



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA
SCIENZE BIOLOGICHE

LA SOMMINISTRAZIONE DEL PROBIOTICO LACTOBACILLUS PLANTARUM ALLEVIA GLI EFFETTI TOSSICI
INDOTTI DAL TRICLOSAN MODULANDO LA FLORA INTESTINALE DELLO ZEBRAFISH

**Dietary Lactobacillus plantarum ST-III alleviates the toxic effects of triclosan
on zebrafish (Danio rerio) via gut microbiota modulation**

Tesi di laurea

di:

Marchegiani Greta

Docente Referente Chiar.ma

Prof.ssa:

Maradonna Francesca

SESSIONE: Autunnale (Ottobre 2019)

ANNO ACCADEMICO: 2018/2019

1. INTRODUZIONE

TRICLOSAN



- Battericida ad ampio spettro
- Fonte di preoccupazione per gli organismi acquatici e per la salute umana

PROBIOTICI



- Trattano e possono prevenire malattie gastrointestinali
- Modificano il metabolismo dei nutrienti dell'ospite e l'omeostasi energetica
- BSH → estratto attivo dei lattobacilli → tolleranza ai sali biliari

OBIETTIVO
DELLO
STUDIO



1. Valutare l'effetto dell'esposizione cronica al TCS sul metabolismo lipidico, sul sistema immunitario della mucosa intestinale, sugli indici comportamentali e sul microbiota intestinale
2. Valutare la capacità del probiotico di modulare la risposta degli organismi al TCS

2. MATERIALI E METODI

I pesci zebra adulti sono stati divisi in sei gruppi di trattamento in base al tipo di alimentazione:

Gruppo di controllo (CONTROLLO)	Cibo secco
Gruppo esposto al triclosan (TCS)	Cibo ed esposizione via acqua al triclosan (0.002% v/v)
Gruppo <i>Lactobacillus Plantarum</i> ST-III (LAB)	Cibo con l'aggiunta <i>Lactobacillus Plantarum</i> ST-III 1×10^8 CFU
Gruppo con idrolasi di sale biliare (BSH)	Cibo addizionato con idrolasi di sale biliare
Gruppo combinato con triclosan e probiotico (TL)	Cibo con l'aggiunta di <i>Lactobacillus Plantatum</i> ST-III ed esposizione al triclosan
Gruppo combinato con BSH e triclosan (TB)	Cibo con l'aggiunta di idrolasi di sale biliare ed esposizione al triclosan

- Durata di esposizione al triclosan 0,002% (v/v) per i gruppi TCS, TL e TB: 90 giorni

2.1. SEQUENZIAMENTO DELLA FLORA INTESTINALE

1. Raccolta del campione → Asportazione dell'intestino di 12 pesci zebra per ogni trattamento ed estrazione del DNA
2. Preparazione della libreria Illumina e analisi della sequenza genica dell'rRNA 16S
3. Analisi qRT-PCR di geni immuno-correlati

2.2. Rilevazione di biomarcatori, colorazione Oil Red O e analisi biochimica dei lipidi epatici

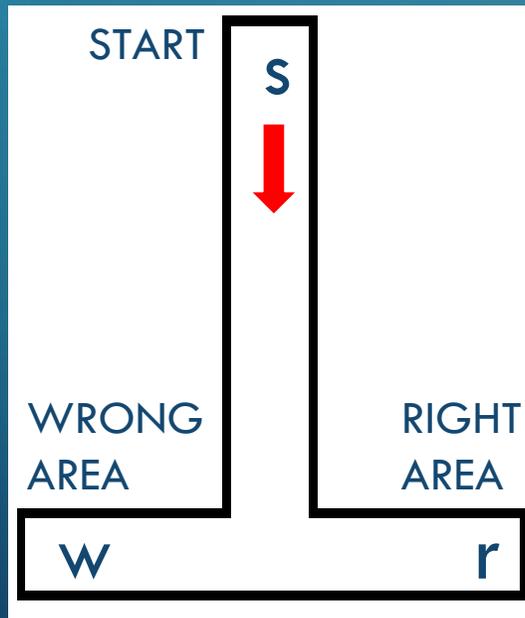
2.3. Osservazione istopatologica e colorazione in immunofluorescenza di fegato e intestino

