

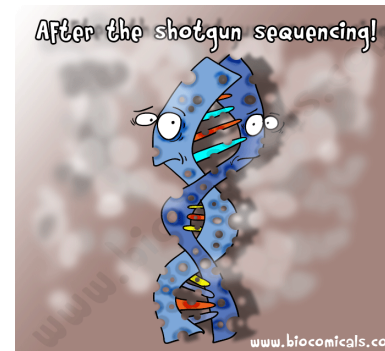
Gli approcci di sequenziamento hanno rivoluzionato lo studio dei microbiomi, consentendo di analizzare il contenuto genomico di tutti i microrganismi presenti in un campione, non solo quelli coltivabili in laboratorio.

Uno dei metodi più completi è la shotgun metagenomics, che consiste nel sequenziamento non mirato (“shotgun”) di tutti i genomi microbici presenti in un campione.

**DNA extraction**



**and sequencing**



Questo approccio permette di caratterizzare sia la composizione tassonomica sia il potenziale funzionale delle comunità microbiche e consente, in alcuni casi, di ricostruire interi genomi microbici.

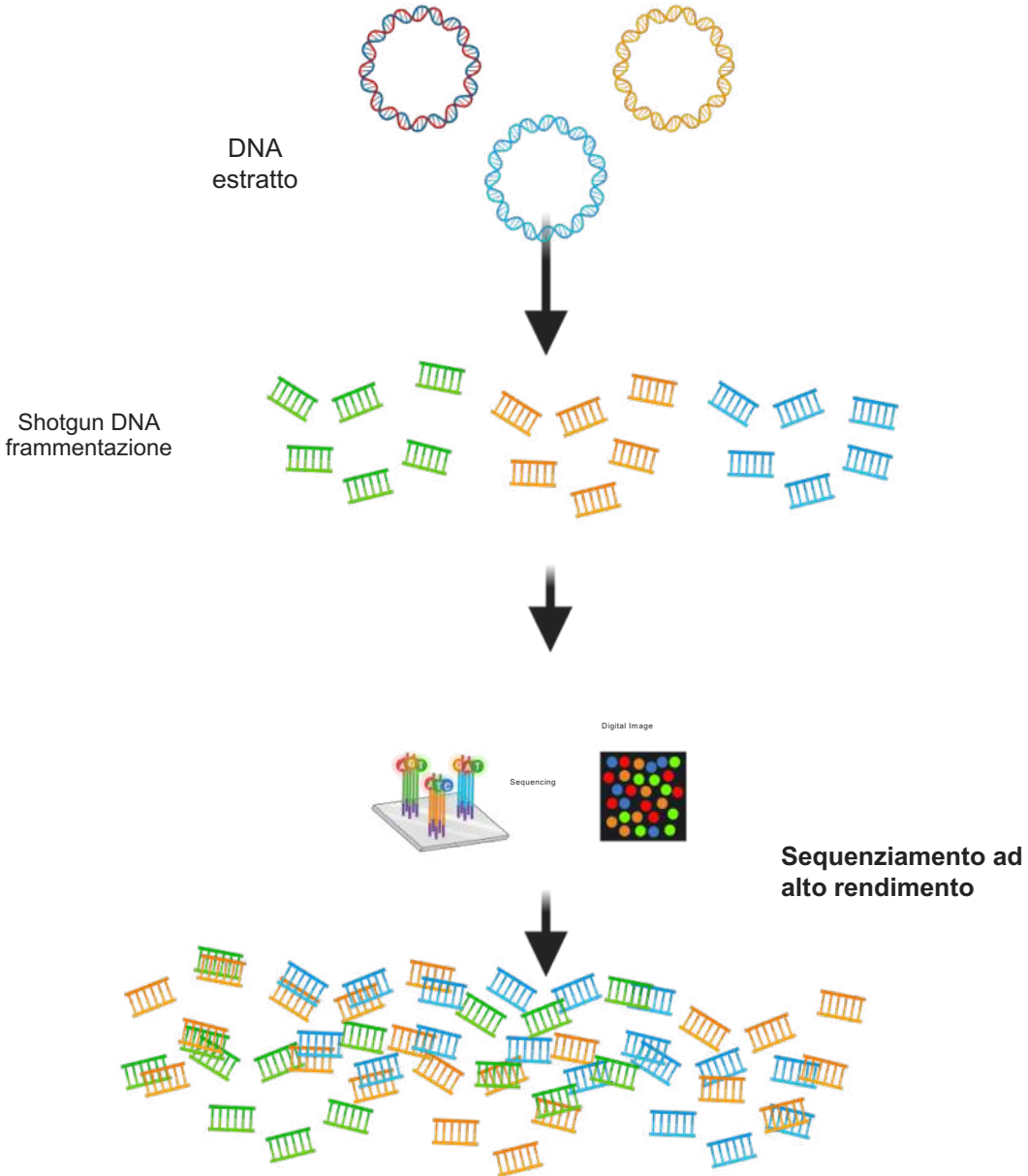
Un tipico studio di shotgun metagenomics si articola in cinque fasi principali:

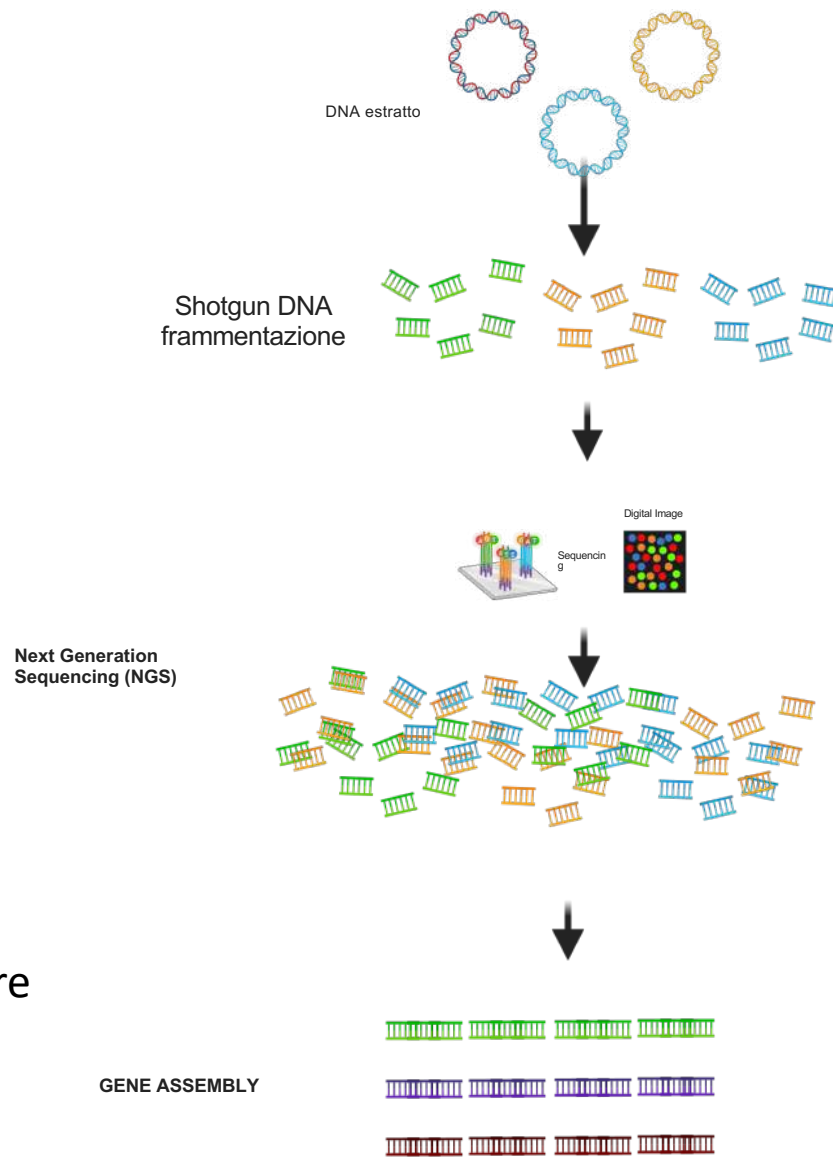
- (i) raccolta, processamento e sequenziamento dei campioni;
- (ii) preprocessing dei dati di sequenziamento;
- (iii) analisi delle sequenze per la profilazione tassonomica, funzionale e genomica;
- (iv) analisi statistica e biologica dei risultati;
- (v) validazione dei dati.

