

Effetti della tecnica di allevamento sul microbismo intestinale del pollo

Gerardo Manfreda

Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna
Forlì - 7 Aprile 2011



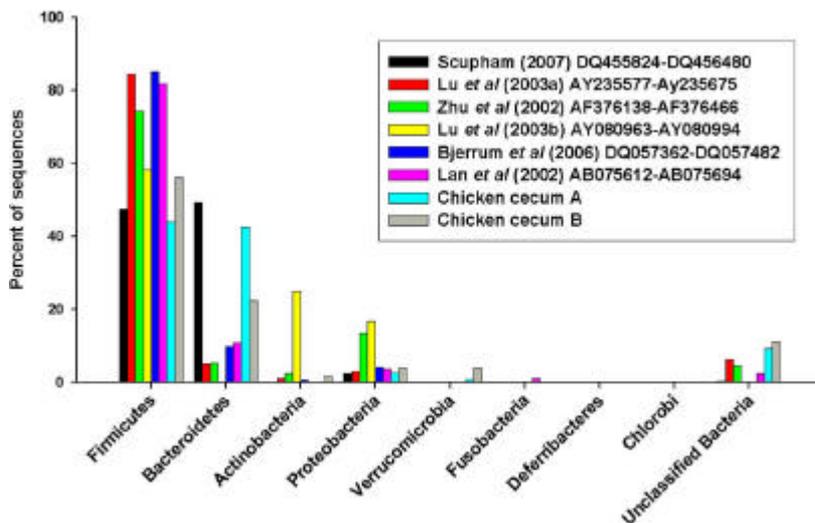
Razionale

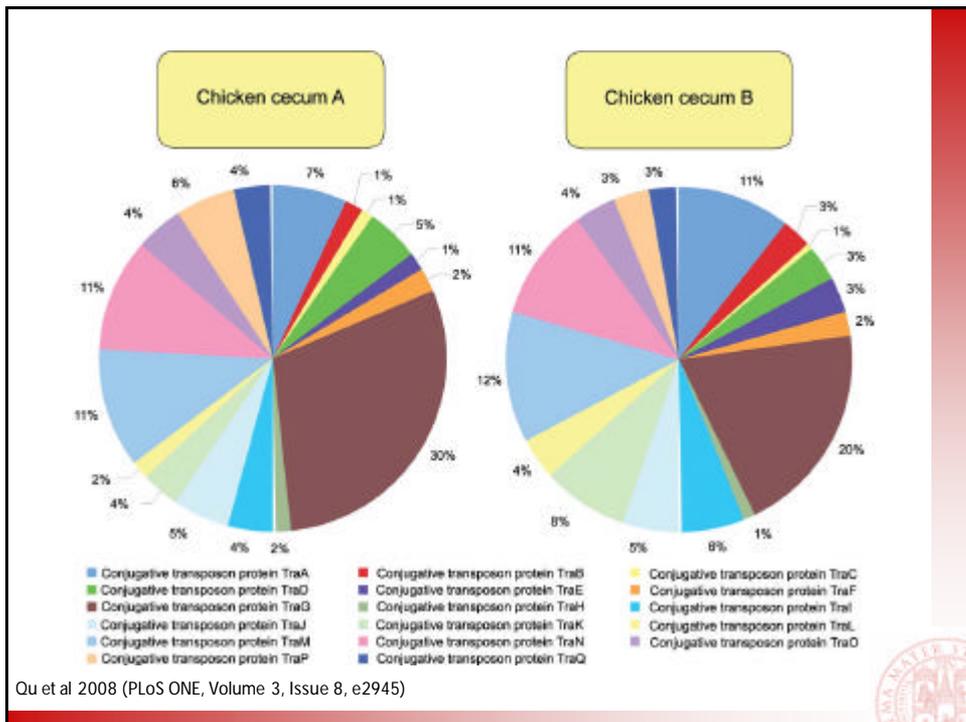
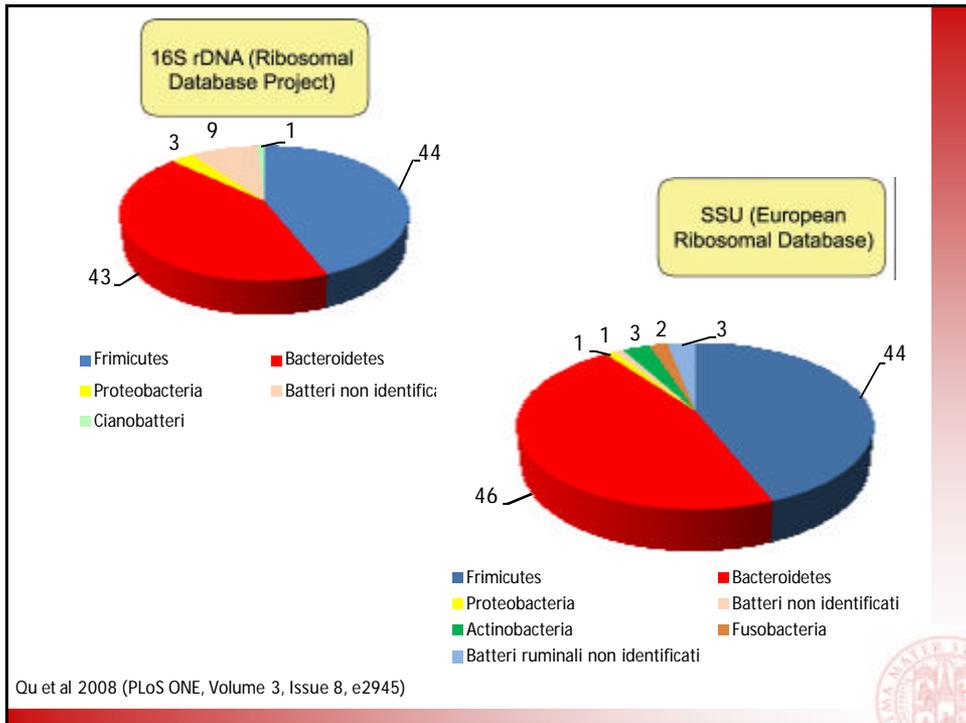
- Il tratto gastrointestinale dei volatili ospita una grande, complessa e dinamica comunità microbica la cui composizione riflette la co-evoluzione o selezione di microrganismi con il loro ospite, la dieta utilizzata e l'ambiente circostante.
- Nel pollo questo microbiota presenta un'elevata concentrazione variabile da 10^7 a 10^{11} batteri per grammo di contenuto intestinale. Tuttavia la maggioranza delle specie microbiche risultano non coltivabili con le tecniche analitiche colturali e pertanto limitate sono le conoscenze sulla loro azione.
- Recentemente l'introduzione delle tecniche molecolari nell'ambito dell'ecologia microbica ha permesso di raccogliere informazioni dettagliate sulla diversità della comunità microbica intestinale sulla loro struttura e soprattutto sulla loro funzione.



