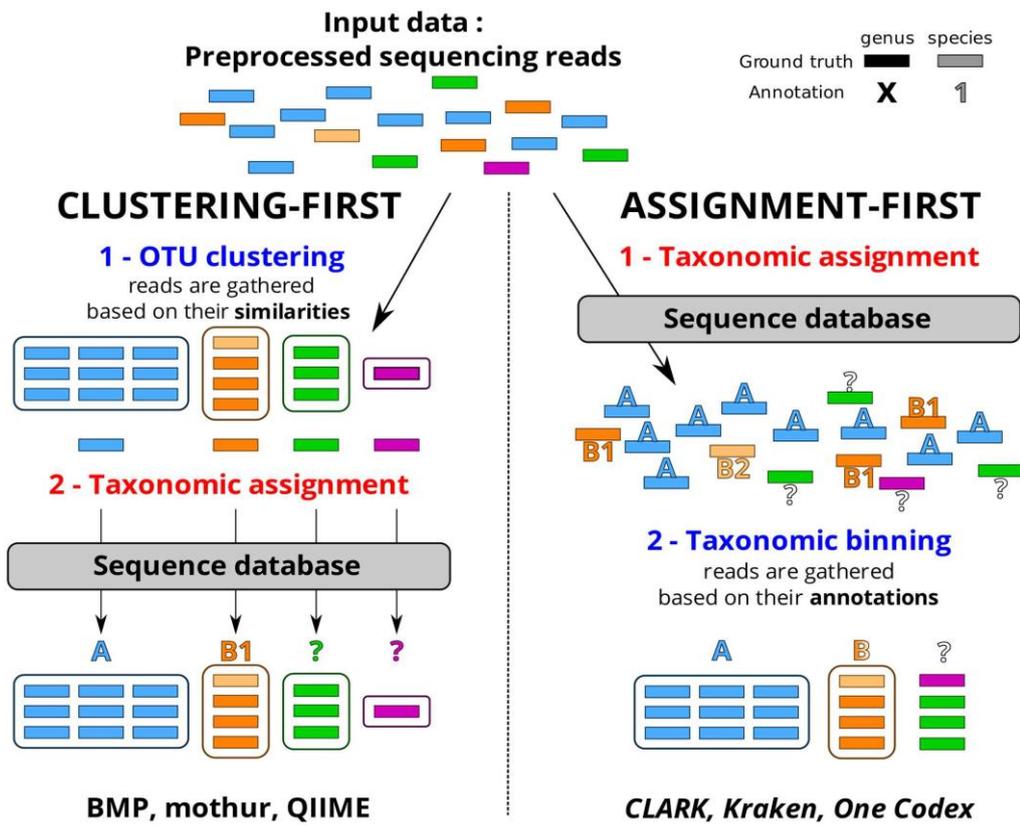


Fig. 8: Principali strategia di analisi del dato di sequenziamento NGS in un esperimento metagenomico. Da Siegwald et al., 2016.

2. Obiettivo del Lavoro

Il suino nero Siciliano rappresenta una razza autoctona siciliana con caratteri fenotipici e comportamentali che lo distinguono enormemente dalle razze di suino utilizzate negli allevamenti intensivi. Storicamente questo animale è sempre stato allevato con metodologie di tipo estensivo, tuttavia nell'ultimo ventennio la tipologia di allevamento è stata standardizzata con l'introduzione dell'allevamento definito "en plein air", che ha permesso di preservare il benessere dell'animale e allo stesso tempo di implementare le performance produttive dell'animale.

Lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento di seconda generazione ha fornito degli strumenti in grado di produrre una mole enorme di dati genetici e di espandere le nostre conoscenze in ambito clinico, microbiologico, ambientale, etc. L'applicazione del sequenziamento shotgun alla caratterizzazione del microbiota del suino ha consentito di scoprire la reale importanza che riveste il microbiota sul benessere dell'animale e l'influenza che questa comunità microbica ha sulle performance produttive degli animali. Tuttavia, in questi studi sono state descritte le comunità microbiche intestinali solo di maiali allevati in maniera intensiva come Large White, Duroc, Yorkshire, Laiwu, e Gloucestershire Old Spo, mentre

non esiste alcun lavoro di caratterizzazione del microbiota intestinale del suino Nero Siciliano. Pertanto, alla luce di queste considerazioni, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare il microbiota intestinale di tre soggetti di suino Nero Siciliano e di ricostruire le relative potenzialità metaboliche attraverso la caratterizzazione del patrimonio genico di questa comunità microbica.

3. Materiali e Metodi

Nel nostro studio, da tre soggetti di razza Nero Siciliano, omogeni per sesso (femmine) età (8 mesi) e peso vivo (75 kg), allevati in tre distinte aziende zootecniche nella provincia di Messina, sono stati prelevati campioni di feci fresche ai fini delle determinazioni analitiche. Gli animali risultavano regolarmente iscritti al “Registro Anagrafico” dell’Associazione Nazionale Allevatori Suini “ (ANAS), organismo ministeriale che ne definisce lo standard morfologico e ne registra le statistiche vitali; e allevati secondo gli standard allevatoriali in linea con il sistema “*en plein air*”, che ne garantisce performances *in vitam* ottimali rispettando le migliori condizioni di benessere animale. Agli animali oggetto di studio, veniva somministrato un mangime composto per suini all’ingrasso a base di Orzo, Favino, Granturco, Cruschetto di Frumento, polpe essiccate di Agrumi, Carrube, Melasso di Canna da zucchero ecc; il cui apporto proteico in termini di proteina grezza era pari al 15%.

Al fine di evitare contaminazioni con microrganismi del suolo, i campioni sono stati prelevati direttamente dall’ampolla rettale e disposti in tubi di plastica sterili, trasportati in ghiaccio secco in laboratorio dove sono stati conservati a -80°C fino al loro processamento.

3.1 - Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto seguendo il protocollo descritto da Tang (Tang et al., 2013) apportando qualche piccola modifica. Brevemente, per ciascun campione 1,6 grammi di feci congelate sono stati sospesi in 10ml di tampone fosfato salino (PBS) 0,05 M pH: 7,4 e vortexati per due minuti. La rottura meccanica delle pareti è stata effettuata aggiungendo glass beads e vortexando per 3 cicli da un minuto ciascuno. Una prima fase di eliminazione delle impurità è stata effettuata mediante centrifugazione dei campioni a 400g per 2 minuti, successivamente alla quale il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo sterile, viceversa al pellet sono stati aggiunti 3ml di PBS freddo, il tutto è stato vortexato per 2 minuti e quindi centrifugato per ulteriori 2 minuti a 400g. Dopo aver unito i due surnatanti, ai campioni sono stati aggiunti 3 volumi di paraformaldeide 4% e incubati in ghiaccio per un'ora. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 8000g per 3 minuti e quindi, dopo aver scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in una soluzione composta 4 ml di PBS freddo e 4 ml etanolo assoluto freddo e incubati a -20°C per 20 minuti. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 8000g per 3 minuti e il pellet è stato risospeso in 4 ml di TE buffer, vortexato e un'aliquota di 500 µL è stata trasferita in eppendorf da 2ml. Al fine di rimuovere i

residui cellulari nonché contaminanti di natura lipidica e fenolica, il pellet di ogni campione è stato risospeso in CTAB extraction buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.0 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVP, 2% β -mercaptoetanolo) incubato per un'ora a 65°C, con agitazione ogni 15 minuti. Successivamente all'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 16000g per 10 minuti e il surnatante è stato trasferito in una nuova eppendorf sterile e risospeso dapprima in un volume di soluzione cloroformio – alcool isoamilico 24:1 (v/v), centrifugato a 16000g per 10 minuti, e il surnatante è stato prelevato e sospeso in un volume di cloroformio e centrifugato a 16000g per 10 minuti a 4°C. Il DNA è stato fatto precipitare mediante aggiunta di 2 volumi di etanolo assoluto, incubato a -20°C per 30 minuti e disidratato con un passaggio in etanolo al 70%. Infine, il DNA è stato risospeso in 50 μ L di acqua sterile bidistillata e l'RNA contaminate è stato rimosso mediante l'aggiunta di 3 μ L di RNAsi e incubato a 37°C per un'ora.

La qualità e la quantità del DNA estratto sono state saggiate mediante lo spettrofotometro Nanophotometer P330 (Implen, Germany), e attraverso elettroforesi in gel di agarosio 1% (w/v).

Infine, una prova di specificità dell'estrazione è stata effettuata mediante amplificazione in vitro del gene ribosomiale procariotico 16S (Lane, 1991), del gene FTO, associato all'obesità nel maiale

(Dvořáková et al., 2012) e dell'ITS fungino (White et al., 1990). L'amplificazione è stata effettuata utilizzando 25µL di DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA) 1µl di DNA genomico templato e 1µl di ogni primer (Tab.1) in un volume finale di 50µl. Le reazioni di PCR sono state effettuate mediante lo strumento MyCycler thermal cycler (Bio-Rad, Milano, Italia) secondo un protocollo che prevedeva: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min seguita da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 55°C per 1 minuto, estensione a 72°C per 1:40 sec ed infine un unico step di estensione finale a 72°C per 10 min. Un'aliquota di questa miscela di reazione (15µL) è stata utilizzata per verificare, mediante elettroforesi in gel d'agarosio 1,5% (w/v) , la formazione degli specifici ampliconi.

Marcatore	Primers	Sequenze
ITS	ITS -1 ITS- 4	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
16S rDNA	27F 1492R	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
FTO	FTO -F FTO-R	5'-TCAAGAAGCCTTCCTCGCACTG-3' 5'-TGGGGATCCATGAAGCTCAACA-3'
Tab.1: Primers utilizzati per il controllo della specificità di estrazione		

3.2 - Library Preparation e Sequenziamento Parallelo

Massivo

Solo i campioni contenenti almeno 50ng di DNA e che a seguito del controllo di qualità presentavano valori di $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$ e non mostravano presenza di DNA suino contaminante sono stati sottoposti alla fase di preparazione delle librerie genomiche effettuata per mezzo del kit Nextera® DNA Library Prep. Questa metodica si suddivide in 6 step:

- Frammentazione del DNA e inserimento di sequenze adattatrici (Tagmenting)
- Purificazione del DNA “tagmentato”
- Amplificazione del DNA “tagmentato”
- Purificazione della libreria
- Controllo della libreria
- Normalizzazione della libreria

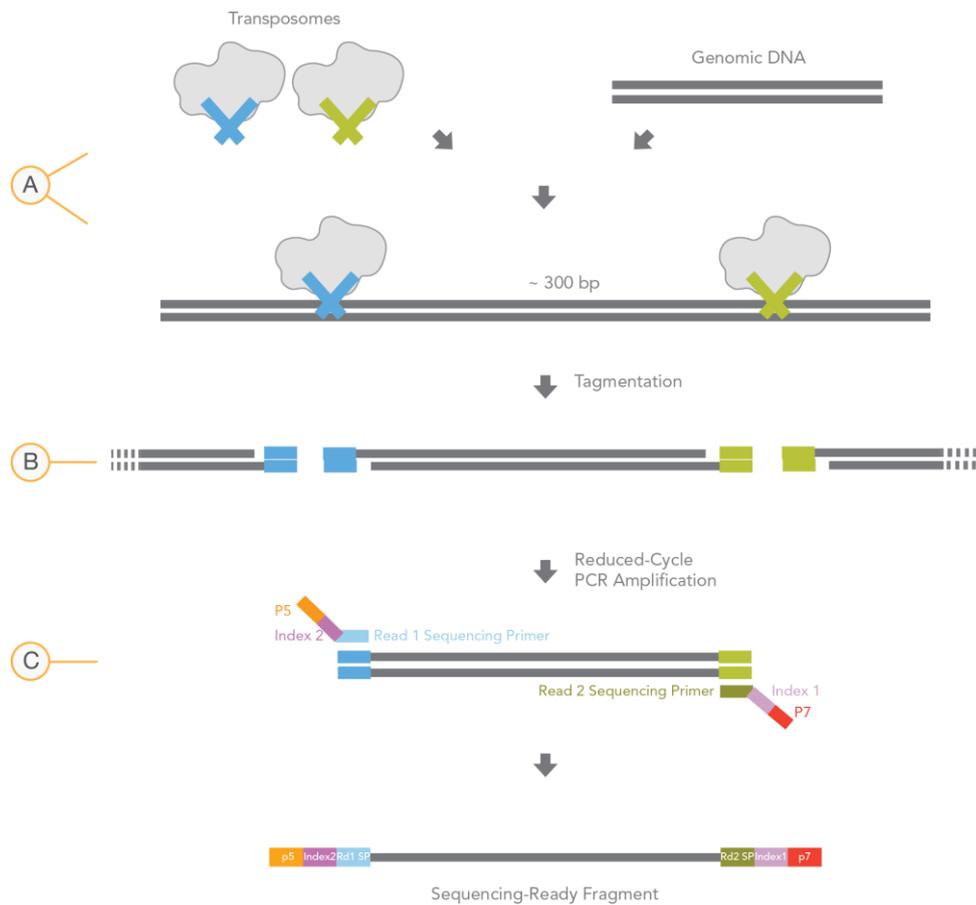


Fig. 9: Workflow preparative della libreria col metodo enzimatico Nextera Illumina

Nel primo step, 50 ng di DNA sono stati trattati enzimaticamente con trasposasi che, mediante un meccanismo definito “taglia e incolla”, hanno frammentato il DNA e altresì aggiunto a ogni estremità delle sequenze “tag”.

Successivamente ad una fase di purificazione, necessaria per rimozione delle trasposasi residue, i frammenti di DNA marcati alle due estremità sono stati utilizzati come template per una reazione di amplificazione in vitro (PCR) necessaria ad inserire ad ogni

estremità ulteriori due coppie di sequenze adattatrici fondamentali per la fase successiva di cluster generation e di sequenziamento.

I prodotti di PCR sono stati purificati mediante perline magnetiche in grado di rimuovere i primers, sali, dideossinucleotidi in eccesso eliminando, inoltre ampliconi troppo corti.

Successivamente, prima dello step finale di normalizzazione delle librerie che porta ad avere all'interno del sequenziatore una quantità uguale di DNA da sequenziare per ogni linea della flow cell, è necessario sottoporre il DNA ad un controllo quantitativo e qualitativo. Il controllo quantitativo dei nostri campioni ha permesso di valutare la quantità di DNA in ciascuna library ed è stato effettuato miscelando 1 μ L dei nostri campione con sonde a doppio filamento marcate e successiva rilevazione mediante saggio fluorimetrico con lo strumento Qubit. Viceversa, l'analisi qualitativa che ha permesso di effettuare una distribuzione per grandezza degli inserti di DNA delle nostre library, è stato effettuata prelevando 1 μ L di una diluizione 1:3 dei nostri campioni e analizzandolo per mezzo dello strumento Agilent Technology 2100 Bioanalyzer. Successivamente, in funzione dei risultati ottenuti dal controllo delle libraries, i nostri campioni sono stati diluiti fino a ottenere una concentrazione di 2nM ciascuno, e sequenziati in paired-end (2x150) su piattaforma Illumina NextSeq 500.

3.3 - Analisi Bioinformatiche.

Le sequenze di DNA una volta sequenziate sono state sottoposte ad un workflow di analisi che si è articolato principalmente in 4 punti.

- Pulizia delle reads
- Classificazione Tassonomica delle reads
- Hierarchical clustering delle reads non classificate con BLAST
- Classificazione funzionale e ricerca dei pathways metabolici principali

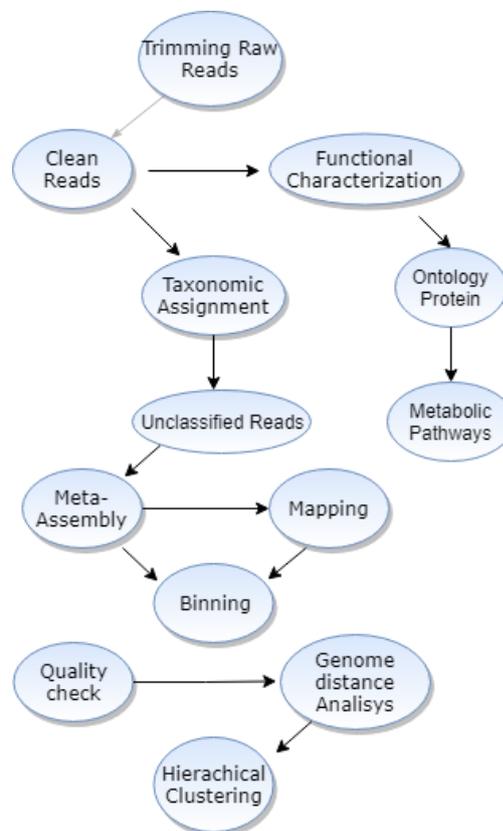


Fig. 10: Workflow bioinformatico applicato per la caratterizzazione tassonomica e funzionale del microbiota del suino nero siciliano

3.3.1 - Pulizia Reads

Le raw reads sequenziate sono state ispezionate con il software FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) al fine di valutare la qualità del sequenziamento. Successivamente, le reads di bassa qualità (phred-score < 20) e le sequenze adattatrici sono state rimosse mediante un approccio basato sull'analisi di kmeri con l'ausilio del software Bbduk (jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/). Inoltre, in questa analisi è stato imposto che le reads avessero una lunghezza minima di 35 nucleotidi.

3.3.2 - Classificazione Tassonomica reads

A questo punto le sequenze nucleotidiche sono state sottoposte a tutto il workflow che porta alla caratterizzazione tassonomica della comunità microbica. Le reads pulite sono state prima di tutto unite con il software PEAR (Paired-End reAd mergeR) (Zhang J. et al., 2014). Questo software, riconoscendo il codice identificativo delle reads, permette di ricongiungere le coppie di reads ottenute dal sequenziamento dello stesso frammento. Le coppie di reads complementari che non presentavano alcuna regione di sovrapposizione sono state concatenate unendo il “reverse complement” del filamento antisenso con la sequenza del

corrispettivo forward, colmando il gap grazie all'inserimento di una "N". Le sequenze così ottenute sono state classificate a livello tassonomico mediante il tool BLAST (Boratyn G.M. et al., 2013), utilizzando come reference l'intero database di sequenze nucleotidiche non ridondante della piattaforma NCBI (versione 08/2018), e applicando un'identità minima di sequenza del 60% e un p-value di almeno $1e^{-06}$ come filtri. Al fine di eliminare eventuali sequenze contaminanti, tutti le reads afferenti al dominio *Bacteria* sono stati filtrate per abbondanza, imponendo un numero di reads minimo assegnato pari allo 0,01% di reads classificate per singolo campione. Inoltre, tutte le reads classificate come *Viridiaeplantae* o *Metazoa* sono state considerate dei contaminanti e quindi rimosse mediante l'utilizzo di script in house. Al fine di risalire al last common ancestor (LCA) di ogni sequenza, i risultati sono stati processati mediante lo script ClassifyBlast.pl implementato all'interno del software Krona v.2.7 (Ondov B.D. et al, 2011).