2.4. Analisi statistica

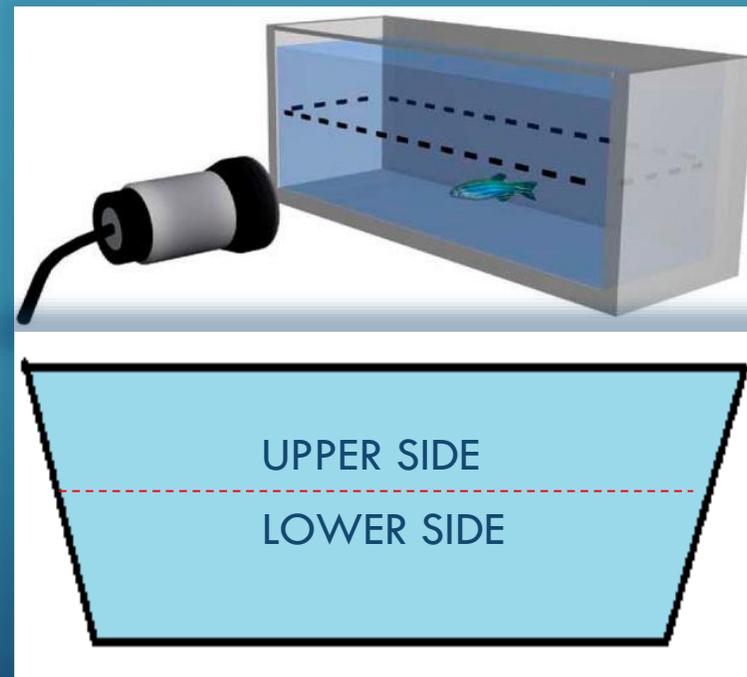
2.5. VALUTAZIONE COMPORTAMENTALE DEL PESCE ZEBRA ADULTO

Tre test comportamentali:

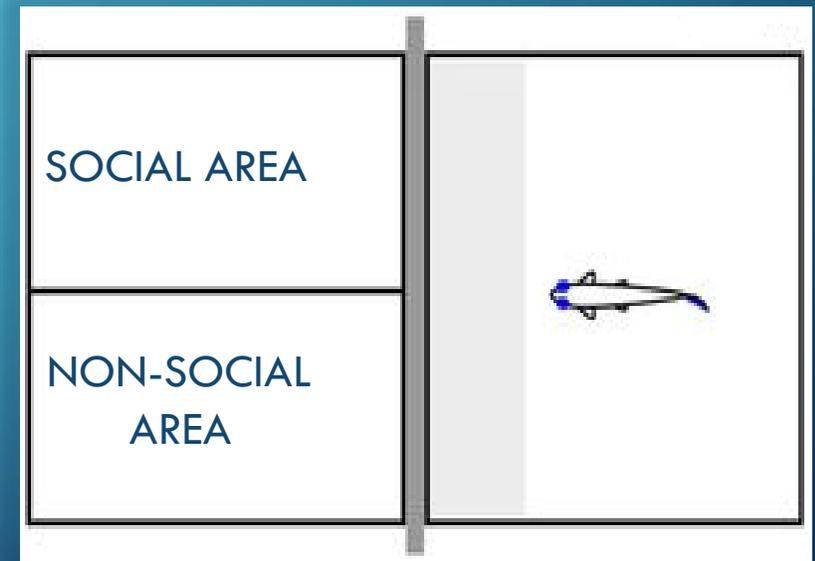
T-MAZE TEST



BOTTOM DWELLING TEST



INTERACTION SOCIAL TEST



3. RISULTATI

3.1. ANALISI DEI DATI DEL SEQUENZIAMENTO ILLUMINA MISEQ DEL PESCE ZEBRA

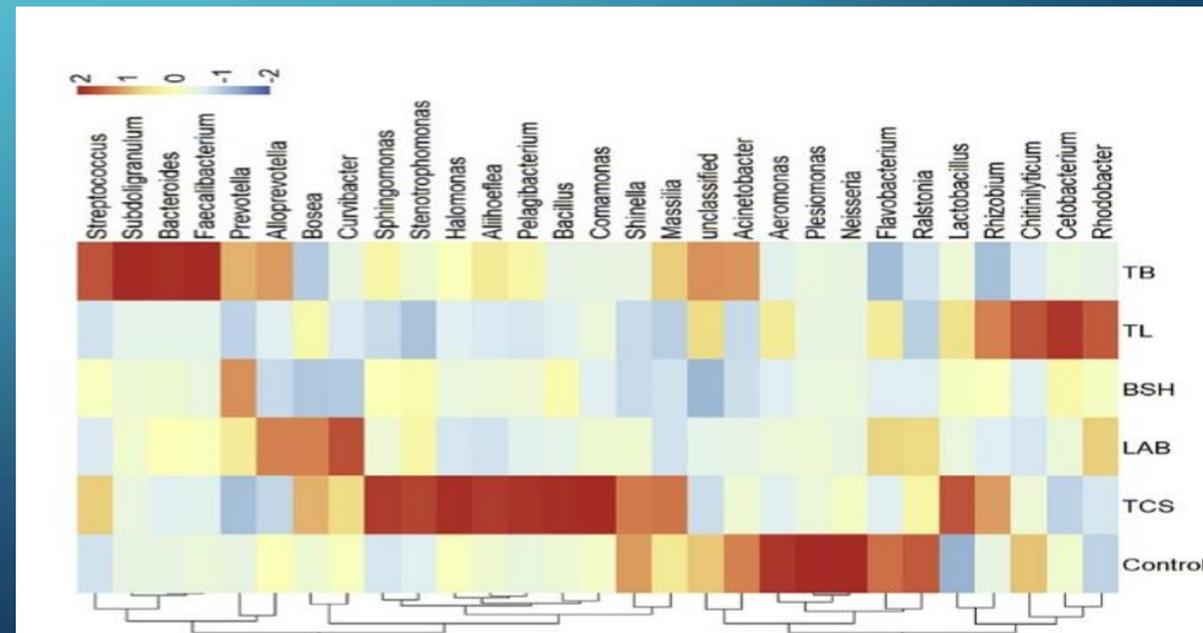
- Analisi statistica multivariata del microbiota intestinale del pesce zebra