Razionale

- Ad esempio Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>) ad oggi contiene un numero pari 1.613.063 sequenze del gene 16S rRNA confermando l'enorme diversità microbica che caratterizza gli ecosistemi animali ed ambientali
- Da questi studi molecolari si è stimato che il microbiota del cieco del pollo contiene almeno 640 specie appartenenti a 140 generi, dei quali solo il 10% appartengono a specie batteriche note mentre il restante 90% fanno parte di specie o generi nuovi.
- Inoltre come già evidenziato in campo umano, anche nel pollo Firmicutes e Bacteroidetes rappresentano più del 90% di tutti i tipi filogenetici colonizzanti il cieco, i quali sono sensibilmente condizionati da numerosi fattori sia di natura alimentare che ambientale.





Obiettivi

- Valutare lo shift microbico (analisi quantitativa) a livello enterico in broilers sottoposti a differenti condizioni sperimentali (diversi trattamenti alimentari diversi sistemi di allevamento)
- Individuare target microbici significativamente correlati ai diversi fattori (dieta, tecnica di allevamento) sui quali sviluppare un'analisi metabolica
- Selezionare target metabolici da utilizzare come strumento di screening rapido



Principali gruppi filogenetici (basati sull'analisi del 16S rRNA) del microbiota intestinale con le famiglie associate e i principali prodotti di fermentazione

