



UNIVERSITÀ  
CATTOLICA  
del Sacro Cuore

**Scuola di Dottorato per il Sistema Agro-alimentare**

**Doctoral School on the Agro-Food System**

**cycle XXIX**

**S.S.D: AGR/16**

**Presence of neglected bacteria in the infant gut microbiota**

**Coordinator: Ch.mo Prof. Marco Trevisan**

---

**Candidate: Valeria Sagheddu**  
**Matriculation n.: 4212115**

**tutor: Prof. Lorenzo Morelli**  
**Dott.ssa Vania Patrone**  
**Dott.ssa Maria Luisa Callegari**

**Academic Year 2015/2016**

*"Vivitur ingenio, caetera mortis erunt"*

## Index

Abstract.....	5
Riassunto in italiano.....	7
Chapter1: General introduction.....	10
1.11 References.....	21
1.12 PhD research steps: <b>some</b> considerations .....	31
Chapter 2: Abundance and diversity of hydrogenotrophic microorganisms in the infant gut before the weaning period assessed by DGGE and qPCR.....	33
Abstract.....	34
1. Introduction.....	35
2. Materials and methods .....	37
2.1 Subjects.....	37
2.2 DNA extraction.....	37
2.3 qPCR.....	37
2.4 PCR-DGGE.....	38
2.5 Statistics .....	38
3. Results.....	38
3.1 qPCR quantification of hydrogenotrophic microorganisms.....	38
3.2 PCR-DGGE analysis of acetogenic bacteria in the infant gut.....	39
4. Discussion.....	39
5. Conflict of Interest .....	42
6. Author Contributions .....	42
7. Funding .....	42
8. Acknowledgments.....	42
9. References.....	43
10. Tables and figure captions .....	49
Chapter 3: Infant early gut colonization by Lachnospiraceae: high frequency of Ruminococcus gnavus .....	54
Abstract.....	56
1. Introduction.....	57
2. Materials and Methods .....	58
2.1 Subjects .....	58
2.2 Fecal DNA extraction.....	58
2.3 PCR-DGGE .....	59
2.4 qPCR .....	59
3. Results.....	60
4. Discussion .....	61
5. Conflict of Interest .....	63
6. Author Contributions.....	63
7. Funding .....	63
8. Acknowledgments.....	63
9. References .....	64
10. Tables and figures captions.....	69
11. Supplementary materials.....	71
11.1 Supplementary Table 1.....	71
11.2 Supplementary Table 2.....	72
Chapter 4: Characterization of the fecal archaeal microbiota in newborn piglets fed pectin-supplemented milk formula.....	73
Abstract.....	75
1. Introduction.....	76
2. Materials and methods.....	77
2.1 Animals and diets.....	77
2.2 DNA extraction .....	78
2.3 Illumina sequencing of 16S rRNA gene PCR amplicons and bioinformatic analysis.....	78
2.4 Quantitative real-time PCR assays.....	78
2.5 Statistics .....	79
3. Results.....	79

3.1 Richness and diversity.....	79
3.2 Taxonomic composition of fecal archaea community of piglets.....	80
3.3 Quantification of specific archaeal groups.....	80
4. Discussion.....	80
5. Conclusion.....	83
6. Conflict of interest.....	83
7. Funding.....	83
8. Acknowledgments.....	83
9. References.....	84
10. Figures.....	89
Chapter 5: Concluding remarks.....	94
Acknowledgments.....	96