Summary of the Illumina MiSeq sequence data and the alpha diversity index.

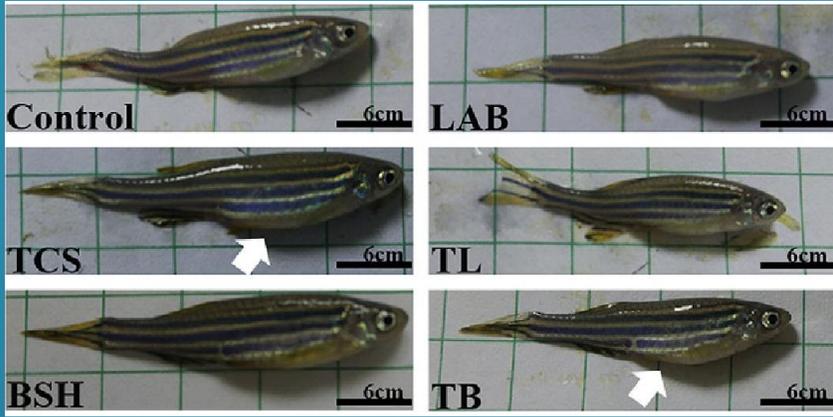
Treatments	Valid sequence	Item ¹				Coverage	OUT
		Chao	Ace	Shannon	Simpson		
Control	45717	328 ^a	328 ^a	3.05	0.1428	0.999737	325 ^a
TCS	35007	310 ^a	305 ^a	3.96	0.0404	0.999428	294 ^a
BSH	26514	352 ^{acd}	352 ^{acd}	3.84	0.059	0.999321	345 ^{abc}
LAB	39434	384 ^{cd}	383 ^{cd}	3.62	0.1028	0.999696	380 ^{cd}
TL	42336	315 ^{ae}	314 ^{ae}	2.83	0.1341	0.999386	303 ^{ae}
TB	48448	374 ^{acd}	365 ^{acd}	4.40	0.0245	0.999711	361 ^{acd}

Microbiota dei gruppi esposti al TCS ≠ gruppi con dieta probiotica e gruppi di controllo

- *Lactobacillus Plantarum ST-III* ha migliorato la comunità batterica intestinale mitigando la disbiosi, dovuta all'aumento dei proteobatteri indotto dall'esposizione al TCS



3.2. INDICI DELLE CARATTERISTICHE CORPOREE E RILEVAZIONE DEI BIOMARCATORI



C: lunghezza e larghezza standard del pesce zebra a 90 dpf

Larghezza e lunghezza del corpo maggiori nei gruppi TCS e BSH

D: indice di massa corporea (BMI) dei sei trattamenti sperimentali:

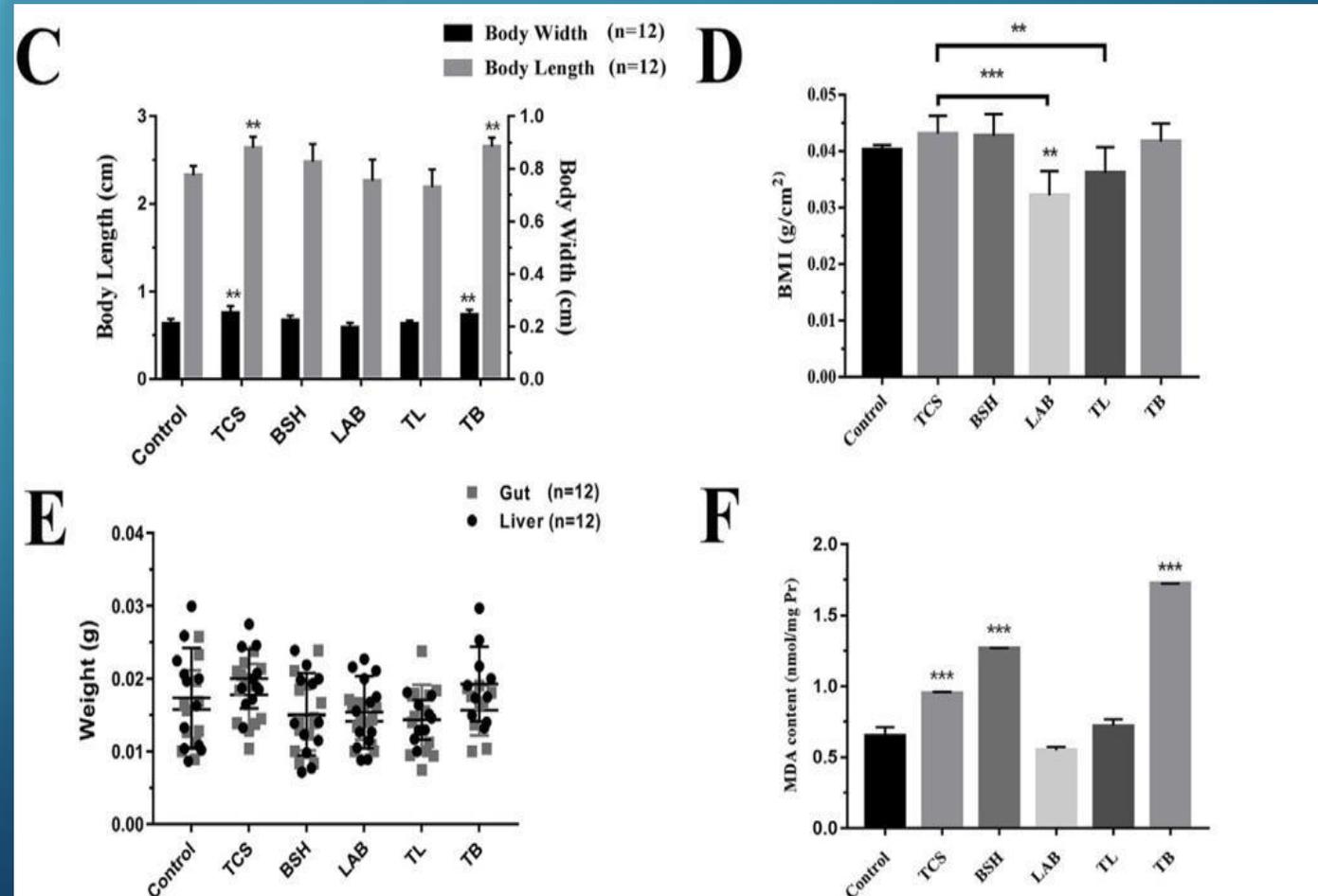
- **Indice inferiore per il gruppo TL rispetto ai gruppi TCS e BSH**

E: pesi di fegato e intestino per i sei trattamenti sperimentali:

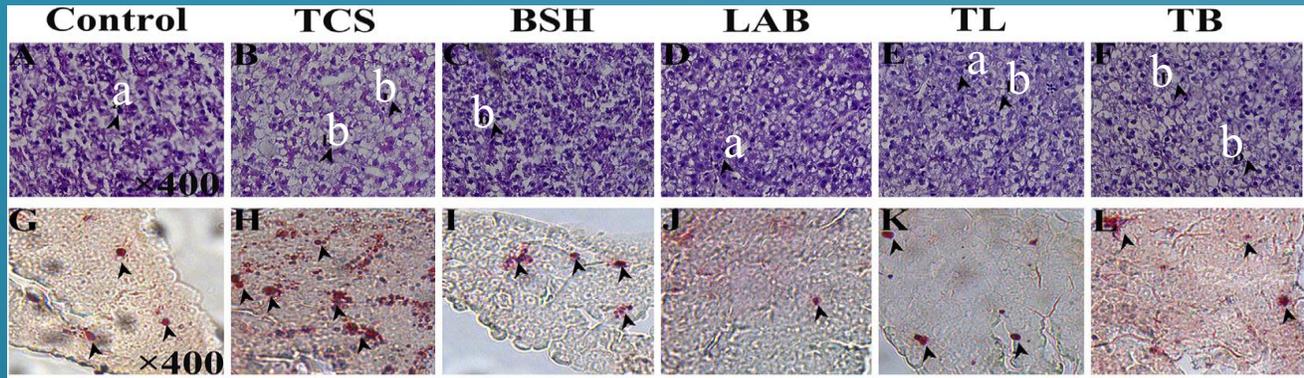
- **Lieve aumento nel gruppo TCS**

F: concentrazione di malondialdeide (MDA):

- **Maggiore nei gruppi TCS, BSH e TB**



3.3. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AL TCS E DELLA DIETA PROBIOTICA SUL METABOLISMO LIPIDICO NELL'INTESTINO E NEL FEGATO