3.3.3 - Hierarchical clustering

Per cercare di caratterizzare tassonomicamente il maggior numero di reads possibili, le sequenze nucleotidiche per le quali non è stata trovata alcuna corrispondenza con il precedente approccio sono state processate utilizzando un metodo riportato da Pasolli et al. (Pasolli et

al., 2019). Le reads non classificate provenienti da ciascun campione sono state assemblate con metaSPades (v.3.13.1) (Nurk S. et al., 2017) e rimuovendo i risultanti contigs con lunghezza inferiore a 1kb. Successivamente, il software Bowtie2 versione 2.3.5.1 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) è stato utilizzato per mappare le reads di ciascun campione contro i contigs ottenuti precedentemente. I bam files ottenuti sono stati dunque analizzati dal software Metabat2 versione 2.12.1 (Kang et al., 2019) insieme ai vari contigs in modo da raggruppare gli stessi contigs in gruppi di sequenze (bins) secondo un'analisi di frequenza tetranucleotidica. La qualità dei bins ottenuti precedentemente è stata valutata mediante il software CheckM versione 1.0.18 (Parks et al., 2014) attraverso l'analisi dei seguenti parametri: grado di completezza, di contaminazione e di eterogeneità a livello di ceppo. I bins che presentavano una completezza maggiore del 50% e una contaminazione minore del 5%, sono stati selezionati per effettuare un'analisi comparativa contro l'intero database genomico RefSeq (154.884 genomi, 02/2019) utilizzando il software Mash (Ondov et al., 2016) e stimare la distanza genomica con ognuno di essi. La distanza di mash, ovvero la stima della distanza nucleotidica, dei risultati con p-value minore di 0,05 è stata utilizzata per elaborare un cluster gerarchico e costruire un albero filogenetico attraverso i

seguenti pacchetti implementati in R: hclust, limma, ape. Un bin è stato classificato a livello di specie soltanto se presenta una distanza di Mash non superiore a 0,05 con un genoma (Pasolli et al., 2019). Tuttavia se le distanza di mash superavano il valore di 0,05, sono stati fissati ulteriori due valori limite di 0,15 e 0,3 entro cui i bins sono stati classificati rispettivamente a livello di genere e di famiglia (Pasolli et al., 2019). Infine, l'albero filogenetico è stato visualizzato mediante il tool online ITOL versione 4 (Letunic et Bork, 2019).

3.3.4 - Classificazione funzionale e ricerca dei pathway metabolici principali.

In questo studio è stata inoltre effettuata la caratterizzazione funzionale del microbiota di tre scrofe di suino razza Nero Siciliano. Per questo fine, le reads con phred score ≥ 20 sono state analizzate con il software FAMLI (Golob et Minot, 2018) metodo *align*, che prevede una traduzione e successivo allineamento delle sequenze dei nostri campioni contro l'intero database proteico UniRef90 (versione 06/2018). I risultati sono dunque analizzati da FAMLI, il quale ha scartato tutti i match che presentavano un punteggio di allineamento inferiore a 20. Successivamente, i codici proteici associati a ciascuno dei nostri risultati sono stati utilizzati per ottenere i gene ontology

di ciascuna proteina corrispondente e ricostruire il pathway metabolico di ciascun campione.

4. Risultati

4.1 - Sequenziamento e Pulizia delle reads

In questo studio, il sequenziamento parallelo massivo effettuato su Illumina NextSeq 500 ha prodotto 76.489.348 reads (Tab.2). La pulizia delle reads effettuata con BbDuk ha rimosso 11.952.730 (Tab2) di sequenze nucleotidiche di bassa qualità (15,6%), mentre il rimanente 84,37% presentava qualità valori di phred-score ≥ 20 (Fig.11).

Samples	Raw Reads	Clean Reads	%
PIG1	22.031.696	18.605.972	84,45
PIG2	33.418.104	28.358.680	84,86
PIG3	21.039.548	17.571.966	83,52
Total	76.489.348	64.536.618	84,37

Tab.2:Metriche di sequenziamento e di trimming

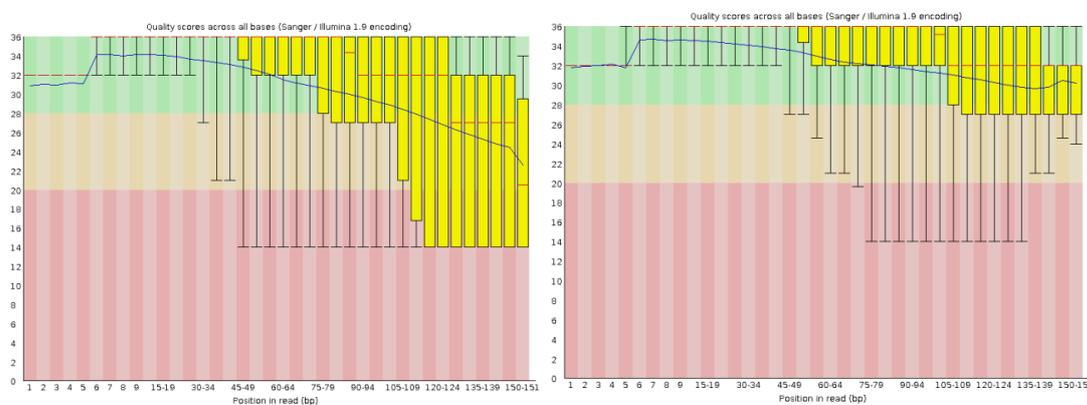


Fig. 11: Comparazione qualità reads prima e dopo il processo di Trimming.

4.2 - Classificazione Tassonomica delle Reads

L'assegnazione Tassonomica effettuata mediante BLAST (Boratyn G.M. et al., 2013), ha permesso di ricostruire l'insieme della comunità microbica colonizzante l'intestino di tre scrofe razza Nero Siciliano.

Questa analisi ha consentito l'identificazione di 44 phyla, 937 generi e 2.005 specie diverse derivanti dalla classificazione di 6.302.344 sequenze (19,53%), le restanti reads non hanno trovato alcuna corrispondenza statisticamente rilevante all'interno dell'intero database di sequenze non ridondante GenBank.

PIG1 è stato il campione in cui sono state affiliate il maggior numero di reads (2.755.723, 29,62%), viceversa nei campioni PIG2, nonostante il maggior numero di reads prodotte dal sequenziamento, e PIG3 sono state classificate rispettivamente 2.071.384 (14,6%) e 1.475.237 (16,8%).

Quasi la totalità delle reads appartengono a microrganismi appartenenti al dominio *Bacteria* (99%) seguiti dagli *Archaea* (0,7%), *Eukaryota* (0,1%) e *Viruses* (0,04%). In maniera molto interessante, nel campione PIG2 a una diminuzione dei *Bacteria* fino al 97% è stata controbilanciata da un aumento degli *Archaea* fino al 2%.

4.2.1 - Bacteria

A livello di phylum, mediamente i *Firmicutes* (79%) sono risultati essere il gruppo più abbondanti, seguiti da *Proteobacteria* (6%), *Actinobacteria* (5%), *Bacteroidetes* (3%). Tuttavia, quando i campioni vengono analizzati singolarmente, questa proporzione di phyla non viene sempre rispettata. Infatti, per esempio i *Firmicutes* nel campione PIG1 rappresentano addirittura 87% di tutte le reads classificate, mentre il phylum dei *Bacteroidetes*, nel campione PIG2, raggiunge il 6% rappresentando insieme ai *Proteobacteria* il secondo phylum più abbondante.

Lactobacillus, invece, rappresenta il genere più abbondante in tutti e tre i campioni dove la sua prevalenza oscilla dal 73% di PIG1 e il 31% di PIG2, con PIG3 (33%) che mostra proporzioni sovrapponibili a quelle di PIG2 (Fig.12).

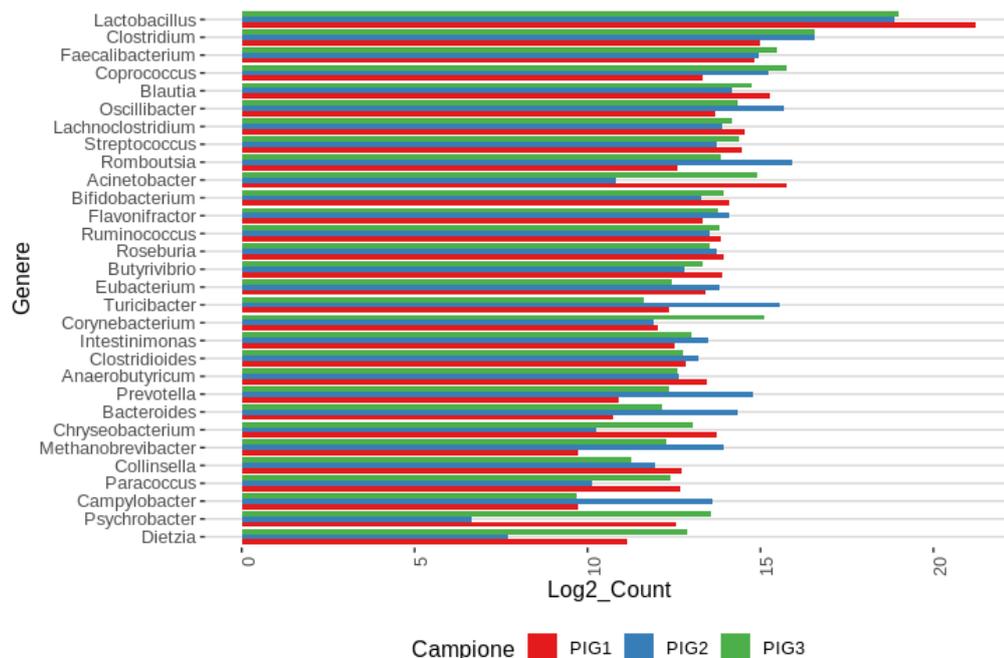


Fig. 12: Barplot raffigurante i 30 principali generi batterici per campione riscontrati in questo studio.

Benché i campioni presentino una composizione di generi molto omogenea sono evidenti delle proporzioni diverse fra i diversi campioni. Per esempio, il genere *Clostridium* risulta maggiormente rappresentato nei campioni PIG2 e PIG3 rispetto al campione PIG1; *Acinetobacter* presenta un'abbondanza molto scarsa nel campione PIG2 rispetto a PIG1 e PIG3 e, infine il campione PIG2 presenta una prevalenza maggiore dei generi *Oscillibacter*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Campylobacter* rispetto a PIG3 ma soprattutto a PIG1. Ne risulta quindi che i campioni PIG2 e PIG3 mostrino una maggiore eterogeneità a livello di genere rispetto a

FIG1, in cui il bloom del genere *Lactobacillus* crea delle notevoli disproporzioni fra i generi.

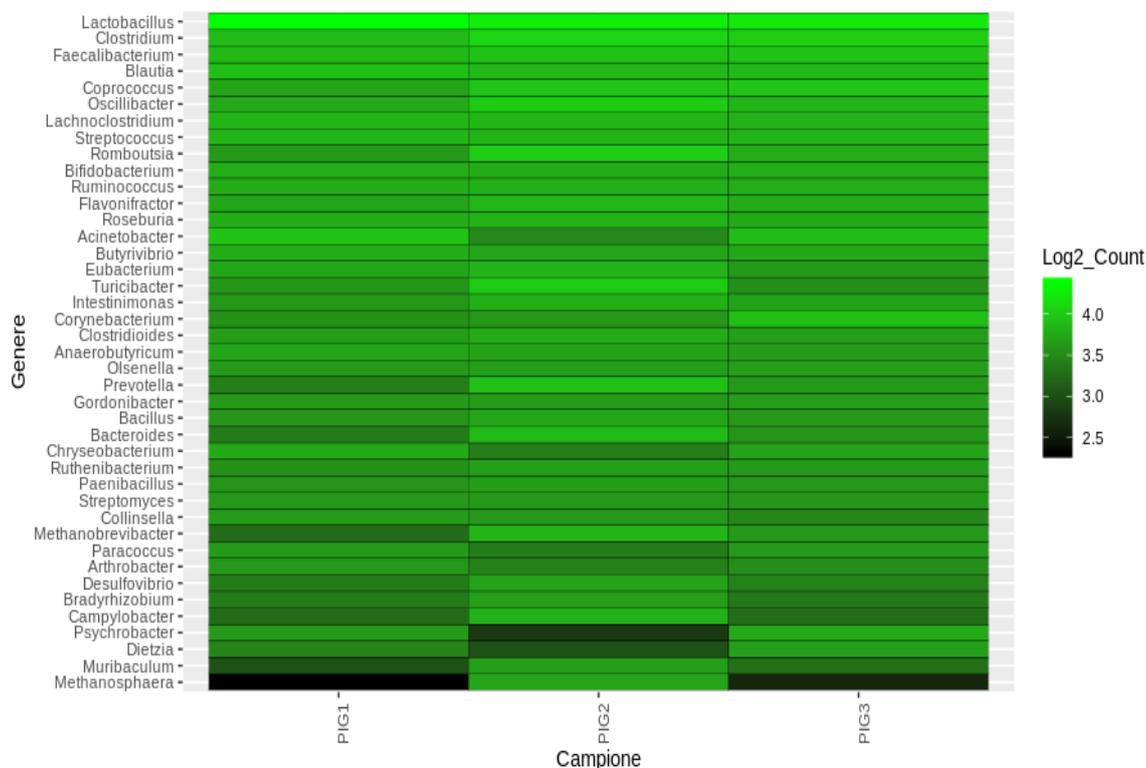


Fig. 13: Barplot raffigurante i 30 principali generi batterici per campione riscontrati in questo studio

A livello di specie, *Lactobacillus amylovorus* è stata la specie con la maggior prevalenza in tutti i campioni in analisi (mediamente 40%), arrivando a rappresentare addirittura il 60% nel campione FIG1, mantenendosi invece rispettivamente al 25% e al 27% nei campioni FIG2 e FIG3.

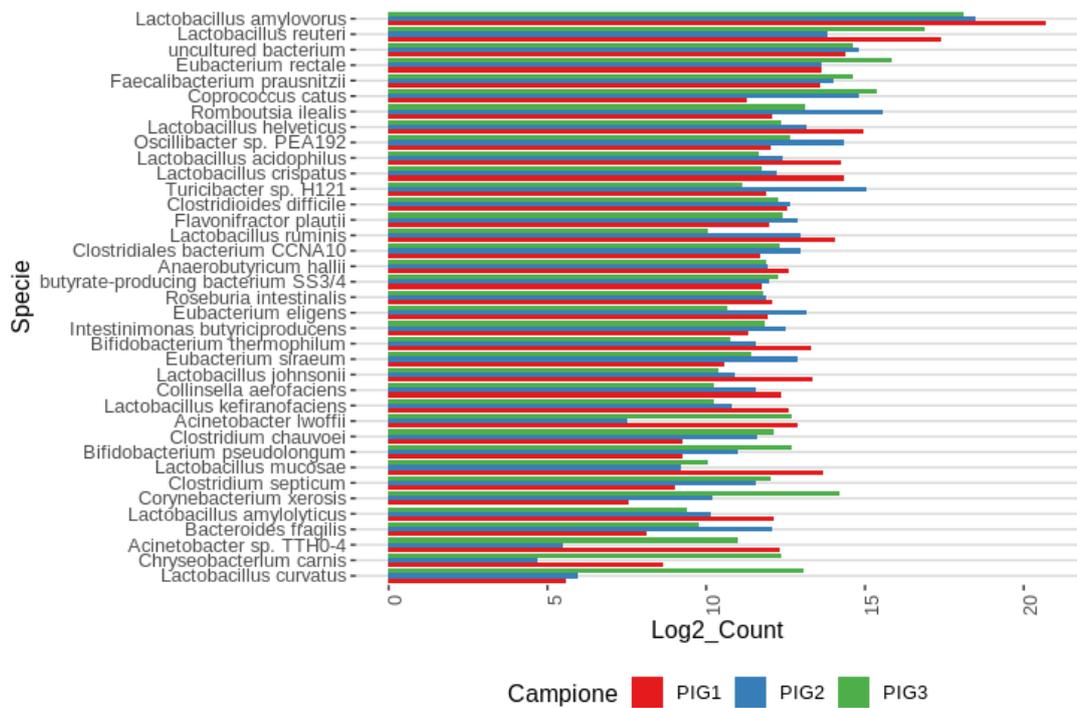


Fig. 14: Barplot raffigurante le 30 principali specie batteriche riscontrate in questo studio

Tuttavia la Fig.14, in cui sono illustrate le venti specie maggiormente presenti all'intero dei tre campioni, ci evidenzia come, nonostante vi siano molte specie condivise fra i tre campioni con abbondanze sovrapponibili, alcune specie mostrano al contrario una prevalenza piuttosto diversa fra i tre campioni. Per esempio, il campione PIG1 mostra una maggiore abbondanza di specie appartenenti al genere *Lactobacillus*, fra queste oltre *Lactobacillus amylovorus* spiccano, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus amyolyticus*, *Lactobacillus mucosae* noti per essere microrganismi estremamente utili come costituenti del microbiota e spesso utilizzati come

probiotici, mentre presenta una minore prevalenza di specie appartenenti ai generi *Clostridium* e *Coprococcus*.