Major Phyla	Important Families	*Main Fermentation Products
Bacteroidetes	Bacteroides Prevotellae Prophyomonadaceae Rikenellaceae	acetate, propionate, succinate from carbohydrates
Firmicutes	Clostridiaceae Lactobacillaceae Leuconostocaceae Bacillaceae Streptococcaceae Eubacteriaceae Staphylococcaceae Peptococcaceae Peptostreptococcaceae	acetate, formate, L- and D-lactate, butyrate, succinate, propionate from carbohydrates; BCFAs, indoles, sulphides, phenols, amines, NH ₃ , H ₂ , CO ₂ , CH ₄ from proteins and amino-acids
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae Actinomycetaceae Coriobacteriaceae Corynebacteriaceae Propionibacteriaceae Micrococcaceae	lactate, acetate, formate from carbohydrates
Proteobacteria	Enterobacteriaceae Oxalobacteriaceae Pseudomonadaceae Desulfobrivionaceae Helicobacteriaceae	lactate, acetate, succinate, formate from carbohydrates; sulphide from sulphate, H ₂ S, mercaptans
Euryarchaeota	Methanobacteriaceae	CH ₄
Fusobacteria	Fusobacteriaceae	acetate, butyrate, NH ₃ , formate, lactate
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	N.R.
Lentisphaerae	Victivallaceae, e.g. <i>Victivallis vadensis</i>	acetate, ethanol, H ₂



Sequenze di primers e sonde utilizzate nella sperimentazione

Phylum Target	Gene target	Amplicone	Sequenze dei primer
Firmicutes	16S rRNA	177	FP: GTCAGCTCGTGTCGTGA RP: CCATTGTAKYACGTGTGT
Bacteroidetes	16S rRNA	183	FP: AGCAGCCGCGGTAAT RP: CTAHGCATTTACCGCTA
Lactobacillus	Tuf	91	FP: TACATYCCAACHCCAGAACG RP: AAGCAACAGTACCACGACCA
<i>Proteobacteria</i>	16S rRNA		FP: AGTACCGTGAGGGAAAG RP: ATGGCTGCTTCTAAGCC
<i>B-? Proteobacteria</i>	sonda		GCCTTCCCACTTCGTTT
<i>?-Proteobacteria</i>	sonda		GCCTTCCACATCGTTT

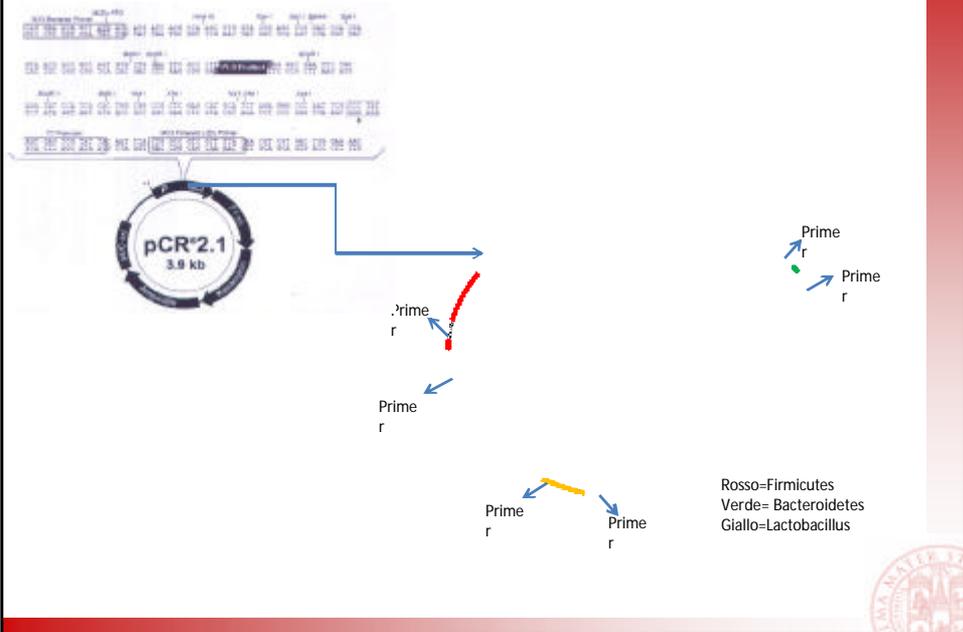


Specificità delle sequenze utilizzate nella qPCR

- Il sistema di identificazione dei Bacteroidetes è risultato altamente sensibile (89.89%), poichè ha evidenziato una completa similarità con 30.237 delle 33.639 16S rRNA sequenze del RDP-II Bacteroidetes phylum.
- Il sistema di identificazione dei Firmicutes è risultato anch'esso altamente sensibile (88.94%), poichè ha evidenziato una completa similarità con 83.576 dei 93.969 of 16S rRNA sequenze del RDP-II Firmicutes phylum.