**Abstract**

At birth, the gastrointestinal tract is virtually sterile, but is rapidly colonized during the first days of life until a relatively stable state is reached. However, studies using both bacterial culture techniques and bio-molecular methods revealed that the amniotic cavity harbors microorganisms and, among them, uncultivated and uncharacterized taxa. The colonization process is influenced by many factors including the mode of delivery, the type of feeding, the gestational period and the living environment. For infants vaginally delivered, the major inoculum source of microorganisms is represented by the birth canal, where colonization starts by the maternal vaginal and intestinal microbiota. In contrast, for infants delivered by caesarean section, environmental bacteria are the first colonizers. Since it is known that commensal human intestinal bacteria stimulate a range of important functions, from postnatal intestinal development to maintenance of the mucosal barrier and nutrient absorption, the aim of the present PhD thesis has been to evaluate some peculiar components of infant microbiota during the first two years of life. The initial part of my work mainly focused on three different microbial populations directly involved in the hydrogen metabolism: namely acetogens and sulphate reducing bacteria (SRB) belonging to the eubacteria domain and methanogens belonging to the archaea domain. The study was conducted on fecal samples of healthy babies, age ranging from 15 days to 6 months of life. The purpose of this preliminary work was to quantify the hydrogen-consuming microorganisms in sixteen healthy subjects and to assess a correlation between their occurrence and the delivery and feeding mode. PCR-DGGE and quantitative PCR (qPCR) have been the prevalent techniques employed. The quantification was performed for all three hydrogenotrophic populations. The PCR-DGGE was conducted only for the acetogen group, as it was not possible to perform it for the SRB and methanogens because their levels fall below the detection limit of the technique. I detected the *Blautia* genus presence in all samples by qPCR in infants less than six months of age. The occurrence of *Blautia* spp. did not correlate neither with the delivery mode nor to the feeding condition. The difficulty of detecting those microorganisms is higher in infant specimens compared to adult ones and the global conclusion obtained was that probably infant microbiota harbors bacterial species that have been previously ignored. In the second period of my PhD I focused my attention on the acetogenic population and particularly on the *Lachnospiraceae* family. I studied the *Lachnospiraceae* distribution in 25 healthy subjects aged from 15 days to 24 months by means of DGGE and quantitative PCR. The main result of the study was represented by the detection of *Ruminococcus gnavus* (*R. gnavus*) as a prevalent species belonging to the *Lachnospiraceae* family. *R. gnavus* was present in the 88% (22 out of

25) subjects. Our data support the need to gain a deeper insight into the biological role of this organism in the early stages of life. During the third part of the doctoral period I took in consideration the variation of the methanogenic archaeal population in the feces of 24 neonatal piglets fed either a control (n=12) or a pectin-containing milk diet (10.0 g/L) (n=12) by means of 16S rRNA gene deep sequencing and qPCR. The pig digestive tract is anatomically and functionally similar to that humans thus making piglets a popular model in gastrointestinal micro-ecological and dietary intervention studies related to newborns. I observed that in control piglets the dominant members of the archaea community belonged to the *Methanobrevibacter* genus, followed by *Methanosphaera cuniculi* (*M. cuniculi*). The qPCR data confirmed that pectin-containing formula did not alter the total number of either methanogens or total archaea. On the contrary, pectin supplementation resulted in lower proportions of *Methanobrevibacter* spp. and *Methanobrevibacter smithii* (*M. smithii*), and higher levels of *M. cuniculi* compared with controls. This study on the linkage between methanogens and diet in a piglet's model may represent a significant step towards a better understanding of gut archaea ecology. The present doctoral thesis underlines the need of future further efforts in order to support the studies presented. The development of new primer sets that better describe the ecological complexity of the gut microbial community will be a major goal assessed. This objective will be reached when it is possible to properly identify and quantify less represented bacterial populations within the infant gut ecosystem.