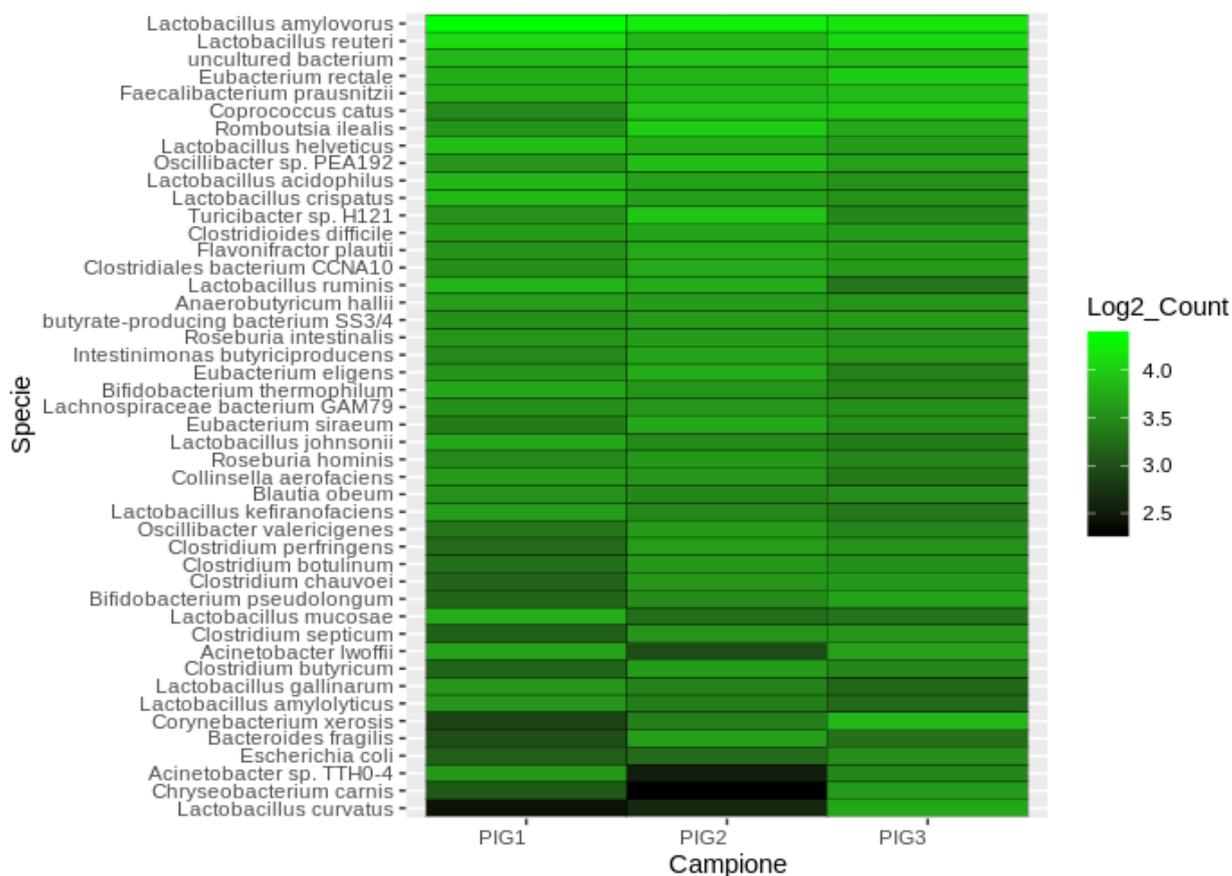


Fig. 15: Abbondanza differenziale delle principali specie batteriche riscontrate. Il colore verde indica una maggiore abbondanza, viceversa il nero indica una minore prevalenza

Viceversa, i campioni PIG2 e PIG3 che hanno mostrato una maggiore eterogeneità a livello di genere, mostrando di conseguenza una maggiore abbondanza di specie appartenenti ai generi *Clostridium*, *Coprococcus*, *Romboutsia*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*. In particolare *Turicibacter sp. H121*, *Lactobacillus*

curvatus, *Rombutsia ilealis*, mostrano una prevalenza differenziale specifica fra i campioni (Fig.15).

4.2.2 Archaea

Gli *Archaea* sono stati riscontrati con una percentuale media dello 0,7%, nonostante il campione PIG2 si distacchi da questa percentuale, presentando il 2% di reads classificate all'interno di questo dominio.

All'interno del dominio degli *Archaea*, il phylum più abbondante è risultato essere quello degli *Euryarchaeota* (98%) seguito da quello dei *Thaumarchaeota* (1%) e *Crenarchaeota* (0,5%). Tuttavia, nel campione PIG1 il phylum degli *Thaumarchaeota* risulta maggiormente presente rispetto agli due campioni arrivando a rappresentare 8% delle sequenze attribuite agli *Archaea*.

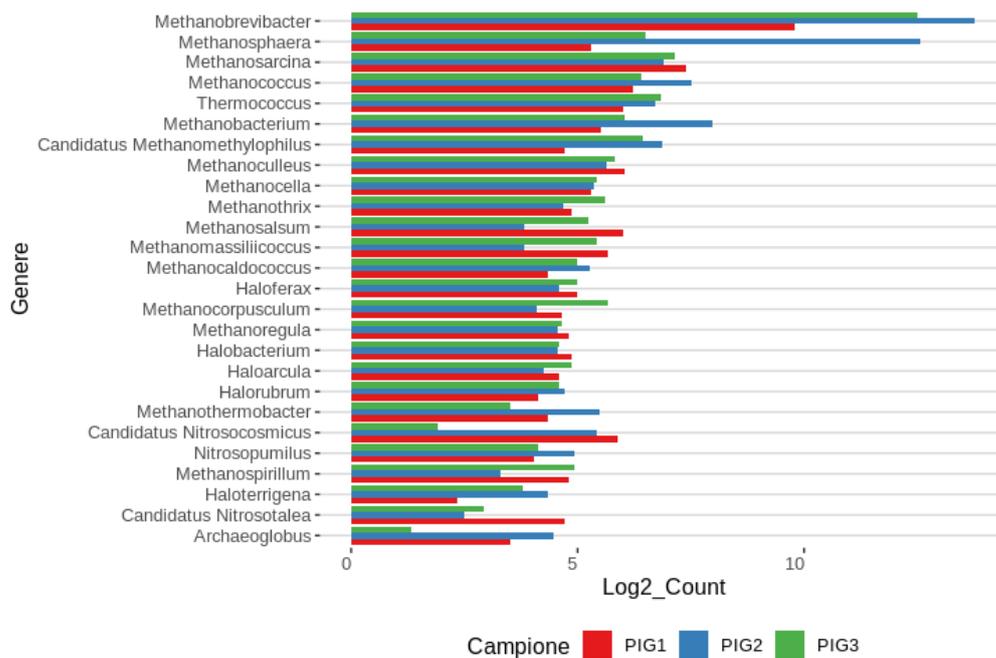


Fig. 16: Barplot raffigurante i principali generi di Archaea identificati in questo studio

Sebbene la distribuzione dei generi all'interno dei campioni appaia piuttosto omogenea, *Methanobrevibacter* che risulta essere il genere più abbondante in tutti e tre i campioni, con una prevalenza maggiore in PIG2 e PIG3 rispetto a PIG1. Anche il genere *Methanosphaera* mostra un'abbondanza significativamente maggiore PIG2 rispetto ai campioni PIG1 e PIG3.

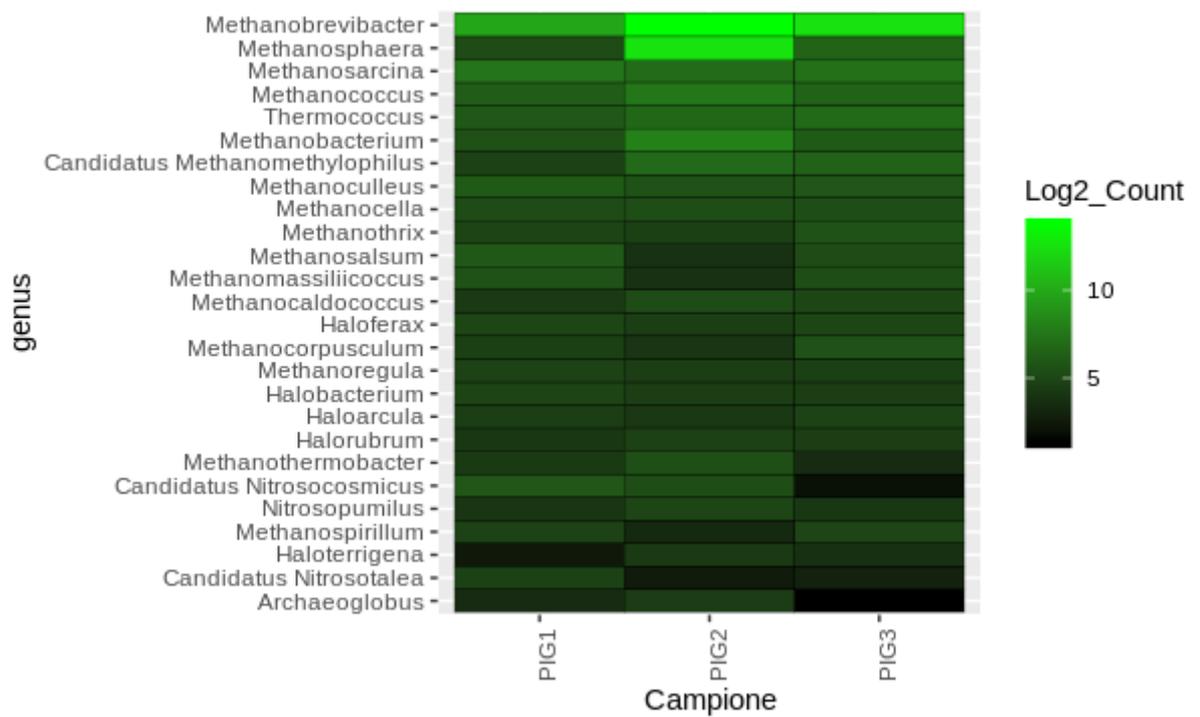


Fig. 17: Abbondanza differenziale dei principali generi di archaea riscontrati. Il colore verde indica una maggiore abbondanza, viceversa il nero indica una minore prevalenza

Le specie più abbondanti del dominio *Archaea* appartengono ovviamente al genere *Methanobrevibacter*, e in particolare *Methanobrevibacter* *sp.YE315*, *Methanobrevibacter* *milerae*, *Methanobrevibacter* *smithii*, *Methanobrevibacter* *olivae* sono maggiormente prevalenti in tutti e tre i campioni, seguite da *Methanosphaera* *stadtmanae*. Tuttavia, benché queste specie siano quelle maggiormente prevalenti in tutti i campioni, risulta piuttosto evidente una maggiore abbondanza all'interno del campione PIG2, probabilmente dovuta al maggior numero di reads classificate all'interno del dominio de *Archaea*.

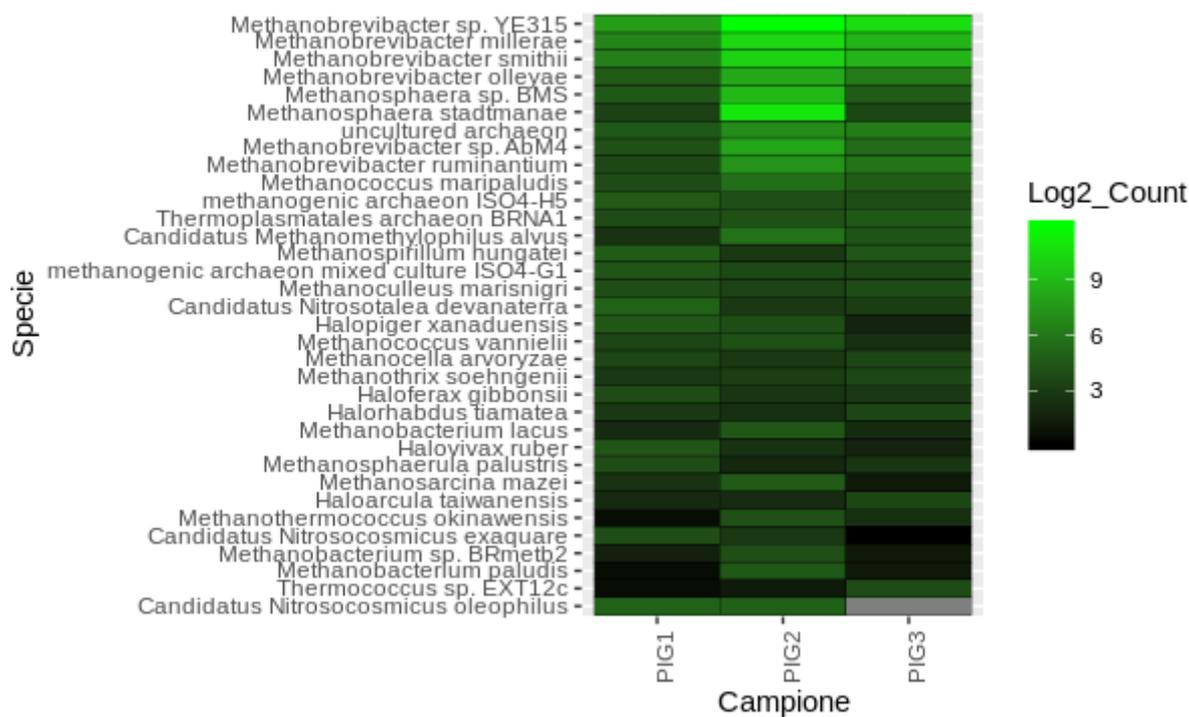


Fig. 18: Abbondanza differenziale delle principali specie di Archaea riscontrate. Il colore verde indica una maggiore abbondanza, viceversa il nero indica una minore prevalenza

4.2.3 Eukarya.

Gli *Eukarya* in questo lavoro rappresentano lo 0,1% del microbiota, con percentuali per singolo campione che oscillano dallo 0,03% di PIG1 allo 0,3% di PIG3. Le sequenze affiliate al dominio degli *Eukarya* vengono distribuite fra il regno dei *Fungi* (67% degli *Eukarya*) rappresentati dai phyla *Ascomycota* (46%), *Basidiomycota* (16%), *Mucormycota* (1%), *Chytridiomycota* (0,9%) e il regno dei *Protisti* rappresentati dal solo phylum degli *Apicomplexa* (33%).

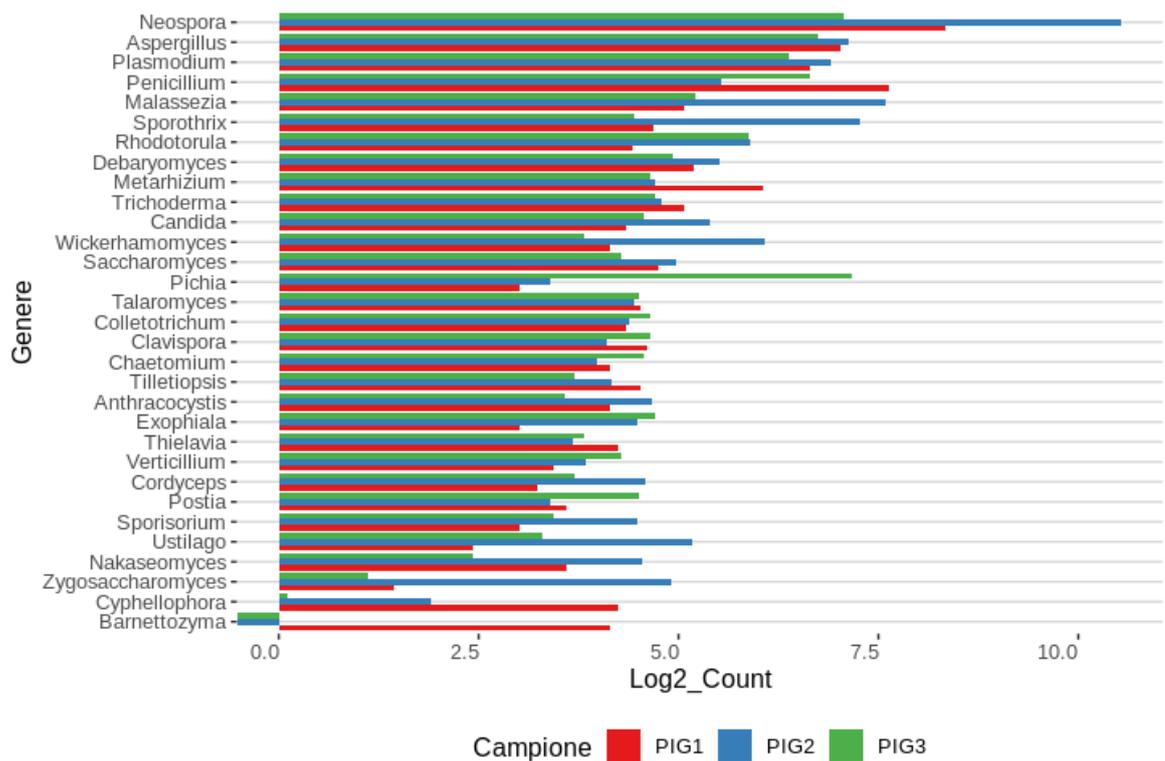


Fig. 19: Barplot dei principali generi eucariotici riscontrati in questo studio

La distribuzione dei generi appartenenti agli eucarioti risulta piuttosto omogenea fra i tre campioni e il genere protista *Neospora* risulta il più abbondante nei campioni PIG1 e PIG2, viceversa nel campione PIG3 è il genere fungino *Pichia* a mostrare la prevalenza maggiore.

La composizione dei venti generi più abbondanti illustrata in Figura 19, evidenzia come molti di questi presentino un elevato potenziale patogenico.

Questa evidenza viene confermata anche quando andiamo ad analizzare le principali specie eucariotiche riscontrate nei nostri campioni.

