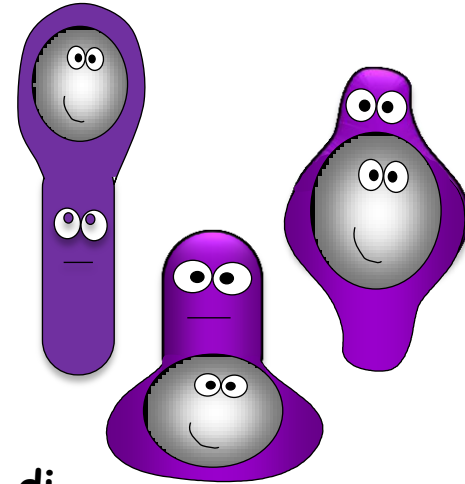
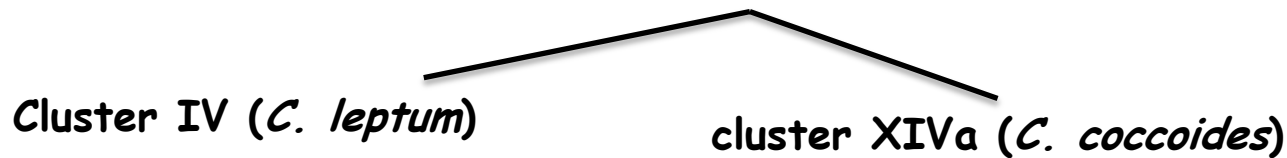


La maggior parte della diversità è interna ai Phylum evolutivi
Firmicutes (50-80%) e Bacteroidetes

Tra i Firmicutes prevalgono i "Clostridia"

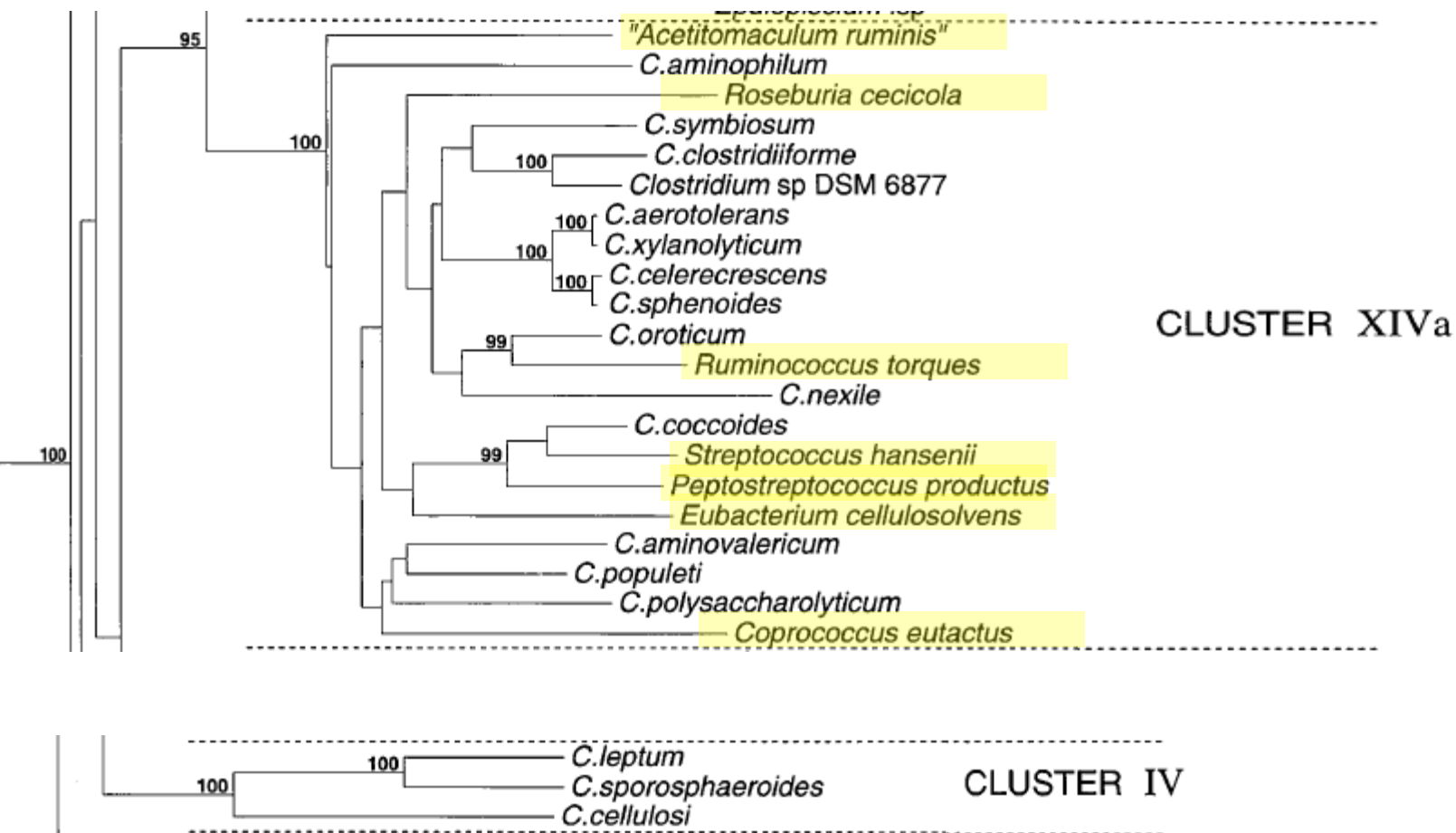


La divisione in cluster = gruppi di rRNA
Si adotta quando ci si accorge che la tassonomia di
un gruppo di microrganismi va rivista profondamente

Nel caso dei clostridi, alcune specie erano state incluse
nei phylum didermi (si colorano male con il Gram)

In altre non erano evidenti le spore

La morfologia dei "peptostreptococchi» era fuorviante

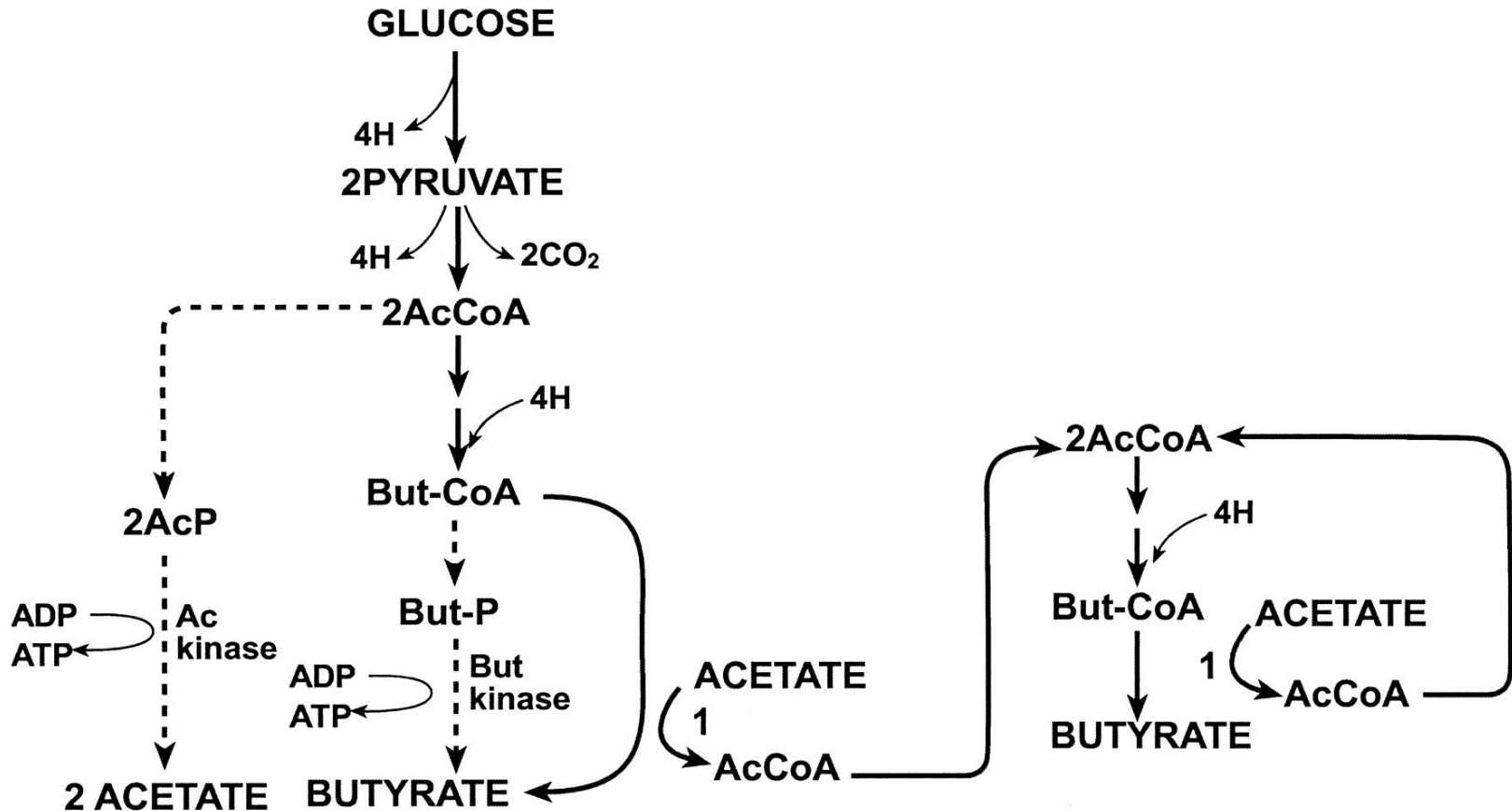


Questi microrganismi hanno in comune la capacità di produrre ingenti quantità di butirrato, direttamente o per trasformazione dell'acetato

Il butirrato è importante come fonte di energia per le IEC

Ha un effetto anti-infiammatorio perché inibisce la trascrizione di NF-κB che media gli effetti delle citochine proinfiammatorie

Formazione di acetato e butirrato a partire dal glucosio o dal glucosio+ acetato esogeno
 1, butiril-CoA:acetil-CoA trasferasi;
 AcP, acetil fosfato;
 But, butirile o butirrato



Lactobacilli (Monodermi L G+C)
Phylum Firmicutes, Classe Bacilli, Ordine Lactobacillales, famiglia
Lactobacillaceae, genere Lactobacillus

immobili, eterotrofi, metabolismo fermentativo

Sono associati a substrati ricchi sotto il profilo nutrizionale, perché hanno spesso difetti di sintesi e richiedono la presenza di aminoacidi e vitamine

L. reuteri è la specie autoctona dominante, negli infanti e nell'adulto; occasionalmente si trova anche nello stomaco. *L. ruminis* (ex *Catenabacterium cateniforme*) è probabilmente una variante immobile di *L. reuteri*



Omofermentanti obbligati (Gruppo I)

L. acidophilus, *L. delbrueckii*

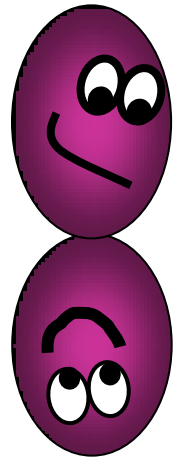
Eterofermentanti facoltativi (Gruppo II)

Eterofermentanti obbligati (Gruppo III)

Prodotti finali: lattato, acetato (o etanolo) e CO₂

L. brevis, *L. reuteri*

Lactobacilli (Monodermi L G+C)
Phylum Firmicutes, Classe Bacilli, Ordine Lactobacillales, famiglia
Enterococcaceae*, genere *Enterococcus



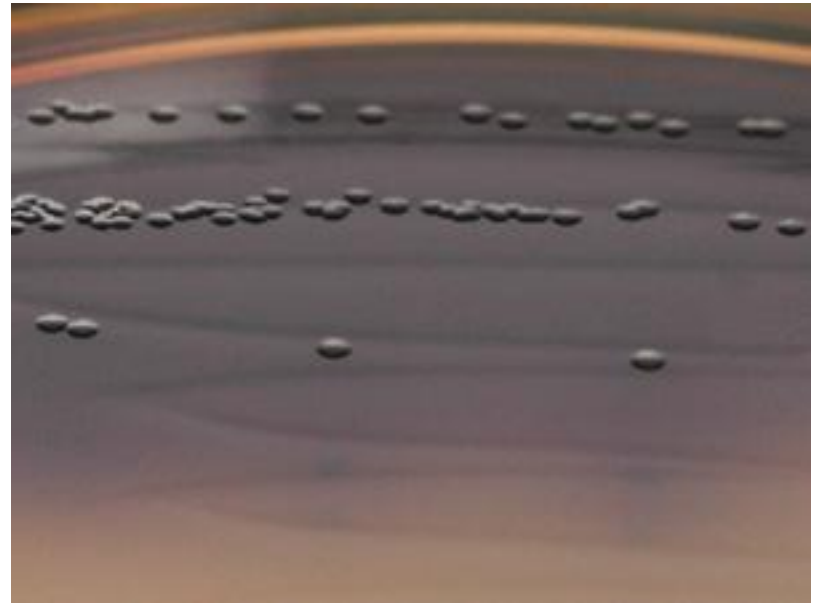
Sono stati separati dagli streptococchi

Appartengono al gruppo D di Lancefield

Vivono come commensali nell'intestino di uomo e animali e sono considerati indicatori di inquinamento fecale dell'ambiente

Diversamente dagli streptococchi crescono sui normali terreni di coltura e in presenza di bile

anaerobi aerotolleranti (catalasi negativi)
svolgono una fermentazione OMO-lattica



Phylum: Bacteroidetes, Class: Bacteroidetes, Order: Bacteroidales
Family: *Bacteroidaceae*

Didermi, bastoncellari, anaerobi

Tratto caratteristico, presenza di
sfingolipidi in membrana

Possono usare carboidrati semplici ma le loro fonti
di energia principali nel colon sono glucani vegetali
e composti complessi dell'ospite

B. fragilis, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*
sono tra le specie più frequenti

*Dal genere Bacteroides è stato separato il genere Parabacteroides
a cui appartiene il ceppo AF510 della flora alterata di Schaedler*

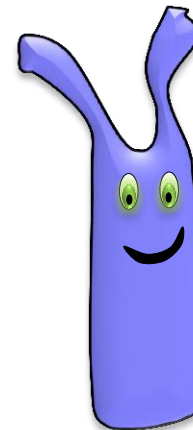
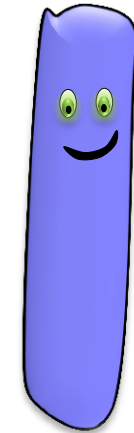
Bifidobacterium
(classe Actinobacteria)