(A-F): colorazione del fegato dei sei trattamenti sperimentali

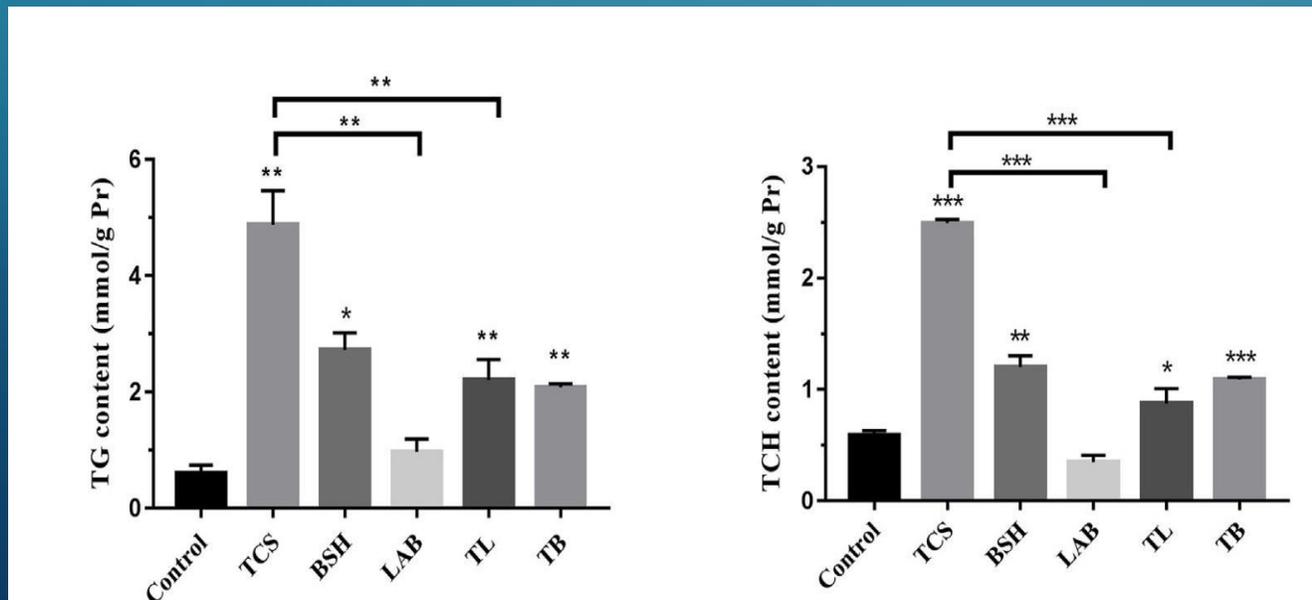
"Freccia nera": diminuzione del numero di nuclei e steatosi;

"Freccia a": epatocita normale

"Freccia b": steatosi

(G-L): analisi istopatologica Oil red O

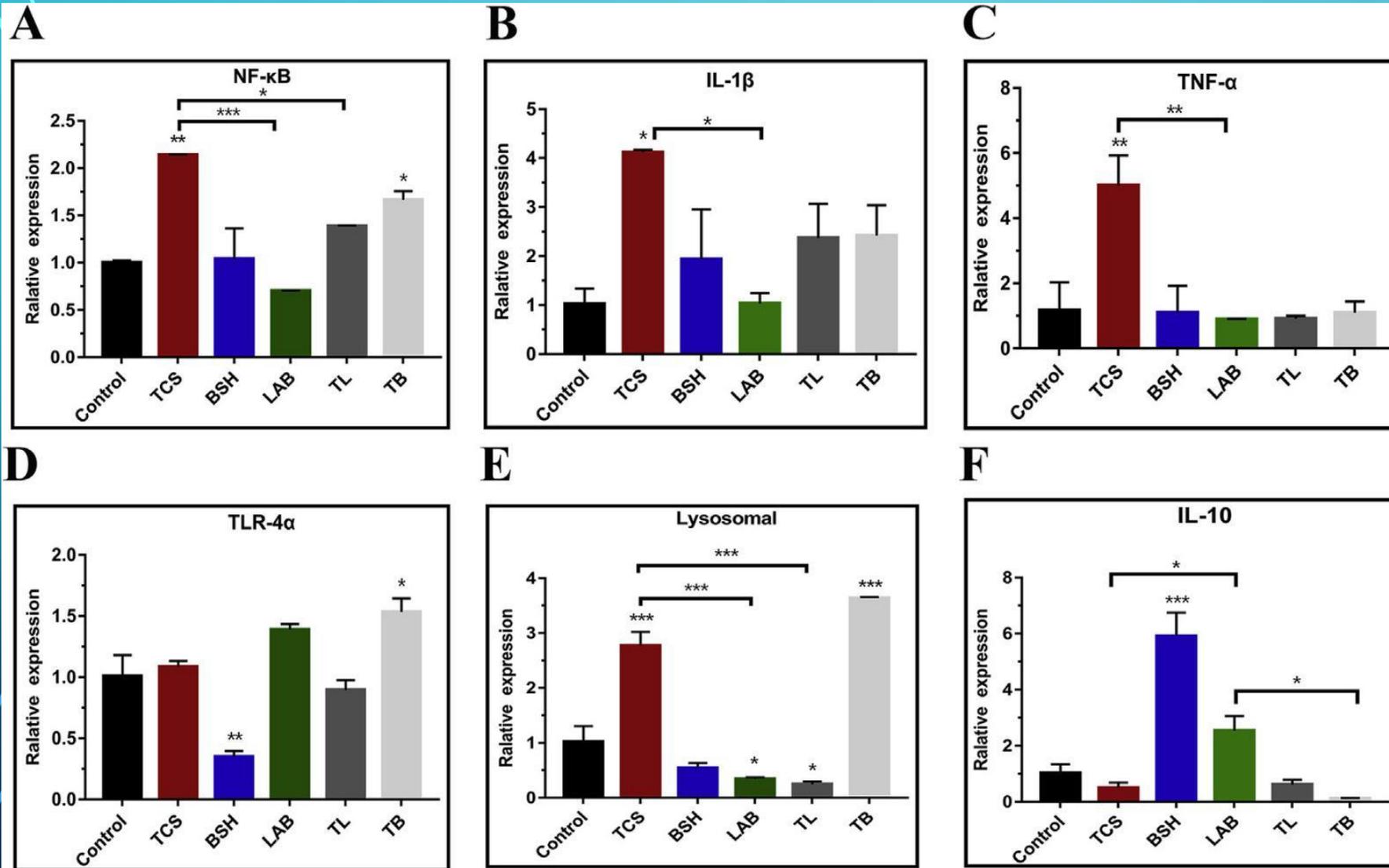
"Freccia nera": goccioline lipidiche (> in TCS)