**Estrazione del DNA:** Si isola il DNA totale dal campione, (batterico, virale, fungino, ecc.).

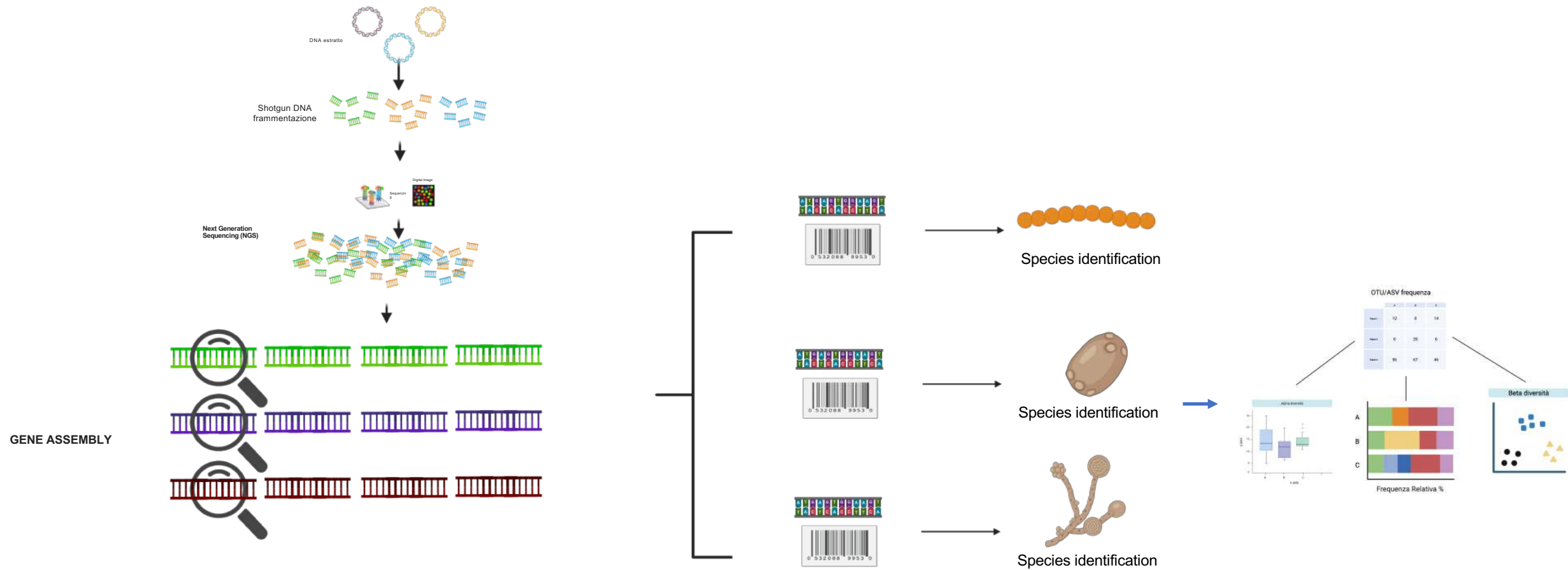
**Fragmentazione del DNA:** Il DNA estratto viene frammentato in pezzi più piccoli (solitamente tra 100 e 500 bp), creando un "shotgun" di frammenti casuali.

**Sequenziamento:** I frammenti di DNA vengono sequenziati usando tecniche come la sequenziamento di nuova generazione (NGS), generando milioni di brevi letture (reads).