Gram-positivi alto contenuto G+C
anaerobi obbligati

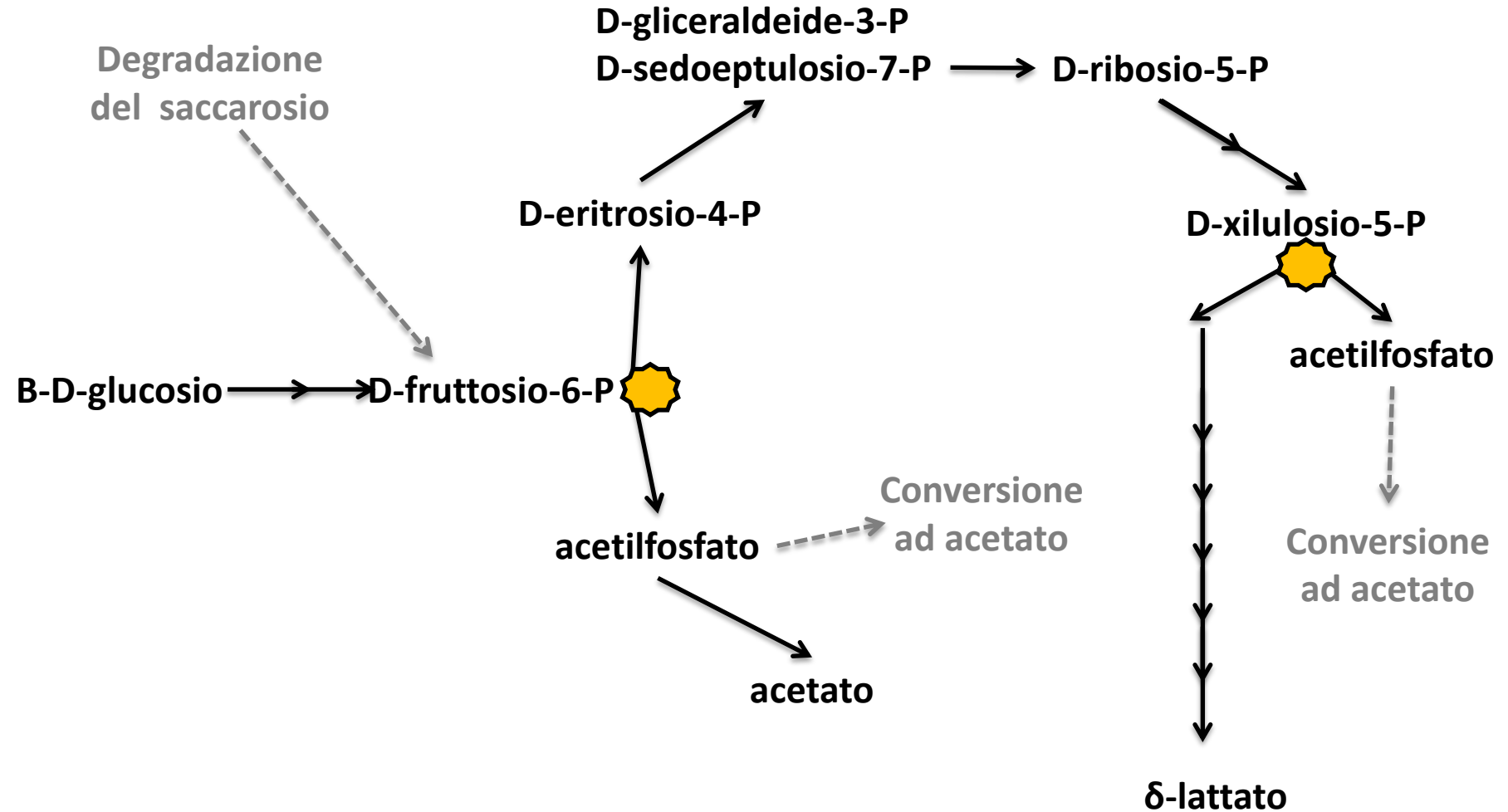
metabolismo fermentativo

Forme bastoncellari (colture giovani)

o ramificate (fase stazionaria-tarda logaritmica)



I bifidobatteri hanno una via fermentativa tipica (Bifido shunt)
«fructose-6-phosphate pathway» 2 moli glucosio → 2 moli lattato
+ 3 moli acetato, 5 moli ATP



L'enzima chiave xylulose-5-P fosfochetolasi / fruttosio-6-P fosfochetolasi
è usato a volte come marcatore per i bifidobatteri

IL MICROBIOMA INTESTINALE COMPRENDE POPOLAZIONI STANZIALI E TRANSITORIE

Composizione: determinata da
fattori di ospite

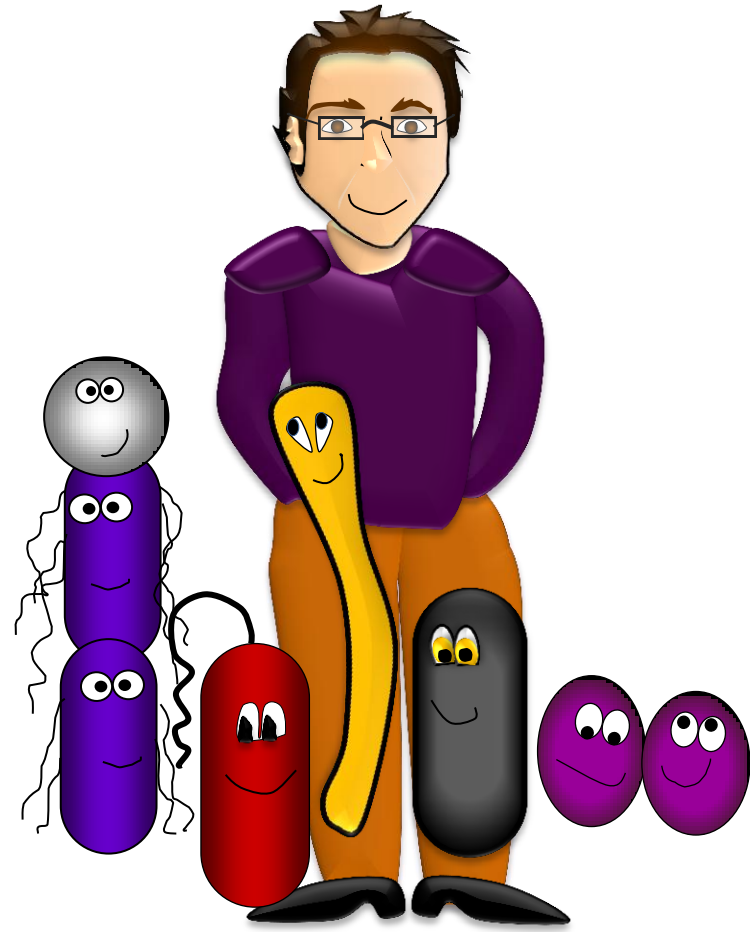
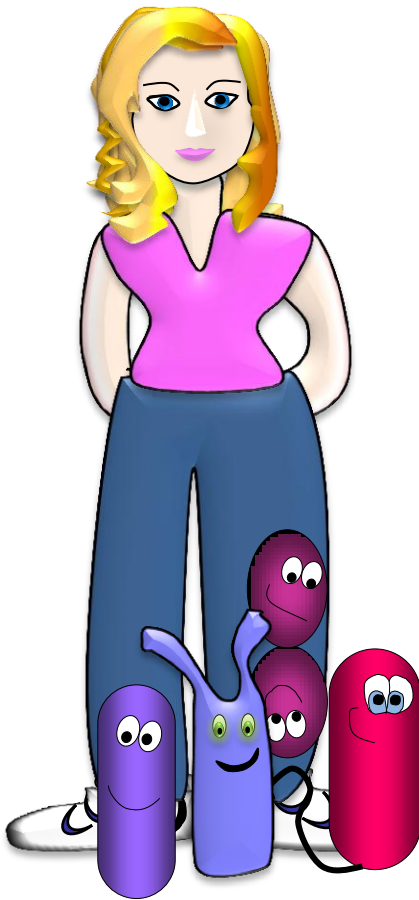
stato immunitario

età

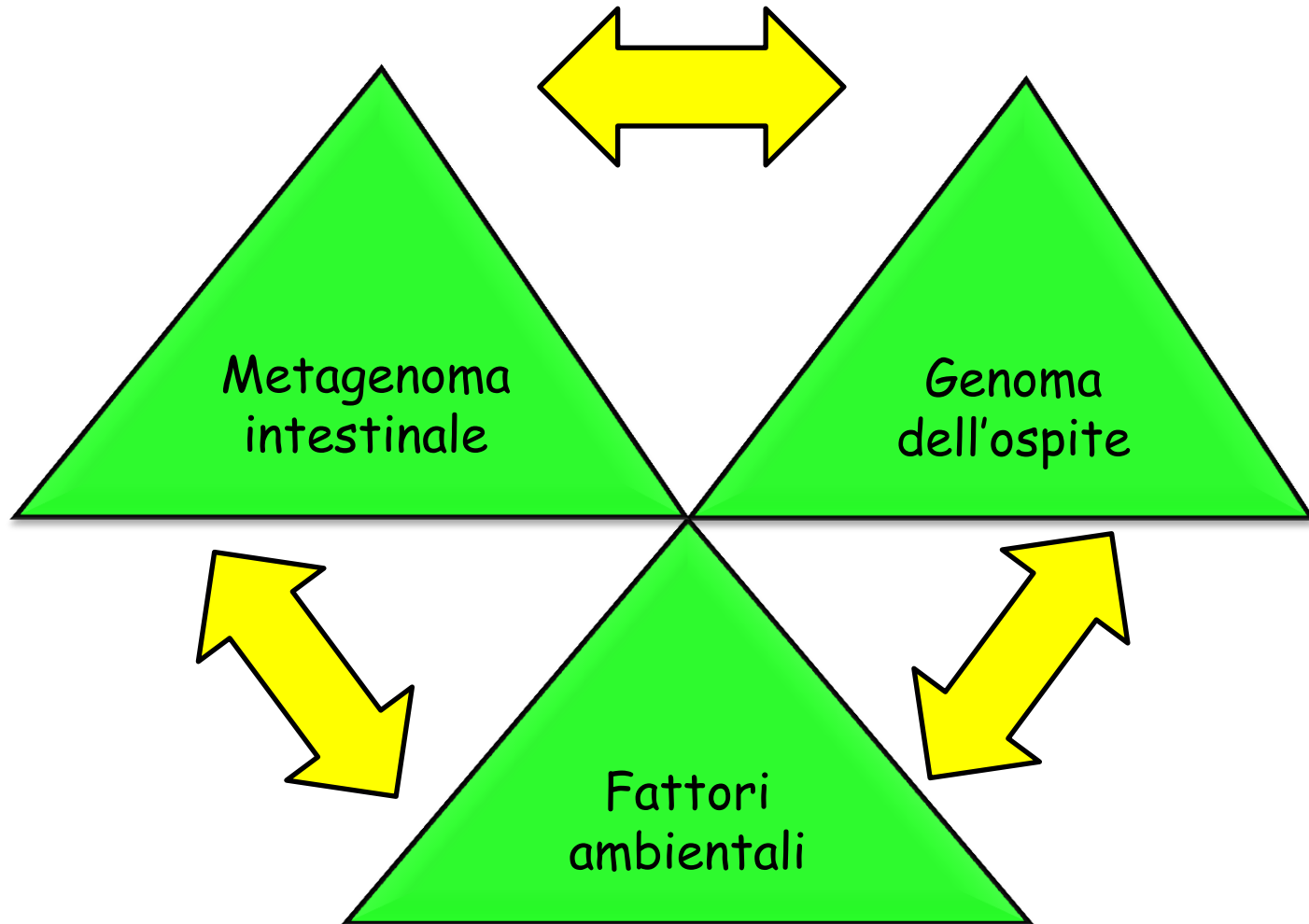
fattori ambientali

dieta

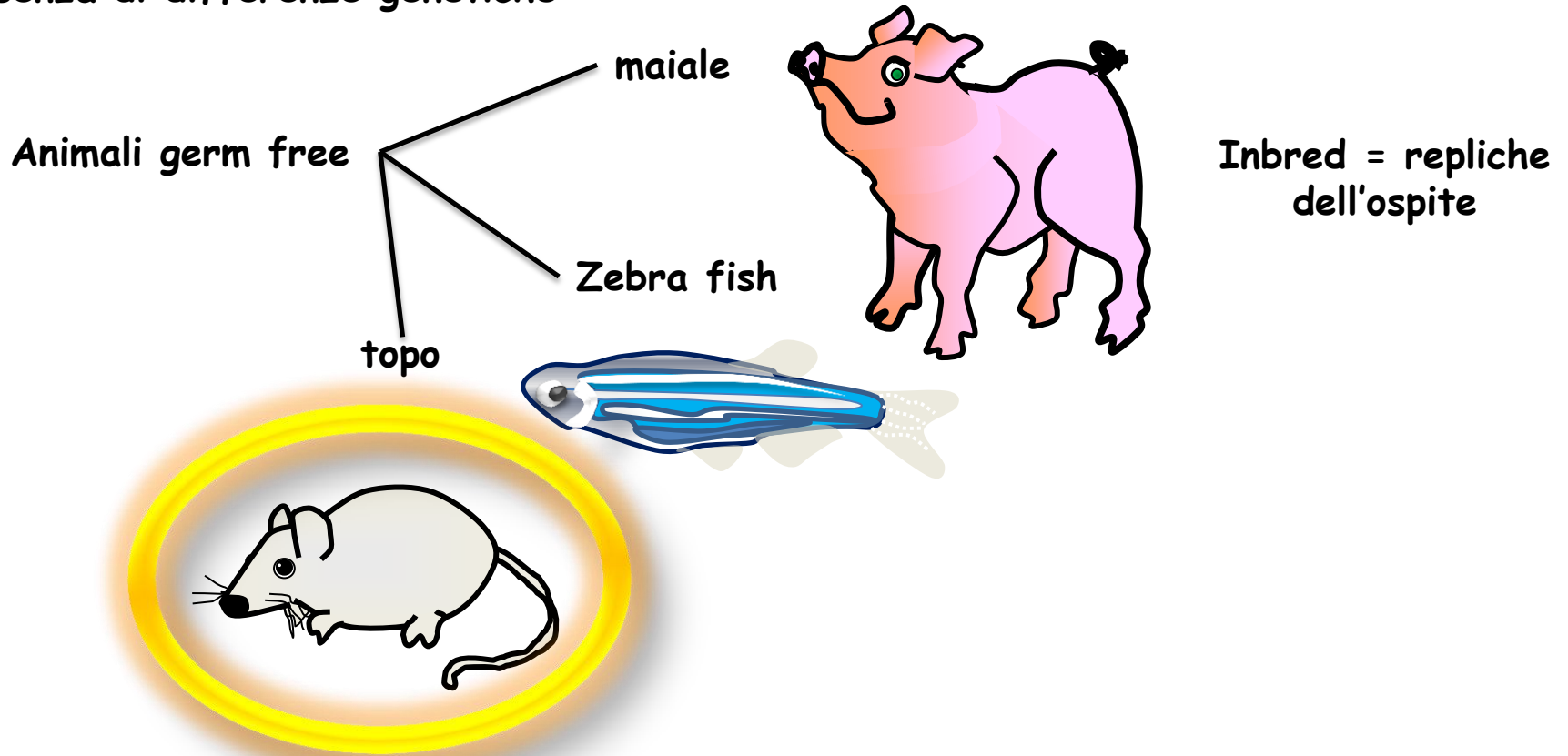
genotipo



Per capire l'influenza delle singole componenti, specialmente per determinare il peso del genoma dell'ospite, è necessario poter stimare il rumore di fondo delle altre variabili