Concentrazione dei TRIGLICERIDI (TG) e COLESTEROLO TOTALE (TCH) nel fegato del pesce zebra

→ **Maggior concentrazione nei gruppi esposti al TCS**

3.4. ANALISI QRT-PCR DI GENI IMMUNO-CORRELATI NELL'INTESTINO DEL PESCE ZEBRA ADULTO



Espressione dei sei geni immuno-correlati

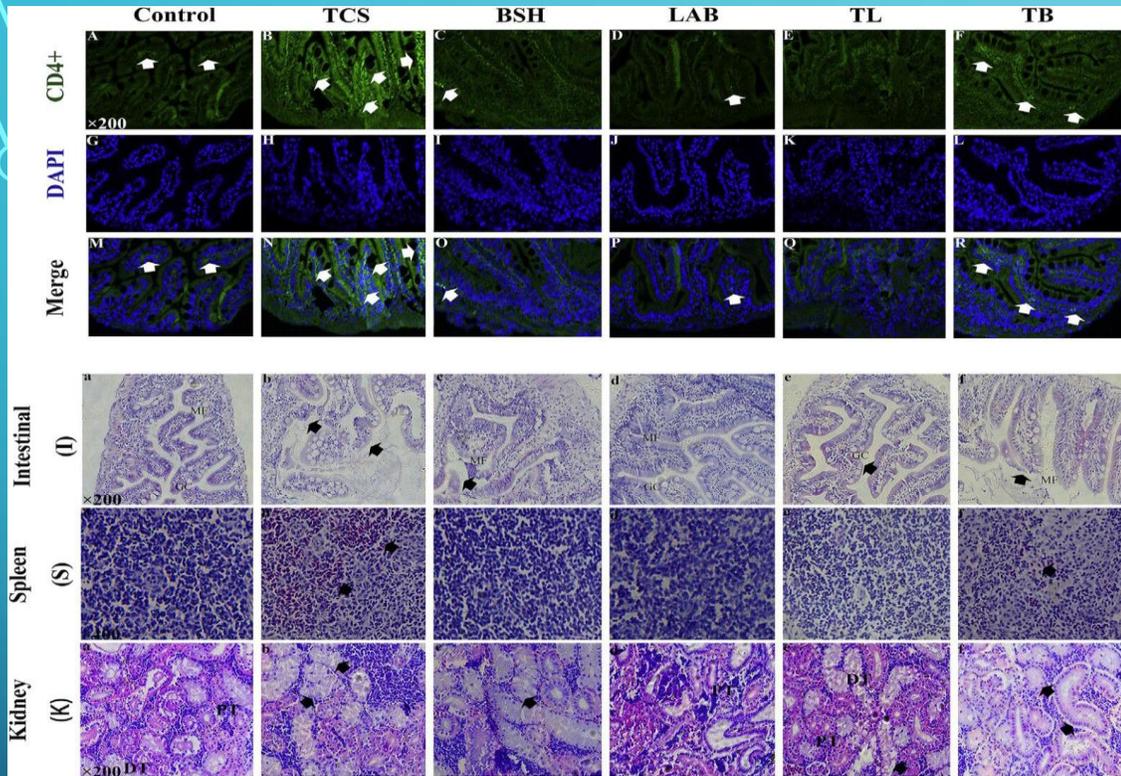
NF-κb } > in TCS
 IL-1β } < in LAB e BSH
 TNF-α }