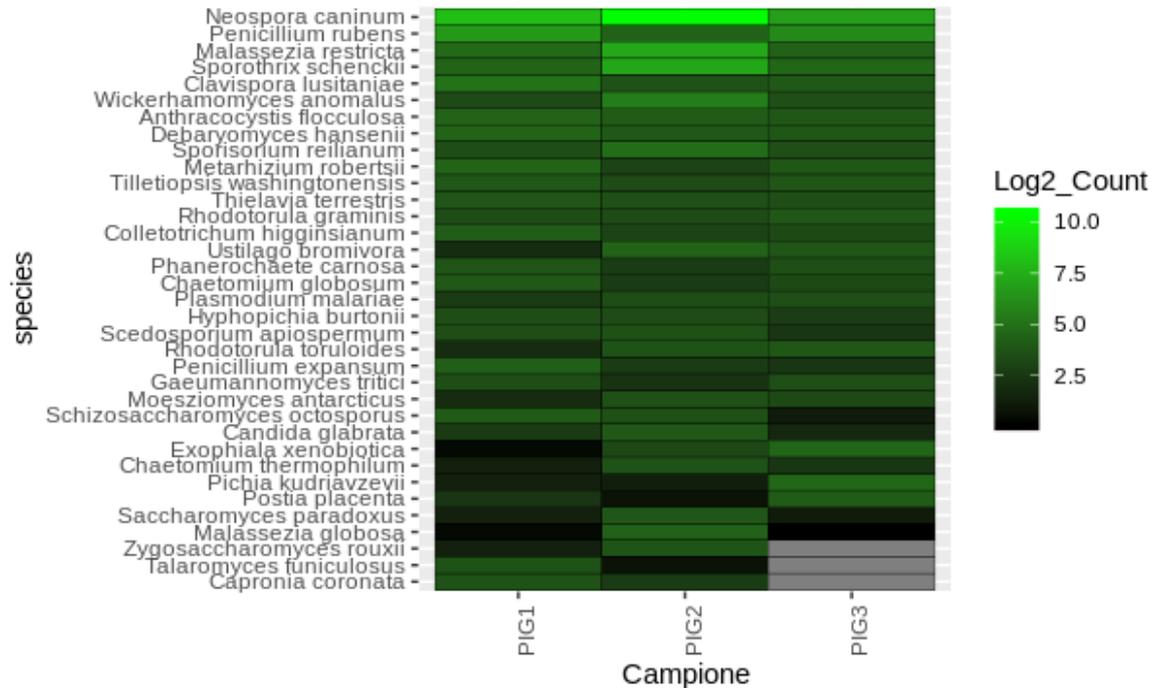


Fig. 20: Heatmap illustrante le 20 specie eucariotiche maggiormente identificate in questo studio.

La specie maggiormente riscontrata è stata il *Neospora caninum*, noto protista dalle abitudini parassitarie che colpisce soprattutto i bovini, dove provoca aborti, e cani. Importanti funghi patogeni quali *Sporothrix schenckii* e *Candida glabrata* sono stati riscontrati in tutti i campioni, con una prevalenza maggiore in PIG2. Inoltre, la presenza delle specie fungine *Candida lusitaniae* e *Pichia kudriavzevii* come componenti del microbiota intestinale qui riportata conferma un

primo isolamento delle stesse specie dalla stessa matrice biologica effettuato mediante un approccio coltura dipendente.

4.2.4 Virus

I virus sono degli organismi facenti parte del normale microbiota con una percentuale che può potenzialmente raggiungere quella della popolazione batterica residente (Hillman et al, 2016).

In questo lavoro solo lo 0.04% delle reads classificate da BLAST sono state identificate appartenenti a virus. Come mostrato in figura 21, la famiglia virale maggiormente riscontrata è risultata essere quella dei *Siphoviridae*, al cui interno sono comprese specie virali batteriofaghe, ovvero virus infettanti i batteri. L'abbondanza dei batteriofagi nei tre campioni è stata ulteriormente arricchita dalla grande abbondanza di sequenze appartenenti alla famiglia dei *Myoviridae*. Nel campione PIG2 risulta inoltre molto interessante l'abbondanza mostrata dalla famiglia virale dei *Parvoviridae*, al cui interno sono incluse specie virali con un importante patrimonio patogenico nei confronti di diverse specie di mammiferi

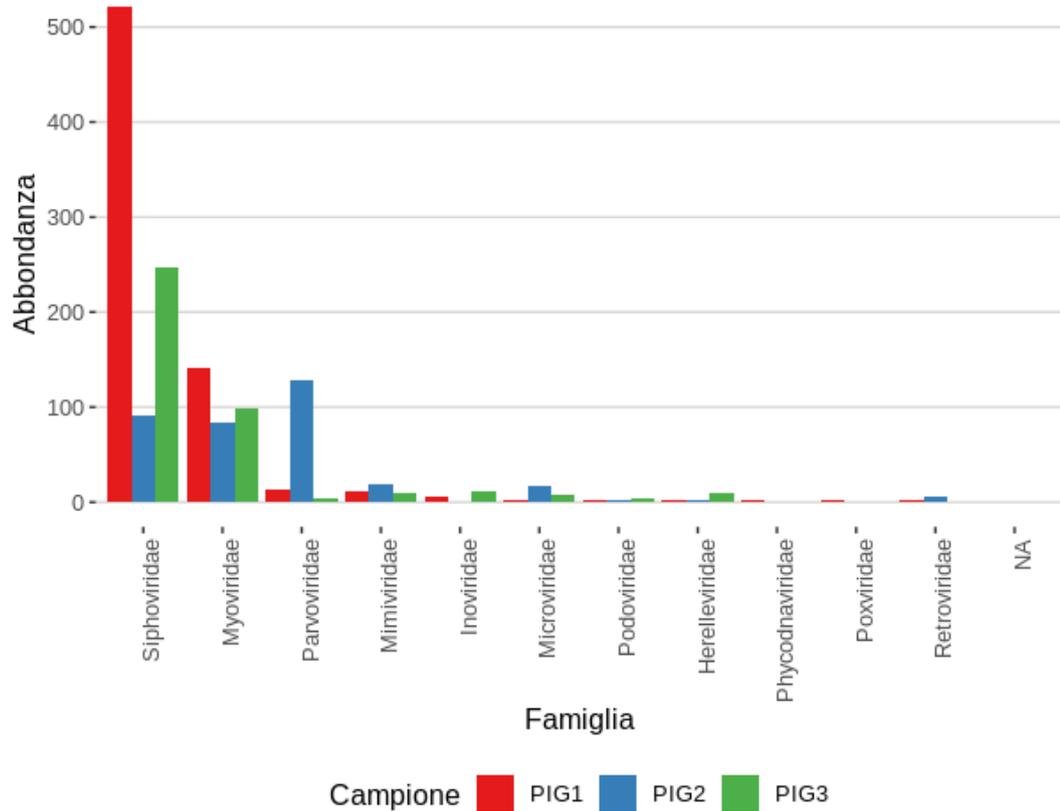


Fig. 21::Barplot raffigurante le principali famiglie virali identificate in questo studio

Nel campione PIG1 sono stati riscontrati un numero decisamente superiore di specie virali appartenenti alla famiglia dei *Siphoviridae* rispetto ai campioni PIG2 e PIG3, probabilmente a causa della grande quantità di specie appartenenti al genere batterico *Lactobacillus* identificate in questo campione. Dalla figura 22 si evince che la maggior parte delle specie virali più identificate sono dei batteriofagi, in particolare il batteriofago EV3 infettante i lattobacilli risulta la specie più identificata sia nel campione PIG1 che nel campione PIG3, viceversa nel campione PIG2 il virus

maggiormente identificato è il fago del genere *Clostridioides* phisemix9p1.

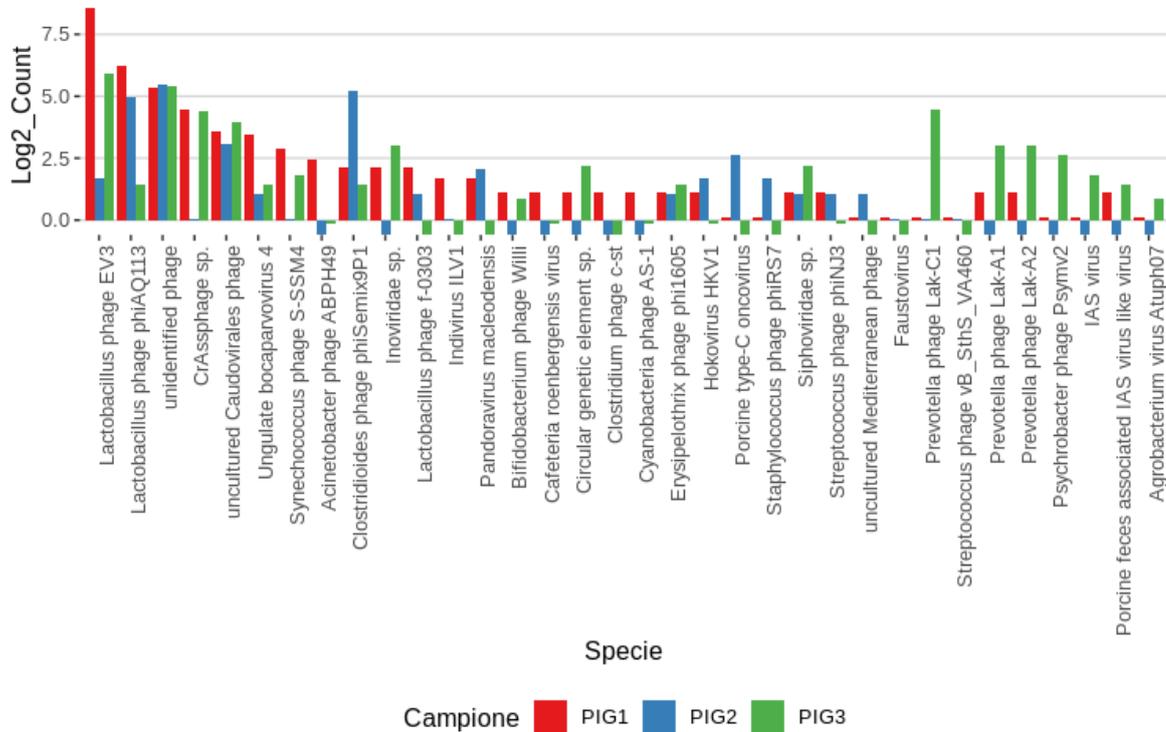


Fig. 22: Principali specie virali identificate in questo studio.

4.3 Hierarchical Clustering

Le 25.965.965 sequenze per cui BLAST non ha trovato alcuna corrispondenza statisticamente rilevante all'interno del database di sequenze non ridondanti GenBank, sono state riunite in un unico file di testo e assemblate con metaSpades. Il meta-assembly ha prodotto 1.906.960 contigs, il contigs con le dimensioni maggiori era costituito da 88.538 bp, di cui 70.108 presentavano una lunghezza di almeno 1kb i quali sono stati selezionati per le analisi successive.

Dopo aver utilizzato il programma Bowtie2 per indicizzare e mappare le reads contro i contigs filtrati, il bam file e le reads sono state raggruppate mediante binning tetranucleotidico con MetaBat2 che ha prodotto 46 diversi bins.

Il controllo di qualità dei bins effettuato con CheckM ha permesso di evidenziare che di questi 46 bins 20 presentavano un grado di completezza maggiore del 50% e 37 un grado di contaminazione inferiore del 5%.

I 20 bin che hanno soddisfatto i filtri imposti sono stati clusterizzati con il tool Mash contro 154,884 genomi non ridondanti scaricati da RefSeq, ottenendo distanze di mash comprese fra 0,05 e 0,26.

L'albero filogenetico è stato visualizzato mediante il tool online ITOL ed è liberamente accessibile visitando l'indirizzo: <https://itol.embl.de/tree/37160676338321566296520#>

Il phylum dei *Firmicutes* è stato quello in cui hanno clusterizzato il maggior numero di bins (7; 35%), seguito dai *Bacteroidetes* (5; 25%), *Proteobacteria* (3; 15%), *Actinobacteria* e *Tenericutes* (1; 5%). I restanti 3 bins, bin.25, bin.32, bin.41, clusterizzano rispettivamente vicino al verme nematode *Caenorhabditis elegans*, al genere di cianobatteri *Trichormus*, e al vegetale *Cucurbita maxima*.

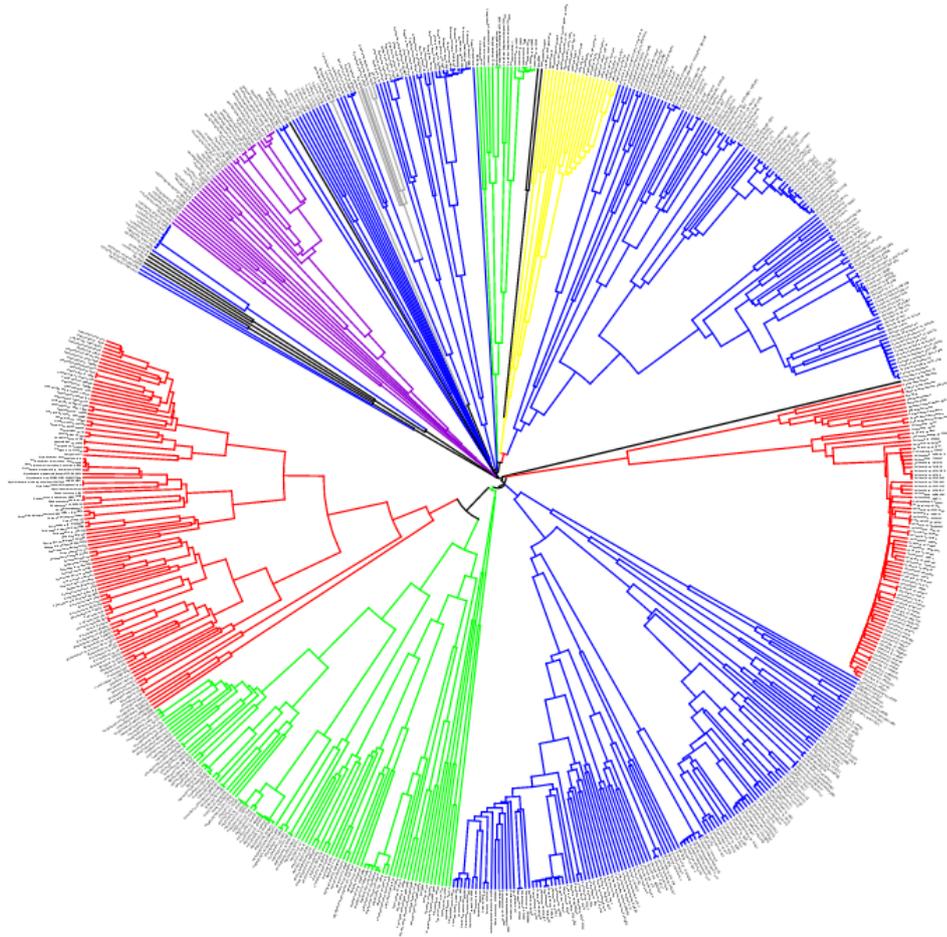


Fig. 23: Albero filogenetico che mostra l'identità dei 20 bins rispetto ai principali genomi di riferimento; In rosso Actinobacteria, in Blu Firmicutes, in verde Proteobacteria, in viola Bacteroidetes, in giallo Protisti, in nero altri phyla.

I gruppi gli bin.9 e bin.18 sono stati gli unici a clusterizzare con una mash distance compresa entro 0,05, formando un cluster all'interno del phylum dei *Bacteroidetes* con microrganismi compresi nel genere *Prevotella* (Fig. 24).

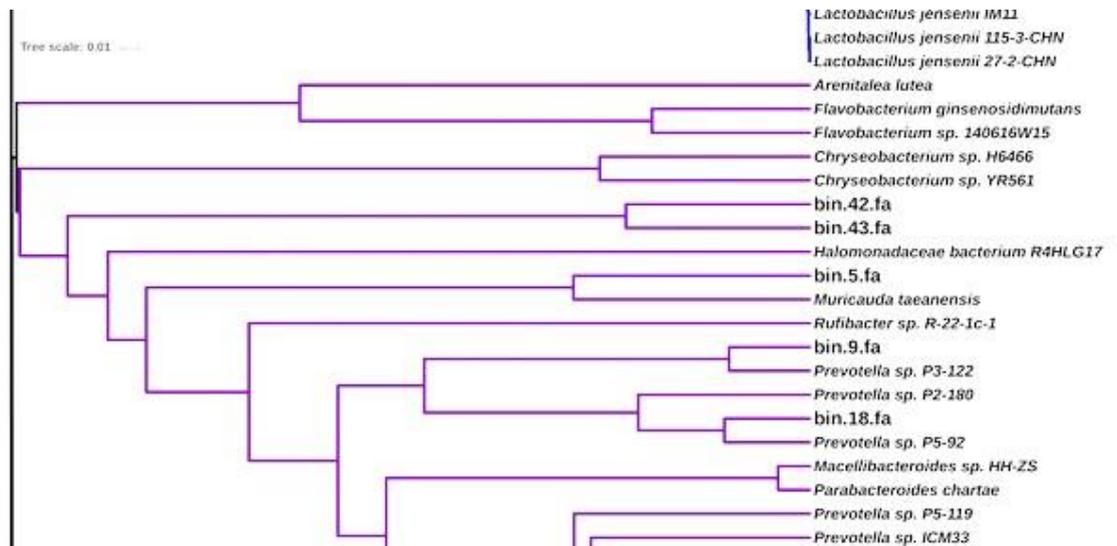


Fig. 24: Clusterizzazione dei gruppi bin.9 e bin18 all'interno del genere *Prevotella*.

Gli altri bin, clusterizzando a una distanza di mappa superiore a 0,05, non sono stati classificati a livello di specie a causa della mancanza di un genoma di riferimento vicino, tuttavia talvolta è possibile valutare una clusterizzazione a livello di genere.