Studio dell'ambiente: necessario per valutare i fattori che influenzano il microbiota in assenza di differenze genetiche

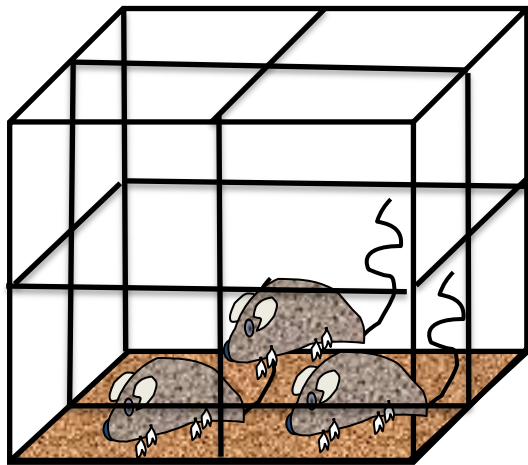


La composizione del microbiota intestinale murino, a livello di Phylum e ordine è la più simile a quella umana

è più facile standardizzare e controllare le condizioni di convivenza

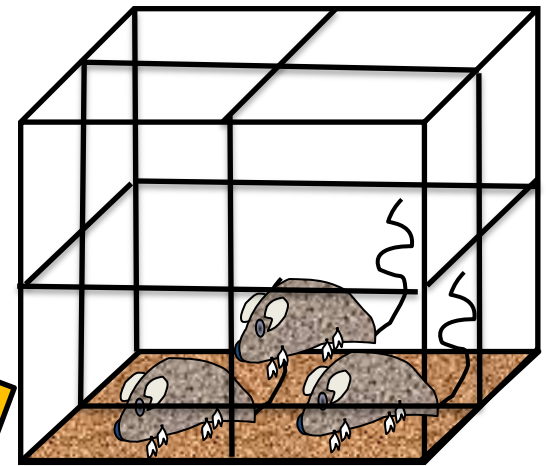
uno dei primi fattori che influenzano profondamente
il microbiota è l'ambiente materno

topi geneticamente
identici, stessa cucciolata

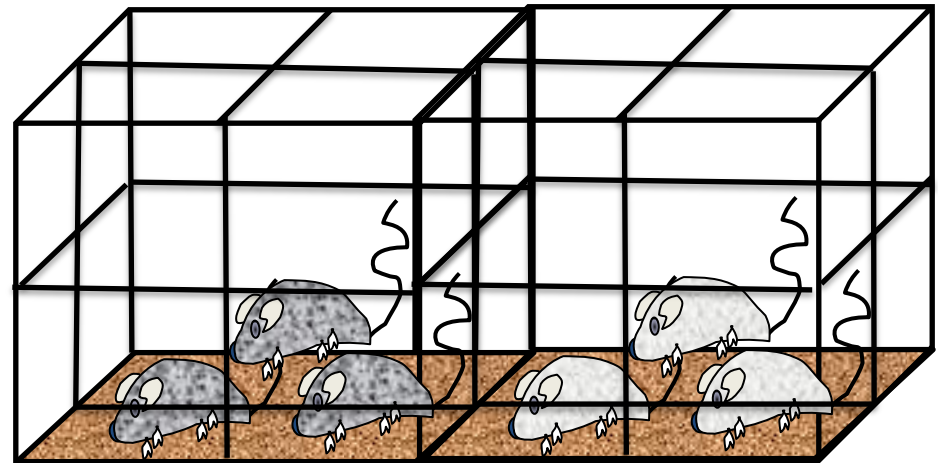


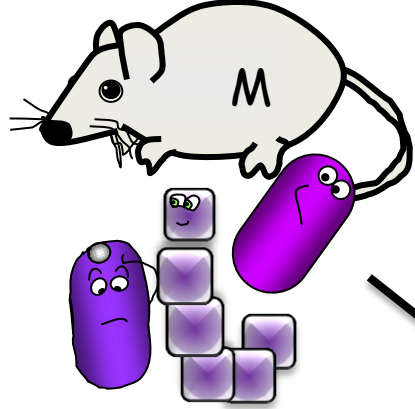
L'effetto materno si ha se i cuccioli
nascono per via vaginale: il microbiota
materno è il primo inoculo

Microbiota simile

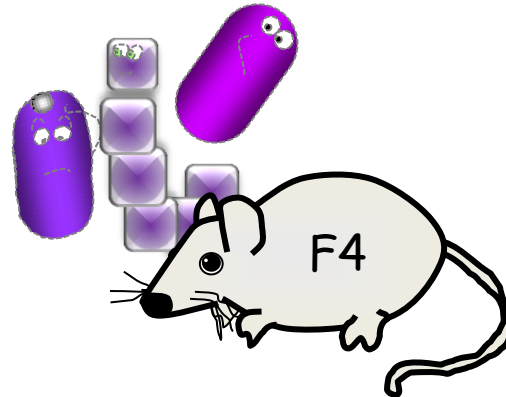
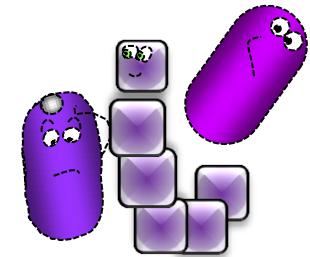
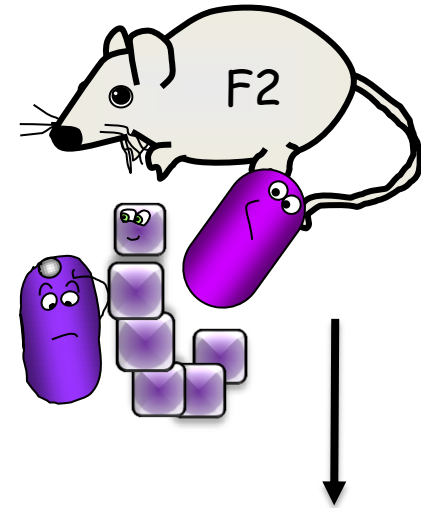
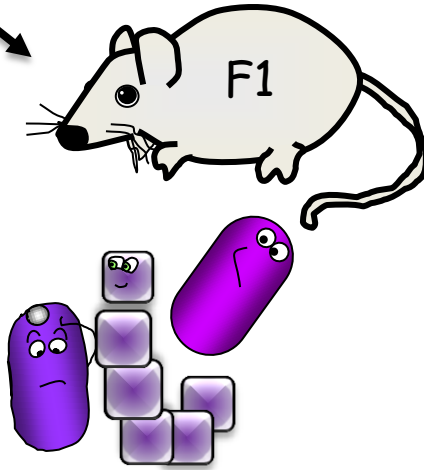


cucciolate diverse, allevati in gabbie
adiacenti minore somiglianza





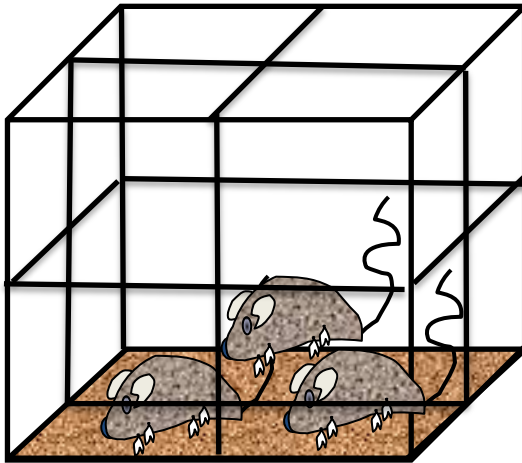
L'effetto materno può influenzare la diversità batterica per due - quattro generazioni



è il principale fattore di confusione per il confronto di gruppi di individui con differenti genotipi o allevati in condizioni diverse

anche se l'inoculo iniziale deriva dalla madre, differenze stocastiche nel processo di colonizzazione e sottili differenze ambientali interagiscono con il genotipo per determinare le variazioni tra individui diversi

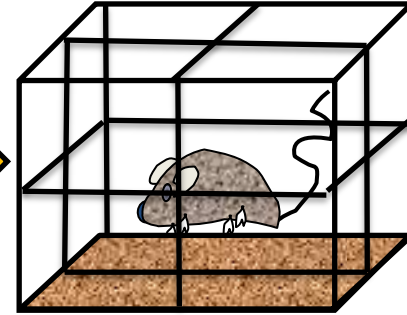
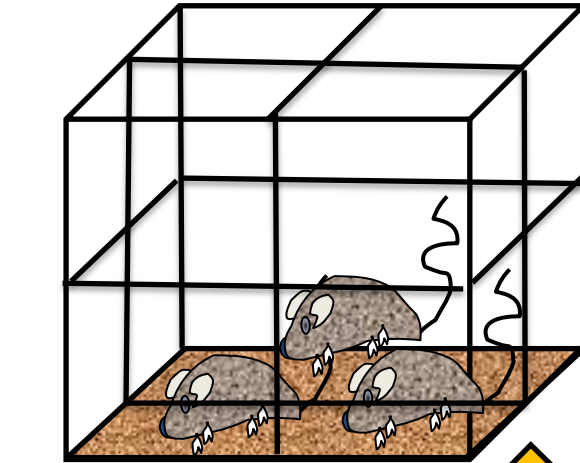
Topi isogenici, stessa gabbia



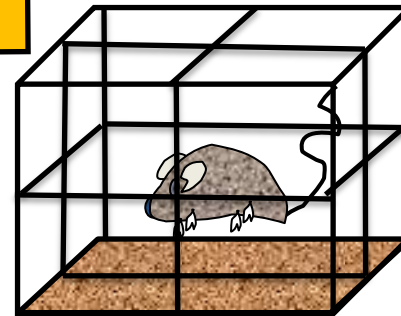
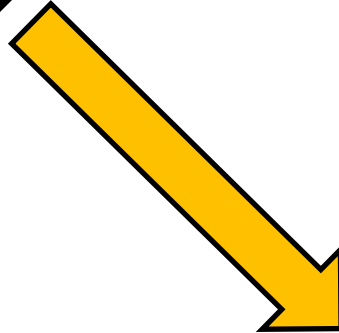
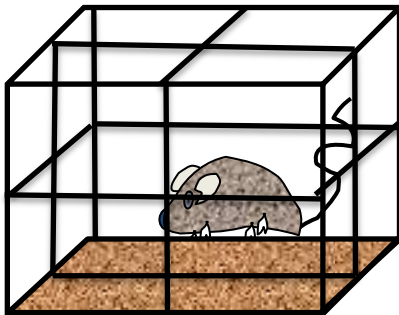
POCHISSIME DIFFERENZE

separati al momento dello
svezzamento

La diversità del microbiota aumenta



La divergenza è correlata
al genotipo



LA DIVERSITA' NEL MICROBIOTA E' FUNZIONE ANCHE DELL'ETA'

Microbiota infantile
(1-2 anni)