LISOZIMA } > in TCS e TB
 < in LAB e TL

TLR4α < } in BSH
 IL-10 > }

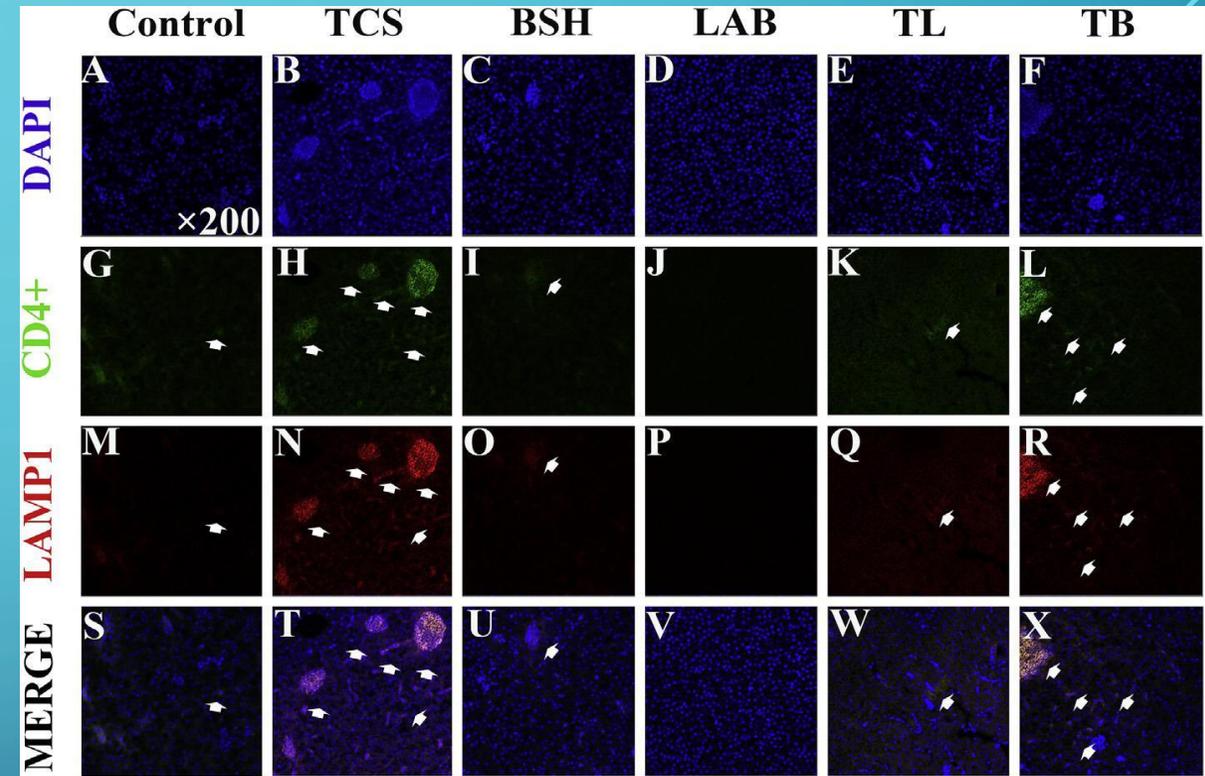
Effetto inibitorio immunitario potenziato nel gruppo BSH

3.5 DANNO CRONICO DA ESPOSIZIONE AL TCS ALLA MUCOSA INTESTINALE E AGLI ORGANI IMMUNITARI



- Aumento significativo delle cellule T CD4 + nei gruppi TCS e TB
- Valori inferiori nei gruppi LAB e TL
- Fenomeni di rottura e dissoluzione, assottigliamento della parete e distruzione dell'epitelio intestinale nel gruppo TCS