Per esempio bin.31 si inserisce all'interno del genere *Clostridium* clusterizzando a una distanza di mash di 0,1 con *Clostridium celatum* (Fig.25)

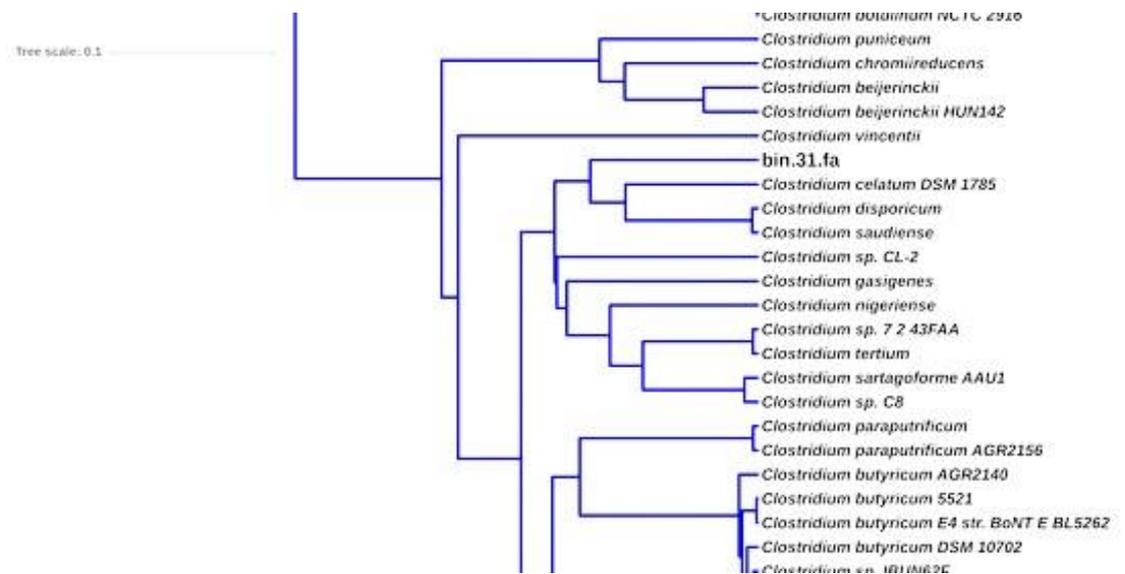


Fig. 25: Clusterizzazione di bin31 all'interno del genere *Clostridium*.

Allo stesso modo anche bin.17 bin.19 e bin.23 si inseriscono all'interno dei *Firmicutes* clusterizzando rispettivamente con la famiglia delle *Erysipelotrichaceae* e con il genere *Clostridium*, tuttavia la distanza di mash varia da 0,1479905 (bin.17 e bin.19) a 0,265327 (bin.23).

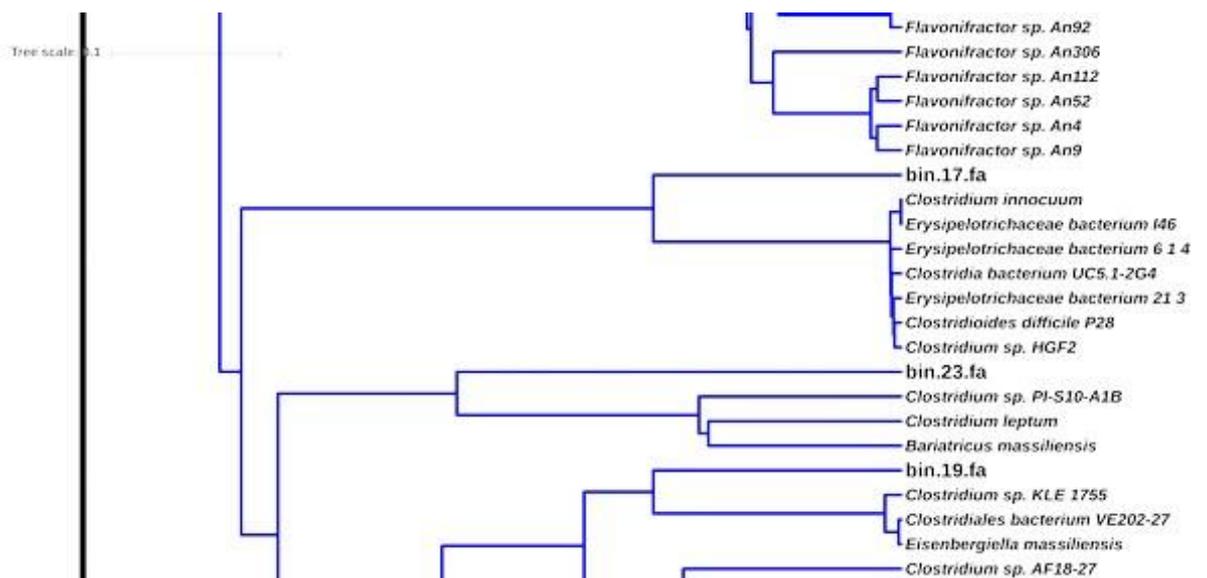


Fig. 26: Clusterizzazione dei gruppi bin.17, bin.19 e bin.23 all'interno della famiglia *Erysipelotrichaceae* e del genere *Clostridium*.

Anche bin.5, bin.46, bin.16 e bin.26, formando un nodo a una distanza di mash di 0,1479905, riescono a clusterizzare a livello di genere rispettivamente con *Muricauda*, *Helicobacter*, *Mycoplasma*, *Bacillus*.

In maniera molto interessante, bin.20 e bin.22 non possono essere classificati a livello di genere poiché, non trovando alcun genoma simile, formano un cluster tra di loro. Tuttavia è evidente come questi bins si inseriscano all'interno del phylum dei *Firmicutes* trovando una lontana similarità col genere dei *Butyrivibrio*.

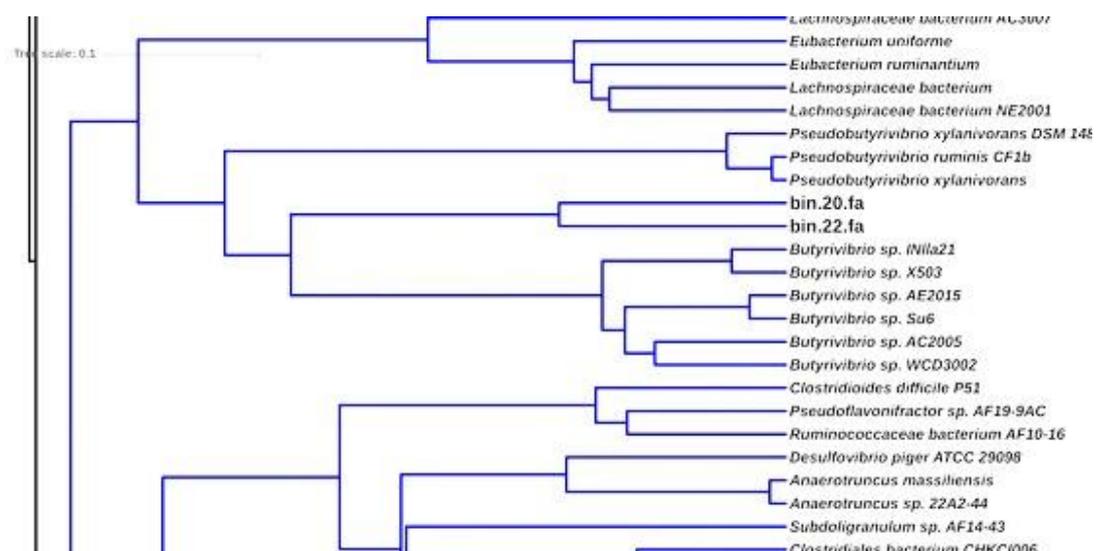


Fig. 27: Clusterizzazione reciproca dei gruppi bin.20 e bin.22.

Allo stesso modo, bin.43 e bin.40 si inseriscono all'interno del phylum dei *Bacteroidetes* e formano un cluster comune a una distanza di 0,1479905 (Fig.24). Infine, bin.16 e bin.24 hanno

clusterizzato rispettivamente all'interno dei phylum *Tenericutes* e *Actinobacteria* con i generi *Mycoplasma* e *Parvibacter* con distanze di mash di 0,1479905 e 0,1411033571.

4.4 Classificazione funzionale e ricerca dei pathway metabolici principali

In questo studio è stata effettuata la caratterizzazione funzionale del microbiota dei campioni in analisi.

Brevemente, le reads pulite sono state analizzate col programma FAMILI il quale, dapprima traduce le sequenze utilizzando i sei diversi schemi di lettura e successivamente allinea le sequenze tradotte contro il database proteico UniRef90 utilizzando software DIAMOND implementato al suo interno, e infine scarta tutti i risultati che presentano un punteggio di allineamento inferiore a 20.

Samples	Clean Reads	Reads Annotated	%	Unique Protein Annotated
PIG1	18.605.972	4.783.026	25,7%	85.826
PIG2	28.358.680	5.781.988	20,39%	130.328
PIG3	17.571.966	3.472.451	19,76%	101.035
Total	64.536.618	14.037.465	21,75%	231.428

Tab.2: Metriche di sequenziamento e di annotazione totale e relativa

A fronte di 64.536.618 reads totali analizzate, 14.037.465 reads (21,75%) hanno trovato una corrispondenza con 231.428 proteine

diverse depositate nel database proteico Uniprot. Tuttavia, 10.334 reads annotate sono state rimosse poiché, da un'analisi crociata dei risultati ottenuti da FAMLI con quelli provenienti da BLAST, queste reads sono risultate tassonomicamente affiliate a *Metazoa*. PIG1 è stato il campione in cui sono state annotate il maggior numero di reads con la biodiversità proteica più bassa. Viceversa, PIG2 è stato il campione che in cui sono state annotate il maggior numero di proteine diverse.

Sebbene la maggior parte delle proteine identificate non presentava nessuna funzione precedentemente caratterizzata all'interno dei database proteici, le proteine restanti con funzione note erano coinvolte in un totale di 3.142 diversi processi.

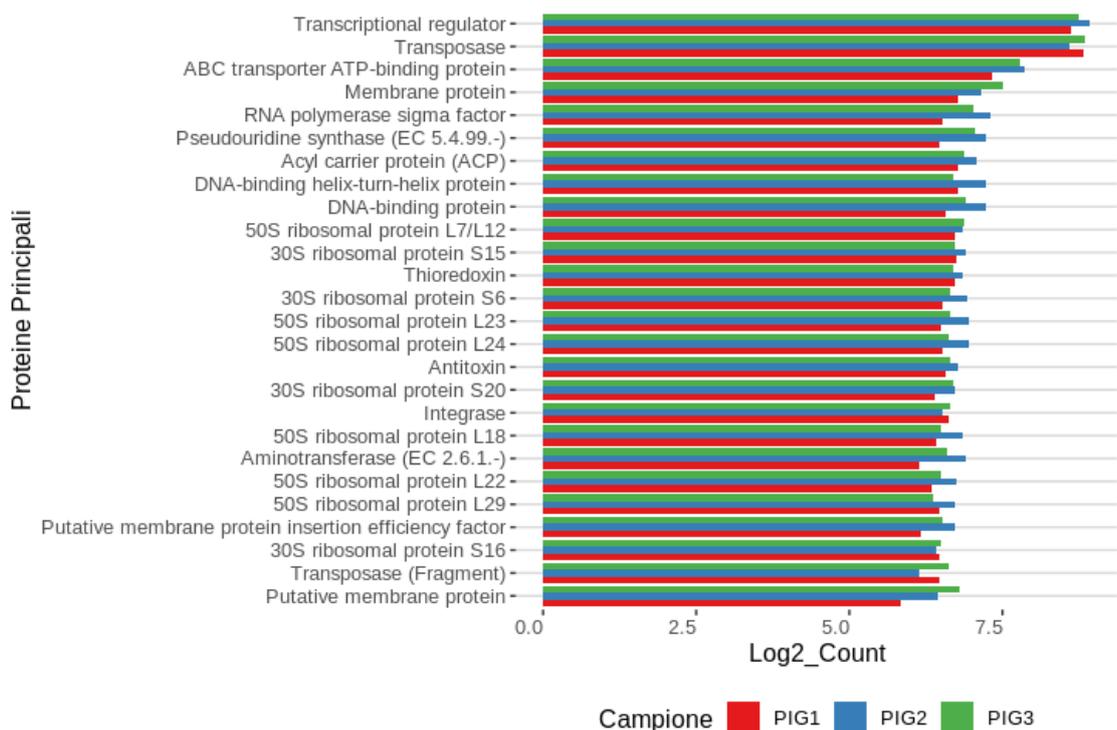


Fig. 28: Barplot comparativo fra i diversi campioni in esame riguardo l'abbondanza delle principali proteine riscontrate nei campioni analisi.

I fattori di trascrizione sono risultate le proteine riscontrate maggiormente nei nostri campioni, seguite dalle trasposasi. Entrambe le proteine svolgono funzioni molecolari, le prime sono proteine che legando l'RNA polimerasi ne permettono la processività consentendo di conseguenza l'espressione genica, viceversa le seconde sono proteine a funzione enzimatica codificate da elementi mobili del genoma definiti trasposoni la cui funzione è proprio quella di permettere lo spostamento dei trasposoni in vari punti del genoma. Risulta molto interessante anche l'elevato numero di proteine leganti il ribosoma che sono state riscontrate in tutti i campioni. Inoltre sono

state identificate un numero elevato di proteine ABC con funzione di trasporto e la pseudouridina sintasi, proteina coinvolta nella sintesi della suddetta pseudobase che ricopre un ruolo fondamentale all'interno della struttura del tRNA. Da questa prima descrizione emerge un quadro di un ecosistema con delle spiccate potenzialità in termini di comunicazione cellulare.

Dall'analisi delle varie categorie funzionali delle proteine spicca sicuramente una forte omogeneità, infatti in tutti i campioni, come mostrato dalla figura 29, le proteine identificate svolgevano principalmente funzioni molecolari, seguite da proteine coinvolte nello svolgimento di funzioni biologiche e da quelle che coinvolte in ruoli strutturali sono state riscontrate in numero palesemente inferiore.

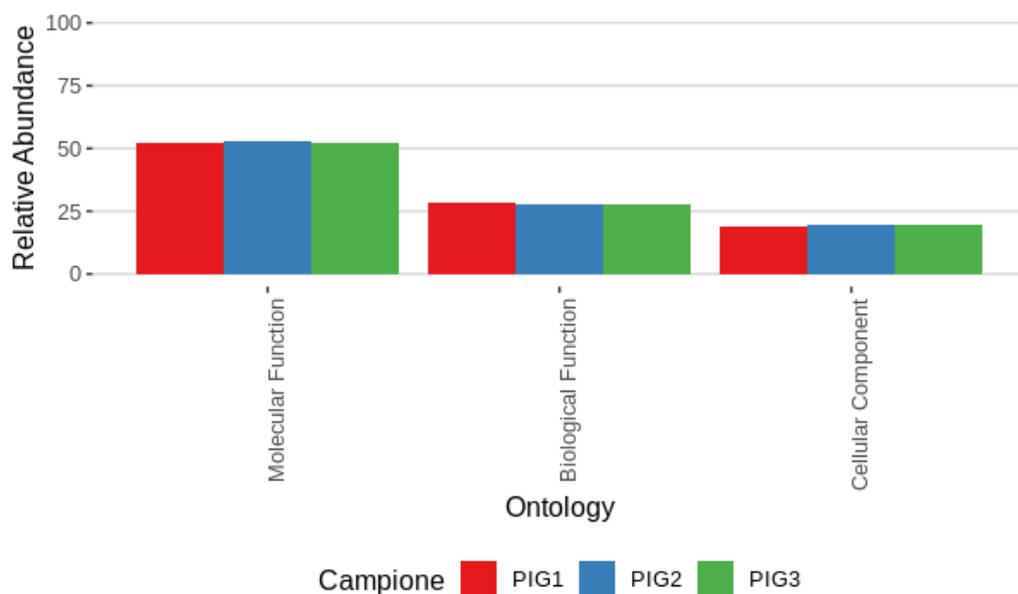


Fig. 29: Abbonanza relativa delle varie classi ontologiche all'interno dei campioni in analisi.

Fra i vari processi molecolari, proteina leganti il DNA o l'ATP risultavano maggiormente prevalenti in tutti i campioni. Proteine coinvolte nei legami di ioni metallici, di RNA, e proteine strutturali del ribosoma svolgono attività molecolari prevalenti nei nostri campioni.

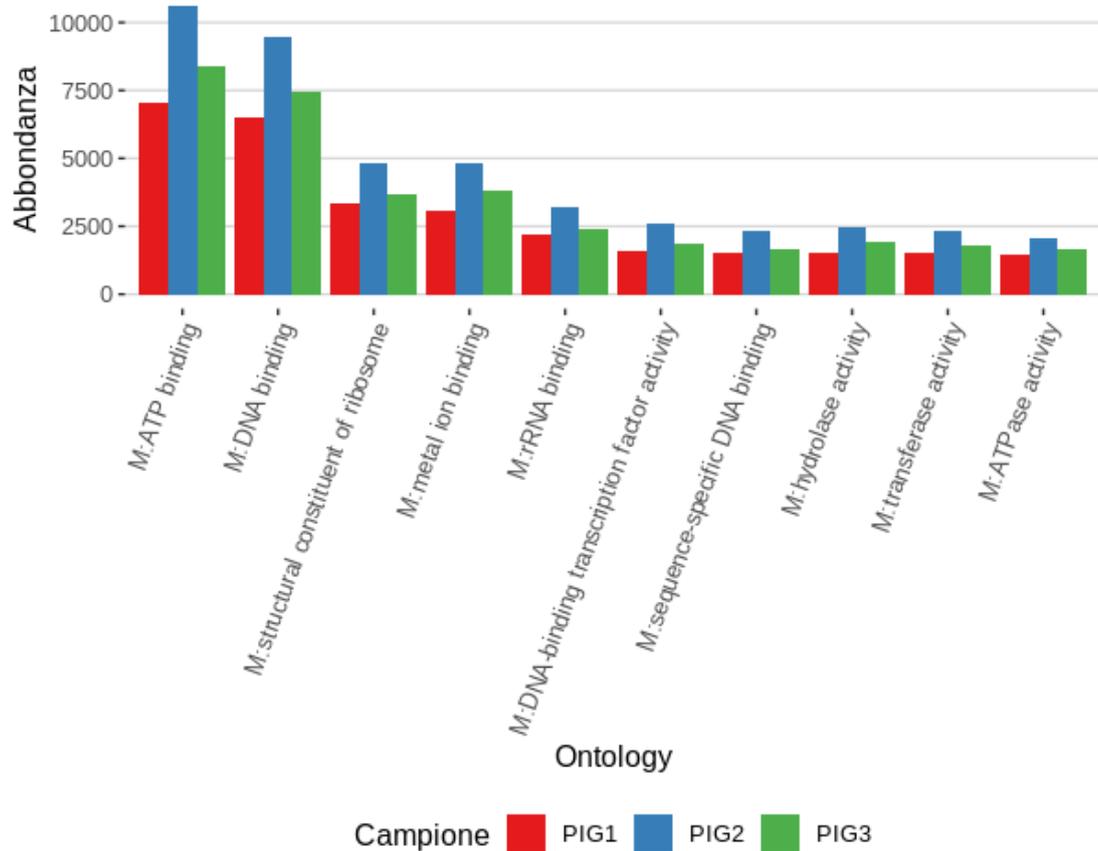


Fig. 30: Abbondanza delle principali funzioni molecolari riscontrate in questo studio

Viceversa, in termini di abbondanza relativa e assoluta, i geni codificanti proteine implicate in ruoli biologici sono risultati piuttosto omogenei fra i campioni in analisi. All'interno di questa categoria sono stati identificate in numero maggioritario proteine

coinvolte all'interno di processi di traduzione, trascrizione e proteine transmembrana.