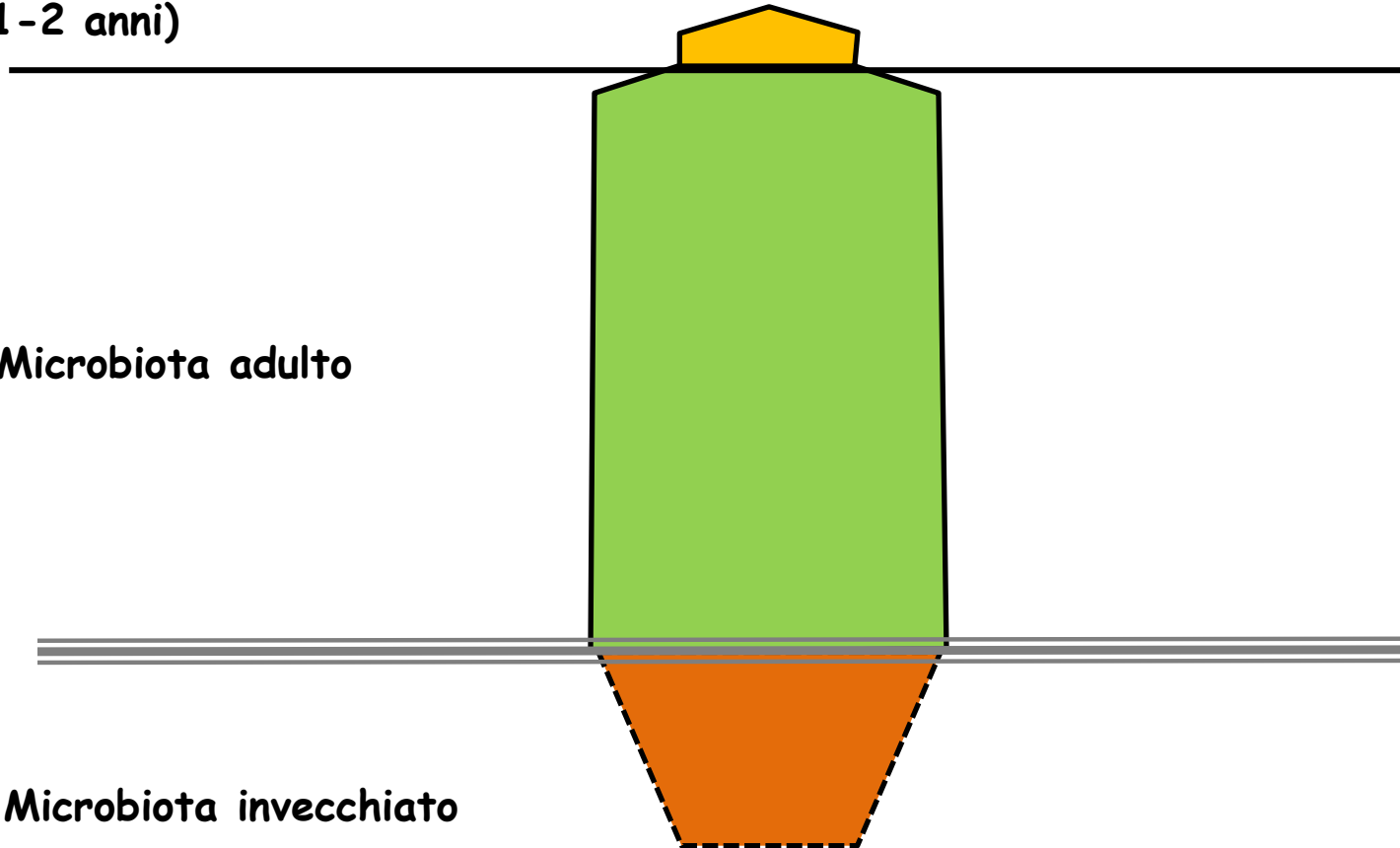
svezzamento

Microbiota adulto

Età soglia

Microbiota invecchiato

Diversità microbica

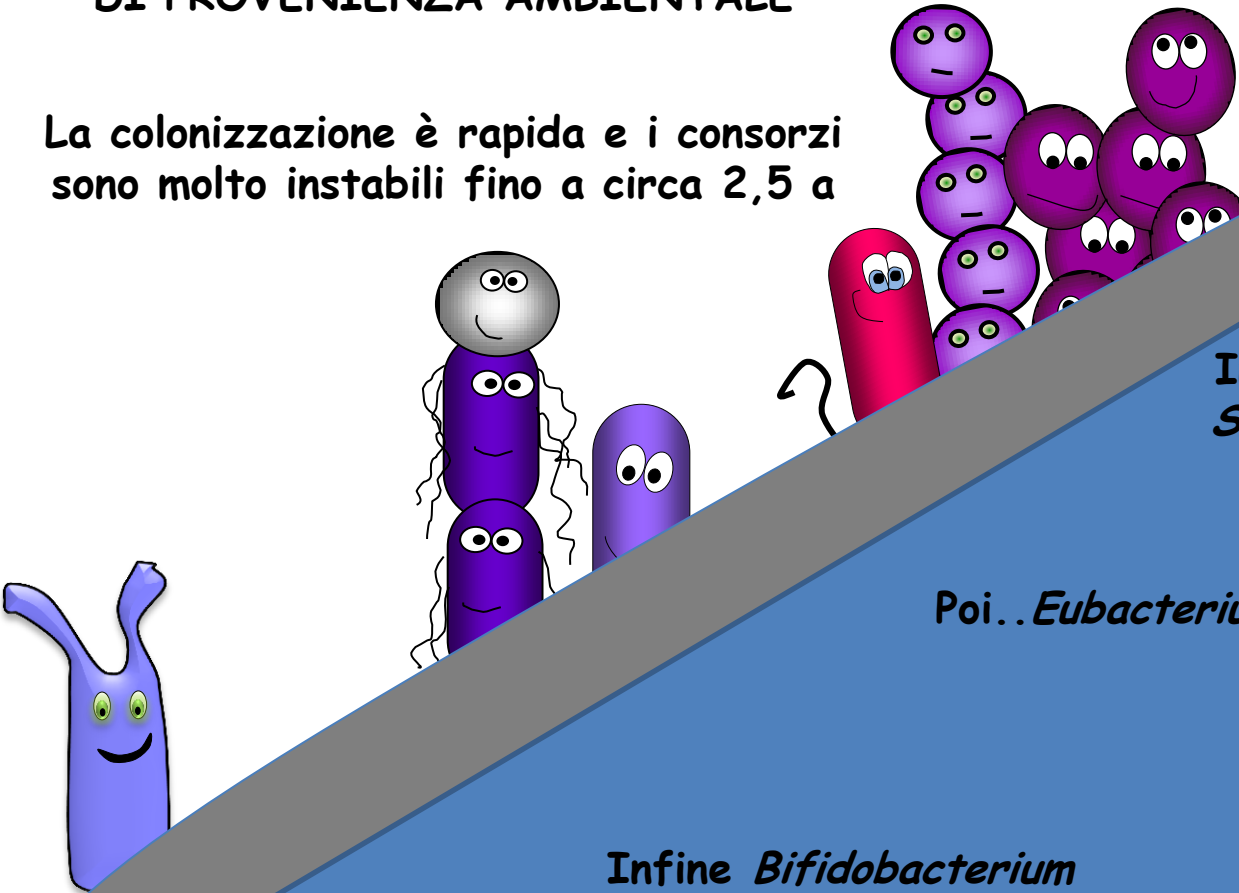
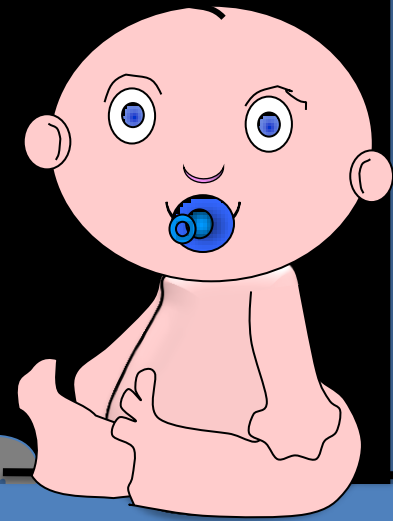


Microbiota infantile
Dieta liquida
SI intestinale in via di sviluppo

ALLA NASCITA L'INTESTINO E' STERILE

COLONIZZAZIONE = OPPORTUNISTI
DI PROVENIENZA AMBIENTALE

La colonizzazione è rapida e i consorzi
sono molto instabili fino a circa 2,5 a

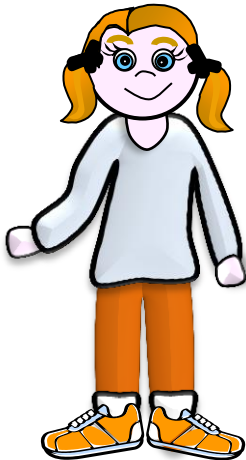


Inizialmente *Staphylococcus*,
Streptococcus, enterobatteri

Poi... *Eubacterium*, *Clostridium*

Infine *Bifidobacterium*
(specialmente se allattati al seno -90%)

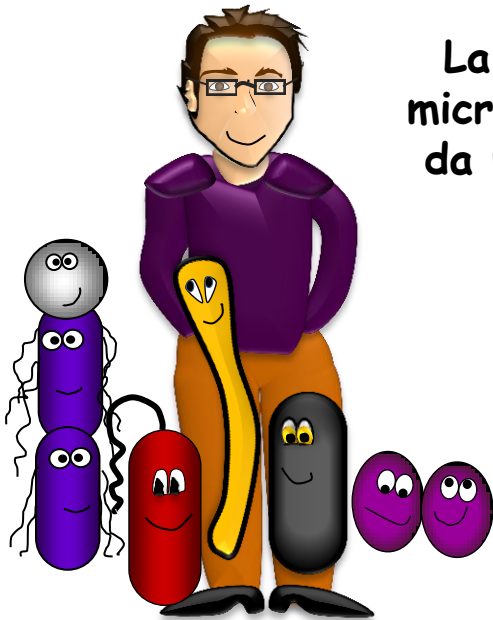
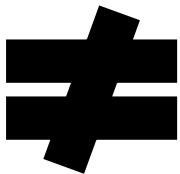
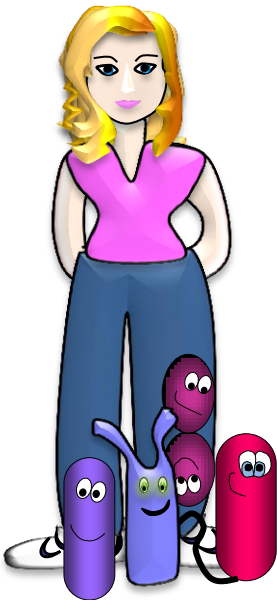
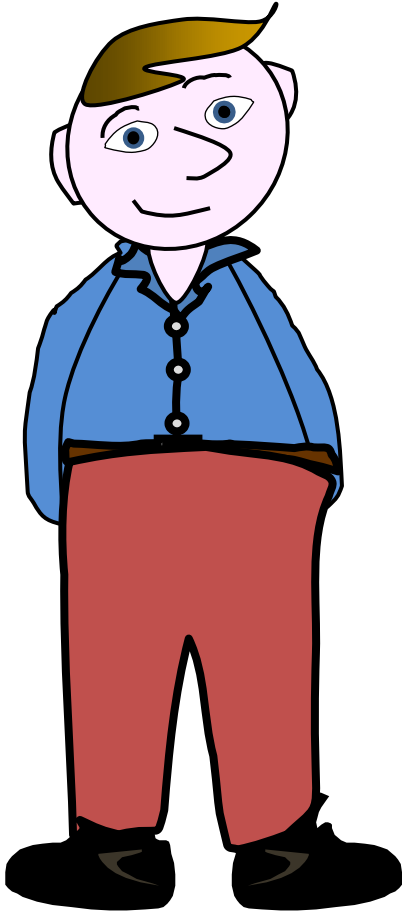
Microbiota adulto
Dieta solida
SI intestinale in equilibrio



Diversità e ricchezza raggiungono un livello più o meno stabile già nell'infanzia

La diversità è marcata ai livelli bassi (specie-ceppo)

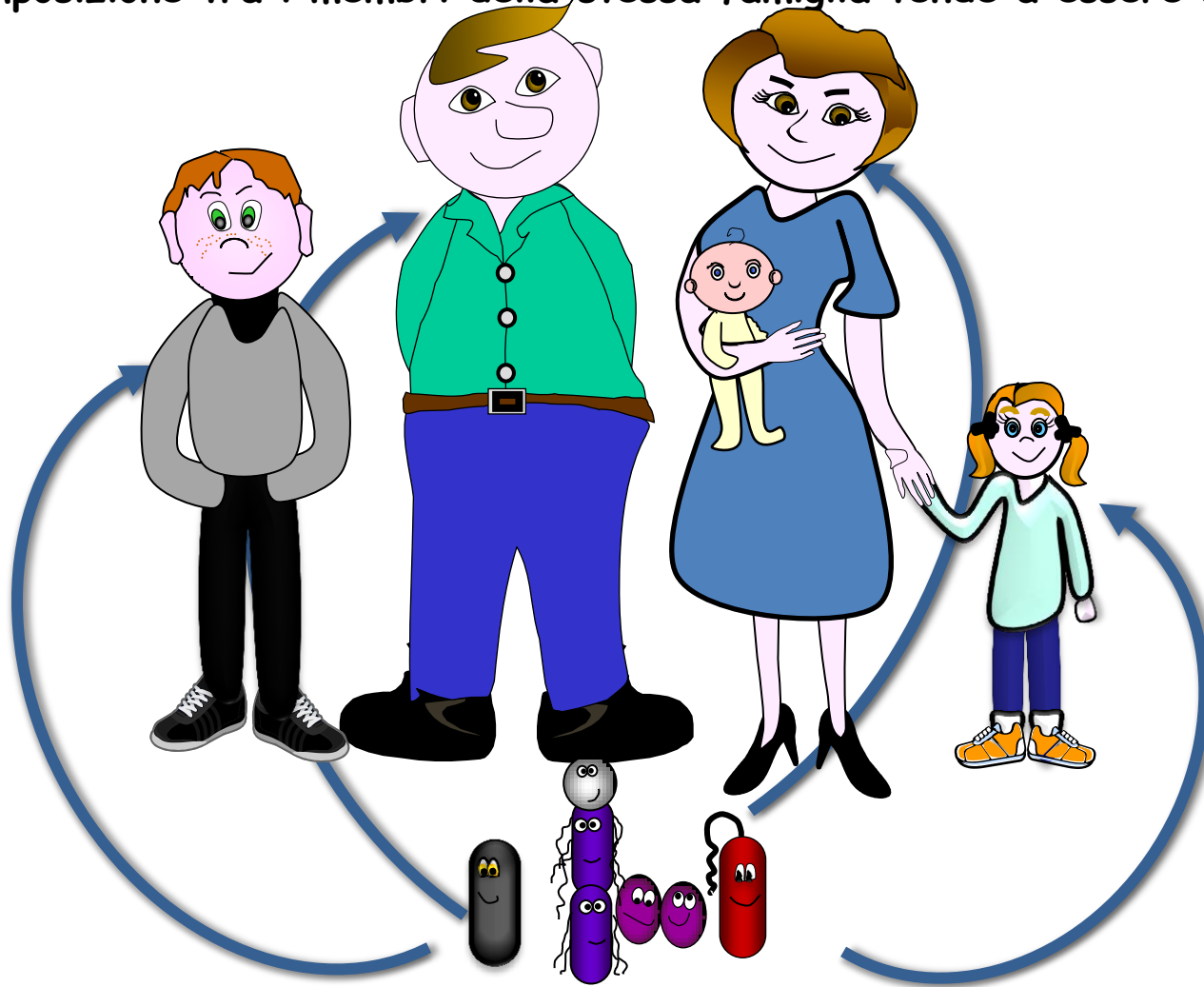
La composizione base ha una tendenza al mantenimento anche in presenza di stress



La composizione del microbiota adulto varia da persona a persona

Ma alla grande diversità a livello di specie e ceppi corrisponde un'elevata conservazione delle funzioni espresse e dei metaboliti prodotti (ridondanza funzionale)

Ma la composizione tra i membri della stessa famiglia tende a essere simile



Questo effetto è probabilmente dovuto a

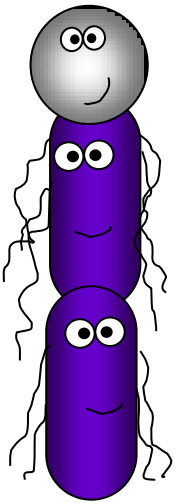
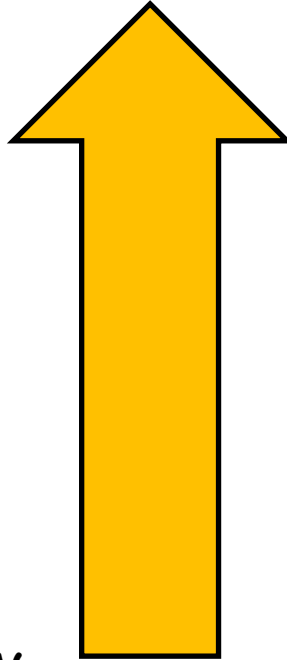
Ambiente comune

background genetico condiviso

Nell'età adulta la presenza delle
specie anaerobie è pronunciata ma

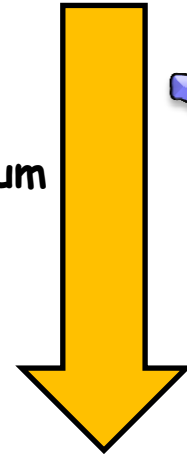


Bacteroidetes

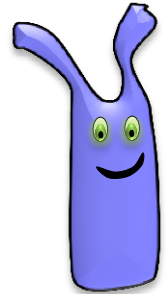


**Clostridium
cluster IV e XIVa**

Bifidobacterium



50 %



L'invecchiamento del microbiota ha inizio a un'età soglia, diversa da individuo a individuo

Che dipende da:

dieta

Paese di appartenenza

immunosenescenza

La diversità diminuisce, le popolazioni dominanti sono nuovamente

Staphylococcus,
Streptococcus,
Enterobacteriaceae

anaerobi bacteroidetes
Clostridium Cluster IV e XIVa

Nel microbiota invecchiato, come in quello adulto la percentuale di *Bifidobacterium* è bassa