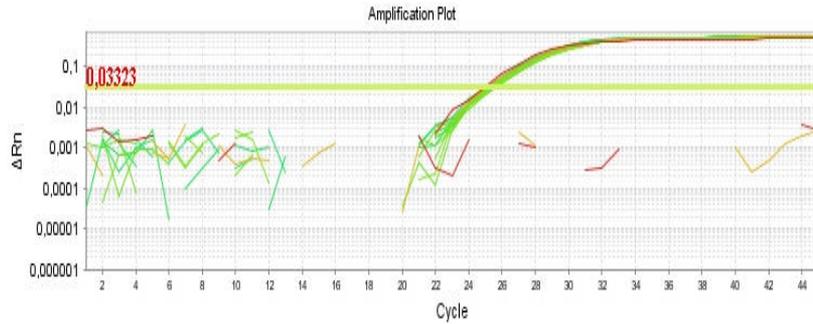
Quantificazione mediante plasmide di Firmicutes, Bacteroidetes e Lactobacillus



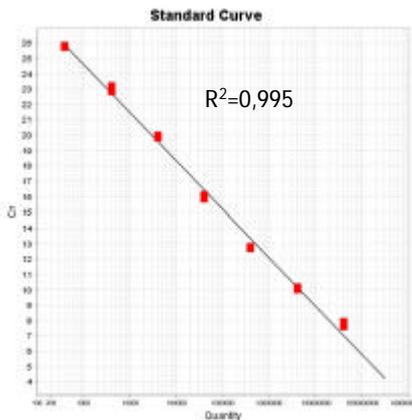
qPCR

- Isolamento del DNA da contenuto intestinale
 - Approssimativamente 1 g di contenuto intestinale (ileo o ceco) è stato congelato a -20°C fino al momento dell'analisi
 - 0,2 g di contenuto intestinale congelato sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA mediante il kit di estrazione QIAamp DNA Stool (QIAGEN).
 - Dopo le diverse fasi effettuate secondo le istruzioni del produttore il DNA estratto è stato risospeso in 200 µl di Buffer AE e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi qPCR
- I primers di Bacteroidetes, Firmicutes phylum e Lactobacillus genere:
 - si sono utilizzati quelli riportati da Armougom e coll. (PLoS ONE 2009)
- Il test di Real-time assays è stato effettuato con un ABI 75000 FAST utilizzando un FAST SYBRGreen master mix (Applied Biosystem)
 - Un totale di 4 µl di DNA estratto dalle feci, diluito 1/100, è stato aggiunto in un volume finale di 20 µl contenente 900 nM di primers..
- Ciclo di amplificazione per Bacteroidetes e Firmicutes:
 - denaturazione a 95°C per 20s seguita da 40 cicli (95°C per 3s, 60°C per 30s) ed infine una fase di melting (95°C per 15s, 60°C per 1min, 95°C per 15s e 60°C per 15s).

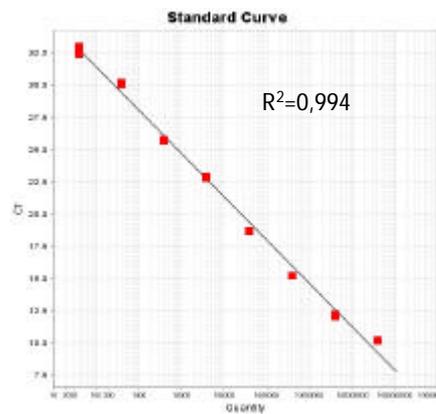
Prova di verifica della presenza di eventuali inibitori nel DNA estratto



Curva standard per Bacteroidetes e Firmicutes



BACTEROIDETES: Slope: -3.14, Y-inter:34.043, R²: 0.995, Eff%: 108,2



FIRMICUTES: Slope: -3.35, Y-inter:38.103, R²: 0.994, Eff%: 98.79

Sperimentazioni

1° Sperimentazione

1. dieta di controllo
2. dieta a basso contenuto proteico (-10%)
3. dieta a contenuto proteico normale + 100ppm di xilanas
4. dieta a basso contenuto proteico + 100 ppm di xilanas
5. dieta a contenuto proteico normale + 15000 U/kg di proteasi
6. dieta a basso contenuto proteico + 15000ppm di proteasi

2° Sperimentazione

1. dieta di controllo a contenuto proteico normale
2. dieta a contenuto proteico normale + 260 ppm di tannino
3. dieta con una riduzione del 10% del contenuto proteico