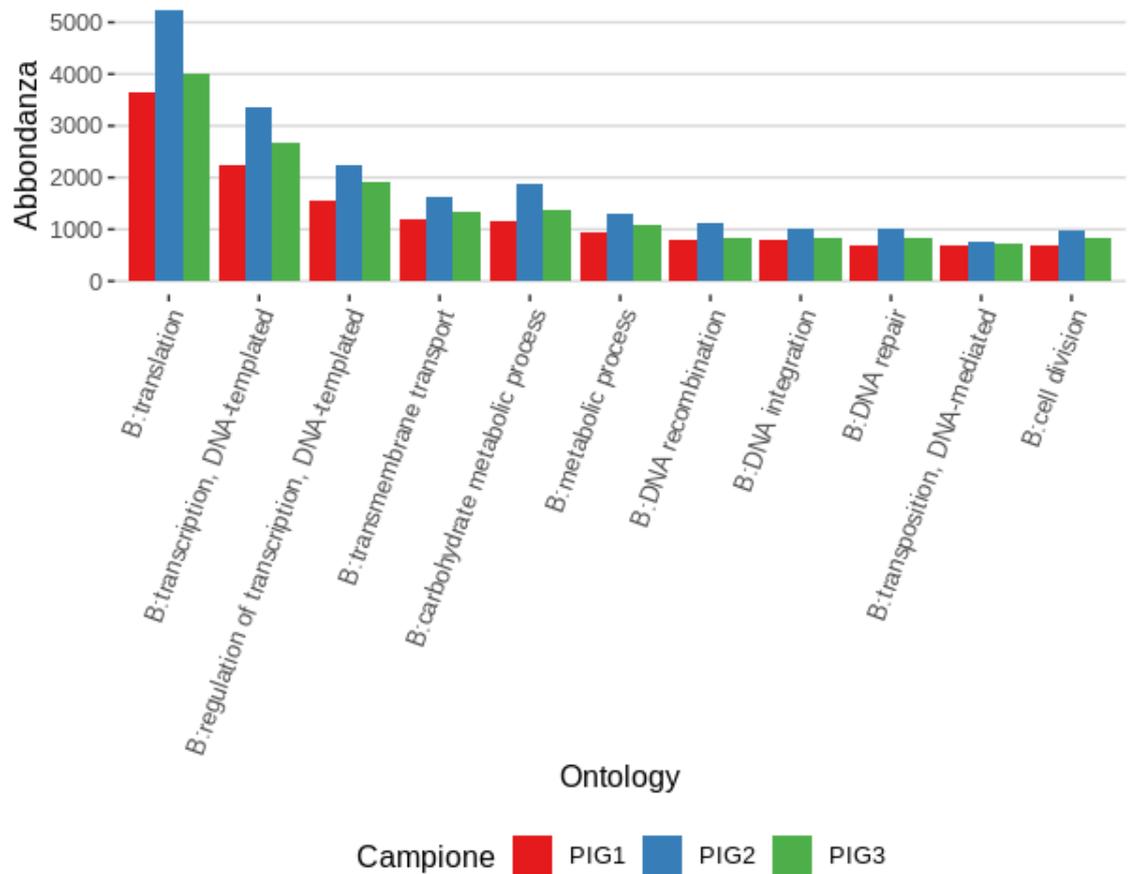


Fig. 31: Abbondanza delle principali funzioni biologiche riscontrate in questo studio.

Infine, le proteine coinvolte in funzioni strutturali rappresentano la categoria meno riscontrata all'interno dei nostri campioni. Fra questa quelle con la maggior abbondanza risultano le proteine integrali di membrana, seguite da proteine citoplasmatiche e ribosomiali.

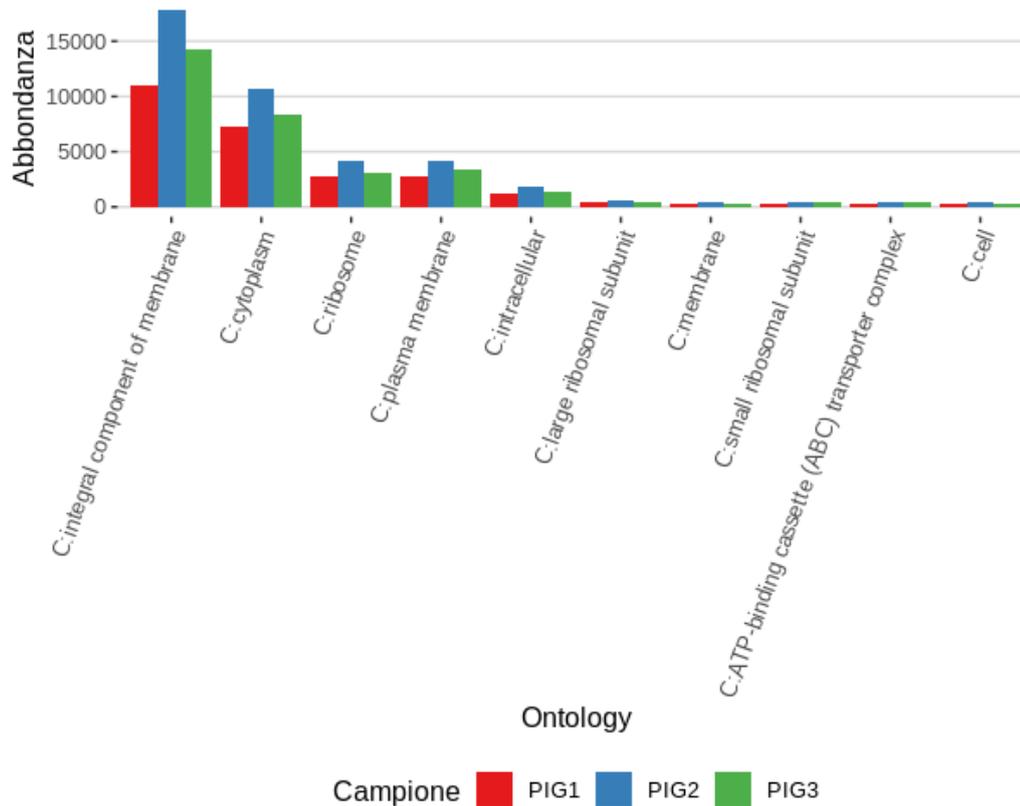


Fig. 32: *Abbondanza delle principali funzioni strutturali riscontrate in questo studio*

La conversione dei codici dei gene ontologies e delle varie classi enzimatiche delle proteine identificate in codici KEGG ha permesso di risalire ai relativi pathways metabolici in cui queste proteine sono inserite, di valutarne l'abbondanza relativa, e di ricostruire il potenziale metabolico dei campioni in analisi. La ricostruzione dei pathways metabolici nei singoli campioni in analisi ha prodotto risultati sovrapponibili in termini qualitativi e quantitativi.

In totale sono stati ottenuti 125 diversi pathways, di cui, la biosintesi degli antibiotici e dei metaboliti secondari sono stati i due pathways maggiormente identificati nei campioni in esame.

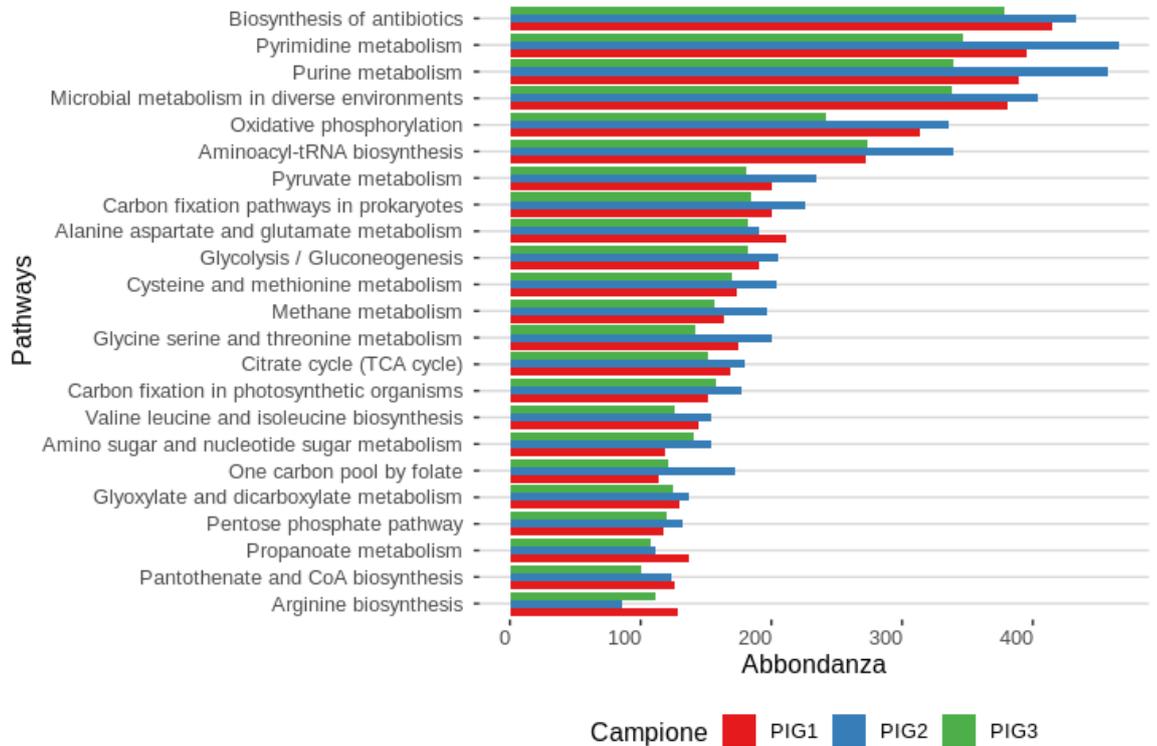


Fig. 33: Principali pathways metabolici riscontrati all'interno dei campioni in analisi

L'abbondanza di questi specifici pathways riflette probabilmente una forte competitività ecologica fra le varie specie che compongono la comunità microbica costituente il microbiota. Inoltre sono stati identificati numerosi pathways coinvolti nella biosintesi di vari antibiotici quali streptomicina, monobattami, validamicina, acarbiosio, etc.

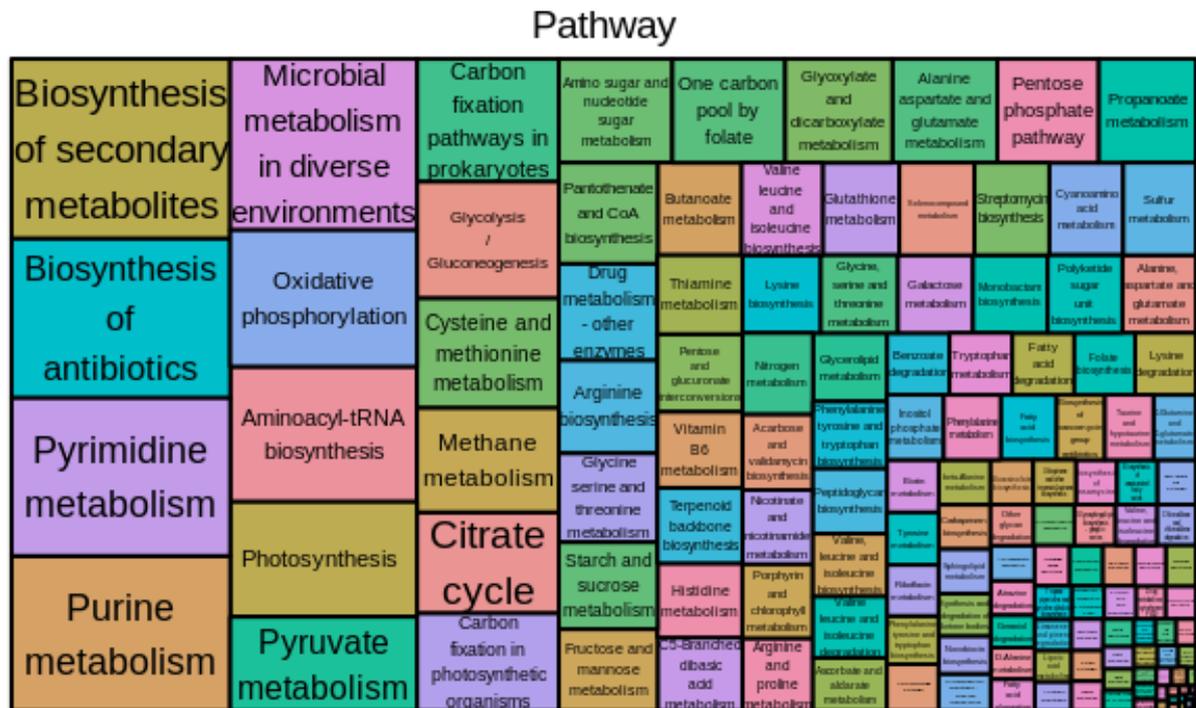


Fig. 34: Treemap raffigurante l'abbondanza relativa totale dei pathway metabolici identificati

Dal punto di vista metabolico, sono stati identificati numerosi pathways inseriti all'interno del metabolismo delle varie macromolecole biologiche, in particolare il microbioma di questi animali mostra un elevato contenuto di enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati, con un certo arricchimento di vari cicli metabolici fra cui il metabolismo del piruvato, la fosforilazione ossidativa la via dei pentosi fosfato, glicolisi, gluconeogenesi ciclo del citrato. Inoltre le vie metaboliche degli acidi nucleici, purine e pirimidine, risultano particolarmente presenti in tutti e tre i campioni.

In particolare, nel campione PIG2 il metabolismo delle purine e delle pirimidine sono stati identificati in un numero maggiore rispetto ai campioni PIG2 e PIG3. Infine, le vie metaboliche e anaboliche degli acidi grassi e delle proteine sono state riscontrate con un minore prevalenza, tuttavia sono stati identificati numerosi pathways diversi coinvolti nel metabolismo azotato, in particolare quelli del metabolismo di vari amminoacidi fra cui, gli amminoacidi ramificati (valina, leucina, isoleucina), cisteina e della metionina, glicina, serina, treonina alanina, aspartato e glutammato.

5. DISCUSSIONI

Il microbiota è l'insieme dei microrganismi che colonizzano un determinato ambiente (Knight et al., 2017). Negli ultimi anni, l'introduzione della Next Generation Sequencing e lo sviluppo di numerosi software bioinformatici sviluppati per l'analisi di dati di sequenziamento NGS, ha fatto sì che venissero elaborati un gran numero di progetti di ricerca focalizzati sulla caratterizzazione metagenomica delle comunità microbiche colonizzanti i vari distretti corporei dei mammiferi, e sulla comprensione della fitte rete di interazioni esistenti fra le diverse specie di microrganismi ivi associate e l'ospite (Breitwieser et al., 2017). In particolare un grande interesse ha suscitato la caratterizzazione del microbiota intestinale, il quale sembra giocare un ruolo fondamentale nel mantenimento del benessere dei mammiferi.

Nel suino queste comunità microbiche giocano un ruolo molto importante in vari processi fisiologici fra cui lo sviluppo dell'apparato digerente, la stimolazione e maturazione del sistema immunitario, la protezione dai patogeni, e, attraverso il metabolismo fermentativo, rilasciando delle molecole estremamente importanti per l'ospite quali la vitamina K o la B12, o gli acidi grassi a catena corta (Willing et al., 2007; Danielsen et al., 2007; Chowdhury et al., 2001; Isolauri et al.,

2001; Berg, 1996). Inoltre è stato evidenziato che il microbiota intestinale del suino possa modificare anche le performance produttive dell'animale, influenzando la resa alimentare di questi animali (Mach et al, 2015; McCormack et al., 2017; Ramayo – Caldas, 2016). Il suino Nero Siciliano è una razza di suino autoctona molto rustica, allevata in maniera semi estensiva nell'area dei monti Nebrodi e Madonie, con caratteristiche fenotipiche e comportamentali e abitudini alimentari che ben lo distinguono dai suini allevati in maniera intensiva (D'Alessandro et al., 2019).

In questo progetto di dottorato è stato caratterizzato il microbiota intestinale del suino nero siciliano ed il relativo patrimonio genico mediante la strategia di sequenziamento shotgun metagenome sequencing. Il sequenziamento ha prodotto 76.489.348 reads totali di cui solo il 20% circa (6.302.344 reads) è stato classificato a livello tassonomico mediante BLAST (Boratyn et al., 2013). Questa bassa percentuale di sequenze assegnate tassonomicamente potrebbe dipendere dalla carenza all'interno delle banche dati genomi sequenziati, che sono talvolta arricchite di specifiche sequenze ottenute o con il vecchio metodo di sequenziamento di Sanger o provenienti da lavori di target sequencing. A livello di phylum, mediamente i *Firmicutes* (79%) sono risultati essere il gruppo più abbondante, seguiti da *Proteobacteria* (6%), *Actinobacteria* (5%),

Bacteroidetes (3%). L'elevato rapporto *Firmicutes:Bacteroidetes* da noi descritto è stato riportato anche nella caratterizzazione del microbiota di suini Jinhua, una razza di maiali autoctona allevata in Cina (Yang et al.,2018) e nel suino Iberico, razza di maiale autoctona spagnola (Crespo – Piazuolo et al., 2018). Viceversa, nelle principali razze di suini commerciali allevate in maniera intensiva è stata descritta una maggiore prevalenza del phylum *Bacteroidetes* (57.01% Duroc, 51.38% Yorkshire, 47.64% Landrace) e una minore prevalenza del phylum *Firmicutes* (Duroc, 39.63%, Yorkshire 42.02%, Landrace 45.55%) (Pajarillo et al., 2014). Recentemente alcuni studi hanno evidenziato come la composizione del microbiota intestinale influenzi fortemente lipogenesi e la deposizione del grasso corporeo attraverso il controllo del metabolismo energetico (Turnbaugh et al., 2006; Greiner and Backhed, 2011; Gerard, 2016). Numerosi studi hanno inoltre associato un elevato contenuto di *Firmicutes* e un basso livello di *Bacteroidetes* a condizioni di obesità (Bell, 2015; Mathur and Barlow, 2015; Riva et al., 2017). Il suino nero è un animale caratterizzato dall'ottima capacità di deposizione di lardo con una rapida tendenza all'ingrasso, l'elevato rapporto *Firmicutes:Bacteroidetes* osservato nei nostri campioni potrebbe essere correlato alla spiccata capacità lipogenetica mostrata da questo animale. Inoltre, la maggiore prevalenza di microrganismi

appartenenti al phylum dei *Proteobacteria* osservata in questo studio è stata associata ad una maggiore tendenza all'obesità (Shin et al., 2015).