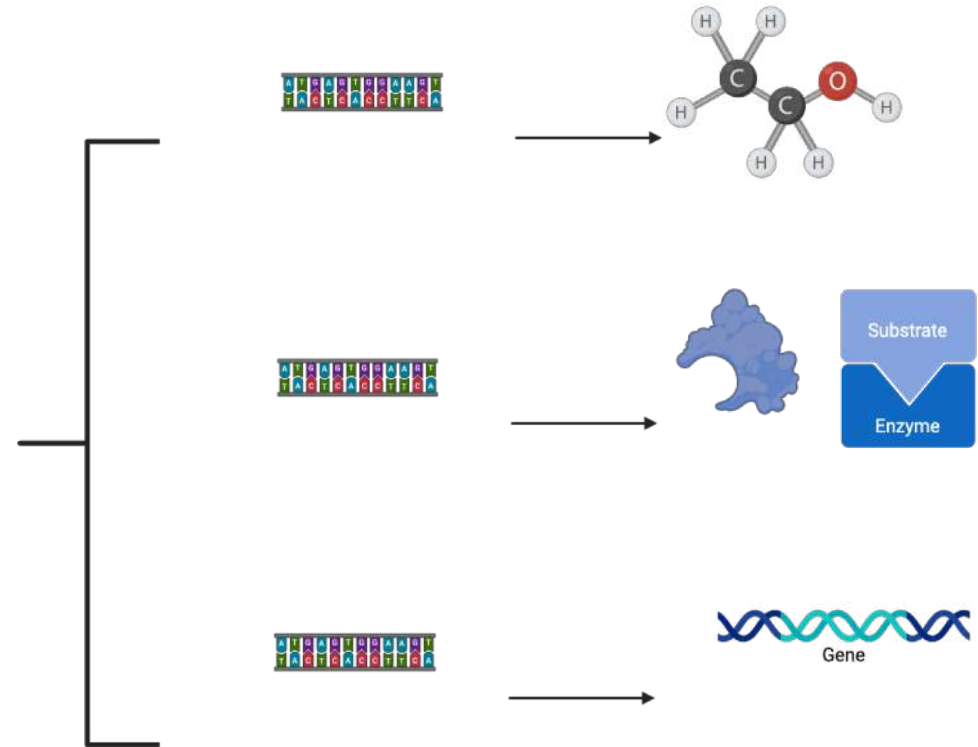
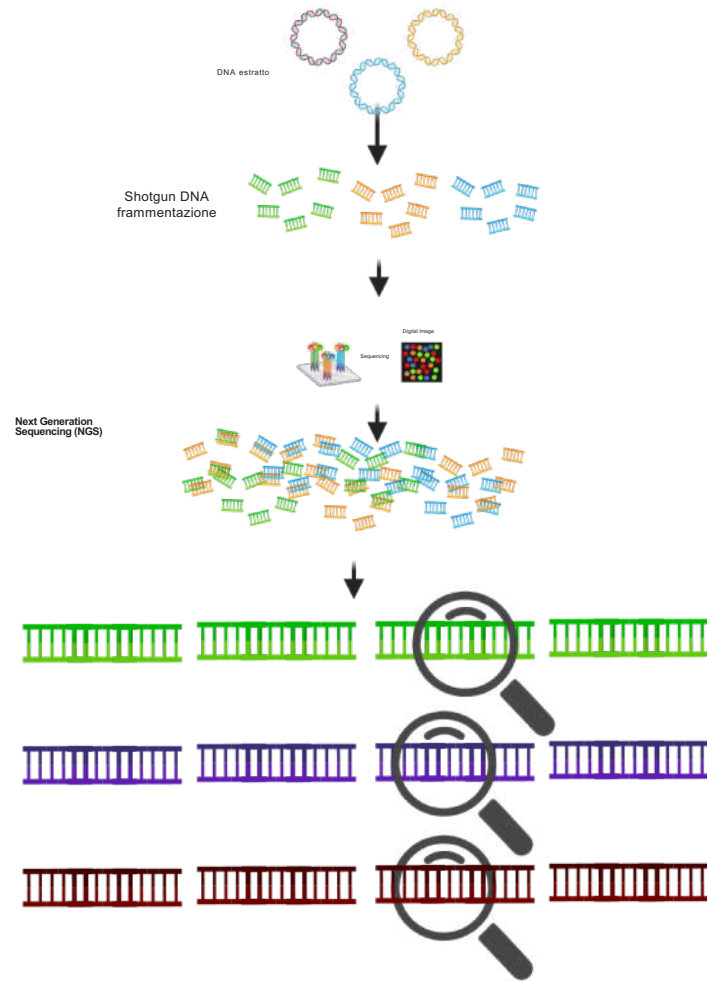