**Riassunto in italiano**

Il tratto gastro intestinale infantile al momento del parto è considerato virtualmente sterile e viene rapidamente colonizzato da microrganismi di origine materna e/o ambientale che svolgeranno la funzione di primo inoculo. Tuttavia alcuni studi accoppiati di microbiologia classica e molecolare hanno dimostrato come la cavità amniotica sia popolata da microrganismi alcuni dei quali appartenenti a taxa precedentemente non ancora coltivati e caratterizzati. Le diverse modalità di parto, l'allattamento e l'ambiente familiare saranno i fattori che determineranno il contenuto batterico intestinale durante i primi due anni di vita. Il secondo anno è stato identificato come il periodo in cui il microbiota tende a stabilizzarsi, assumendo la composizione di quello dell'individuo adulto. La colonizzazione del tratto intestinale coadiuva lo sviluppo di importanti funzioni, a partire dalle prime fasi post natali alla produzione della barriera-mucosa fino all'assorbimento dei nutrienti. Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare la composizione del microbiota infantile durante i primi due anni di vita. Nella prima parte del mio periodo di tesi la mia attenzione si è maggiormente concentrata sulle tre popolazioni di microrganismi direttamente coinvolte nel metabolismo dell'idrogeno, nella fattispecie su acetogeni e batteri solfato riduttori (BSR), appartenenti al dominio degli eubatteri e sui metanogeni, facenti parte del dominio degli archaea. Lo studio è stato condotto su feci di soggetti sani di età compresa tra i 15 giorni e i 6 mesi di vita. L'obiettivo di questo primo lavoro è stato quello di quantificare i microrganismi metabolizzatori dell'idrogeno in sedici bambini e di valutare un'eventuale correlazione tra la loro presenza e il tipo di parto ed allattamento. La PCR-DGGE e la PCR quantitativa (qPCR) sono state le tecniche di elezione impiegate. Tutte e tre le popolazioni idrogenotrofiche sono state quantificate. La PCR-DGGE è stata effettuata per la popolazione degli acetogeni, ma contrariamente, per BSR e metanogeni non è stato possibile realizzarla, poiché il loro livello ricadeva al di sotto del limite di sensibilità della tecnica. La qPCR ha permesso di identificare il genere *Blautia* in tutti i campioni appartenenti a bambini sotto il sesto mese. La presenza del genere *Blautia* non è stato correlabile né con il tipo di parto né con l'alimentazione. E' da sottolinearsi che nei campioni fecali appartenenti a bambini è più difficile identificare questi microrganismi rispetto agli adulti. A conclusione del lavoro, è stato evinto che il microbiota infantile, probabilmente, sia composto da specie batteriche che in passato non venivano prese in considerazione. Durante il secondo periodo della scuola di dottorato abbiamo concentrato la nostra attenzione sulla popolazione acetogena e, in particolare, sulla famiglia delle *Lachnospiraceae*. In questo secondo studio, grazie alle tecniche di PCR-DGGE e qPCR abbiamo investigato sulla distribuzione delle *Lachnospiraceae* in 25 soggetti sani

di età compresa tra i 15 giorni e i due anni di vita. Il risultato più interessante è stato l'identificazione di *Ruminococcus gnavus* (*R. gnavus*) come specie prevalente appartenente alla famiglia delle *Lachnospiraceae* riscontrato nell'88% (22 su 25) dei soggetti. I nostri risultati aprono la strada ad altri studi a riguardo del possibile ruolo biologico svolto da questo microrganismo nelle prime fasi della vita. Durante la terza parte del periodo di dottorato l'oggetto principale del nostro studio è stata la variazione della popolazione degli archaea metanogeni nelle feci di 24 maialini alimentati con una dieta controllo (n=12) o con formula infantile contenente pectina (10.0 g/L) (n=12), sfruttando le tecniche di sequenziamento massivo del 16S rRNA e la qPCR. Il tratto gastrointestinale dei maialini è anatomicamente e funzionalmente simile a quello umano; questo lo rende un modello animale molto utilizzato negli studi di micro-ecologia intestinale e negli studi di intervento nutrizionale correlati all'infanzia. È stato possibile osservare come nei maialini controllo il genere *Methanobrevibacter* seguito dalla specie *Methanosphaera cuniculi* (*M. cuniculi*) fossero i membri dominanti appartenenti alla comunità degli archaea. I dati ottenuti tramite la qPCR hanno confermato che l'aggiunta di pectina alla formula infantile non causi un'alterazione del numero totale né degli archaea né dei metanogeni. Al contrario, il supplemento in pectina ha come risultato una minor presenza di *Methanobrevibacter* spp. e di *Methanobrevibacter smithii* (*M. smithii*), e maggiori livelli di *M. cuniculi* nei maialini trattati rispetto ai controlli. Questo studio sulla possibile correlazione tra i metanogeni e la dieta in modello animale potrebbe rappresentare un passo in avanti nella comprensione dell'ecologia degli archaea intestinali. L'obiettivo ideale da raggiungersi consisterebbe nel disegno di nuove coppie di primers che meglio possano descrivere la complessa ecologia delle comunità microbiche intestinali. L'ambizioso obiettivo potrà considerarsi raggiunto quando si potranno identificare e stimare in modo preciso e corretto anche le popolazioni batteriche poco abbondanti nel microbiota intestinale infantile.