Contrariamente a numerosi lavori scientifici in cui i principali generi batterici componenti il microbiota intestinale erano *Prevotella* o *Ruminococcus* (Ramayo – Caldas et al., 2016; Lu et al., 2018), in questo studio il principale genere microbico identificato è stato *Lactobacillus*, con una importante rappresentanza di specie fra cui per abbondanza spiccano *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus reuteri*. Questi risultati sono stati confermati anche da quanto descritto da De Rodas et al. (2018). Infatti gli autori, analizzando la struttura del microbiota intestinale all'interno di diversi distretti anatomici (duodeno/digiuno, ileo, ceco e colon) e in differenti periodi di vita dei suini (0, 10, 21, 33, 62, 84, giorni e al raggiungimento della stazza commerciale) hanno identificato *L. amylovorus* come la specie con la maggiore prevalenza (De Rodas et al., 2018). Al genere *Lactobacillus* appartengono numerosi microrganismi frequentemente riportati come normali componenti del microbiota intestinale di vari mammiferi, dove svolgono numerosi effetti probiotici fra cui partecipano allo sviluppo dell'intestino, proteggono l'ospite dai patogeni attraverso la produzione di molecole ad azione antibiotica e, abbassando i livelli di numerose interleuchine pro-infiammatorie e del TNF- α , riducono lo

stato infiammatorio dell'ospite (Wang et al., 2018). Negli ultimi anni numerosi ceppi di *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus reuteri* sono stati introdotti nella dieta dei suini in svezzamento proprio grazie alla loro azione probiotica svolta nella stimolazione della formazione dei villi e nella protezione da gastroenteriti da *Escherichia coli* ETEC, che è causa di un'elevata mortalità nei suini in svezzamento (Callaway et al., 2008; Fairbrother et al., 2005). Hynönen riportarono che *L. amylovorus* presenta una forte azione probiotica nei confronti del suino, essendo in grado di aderire intimamente con l'intestino dei suini dove svolgeva una efficace azione antimicrobica (Hynönen et al., 2014). Tuttavia dai dati presenti in letteratura, l'influenza svolta da questi microrganismi sulle performance animali risulta alquanto contraddittoria. Nonostante numerosi studi riportino che i Lattobacilli oltre a proteggere il suino dalla colonizzazione di batteri patogeni e svolgere numerose azioni benefiche nei confronti del suino, sembrerebbero positivamente correlati ad un incremento delle performance, attraverso un rapido incremento di peso dell'animale e un miglioramento della qualità della carne (Million et al., 2012; Sayan et al., 2018; Suo et al., 2012), altri invece dimostrano che la somministrazione di Lattobacilli riduca il senso dell'appetito e migliorano l'efficienza digestiva, portando ad una riduzione della massa corporea e una riduzione dell'obesità (Ji et al., 2019). Tuttavia,

Million et al. riportarono che l'effetto sulle performance mostra una variabilità in funzione della specie probiotica in analisi e dell'ospite (Million et al.,2012). Gli autori in particolare hanno evidenziato che le specie microbiche *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus ingluviei* e *Lactobacillus acidophilus* erano associate ad un considerevole aumento di peso sia nell'uomo che in diversi animali da resa, viceversa *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus gasseri* portavano ad una riduzione della massa corporea (Million et al., 2012). Infine, in un recente studio l'aumento della massa dei suini e la deposizione del grasso hanno mostrato una correlazione positiva con l'abbondanza di alcuni generi di microrganismi, fra cui *Lactobacillus intestinalis* (Lecomte et al., 2015). Tuttavia, nonostante l'azione svolta dai Lattobacilli sull'aumento del peso e sulla deposizione del grasso risulti contraddittoria, altri generi riscontrati in questo studio potrebbero essere coinvolti nella regolazione delle performance dell'animale. Infatti in questo studio sono stati trovati numerosi microrganismi appartenenti all'ordine dei *Clostridiales*. Questi microrganismi rivestono un ruolo molto importante nella sintesi di acidi grassi a catena corta (SCFA) attraverso la fermentazione della fibra alimentare (Fang et al., 2017). Una volta formati gli acidi grassi a catena corta vengono rapidamente assorbiti a livello intestinale dall'ospite e da esso utilizzati per la produzione di energia. Si stima

che l'energia prodotta dal metabolismo degli acidi grassi nel suino contribuisca ad una percentuale che varia dal 30-76% della richiesta metabolica basale (Engelhardt, 1995). Da alcuni studi è emerso che la capacità biosintetica di acidi grassi a catena corta posseduta dall'ordine dei *Clostridiales* è stata correlata ad una maggiore performance dell'animale e ad un maggiore tasso di aumento del peso giornaliero (Yang et al., 2017). In questo studio lo 0,4% dei microrganismi apparteneva al dominio degli *Archaea*. In particolare, i generi maggiormente identificati sono stati *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera*. Questi generi di batteri metanogeni colonizzano l'apparato digerente di diversi mammiferi dove partecipano al metabolismo dei carboidrati e svolgono un ruolo nella sintesi di metano (Saengkerdsut et al., 2007; Glad et al., 2010; Kusar et Avgustin, 2010; Borrel et al., 2013; Gaci et al., 2014). Da alcuni studi condotti sull'uomo risulta che questi mostrino una correlazione positiva con l'obesità (Maya-Lucas et al., 2019), mentre nel suino è descritta una forte variazione di specie durante lo svezzamento (Federici et al., 2015).

L'analisi del contenuto genico del microbiota ha permesso di comprendere che questa comunità microbica sembrerebbe in grado di arricchire le capacità metaboliche dell'ospite attraverso la grande abbondanza di proteine riscontrate coinvolte nel metabolismo dei

carboidrati e degli acidi nucleici. In particolare, i pathways del metabolismo delle purine e delle pirimidine e il metabolismo del piruvato, la fosforilazione ossidativa la via dei pentosi fosfato, glicolisi, gluconeogenesi, ciclo del citrato arricchiscono rispettivamente le vie metaboliche degli acidi nucleici e dei carboidrati. Studi precedenti hanno evidenziato come i Lattobacilli siano microrganismi con un'elevata capacità di metabolizzare carboidrati (Drissi et al., 2014), tuttavia la via del metabolismo dell'acido citrico sembrerebbe associata anche alla presenza di batteri del genere *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Butyrivibrio*, *Blautia* (Crespo – Piazuolo et al, 2018). In questo studio il metabolismo azotato è risultato arricchito da proteine coinvolte nei pathways della sintesi dell'arginina, del metabolismo di vari amminoacidi fra cui, gli amminoacidi ramificati (valina, leucina, isoleucina), cisteina e della metionina, glicina, serina, treonina alanina, aspartato e glutammato. Alcuni studi hanno evidenziato che sembrerebbe esistere una correlazione positiva fra i pathways coinvolti nella sintesi degli amminoacidi e performance dell'animale, inoltre l'attivazione di questi pathways potrebbe essere correlata alla concentrazione di acido isobutirrico (McCormack et al., 2017). L'acido isobutirrico rappresenta il metabolita finale della deaminazione di numerosi amminoacidi e la sua concentrazione è

direttamente proporzionale al grado di utilizzo delle fonti azotate fornite con la dieta (Walsh et al., 2013). Inoltre, il metabolismo degli amminoacidi porta alla sintesi di molecole che svolgono numerose azioni benefiche nei confronti dell'ospite: in particolare, glutammato, glutammina e aspartato sono ottime fonti energetiche per l'intestino, la metionina, la cisteina e la glicina svolgono un'azione antiossidante in quanto le relative vie metaboliche portano alla sintesi di glutatione, omocisteina e taurina, infine il metabolismo della treonina migliora la sintesi della mucina ed è coinvolto nel mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale (Yang et Liao, 2019).

Infine, la via di biosintesi degli antibiotici, è risultata essere la via biochimica maggiormente identificata nei campioni in esame. Questa alta prevalenza potrebbe rispecchiare la grande competizione esistente all'interno di questa comunità microbica. Il gran numero di Lattobacilli identificati in questo studio, e la capacità di questi microrganismi di sintetizzare molecole biologicamente attive ad azione antibiotica potrebbe essere correlata all'elevata quantità di geni coinvolti nella biosintesi degli antibiotici riscontrati in questo studio.

6. Conclusioni.

In questo studio è stato descritto per la prima volta il microbiota intestinale di tre femmine di suino nero siciliano. La caratterizzazione tassonomica e funzionale ha permesso di evidenziare che questa ricca comunità microbica fosse dominata da microrganismi ascrivibili al genere *Lactobacillus*, i quali sono noti per svolgere una serie di funzioni protettive nei confronti dell'ospite e nel mantenimento di una corretta funzionalità dell'apparato digerente. Inoltre, questi microrganismi, mostrando una forte capacità di metabolizzare carboidrati, possono influenzare fortemente le performance produttive dell'animale. La comunità microbica possedeva nel suo complesso una grande potenzialità metabolica, mostrando numerosi geni codificanti proteine coinvolte nel metabolismo delle principali macromolecole biologiche, e nella sintesi di metaboliti secondari, la maggior parte dei quali ad azione antibiotica. La struttura della comunità microbica intestinale del suino nero siciliano mostra delle differenze rispetto a quanto descritto per altre razze di interesse commerciale. Questa differenza può essere sicuramente ascrivibile a fattori genetici, ma soprattutto a differenti condizioni di allevamento. Infatti, la tipologia di allevamento en plein air, permettendo all'animale di integrare nella dieta ciò che la natura offre, inserisce

una grande variabilità alimentare rispetto ai suini allevati in maniera intensiva. Tuttavia, la totale casualità di questa variabile non consente di comprendere a pieno quanto le integrazioni alimentari influiscano sulla struttura microbica del suino nero siciliano. Questi risultati rappresentano una prima descrizione tassonomica e funzionale del microbiota del suino nero siciliano e potrebbero fornire strumenti utili nella formulazione di mangimi con integrazioni specifiche volte a migliorare le performance degli animali nonché la qualità dei prodotti derivati.

7. Bibliografia

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5721–5732.
2. Allen HK, Looft T, Bayles DO, Humphrey S, Levine UY, Alt D, Stanton TB. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *MBio.* 2011 Nov 29;2(6). pii: e00260-11. doi: 10.1128/mBio.00260-11.
3. 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 Jun 28. pii: skz208. doi:10.1093/jas/skz208.
4. Armani RG, Ramezani A, Yasir A, Sharama S, Canziani MEF, Raj DS. Gut Microbiome in Chronic Kidney Disease. *Curr Hypertens Rep.* 2017;19:29.
5. Bell DS. Changes seen in gut bacteria content and distribution with obesity: causation or association? *Postgrad Med.* 2015;127(8):863-8. doi: 10.1080/00325481.2015.1098519.
6. Berg, R. D. (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4: 430-435. 8.
7. Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA Cancer J Clin.* 2017. doi: 10.3322/caac.21398.
8. 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 May;18(5):1566-77. doi: 10.1111/1462-2920.13272.

9. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:732–737.
10. Bik, E.M. 2009. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr. Rev.* 67:S164–S171.
11. Blanquet-Diot S. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* 2017 Oct;25(10):851-873. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004.
12. Blázquez AB, Berin MC. Microbiome and food allergy. *Transl Res.* 2017;179:199-203.
13. Bonneau M, Lebreton B. Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat Sci.* 2010 Feb;84(2):293-300. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.03.013.
14. Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezhuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J, Zaretskaya I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jul;41(Web Server issue):W29-33. doi: 10.1093/nar/gkt282.
15. Borrel G, Parisot N, Harris HM, Peyretailade E, Gaci N, Tottey W, Bardot O, Raymann K, Gribaldo S, Peyret P, O'Toole PW, Brugère JF. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics.* 2014 Aug 13;15:679. doi: 10.1186/1471-2164-15-679.

16. Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief Bioinform.* 2017 Sep 23. doi:10.1093/bib/bbx120.
17. Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Harvey RB, Genovese KJ, Kennedy CN, et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim Health Res Rev.* 2008;9:217–225. doi: 10.1017/S1466252308001540.
18. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013 Apr 30;4(1):19. doi: 10.1186/2049-1891-4-19.
19. Cava R., Ventanas J., Ruiz J., Andres A. I., & Antequera. Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Science and Technology International*, 2000, 6, 235–242.
20. Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Gewirtz AT. Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology.* 2014;59:328-39.
21. Chiofalo B., Lo Presti V., Piccolo D., & Arena G. Nero Siciliano pig: Effect of the diet on meat quality. *Italian Journal of Animal Science*, 2007, 2(Suppl. 1), 679.
22. Chiofalo V., Zumbo A., Liotta L., Chiofalo B. In vitam performances and carcass traits of “Nero Siciliano” pigs reared outdoor and plein air. 27th World Veterinary Congress. Tunis, September 25-29, 2002.
23. Cho, I., and M.J. Blaser. 2012. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 13.
24. Chowdhury, S. R., King, D. E., Willing, B. P., Band, M. R., Beever, J. E., Lane, A. B., Loor, J. J., Marini, J. C., Rund, L. A., Schook, L. B., Van Kessel, A.

- G., and Gaskins, H. R. (2007) Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genomics*. 8: 215. 10.
- 25.** Ji Y, Park S, Chung Y, Kim B, Park H, Huang E, Jeong D, Jung HY, Kim B, Hyun CK, Holzapfel WH. Amelioration of obesity-related biomarkers by *Lactobacillus sakei* CJLS03 in a high-fat diet-induced obese murine model. *Sci Rep*. 2019 May 2;9(1):6821. doi: 10.1038/s41598-019-43092-y.
- 26.** Conway P.L., 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. Chapman and Hall London.
- 27.** 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 Aug 24;8(1):12727. doi: 10.1038/s41598-018-30932-6
- 28.** D'Alessandro E, Giosa D, Sapienza I, Giuffrè L, Cigliano RA, Romeo O, Zumbo A. [PROVISIONAL] Whole genome SNPs discovery in Nero Siciliano pig. *Genet Mol Biol*. 2019 Jun 10. pii: S1415-47572019005021102. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0169.
- 29.** Danielsen, M., Hornshoj, H., Siggers, R. H., Jensen, B. B., van Kessel, A. G., and Bendixen, E. (2007) Effects of bacterial colonization on the porcine intestinal proteome. *J. Proteome. Res*. 6: 2596- 604. 11.
- 30.** De Filippo, C., D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini, and P. Lionetti. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe

and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 14691-14696. doi: 10.1073/pnas.1005963107.

31. De Rodas, B., B. P. Youmans, J. L. Danzeisen, H. Tran, and T. J. Johnson. 2018. Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. *J. Anim. Sci.* 96: 1778-1794. doi: 10.1093/jas/sky109.

32. Denner J. The porcine virome and xenotransplantation. *Virology* 2017 Sep 6;14(1):171. doi: 10.1186/s12985-017-0836-z.

33. Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol.* 2019 Aug 29. pii: S0966-842X(19)30214-8. doi: 10.1016/j.tim.2019.08.001.

34. Di Rosa A.R, Chiofalo B., Lo Presti V., Zumbo A. Dietary acorns vs. barley in "Nero Siciliano" pigs: effect on the volatile compounds of salami. *Italian Journal of Animal Science*, 2009, vol. 8 (SUPPL. 2); p. 569.

35. Di Rosa A.R., Zumbo A., Furfaro M. E., Carcione G., D'Angelo G., V. Chiofalo V. Effect of two different rearing systems on quality of dry cured coppa of Nero Siciliano pig. *Acta Agriculturae Slovenica - Suppl.*4, 2013.

36. Diaz I., Garcia Regueiro J. A., Casillas M., & De Pedro E. Triglyceride composition of fresh ham fat from Iberian pigs produced with different systems of animal nutrition. *Food Chemistry*, 1996, 55, 383–387.

37. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int J Food Microbiol.* 2003 Dec 1;88(2-3):147-64.

38. Drissi F, Merhej V, Angelakis E, El Kaoutari A, Carrière F, Henrissat B, Raoult D. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated

with weight gain or weight protection. *Nutr Diabetes*. 2014 Feb 24;4:e109. doi: 10.1038/nutd.2014.6.

39. Dvořáková V, Bartenschlager H, Stratil A, Horák P, Stupka R, Cítek J, Sprysl M, Hrdlicová A, Geldermann H. Association between polymorphism in the FTO gene and growth and carcass traits in pig crosses. *Genet Sel Evol*. 2012 Apr 17;44:13. doi: 10.1186/1297-9686-44-13.

40. El-Jurdi N, Ghannoum MA. The Mycobiome: Impact on Health and Disease States. *Microbiol Spectr*. 2017 Jun;5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0045-2016.

41. Enaud R, Vandeborghet LE, Coron N, Bazin T, Prevel R, Schaefferbeke T, Berger P, Fayon M, Lamireau T, Delhaes L. The Mycobiome: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Microorganisms*. 2018 Mar 9;6(1). pii: E22. doi: 10.3390/microorganisms6010022.

42. Engelhardt W.V. Absorption of short-chain fatty acids from the large intestine. In: Cummings J.H., Rombeau J.L., Sakata T., editors. *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*. Cambridge University Press; Cambridge, UK: 1995. pp. 149–170.

43. Ewing W. N. and Cole D. J. A. The microbiology of the gastrointestinal tract. Pages 45-65 in the living gut. An introduction to microorganism in nutrition. 1994. W. N. ewing and D. J. A. Cole, eds. Context, Ireland, UK.

44. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev*. 2005;6:17–39. doi: 10.1079/AHR2005105.

45. Fang S, Xiong X, Su Y, Huang L, Chen C. 16S rRNA gene-based association study identified microbial taxa associated with pork intramuscular fat

content in feces and cecum lumen. *BMC Microbiol.* 2017 Jul 19;17(1):162. doi: 10.1186/s12866-017-1055-x.

46. Federici S, Miragoli F, Pisacane V, Rebecchi A, Morelli L, Callegari ML. Archaeal microbiota population in piglet feces shifts in response to weaning: *Methanobrevibacter smithii* is replaced with *Methanobrevibacter boviskoreani*. *EMS Microbiol Lett.* 2015 May;362(10). pii: fnv064. doi: 10.1093/femsle/fnv064.

47. Flint, H.J., S.H. Duncan, K.P. Scott, and P. Louis. 2007. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.* 9:1101– 1111.

48. Fouhse, J. M., R. T. Zijlstra, and B. P. Willing. 2016. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers.* 6: 30-36. doi: 10.2527/af.2016-0031

49. Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère JF. Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 21;20(43):16062-78. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16062.

50. Gérard P. Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Jan;73(1):147-62. doi: 10.1007/s00018-015-2061-5.

51. Giuffre L, Sapienza I, Criseo G, Romeo O, E D'Alessandro E. The Intestinal Mycobiota of Nero Siciliano Pig.. 2018. *MEDICAL MYCOLOGY* 56, S148-S148.

52. Glad T, Kristiansen VF, Nielsen KM, Brusetti L, Wright AD, Sundset MA. Ecological characterisation of the colonic microbiota in arctic and sub-arctic seals. *Microb Ecol.* 2010 Aug;60(2):320-30. doi: 10.1007/s00248-010-9690-x.

53. Gordon JI. Honor thy gut symbionts redux. *Science.* 2012;336:1251- 3.

- 54.** Greiner T, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2011 Apr;22(4):117-23. doi: 10.1016/j.tem.2011.01.002.
- 55.** Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E,
- 56.** 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 Apr 16;8(1):6012. doi: 10.1038/s41598-018-24508-7.
- 57.** Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* 1998 Oct;5(10):R245-9.
- 58.** Hao WL, Lee YK. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol.* 2004;268:491-502.
- 59.** 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.
- 60.** Hayashi, H., Shibata, K., Sakamoto, M., Tomita, S., Benno, Y., 2007. *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 941–946.
- 61.** Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ.* 2017 Dec 27;32(4):300-313. doi: 10.1264/jsme2.ME17017.

- 62.** Hinkle, E. E., S. Fernando, and T. E. Burkey. 2012. Differences in core microbiota between P1 and P3 dams and their progeny. In: 12th Int. Symp. Dig. Phys. Pigs, Keystone, CO USA.
- 63.** Hynönen U, Kant R, Lähteinen T, Pietilä TE, Beganović J, Smidt H, Uroić K, Avall-Jääskeläinen S, Palva A. Functional characterization of probiotic surface layer protein-carrying *Lactobacillus amylovorus* strains. *BMC Microbiol.* 2014 Jul 28;14:199. doi: 10.1186/1471-2180-14-199.
- 64.** Isaacson R, Kim HB. The intestinal microbiome of the pig. *Anim Health Res Rev.* 2012 Jun;13(1):100-9. doi: 10.1017/S1466252312000084.
- 65.** Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., and Salminen, S. (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 444S-450S. 9.
- 66.** Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 2018;9:5114.
- 67.** Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015 Aug 7;21(29):8787-803. doi: 0.3748/wjg.v21.i29.8787.
- 68.** Jensen B.B., The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 1998. 89:175-188.
- 69.** Johnson TA, Looft T, Severin AJ, Bayles DO, Nasko DJ, Wommack KE, Howe A, Allen HK. The In-Feed Antibiotic Carbadox Induces Phage Gene Transcription in the Swine Gut Microbiome. *MBio.* 2017 Aug 8;8(4). pii: e00709-17. doi: 10.1128/mBio.00709-17.
- 70.** Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction

from metagenome assemblies. *PeerJ*. 2019 Jul 26;7:e7359. doi: 10.7717/peerj.7359.

71. 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 Jun 12;177(3-4):242-51. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.03.014.

72. 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 Aug 31;18:65-86. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022438. Epub 2017 Mar 20.

73. Konstantinov, S. R., A. A. Awati, B. A. Williams, B. G. Miller, P. Jones, C. R. Stokes, A. D. Akkermans, H. Smidt, and W. M. de Vos. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol*. 8: 1191-1199. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x

74. Kušar D, Avguštin G. Molecular profiling and identification of methanogenic archaeal species from rabbit caecum. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010 Dec;74(3):623-30. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00980.x.

75. Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes C.H. Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livestock Science* 108 (2007) 82–93. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.091.

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

77. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
78. Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, Morris MJ. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One*. 2015 May 18;10(5):e0126931. doi: 10.1371/journal.pone.0126931.
79. Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001;15:8.
80. Leser, T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrona, M. Boye, and K. Moller. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 673-690. doi: 10.1128/AEM.68.2.673-690.2002
81. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1):W256-W259. doi:10.1093/nar/gkz239.
82. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, Arumugam M, Kultima JR, Prifti E, Nielsen T, Juncker AS, Manichanh C, Chen B, Zhang W, Levenez F, Wang J, Xu X, Xiao L, Liang S, Zhang D, Zhang Z, Chen W, Zhao H, Al-Aama JY, Edris S, Yang H, Wang J, Hansen T, Nielsen HB, Brunak S, Kristiansen K, Guarner F, Pedersen O, Doré J, Ehrlich SD; MetaHIT Consortium, Bork P, Wang J; MetaHIT Consortium. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014 Aug;32(8):834-41. doi: 10.1038/nbt.2942.

- 83.** Liotta L., Chiofalo V., Zumbo A., & Chiofalo L. Nero Siciliano pigs reared in plain air and lived in extensive condition: data on tissue separation of fresh ham and shoulder. In 48th international congress of meat science and technology. Roma, 25–30 August 2002.
- 84.** Liotta, L., Chiofalo, B., Zumbo, A., Chiofalo, V. (2003). Nero Siciliano pig for the production of the “S.Angelo” salame: sensorial characteristics. In Proc. 54th Annual Meeting of the EAAP, Rome (Italy).
- 85.** Looft, T., Allen, H.K., Cantarel, B.L., Levine, U.Y., Bayles, D.O., Alt, D.P., Henrissat, B., Stanton, T.B., 2014a. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J.* 8, 1566–1576.
- 86.** 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 Jan 4;6(1):4. doi: 10.1186/s40168-017-0384-1.
- 87.** Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience.* 2012 Dec 27;1(1):18.
- 88.** Lynch, S.V., and O. Pedersen. 2016. The human intestinal microbiome in health and disease. *New Engl. J. Med.* 375:2369–2379.
- 89.** Mach N, Berri M, Estellé J, Levenez F, Lemonnier G, Denis C, Leplat JJ, Chevaleyre C, Billon Y, Doré J, Rogel-Gaillard C, Lepage P. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ Microbiol Rep.* 2015 Jun;7(3):554-69. doi: 10.1111/1758-2229.12285.

- 90.** Madonia S., Porcu S., Liotta L., Margiotta S., Chiofalo V., Ligios S. Slaughter traits of “Sarda” and “Nero Siciliano” pigs reared outdoors. Preliminary results. *Italian Journal of Animal Science*, 2007b, 6:sup1, 697.
- 91.** Madonia S., Porcu S., Liotta L., Margiotta S., Ligios S., Chiofalo V., Russo V. Italian local breeds Sarda and Nero Siciliano: Typical breeding system, carcass traits and meat quality. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig*, Messina, (p. 96). Capo d'Orlando, Italy (2007a, October 11–13).
- 92.** 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 Jan 7;9:2868. doi: 10.3389/fimmu.2018.02868.
- 93.** Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Faggioli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol.* 2016;22:361-8.
- 94.** Mathur R, Barlow GM. Obesity and the microbiome. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(8):1087-99. doi: 10.1586/17474124.2015.1051029.
- 95.** Maya-Lucas O, Murugesan S, Nirmalkar K, Alcaraz LD, Hoyo-Vadillo C, Pizano-Zárate ML, García-Mena J. The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe.* 2019 Feb;55:11-23. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.10.009.
- 96.** Melotti L, Oostindjer M, Bolhuis J.E., Held S., Mendl M. Coping personality type and environmental enrichment affect aggression at weaning in pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 133 (2011) 144–153. doi:10.1016/j.applanim.2011.05.018

- 97.** Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog.* 2012 Aug;53(2):100-8. doi: 10.1016/j.micpath.2012.05.007.
- 98.** Mitsuoka, T. 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.* 50:438–446
- 99.** Mondello, L., Costa, R., Chiofalo, B., Chiofalo, V., Liotta, L., Dugo, P., Dugo, G. (2003). Caratteristiche della frazione lipidica delle carni di suino Nero siciliano mediante GC ultraveloce. In *Qualità e Sicurezza degli Alimenti*, Milano, 2004, Marchelli R. (ed.). Morgan Edizioni Tecniche, Milano, pp. 439-441.
- 100.** Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, Stewart CJ, Metcalf GA, Muzny DM, Gibbs RA, Ajami NJ, Petrosino JF. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome.* 2017 Nov 25;5(1):153. doi:10.1186/s40168-017-0373-4.
- 101.** Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 2017 May;27(5):824-834. doi: 10.1101/gr.213959.116.
- 102.** Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics.* 2011 Sep 30;12:385. doi: 10.1186/1471-2105-12-385.
- 103.** Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, Phillippy AM. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol.* 2016 Jun 20;17(1):132. doi: 10.1186/s13059-016-0997-x.
- 104.** O'Sullivan DJ. Methods for analysis of the intestinal microflora. *Curr Issues intest Microbiol.* 2000 Sep;1(2):39-50.

- 105.** Pajarillo, E.A., Chae, J., Balolong, M.P., Kim, H.B., Kang, D., 2014a. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60, 140–146.
- 106.** Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015 Jul;25(7):1043-55. doi: 10.1101/gr.186072.114.
- 107.** Pasolli E, Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Karcher N, Armanini F, Beghini F, Manghi P, Tett A, Ghensi P, Collado MC, Rice BL, DuLong C, Morgan XC, Golden CD, Quince C, Huttenhower C, Segata N. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell.* 2019 Jan 24;176(3):649-662.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.001.
- 108.** Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:4250–4255.
- 109.** Petri, D., J. E. Hill, and A. G. Van Kessel. 2010. Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. *Livestock Sc.* 133: 107-109. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.037.
- 110.** Pugliese C., Bozzi R., Campodoni G., Acciaioli A., Franci O., & Gandini G. Performance of Cinta Senese pigs reared outdoors and indoors. Meat and subcutaneous fat characteristics. *Meat Science*, 2005, 69, 459–464.
- 111.** Pugliese C., Calagna G., Chiofalo V., Moretti M., Margiotta S., Franci O., & Gandini G. Comparison of the performances of Nero Siciliano pigs reared indoors and outdoors: Joints composition, meat and fat traits. *Meat Science*, 2004a, 69, 523–528.

- 112.** Pugliese C., Calagna G., Chiofalo V., Moretti V.M., Margiotta S., Franci O., Gandini G. Comparison of the performances of Nero Siciliano pigs reared indoors and outdoors: 2. Joints composition, meat and fat traits- *Meat Science*, 2004b, 68(4).
- 113.** Ramayo-Caldas Y, Mach N, Lepage P, Levenez F, Denis C, Lemonnier G, et al. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J.* 2016;10:2973-2977.
- 114.** Riva A, Borgo F, Lassandro C, Verduci E, Morace G, Borghi E, Berry D. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol.* 2017 Jan;19(1):95-105. doi: 10.1111/1462-2920.13463.
- 115.** 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.
- 116.** Saengkerdsub S, Anderson RC, Wilkinson HH, Kim WK, Nisbet DJ, Ricke SC. Identification and quantification of methanogenic Archaea in adult chicken ceca. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan;73(1):353-6.
- 117.** Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107–133.
- 118.** Sayan H, Assavacheep P, Angkanaporn K, Assavacheep A. Effect of *Lactobacillus salivarius* on growth performance, diarrhea incidence, fecal bacterial population and intestinal morphology of suckling pigs challenged with F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2018 Aug;31(8):1308-1314. doi: 10.5713/ajas.17.0746.

- 127.** Svensmark B, Nielsen K, Willeberg P, Jorsal SE. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. II. Post-weaning diarrhoea. *Acta Vet Scand.* 1989;30(1):55-62.
- 128.** 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. PubMed PMID: 8324100.
- 129.** Tang JN, Zeng ZG, Wang HN, Yang T, Zhang PJ, Li YL, Zhang AY, Fan WQ, Zhang Y, Yang X, Zhao SJ, Tian GB, Zou LK. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *J Microbiol Methods.* 2008 Dec;75(3):432-6. doi: 10.1016/j.mimet.2008.07.014.
- 130.** Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res.* 2017;120:1183-1196
- 131.** Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):410S-414S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.410s.
- 132.** Tannock GW. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *Br J Nutr.* 2002 May;87 Suppl 2:S199-201.
- 133.** Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009 Jan 22;457(7228):480-4. doi: 10.1038/nature07540.
- 134.** Turnbaugh, P.J., and J.I. Gordon. 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.* 587:4153–4158.
- 135.** UM, Curião T, Buzoianu SG, Prieto ML, Ryan T, Varley P, Crispie F, Magowan E, Metzler-Zebeli BU, Berry D, O'Sullivan O, Cotter PD, Gardiner GE, Lawlor PG. Exploring a Possible Link between the Intestinal Microbiota and Feed

- Efficiency in Pigs. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Jul 17;83(15). pii: e00380-17. doi: 10.1128/AEM.00380-17.
- 136.** Ventanas S., Ruiz J., Garcia C., & Ventanas J. Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 2007, 77, 324–330.
- 137.** Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vanechoutte M. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol.* 2004;4:16. doi: 10.1186/1471-2180-4-16.
- 138.** Walsh AM, Sweeney T, Bahar B, Flynn B, O'Doherty JV. The effects of supplementing varying molecular weights of chitooligosaccharide on performance, selected microbial populations and nutrient digestibility in the weaned pig. *Animal.* 2013 Apr;7(4):571-9. doi: 10.1017/S1751731112001759.
- 139.** Wang H, Ling Y, Shan T, Yang S, Xu H, Deng X, Delwart E, Zhang W. Gut virome of mammals and birds reveals high genetic diversity of the family Microviridae. *Virus Evol.* 2019 Jun 8;5(1):vez013. doi: 10.1093/ve/vez013.
- 140.** Wang J, Ji H, Wang S, Liu H, Zhang W, Zhang D, Wang Y. Probiotic *Lactobacillus plantarum* Promotes Intestinal Barrier Function by Strengthening the Epithelium and Modulating Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 2018 Aug 24;9:1953. doi: 10.3389/fmicb.2018.01953.
- 141.** Wekerle H. Brain Autoimmunity and Intestinal Microbiota: 100 Trillion Game Changers. *Trends Immunol.* 2017 Jul;38(7):483-497. doi: 10.1016/j.it.2017.03.008.

- 142.** White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press Inc; 1990. pp. 315–322.
- 143.** Williams MR, Gallo RL. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15:65.
- 144.** Willing, B. P. and Van Kessel, A. G. (2007) Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. *J. Anim. Sci.* 85: 3256-66
- 145.** Woodmansey, E.J. 2007. Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.* 102:1178–1186.
- 146.** Xiao L, Estellé J, Kiilerich P, Ramayo-Caldas Y, Xia Z, Feng Q, Liang S, Pedersen AØ, Kjeldsen NJ, Liu C, Maguin E, Doré J, Pons N, Le Chatelier E, Prifti E, Li J, Jia H, Liu X, Xu X, Ehrlich SD, Madsen L, Kristiansen K, Rogel-Gaillard C, Wang J. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nat Microbiol.* 2016 Sep 19;1:16161. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.161.
- 147.** 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 Aug 15;8:1555. doi:10.3389/fmicb.2017.01555.
- 148.** Yang H, Xiao Y, Wang J, Xiang Y, Gong Y, Wen X, Li D. Core gut microbiota in Jinhua pigs and its correlation with strain, farm and weaning age. *J Microbiol.* 2018 May;56(5):346-355. doi: 10.1007/s12275-018-7486-8.

- 149.** Yang Z, Liao SF. Physiological Effects of Dietary Amino Acids on Gut Health and Functions of Swine. *Front Vet Sci.* 2019 Jun 11;6:169. doi: 10.3389/fvets.2019.00169.
- 150.** Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017 Nov;141(11):1544-1557. doi: 10.5858/arpa.2016-0501-RA.
- 151.** Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics.* 2014 Mar 1;30(5):614-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593.
- 152.** Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology.* 2004;150:2565–2573.
- 153.** Zumbo A., Chiofalo B., Liotta L., & Chiofalo L. Physical characteristics of the meat of “Nero Siciliano” pigs living in extensive condition. In 48th international congress of meat science and technology, (pp. 738–739). Roma, Italy (2002, August 25–30).
- 154.** Zumbo A., Di Rosa A. R., 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).
- 155.** Zumbo A., Lo Presti V., Di Rosa A. R., 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).

8. Ringraziamenti

Si ringrazia il Prof. Enrico D'Alessandro, mio tutor dottorale per la costante presenza e abnegazione messa a disposizione per l'elaborazione di questo progetto.

Si ringrazia il Dipartimento di Scienze Veterinarie, l'Unità di Produzione Animale e il Coordinatore del corso di Dottorato di questo triennio, Prof.ssa Adriana Ferlazzo, e la Prof.ssa Rosaria Laurà per l'impegno e la disponibilità mostrata alla prosecuzione del dottorato.

Si ringrazia inoltre la Dott.ssa Cristina Cravana per la costante disponibilità mostrata nell'arco di questo triennio.

Si ringrazia il Sequentia Biotech SL per il supporto umano e tecnico/scientifico.

Si ringraziano i laboratori di "Microbiologia degli alimenti e Micologia Generale" e di "Genetica", afferenti al dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali (ChiBioFarAm), in particolar modo il Prof. Orazio Romeo per il costante supporto tecnico scientifico, e il Prof. Giuseppe Criseo per il continuo supporto umano e scientifico.