3° Sperimentazione

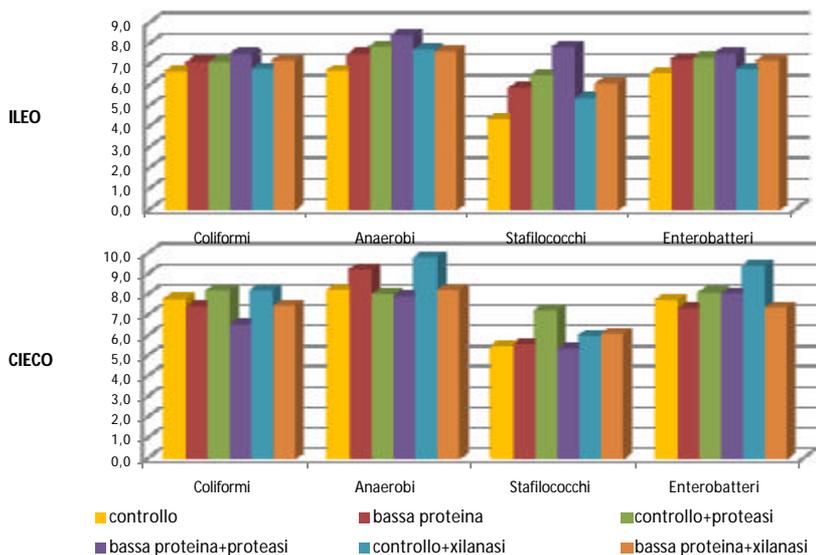
1. dieta con una miscela di acido sorbico e composti aromatici
2. dieta di controllo

4° Sperimentazione

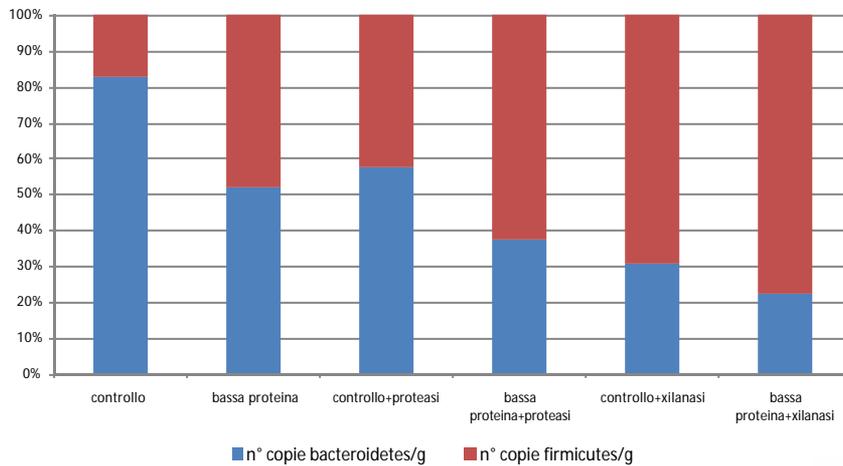
1. Allevamento convenzionale
2. All'allevamento all'aperto



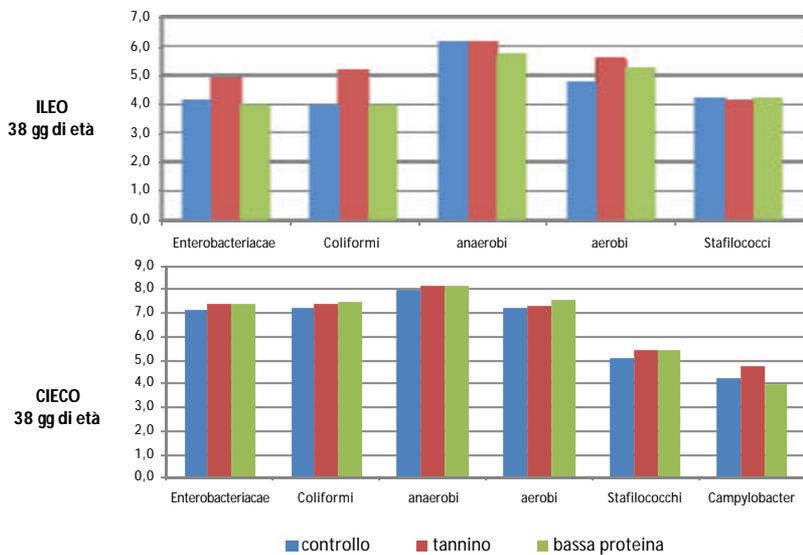
Effetto di differenti diete sulla popolazione microbica di ileo e cieco in polli di 49 giorni di età