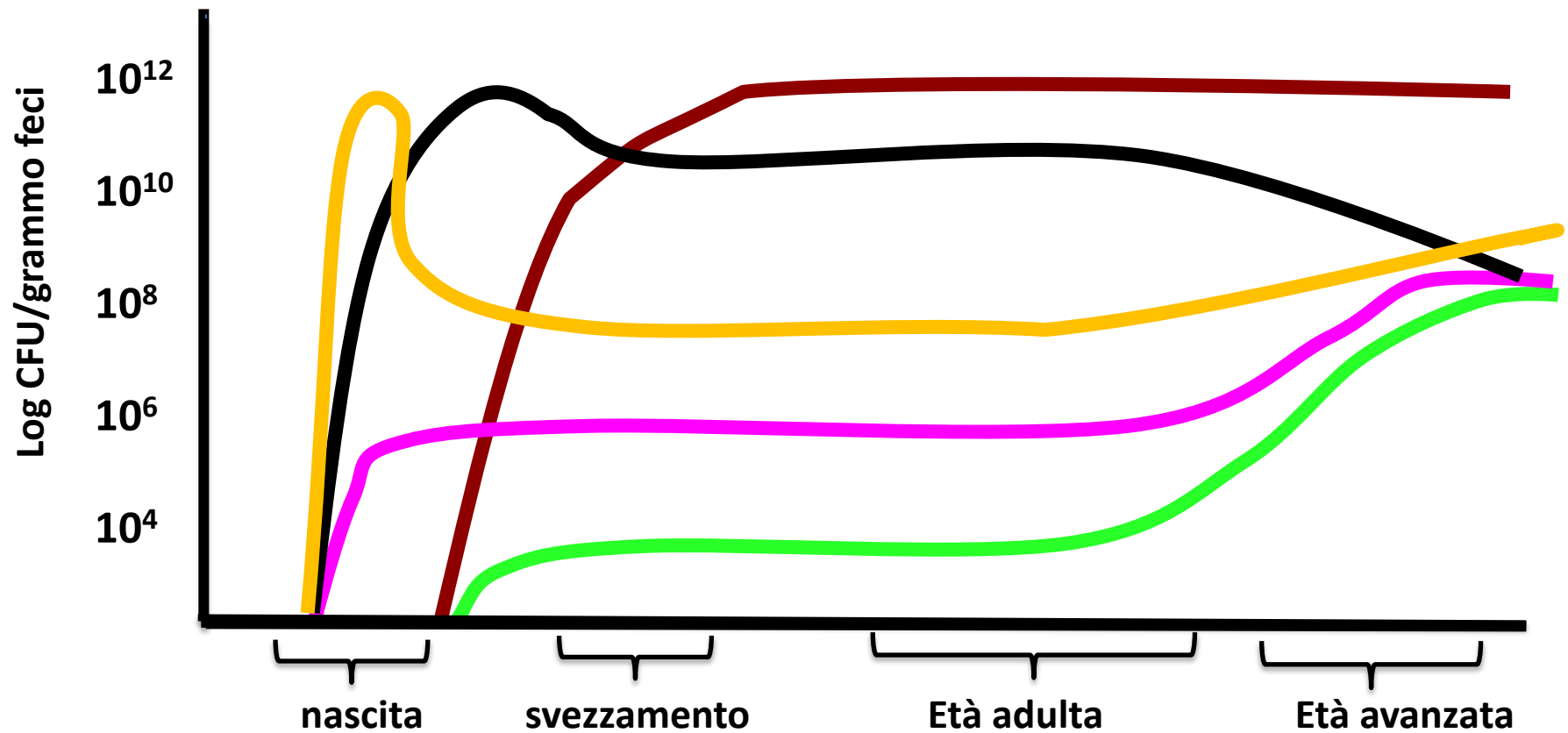
Bacteroides, Eubacterium, streptococchi anaerobi

Lattobacillaceae

Coliformi /enterococchi

Bifidobacterium

Clostridiales

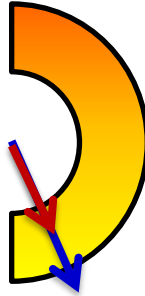


Oltre che sulla **ricchezza in specie**, l'età e le condizioni di vita hanno un effetto anche sulla **stabilità** del microbiota

Stereotipo umano "occidentale"

ETÀ NEONATALE

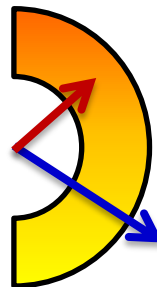
(assetto genetico
Tipo di parto
Tipo di allattamento)



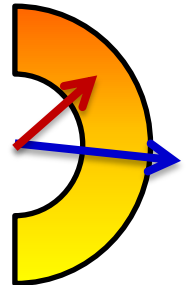
PRIMA INFANZIA
(si sviluppa il sistema immunitario,
Malattie infantili,
Febbre, tipo di nutrizione,
Antibiotici nell'ambiente)



INFANZIA
(socializzazione,
Crescita corporea,
Antibiotici nell'ambiente)



ADOLESCENZA
(pubertà
Attività sessuale,
Uso di droghe
fumo)



PRIMA ETÀ ADULTA

(spostamenti frequenti

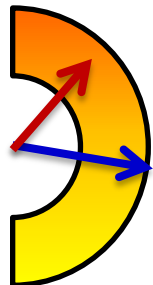
Cambi di partner

Cambi di casa

Viaggi

Sperimentazione
alimentare

Livello di fitness)



ETÀ ADULTA

(coabitazione stabile

Aumento di peso

Gravidanze

Routine prevedibili

Viaggi

traslochi)



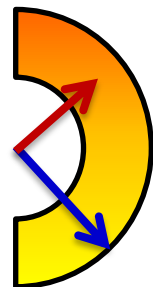
PENSIONAMENTO

(invecchiamento

Menopausa

Uso di farmaci

malattie)



VECCHIAIA

(età avanzata

Mobilità limitata

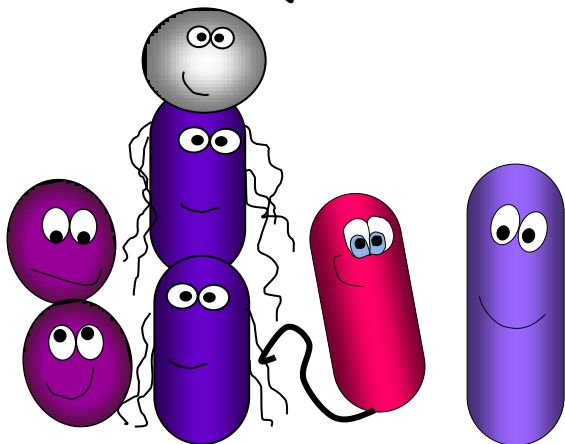
Riduzione delle attività

Cambiamento delle abitudini alimentari)

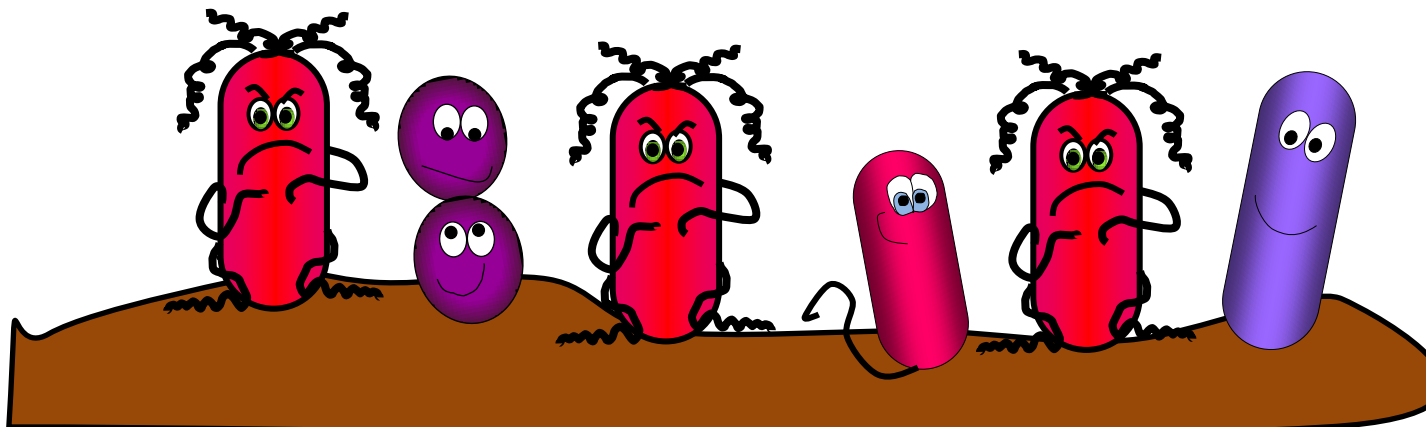


in alcuni periodi quindi, si è più esposti

ad alterazioni rapide del microbiota
(bassa stabilità)



alla colonizzazione da parte di batteri avventizi
(bassa ricchezza → minore esclusione di nicchia)



Nella prima infanzia, quando il microbiota è ancora instabile

Il rischio di alcune malattie legate a una colonizzazione da parte di patogeni è più elevata

BOTULISMO INFANTILE

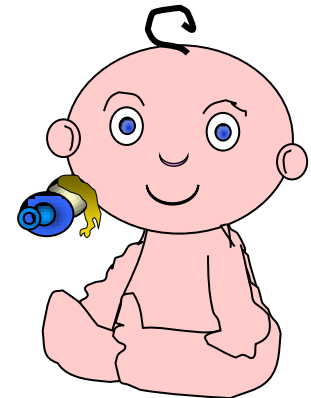
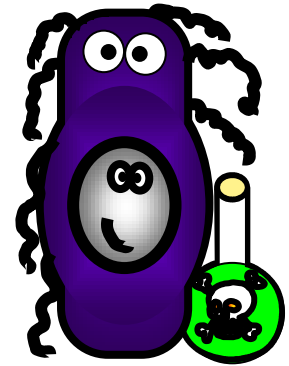
C. botulinum, introdotto con gli alimenti, colonizza l'intestino



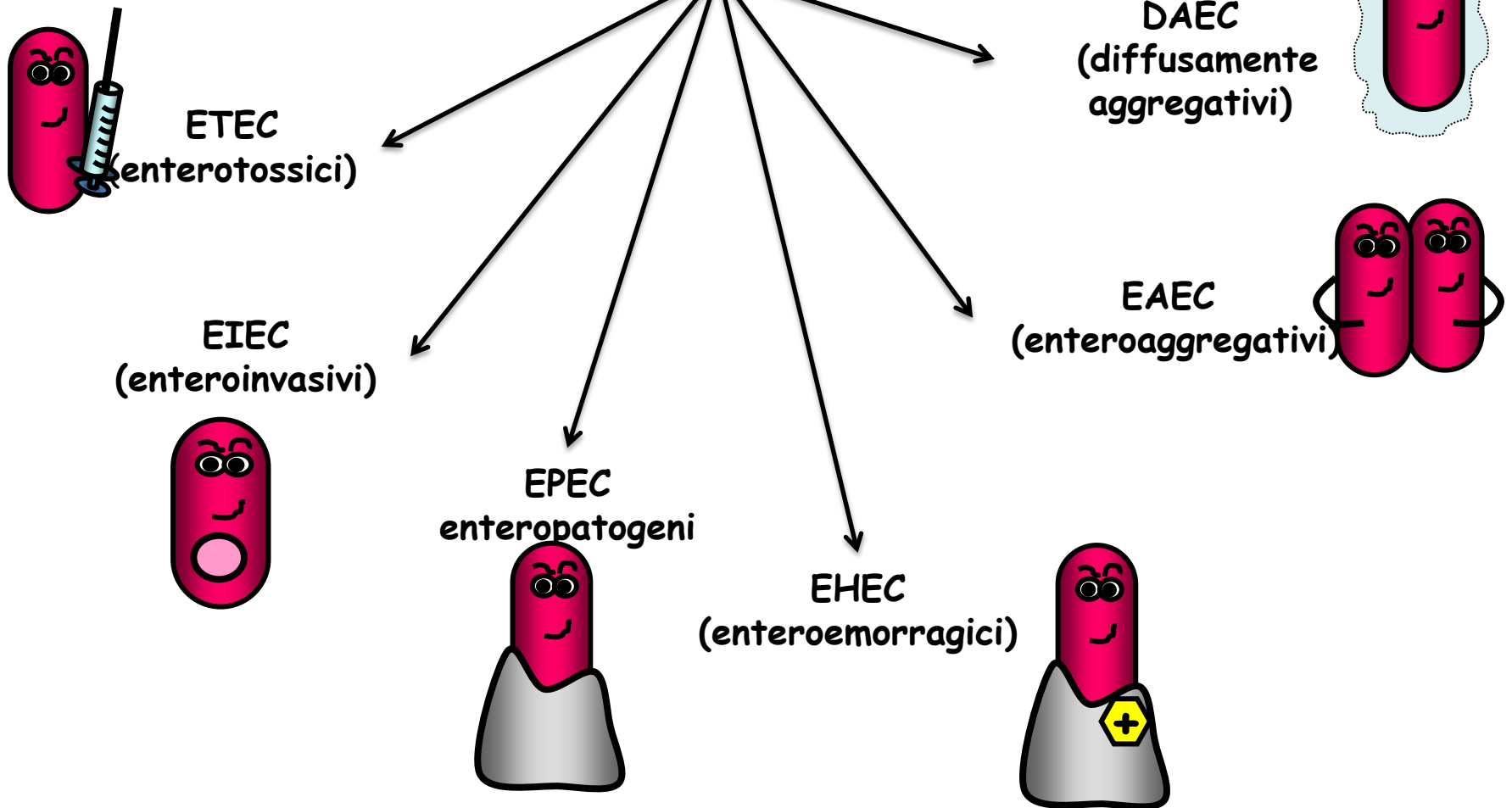
rilascia regolarmente piccole quantità di tossina



Che sono assorbite dall'intestino



virotipi di *E. coli*



Anche in questo caso i bambini sono i più colpiti e la malnutrizione ha una notevole importanza