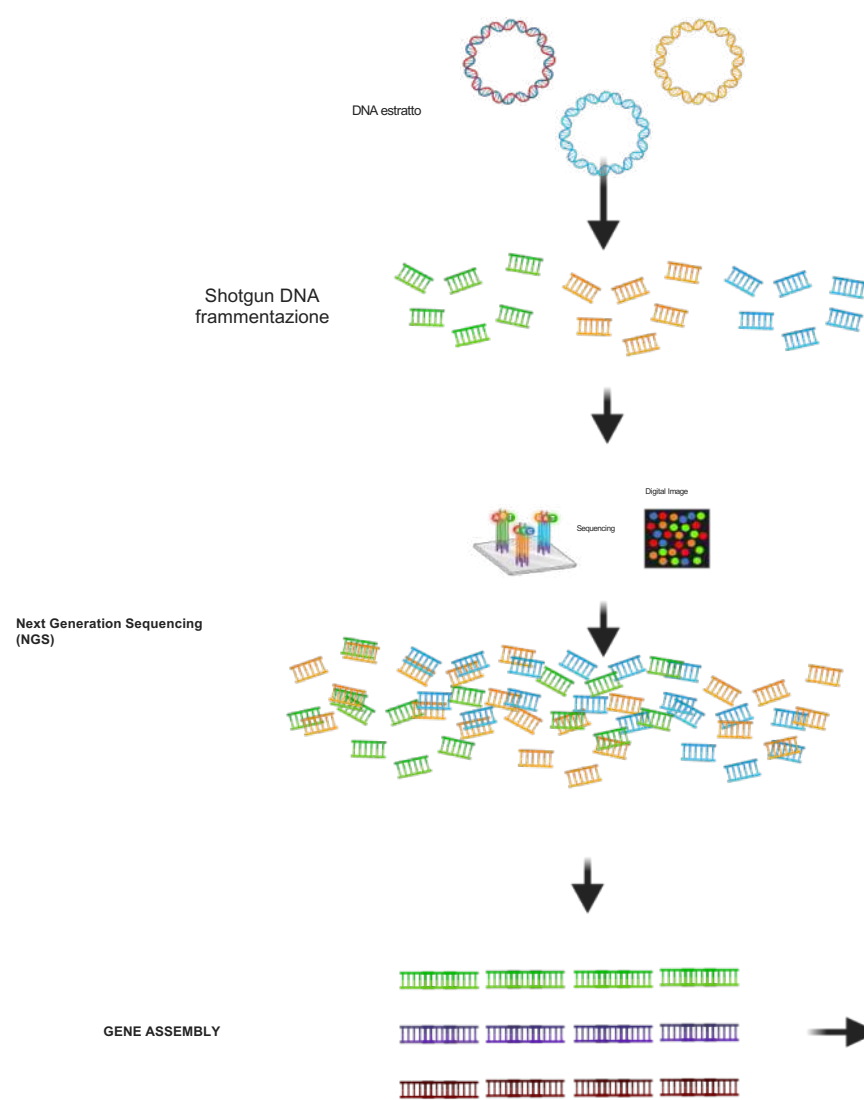
**Assemblaggio delle letture:** Le letture sequenziate vengono assemblate in contigs, ovvero sequenze di DNA più lunghe che rappresentano porzioni complete di genomi.



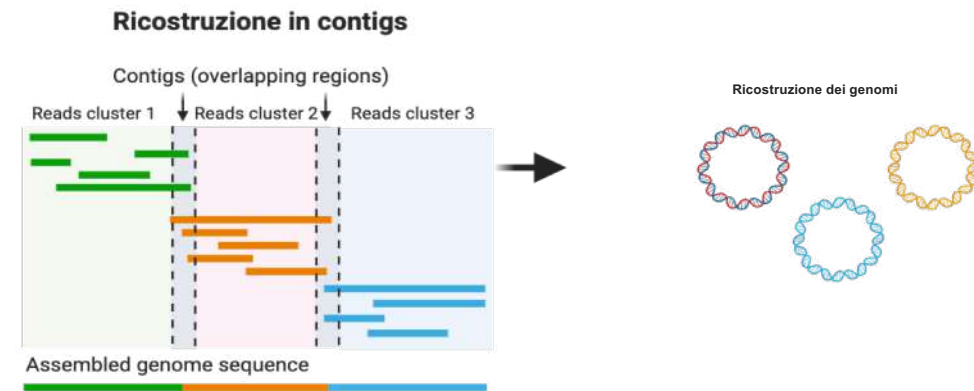
Il **profiling tassonomico** dei metagenomi permette di identificare le specie microbiche presenti in una comunità e di stimarne l'abbondanza relativa.



l'analisi dei geni e dei percorsi metabolici di una comunità microbica fornisce informazioni sul suo potenziale funzionale.



La ricostruzione dei genomi (o genome reconstruction) nella shotgun metagenomics è il processo di assemblare e identificare i genomi completi (o quasi completi) degli organismi presenti in un campione complesso.