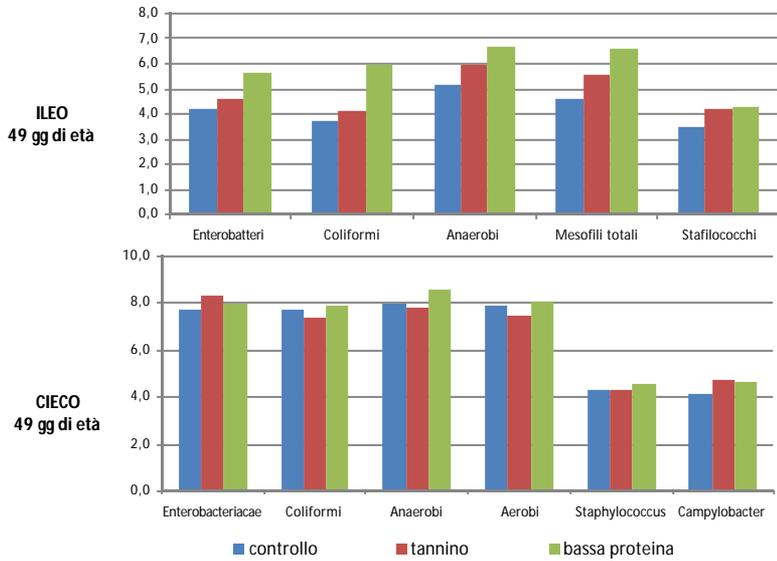
Effetto di differenti diete sul livello di Bacteroidetes e Firmicutes a livello cecale



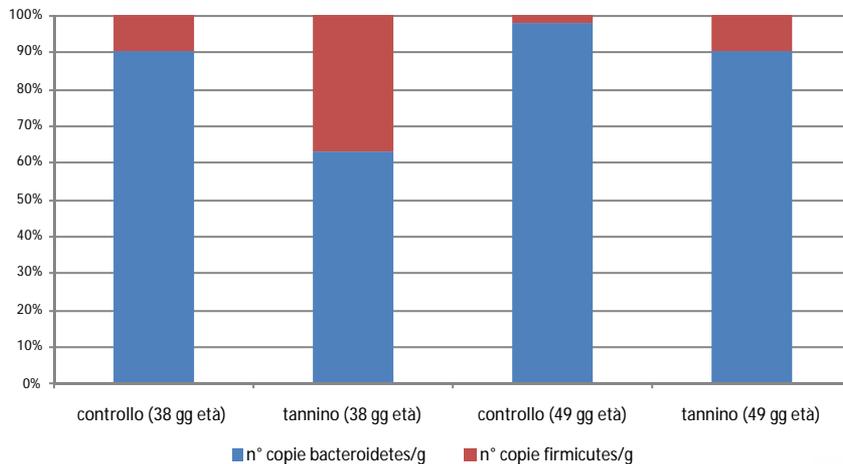
Effetto dell'integrazione dietetica con tannino sulla popolazione microbica di ileo e cieco



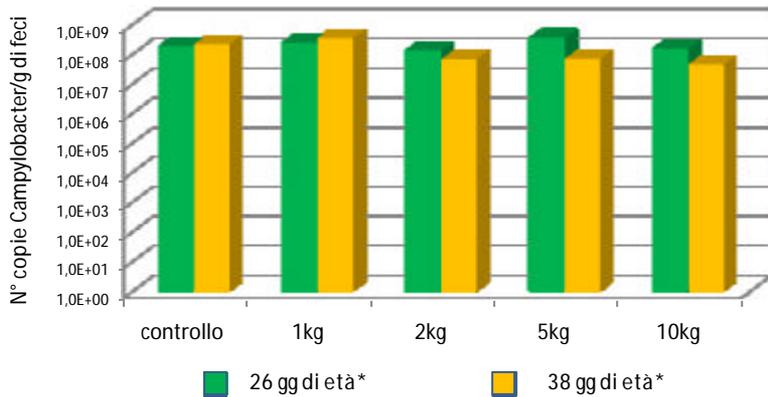
Effetto dell'integrazione dietetica con tannino sulla popolazione microbica di ileo e cieco



Effetto dell'integrazione dietetica con tannino sul livello di Bacteroidetes e Firmicutes a livello cecale