Uno degli altri fattori da prendere in considerazione è la dieta

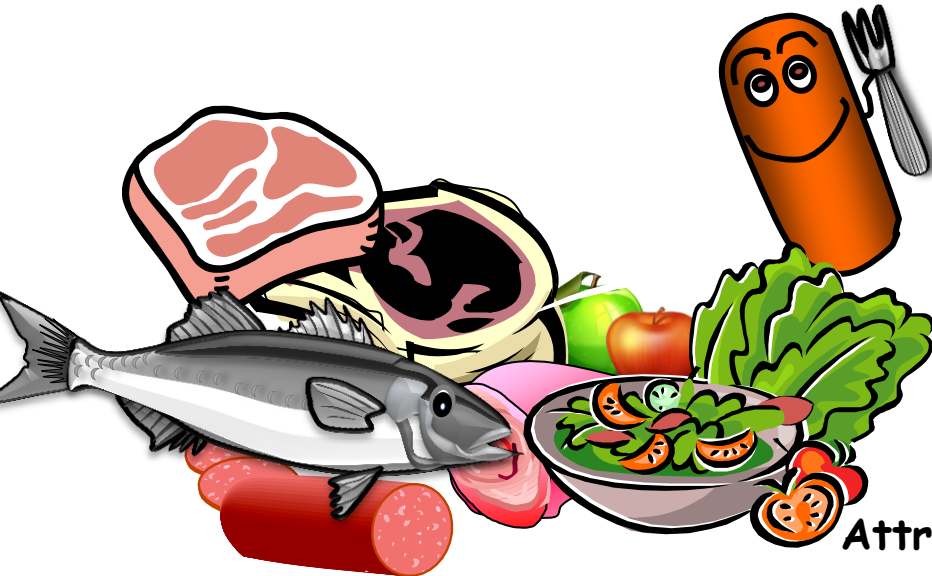
Si stima che solo il 25% delle malattie colorettrali abbia una base genetica evidente

Questo suggerisce che la dieta giochi un ruolo importante attraverso la modulazione del microbiota

Anche se i gruppi più rappresentati sono riconoscibili a livello di Phylum o di ordine

La ricchezza di specie o anche di ceppi dotati di capacità metaboliche diverse è ampia

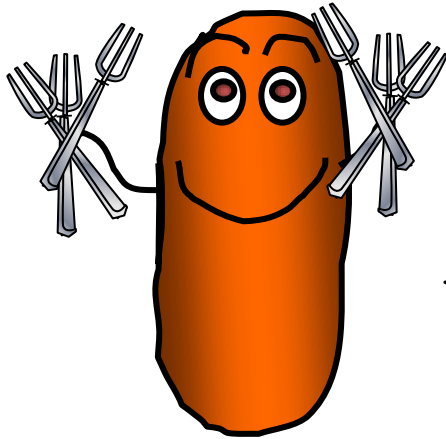
I microrganismi sono in grado di sfruttare substrati diversi



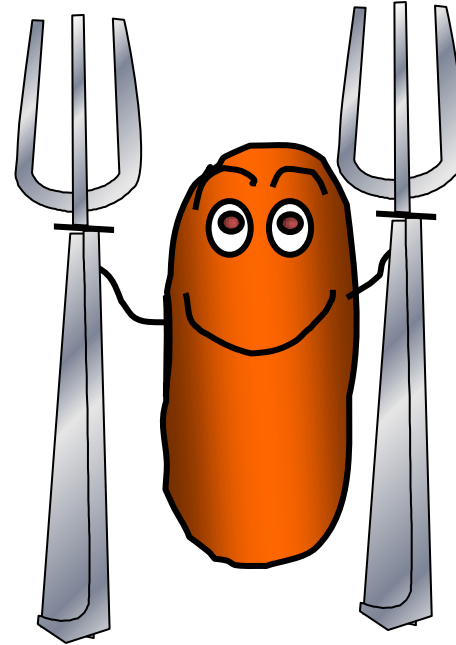
Attraverso l'espressione di geni che sono, in genere, regolati positivamente

La presenza di una maggiore quantità di un substrato o di un altro

Influenza la crescita relativa di specie, o anche di ceppi, più idonei a sfruttare al meglio i nutrienti disponibili



**+ versatilità
nutrizionale**



+ efficienza

lo stesso substrato può essere processato in modo diverso a seconda della quantità e della regolarità con cui viene fornito, dalla fisiologia e dall'ambiente in cui i microrganismi si trovano

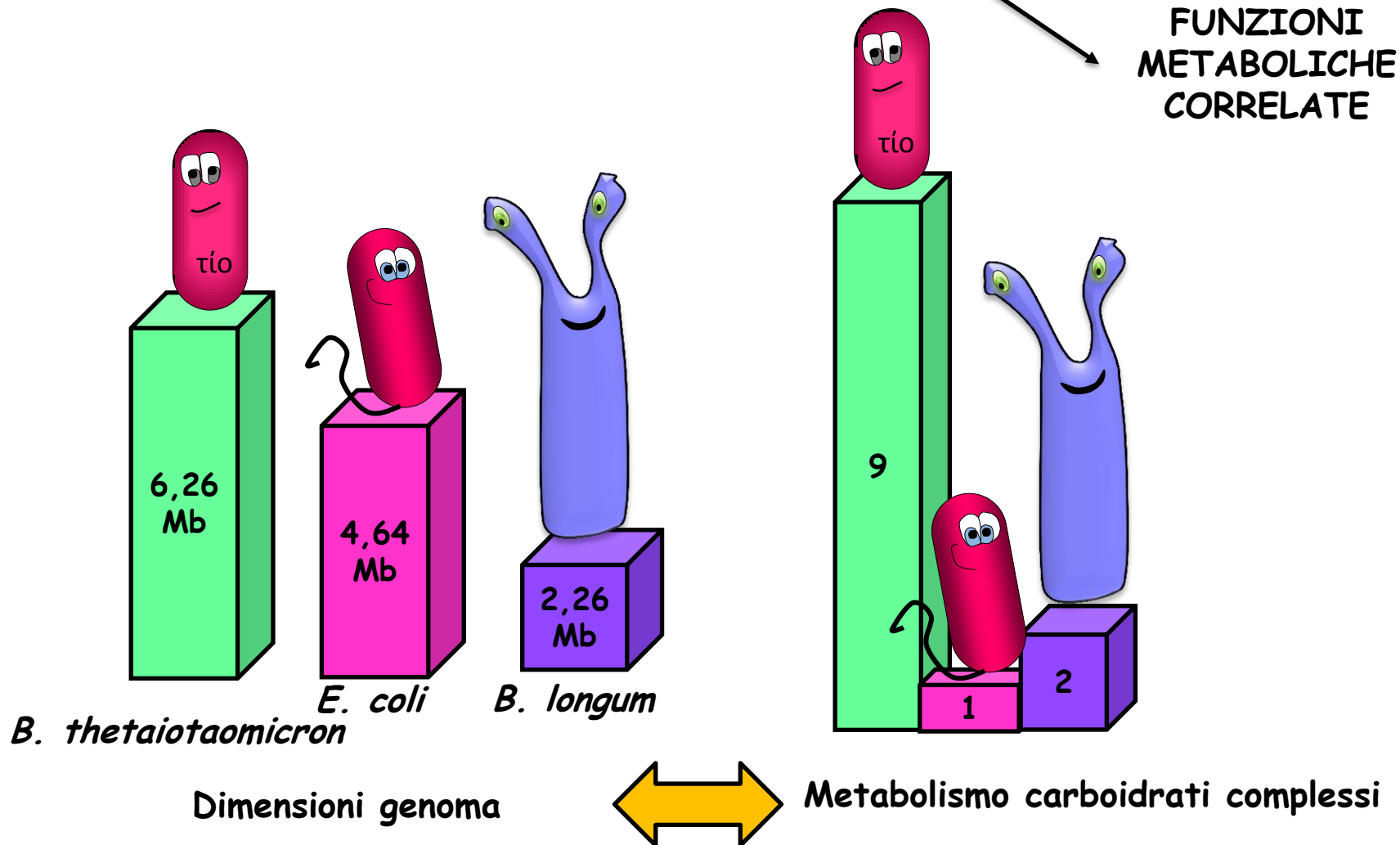
Substrati alternativi danno origine a differenti prodotti come risultato delle diverse vie di fermentazione

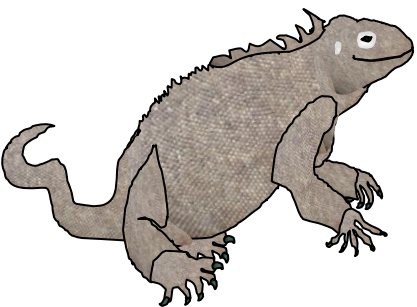
Le analisi del genoma dimostrano la dipendenza dei commensali dai carboidrati complessi

In *Bifidobacterium longum* e *Bacteroides thetaiotaomicron* almeno l'8% del genoma serve a

TRASPORTO DI
CARBOIDRATI

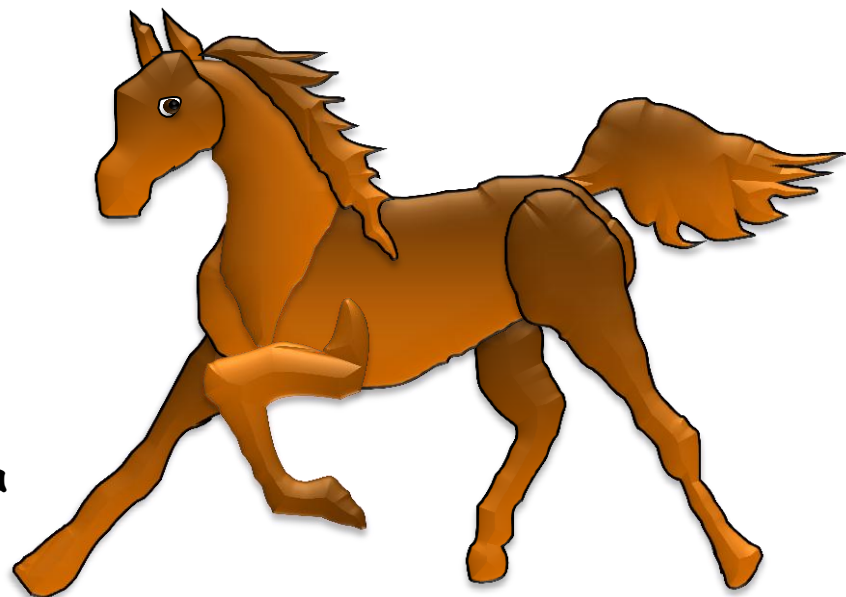
FUNZIONI
METABOLICHE
CORRELATE





In alcune specie animali
(es. cavallo, iguana)

L'inoculo corretto del microbiota in rapporto
alla dieta è assicurato attraverso la coprofagia
praticata dai piccoli



Un caso particolare è quello del Koala

I baby koala sono allattati per 6-7 mesi.
Verso il 4° mese, ingerisce anche il "pap" ,
una forma specializzata di feci materne

Il pap fornisce il microbiota necessario per sopravvivere al
passaggio alla dieta di foglie di eucalipto



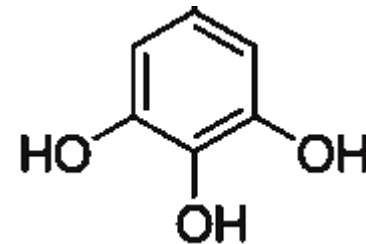
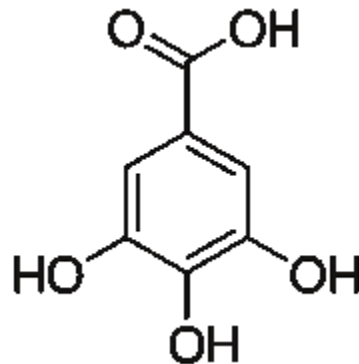
I koala mangiano solo foglie di eucalipto ricche di sostanze indigeribili e di sostanze tossiche (terpeni e fenoli)

I tannini (polifenoli) si complessano con le proteine (T-PC) rendendole insolubili

Per poter recuperare l'azoto e assorbirlo attraverso il ceco, è necessario che i T-PC siano degradati da batteri (T-PCD)

Streptococcus gallolyticus

Lonepinella koalarum
(*Pasteurellaceae*)