3.6 L'ESPOSIZIONE CRONICA AL TCS INDUCE INFIAMMAZIONE AL FEGATO

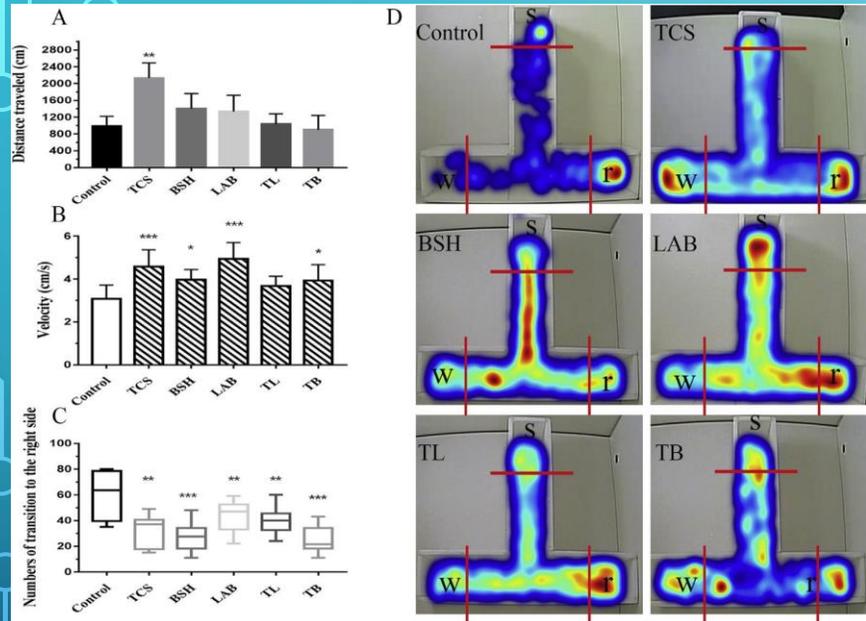


- Esperimento in immunofluorescenza in sezioni di fegato di pesce zebra marcate con CD4 + e LAMP1
- Aumento delle cellule T CD4 + in TCS
- Valori inferiori nei gruppi con dieta probiotica

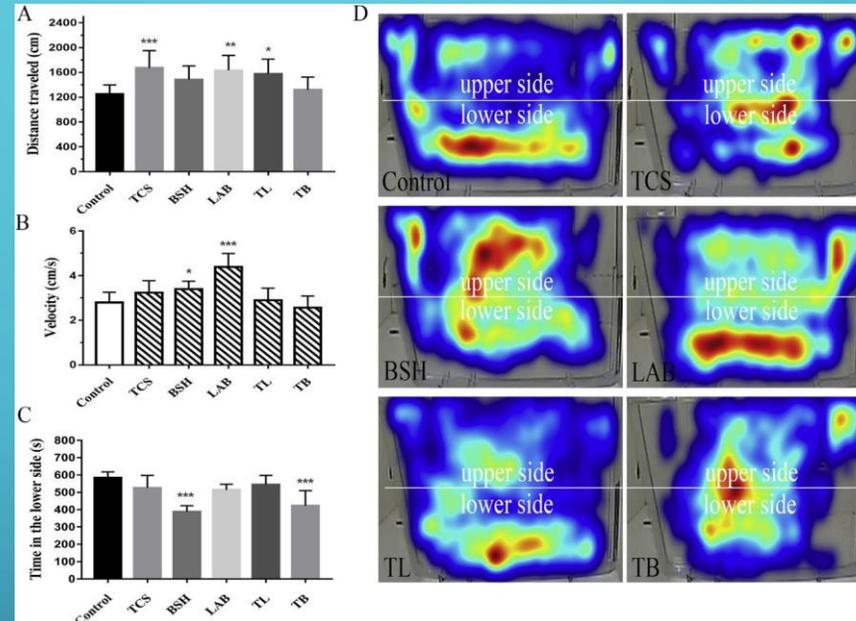
Lactobacillus Plantarum ST-III ha ridotto il numero di cellule infiammatorie

3.7. EFFETTI COMPORTAMENTALI DEL PESCE ZEBRA ADULTO DERIVANTI DALL'ESPOSIZIONE AL TCS E DIETA PROBIOTICA

T- MAZE TEST



BOTTOM DWELLING TEST



INTERACTION SOCIAL TEST

- La velocità media del nuoto > del 10% per il gruppo BSH e < per il gruppo TB
- Non sono stati riscontrati cambiamenti significativi sulla distanza media di nuoto nell'area sociale tra i sei trattamenti sperimentali

Da **blu** a **verde** = frequenza minore
Giallo e **rosso** = frequenza maggiore

DIETA PROBIOTICA:
maggior capacità di memoria e apprendimento rispetto all'esposizione al TCS

DIETA PROBIOTICA:
aumento attività del nuoto e velocità rispetto all'esposizione al TCS

4. CONCLUSIONI

I RISULTATI DELLA SPERIMENTAZIONE:

- Informano del rischio per la salute dovuto all'esposizione al TCS
- Documentano il valore dell'applicazione dei probiotici nell'alleviamento delle malattie immuno-correlate dei pesci

MICROBIOMA

influenza numerosi aspetti

funzioni metaboliche
immunologiche
neurologiche

La diversità della flora batterica ➡ *prodotto di interazioni a lungo termine tra
dieta e ambiente*

L'INDAGINE HA PERMESSO ➡ *La costruzione di un modello di intervento
dieta-farmaco a lungo termine, al fine prevenire
le problematiche risultanti dall'esposizione a tali
sostanze*

5. BIBLIOGRAFIA

- “*Fish and Shellfish Immunology*” il giornale ufficiale della Società internazionale di immunologia dei pesci e dei molluschi.
Journal homepage: www.elsevier.com/locate/fs
- I dati supplementari all'articolo sono disponibili online all'indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.007>