Le sequenze vengono allineate a un genoma di riferimento, se disponibile, o subiscono un assemblaggio *de novo* in *contig* e, utilizzando strumenti bioinformatici

**NUCLEIC ACID EXTRACTION**



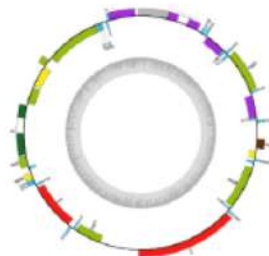
**FRAGMENTATION**



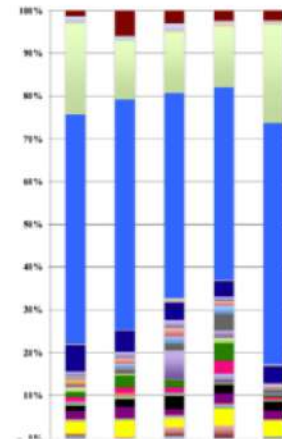
**ASSEMBLY**



**GENOME  
RECONSTRUCTION**



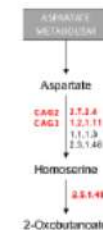
**TAXONOMY**



**ASSEMBLY**



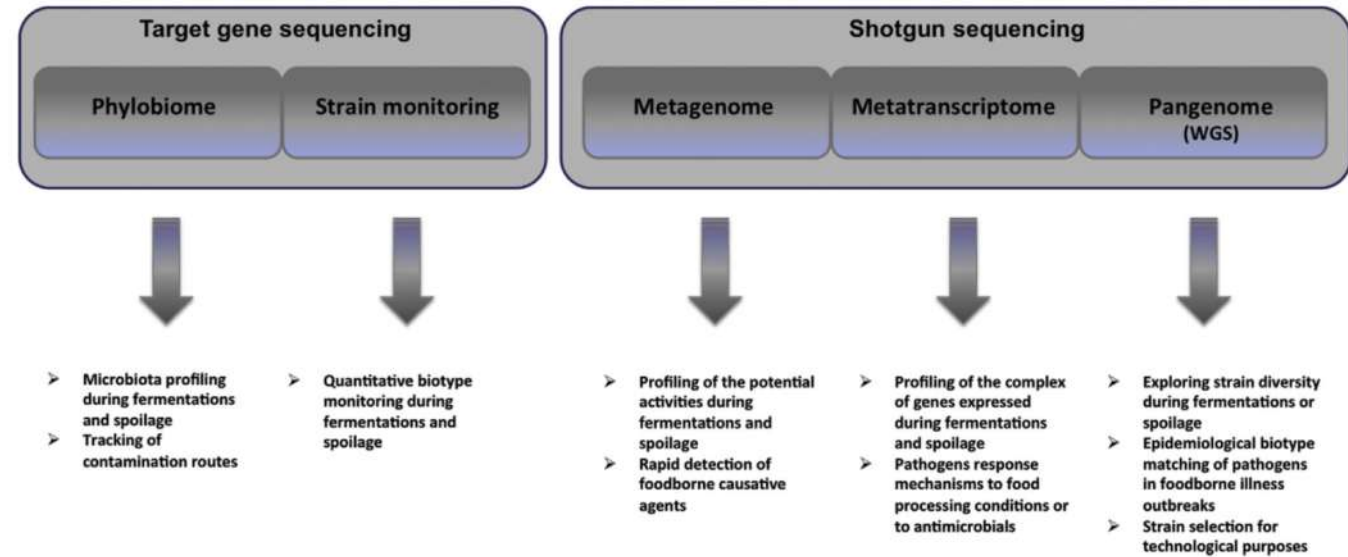
**PATHWAY  
RECONSTRUCTION**





Le tecnologie di sequenziamento ad alta capacità (HTS), spesso abbinate a metabolomica mirata o non mirata, vengono utilizzate negli alimenti per valutare:

- Le dinamiche della microbiota attraverso l'identificazione delle comunità microbiche (**meta-tassonomia**).
- Cambiamenti nel contenuto genetico, nella funzione e nell'abbondanza microbica in situ (**meta-genomica e meta-trascrittomica**).



**Figure 1** Possible applications of high-throughput sequencing (HTS) in food microbial ecology.