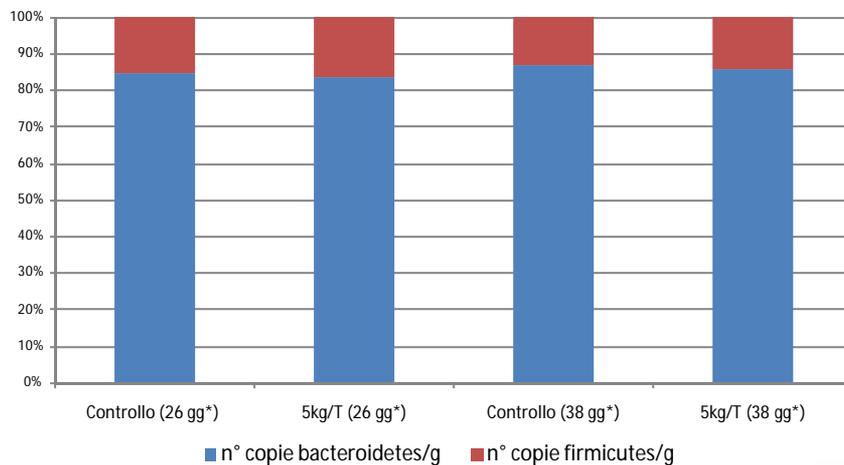


Effetto dell'integrazione dietetica di una miscela di acido sorbico e composti aromatici a differenti concentrazioni sul livello di Campylobacter a livello cecale



*=infezione con 10⁶UFC/ml a 21 gg di età

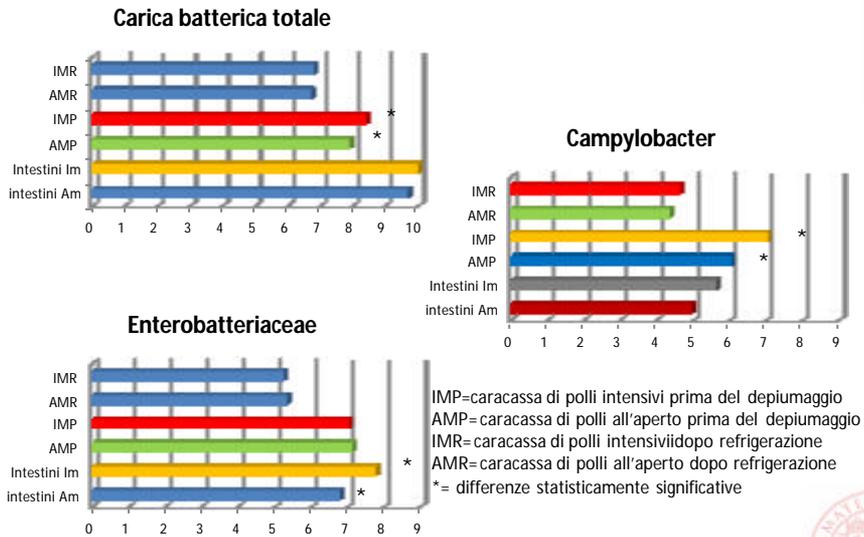
Effetto dell'integrazione dietetica di una miscela di al 5% di acido sorbico e composti aromatici sul livello di Bacteroidetes e Firmicutes a livello cecale



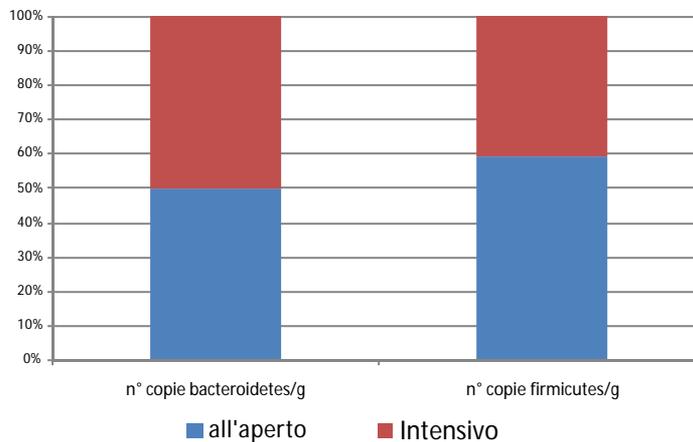
*=infezione con 10⁶UFC/ml a 21 gg di età