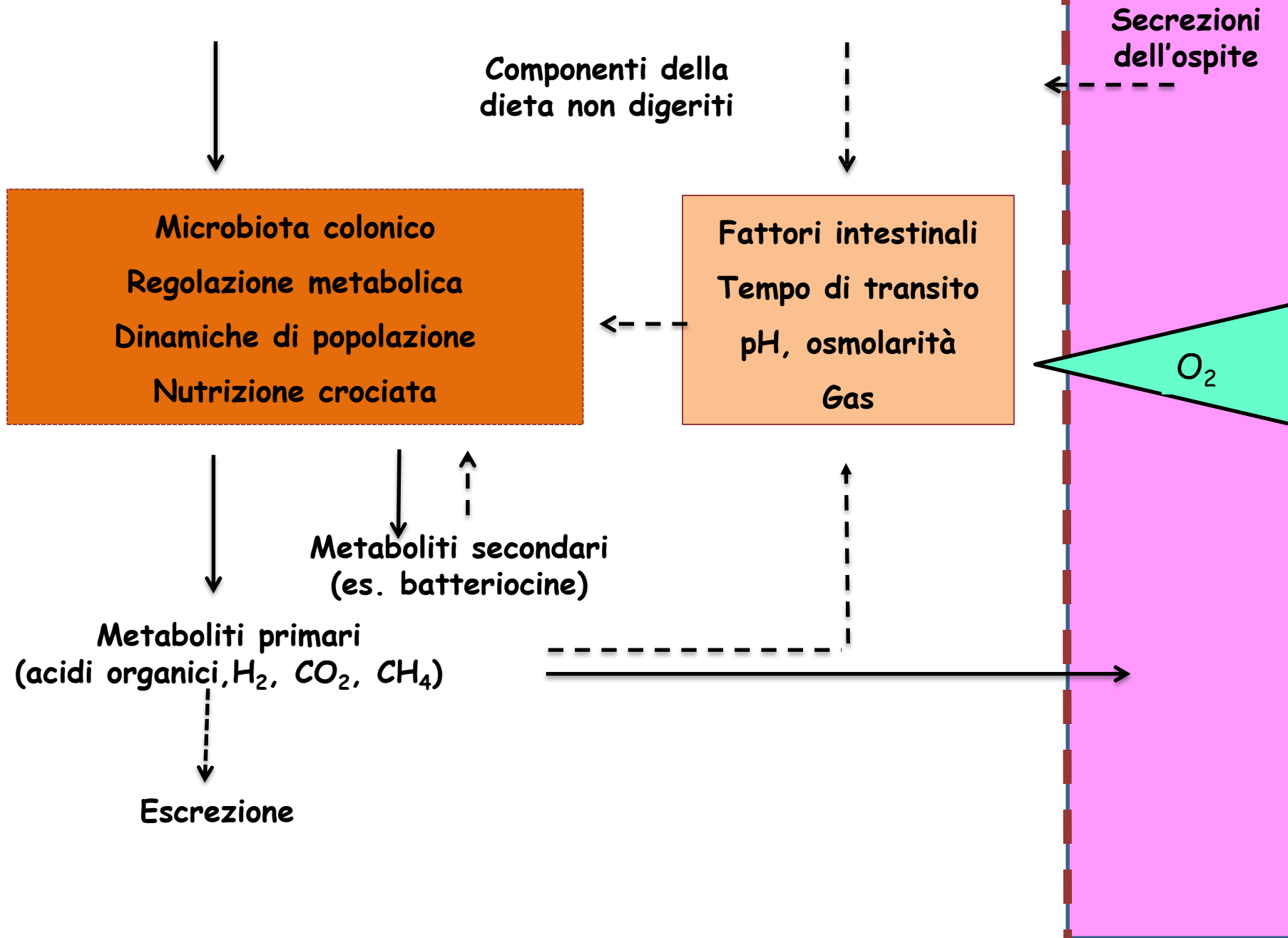
+ CO₂

tannini →

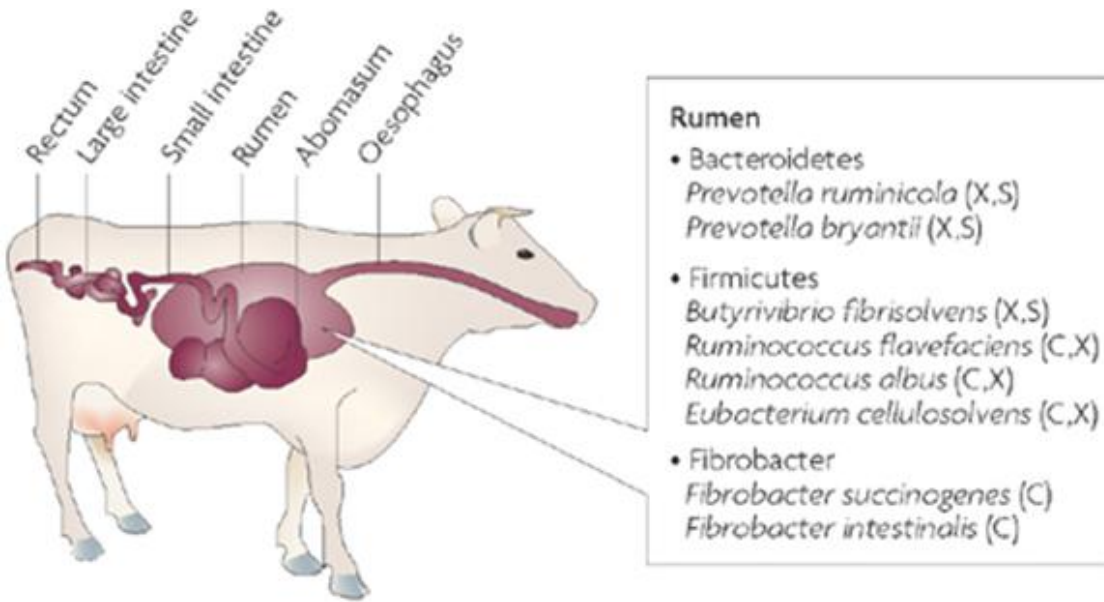
acido gallico →

pirogallolo

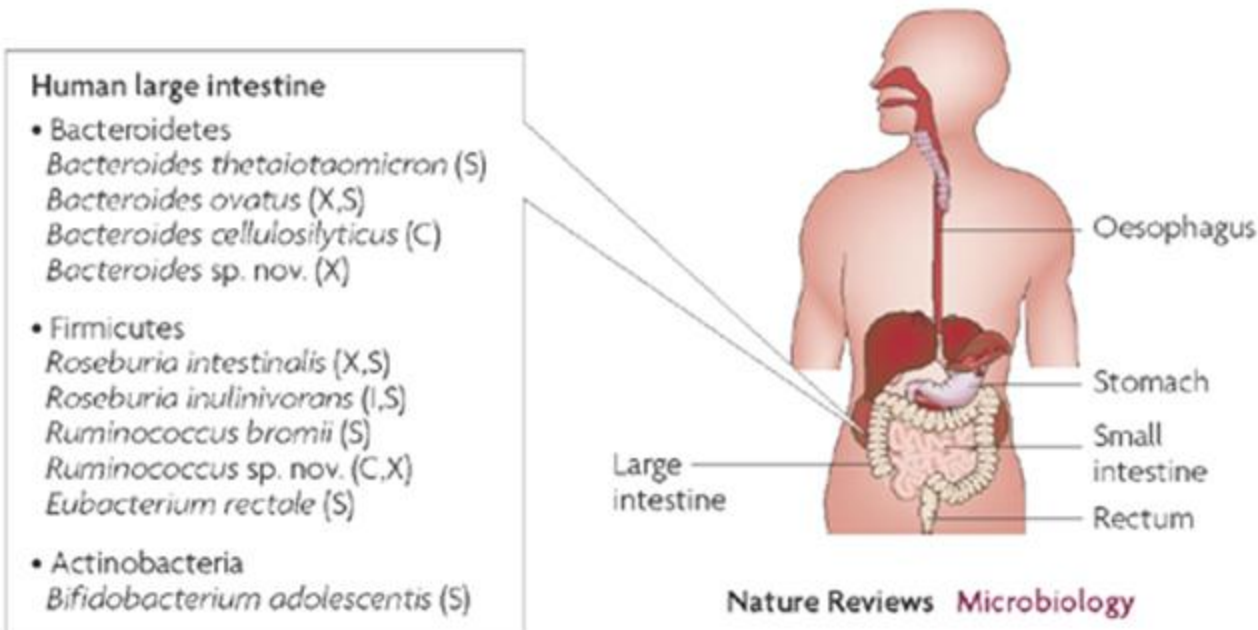
Fattori che influenzano la digestione intestinale e l'equilibrio del microbiota



I degradatori primari sono relativamente pochi



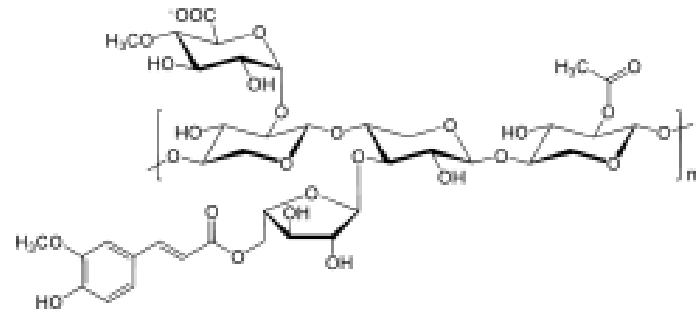
***Roseburia*: Firmicutes, Cluster XIVa Clostridiales**



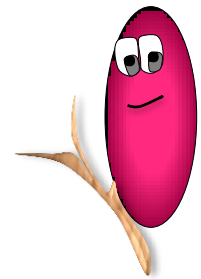
C: cellulosa
S: amido
X: xilano

XILANI

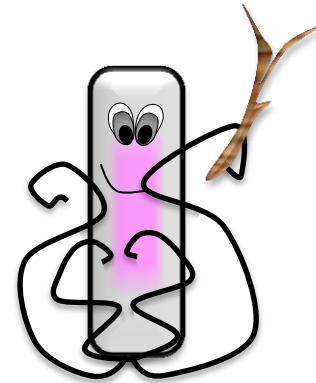
Solo alcuni batteri del colon umano
possono utilizzare gli xilani



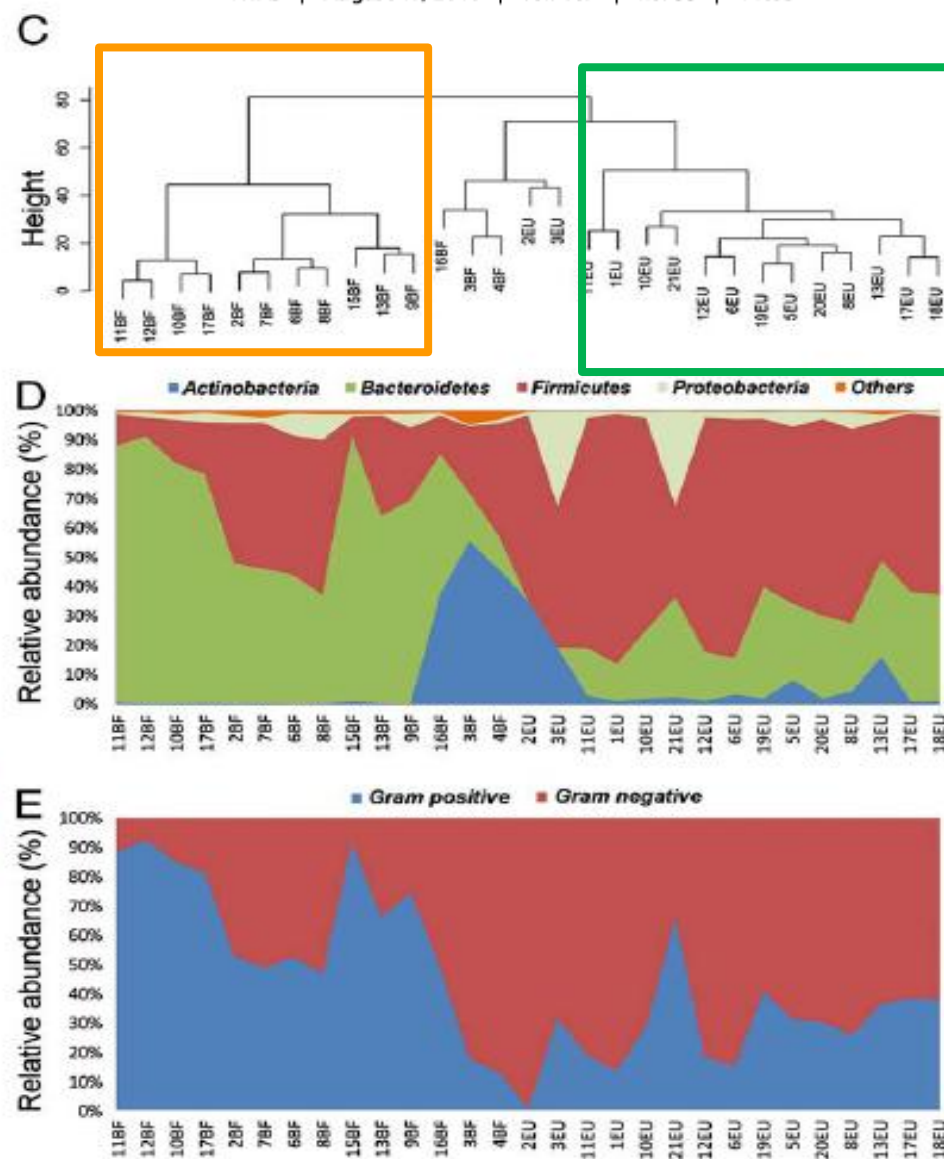
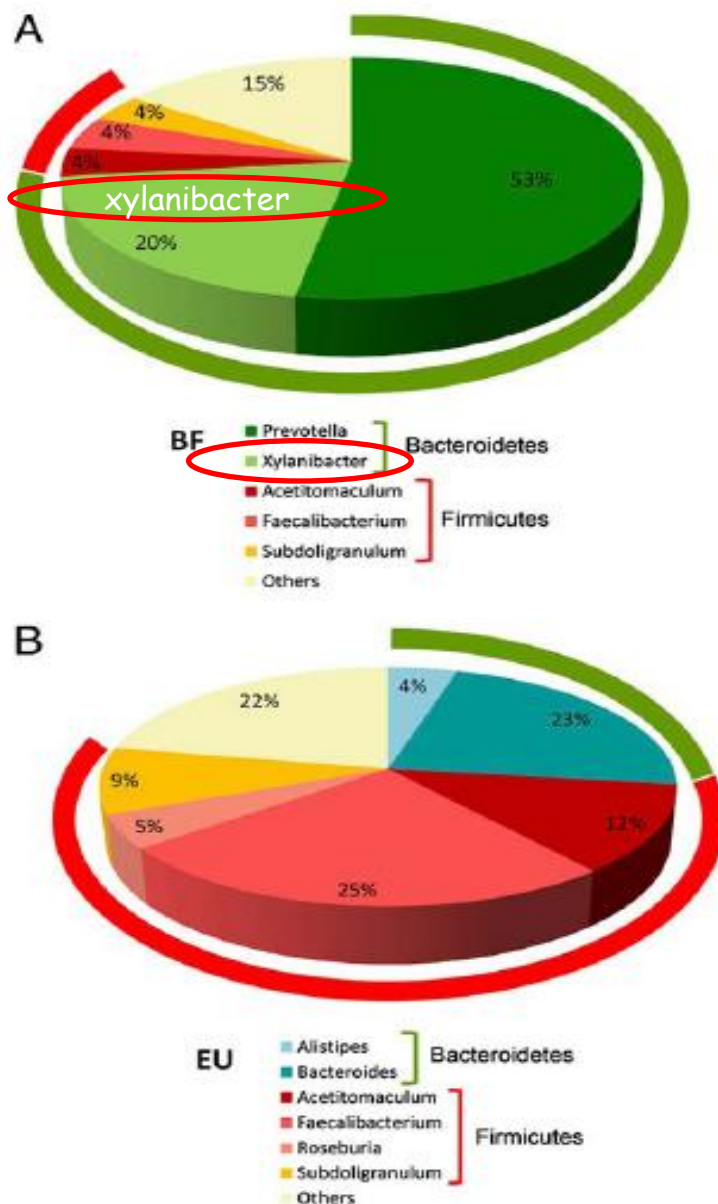
Bacteroides ovatus, ha un operone per l'utilizzo dello xilano
simile a quello trovato in *Prevotella bryantii* (rumine)



B. thetaiotaomicron
non lo possiede



Tra i monodermi, *Roseburia intestinalis* è in grado
di degradare gli xilani

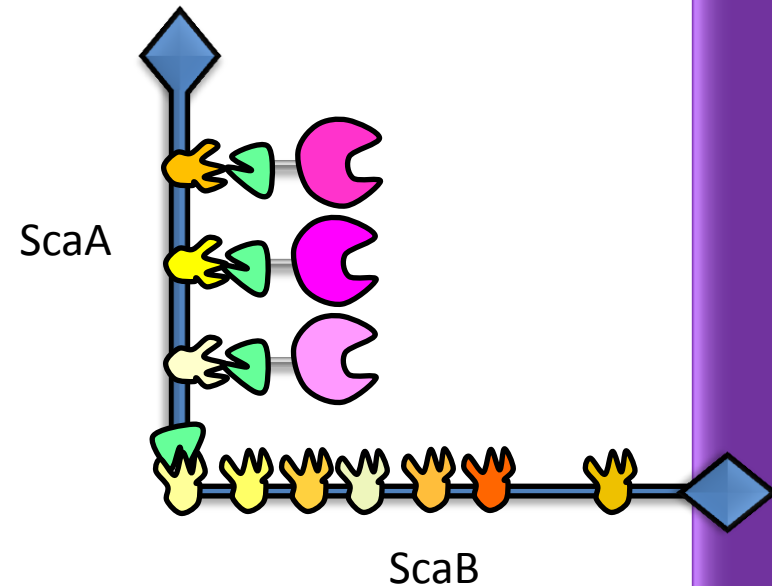


Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa

Carlotta De Filippo^a, Duccio Cavalieri^a, Monica Di Paola^b, Matteo Ramazzotti^c, Jean Baptiste Poulet^d, Sebastien Massart^d, Silvia Collini^b, Giuseppe Pieraccini^e, and Paolo Lionetti^{b,1}