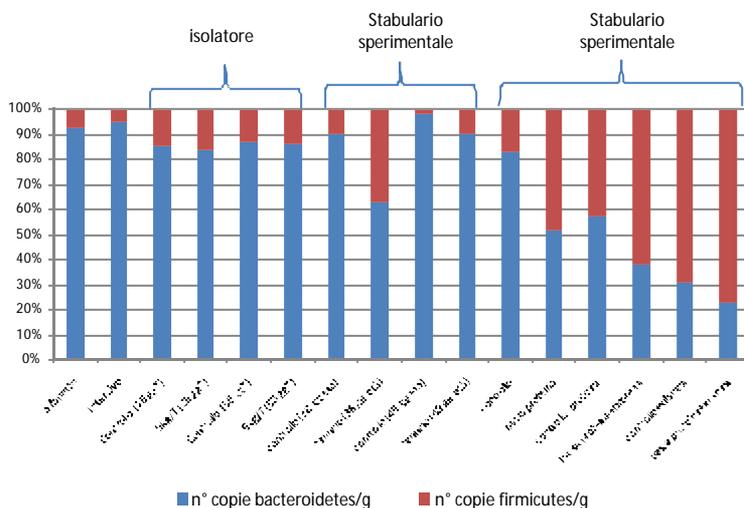
Effetto del sistema di allevamento su alcune classi batteriche rilevate nell'intestino e sulle carcasse



Effetto del sistema di allevamento sul livello di Bacteroidetes e Firmicutes a livello cecale



Effetto della dieta e del sistema di allevamento sul livello di Bacteroidetes e Firmicutes a livello cecale



Conclusioni

1) A livello ileale

- 1) Coliformi ed enterobatteri sono ridotti significativamente nella dieta di controllo+xilanasì
- 2) La dieta con Proteasi+bassa proteina aumenta significativamente tutte le specie batteriche analizzate

2) A livello cecale

- 1) Coliformi, anaerobi ed enterobatteri aumentano significativamente nella dieta di controllo+xilanasì
- 2) Proteasi+bassa proteina riducono significativamente coliformi, anaerobi e stafilococchi

- 3) L'utilizzo di enzimi nella dieta ha modificato sensibilmente il profilo microbico dell'intestino con sensibile aumento dei Firmicutes. Questo dato se associato alla riduzione di enterobacteriaceae potrebbe denotare un incremento di specie lactobacillaceae con probabile riduzione di *E. coli* e *C. perfringens*. **PROBABILE TARGET DI STUDIO METABOLICO: FIRMICUTES NELLE DIETE CON ENZIMI E BACTEROIDETES NELLE DIETE DI CONTROLLO**

Conclusioni

- 3) L'integrazione dietetica con tannino non ha prodotto significativi cambiamenti nella popolazione microbica del cieco mentre un aumento di enterobatteri, coliformi ed aerobi si è osservato nell'ileo a 38 giorni di età.
- 4) Nella stessa sperimentazione la dieta a basso contenuto proteico ha evidenziato sostanziali effetti di incremento delle diverse specie microbiche solo a 49 giorni di età nell'ileo.
- 5) Nessun significativo effetto si è riscontrato per quanto riguarda il livello di campylobacter. Scarsi sono risultati gli effetti sul livello quantitativo di Bacteroidetes e Firmicutes anche se questi sono aumentati significativamente solo a 38 giorni di età. **PROBABILE ULTERIORE APPROFONDIMENTO SU ACTINOBACTERIACEAE E PROTEOBACTERIACEAE. TARGET DI STUDIO METABOLICO: DA DEFINIRE**



Conclusioni

- 7) L'integrazione dietetica di acidi organici ed olii essenziali protetti non ha modificato il microbiota cecale di Firmicutes e Bacteroidetes come pure nessuna significativa differenza si è osservata per Campylobacter. **PROBABILE ULTERIORE APPROFONDIMENTO SU ACTINOBACTERIACEAE E PROTEOBACTERIACEAE**
- 8) Una riduzione di circa 0,7 log di Campylobacter si è registrata negli intestini di animali allevati all'aperto come pure una significativa riduzione di campylobacter nelle sue carcasse prima del depiumaggio.
- 9) Sui campioni intestinali degli stessi animali allevati all'aperto si è osservata una significativa riduzione delle enterobatteriaceae rispetto agli animali allevati intensivamente.
- 10) L'analisi relativa alla concentrazione di Bacteroidetes e firmicutes ha evidenziato un incremento del 10% di quest'ultimi negli animali allevati all'aperto **PROBABILE TARGET DI STUDIO METABOLICO: FIRMICUTES ANIMALI ALLEVATI ALL'APERTO**



Ringraziamenti

- Prof. Achille Franchini
- Prof. Claudio cavani
- Dott. Sirri Federico
- Dott. Petracci Massimiliano