Le specie cellulosolitiche come *Ruminococcus* (*monoderma*, *Cluster XIVa*) *Fibrobacter* (*Diderma Fibrobacteres/Acidobacteria*) si attaccano al substrato
Altri batteri usano poi i polimeri solubili forniti dai degradatori primari

Ruminococcus impiega un sistema di coesine e dockerine di superficie, che permettono a idrolasi di specificità diversa di trovarsi in rapporti di vicinanza spaziale stretta

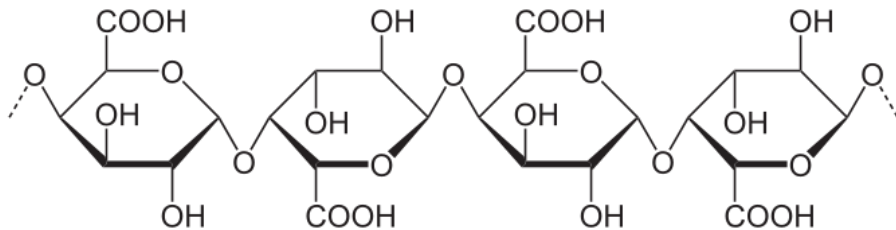


F. succinogenes non codifica dockerine ma ha un involucro cellulare molto flessibile che permette di superare i problemi sterici presentati dalla fibra di cellulosa, anche se le idrolasi si legano direttamente alla superficie senza legarsi tra loro

EMICELLULOSE E PECTINE

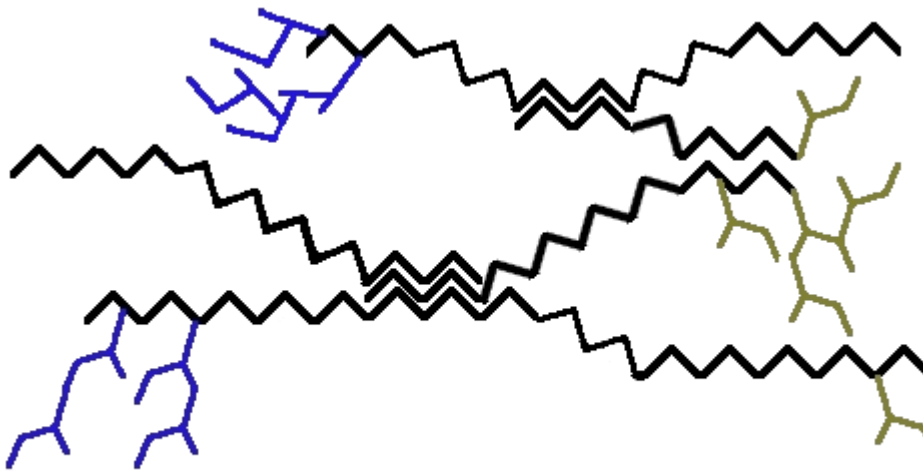
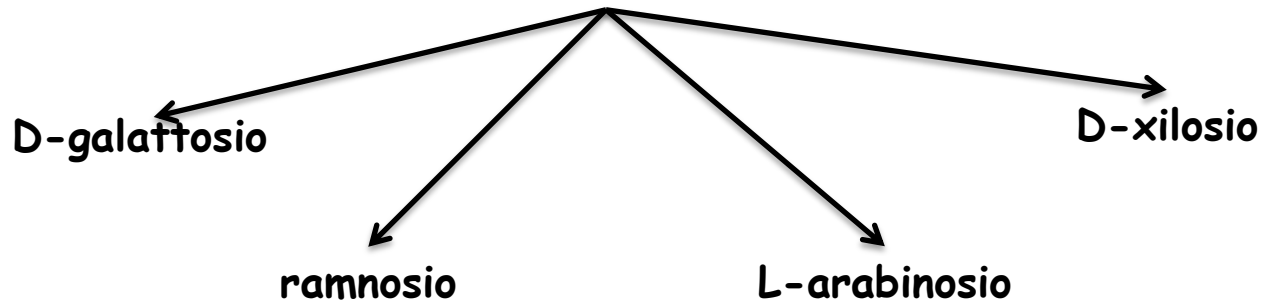
presenti nella matrice della parete cellulare vegetale, sono rese disponibili ai batteri intestinali, in forma solubile, dall'azione dei degradatori primari

La pectina è il componente principale delle pareti cellulari delle piante e dei frutti



pectina liscia: catena di residui di acido galatturonico che possono essere parzialmente esterificati con metanolo

Lungo la catena sono intercalati residui di ramnosio su cui
si innestano catene laterali che possono contenere



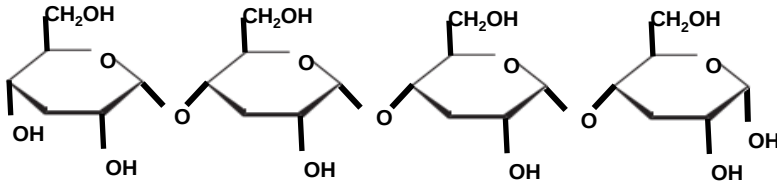
Le regioni in cui si addensano le catene
laterali sono dette pelose (hairy)

il tasso di fermentazione dipende dal grado di
ramificazione e di metilazione del polimero di base

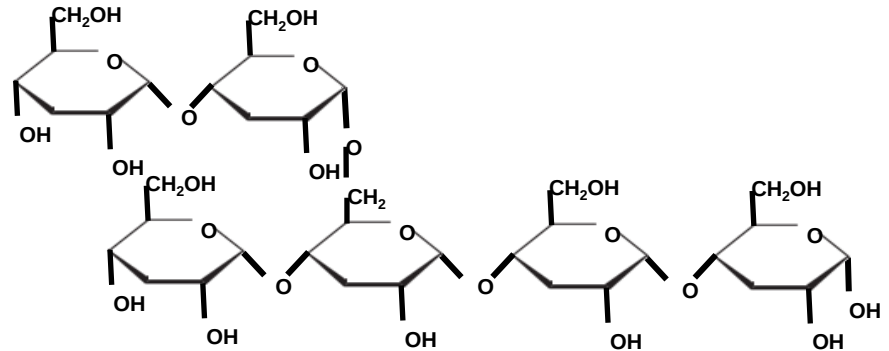
un inoculo totale fecale umano degrada completamente la pectina
in una coltura in batch entro 24 h di incubazione

Un'importante fonte di substrato fermentabile nel colon è l'amido insolubile
(la frazione non degradata dalle amilasi dell'ospite)

amilosio (α -1,4, poco digeribile)



Amilopectina (α -1,6)



Le amilasi sono raggruppate in diverse famiglie
a seconda della loro struttura e includono

←
 α -amilasi, che idrolizzano
i legami α -1, 4

↓
pullulanasi di tipo I che tagliano
specificamente i legami α -1, 6

↘
amilopullulanasi che possiedono
entrambe le attività

I membri del microbiota intestinale competono per gli oligosaccaridi e la maggior parte dei polisaccaridi vegetali ND nel colon

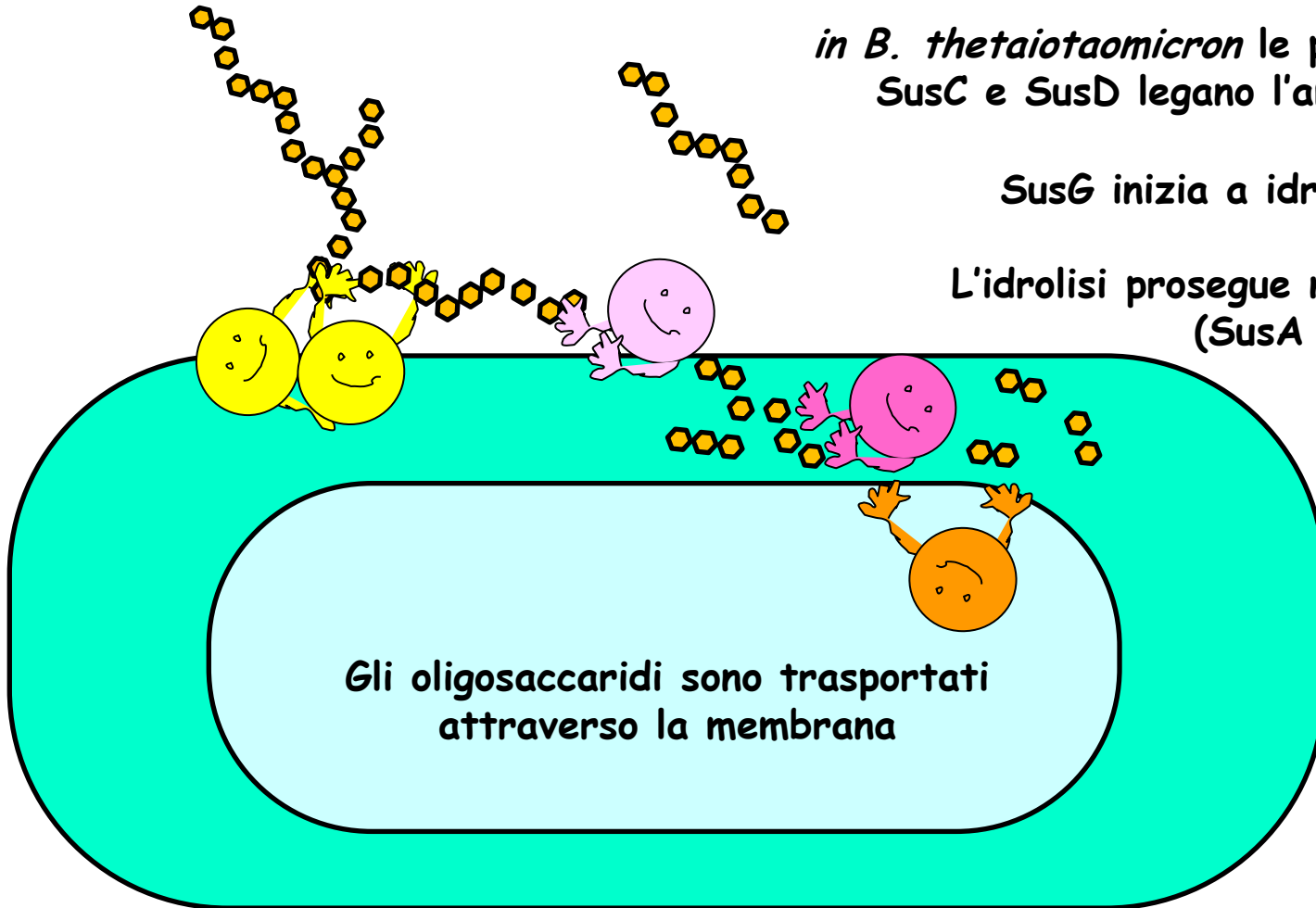
Un modo di avvantaggiarsi è legare il substrato alla cellula per assicurarsi la priorità nello sfruttamento del prodotto

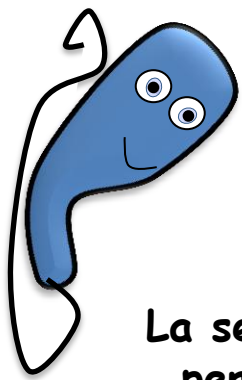
in *B. thetaiotaomicron* le proteine
SusC e SusD legano l'amido

SusG inizia a idrolizzarlo

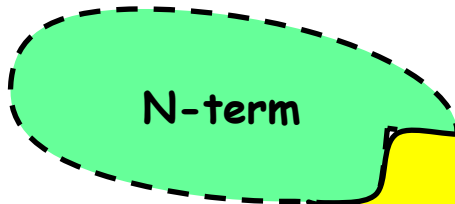
L'idrolisi prosegue nel periplasma
(SusA)

Gli oligosaccaridi sono trasportati
attraverso la membrana



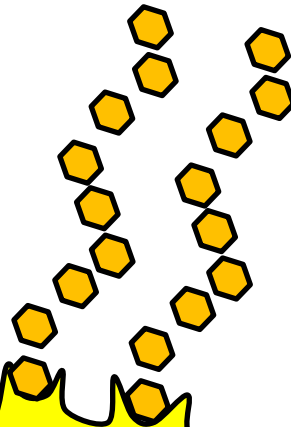


La sequenza N-term
per la secrezione



legame

domini di legame
ai carboidrati

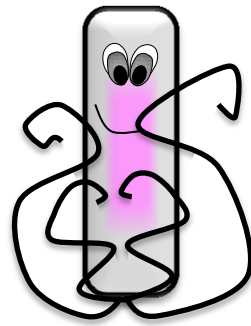


dominio
catalitico

catalisi

C-term

Domini di ancoraggio
alla parete cellulare



Un'altra strategia è quella di *Roseburia inulinivorans*
e *Butyrivibrio fibrisolvens* (Monodermi basso G+C)

hanno α -amilasi di grandi dimensioni

Zuccheri semplici e alcoli

Studi su volontari umani

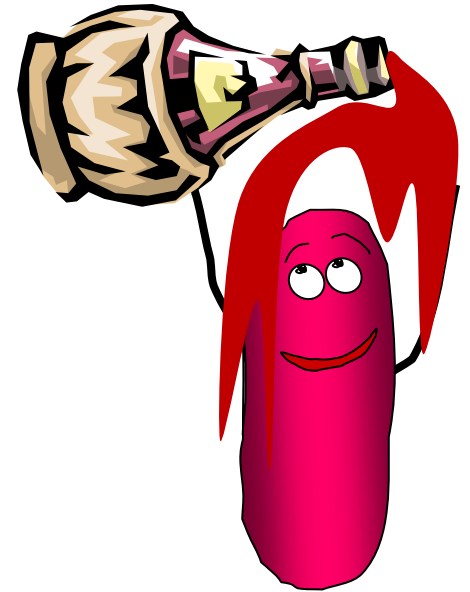
La presenza di lattulosio → acetogenesi

La presenza di 1-ramnosio → produzione di propionato

Effetto attraverso la modulazione del microbiota

Confermato da studi in vitro

quantità non fisiologiche di mono e oligosaccaridi
non assorbibili, provoca effetti collaterali
indesiderabili come gonfiore addominale



DIETA

Un effetto evidente è quello mediato dal raffinosisio

Presente in vegetali (in grandi quantità nei legumi)

Il raffinosisio provoca gonfiori, gas e dolore addominale

ASPARAGI

FAGIOLI

CAVOLINI DI
BRUXELLES

CAVOLI

SAUERKRAUT

BROCCOLI

