

Le tecniche omiche rappresentano un pilastro fondamentale della biologia moderna, poiché consentono di generare grandi quantità di dati utili per descrivere e interpretare i sistemi biologici in modo integrato e su vasta scala.

Negli ultimi decenni, l'uso di vocaboli terminanti in “-omico/a” si è esteso ben oltre la “genomica” originaria, abbracciando un'ampia gamma di discipline entrando nel linguaggio comune.

In generale, il suffisso “-omico/a” indica lo studio sistematico e globale di specifici aspetti biologici, considerati nel loro insieme.

Applicato a molecole cellulari come geni, trascritti, proteine e metaboliti, genera termini come genomica, trascrittomico, proteomica, metabolomica, lipidomica, ecc.

- La **genomica** si occupa dell'intero patrimonio genetico di un organismo, composto da miliardi di coppie di basi di DNA, e consente di identificare variazioni genetiche grazie a tecnologie di sequenziamento avanzate.
- La **trascrittomico** analizza l'insieme degli RNA espressi in una cellula, distinguendo tra RNA codificanti (mRNA) e non codificanti (miRNA, lncRNA), che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione genica.
- La **proteomica** si concentra sulle proteine espresse e sulle loro interazioni funzionali
- **metabolomica** e la **lipidomica** indagano le piccole molecole e i loro ruoli nei processi biochimici, risultando particolarmente vicine al fenotipo e utili per l'identificazione di biomarcatori associati a stati fisiologici o patologici.

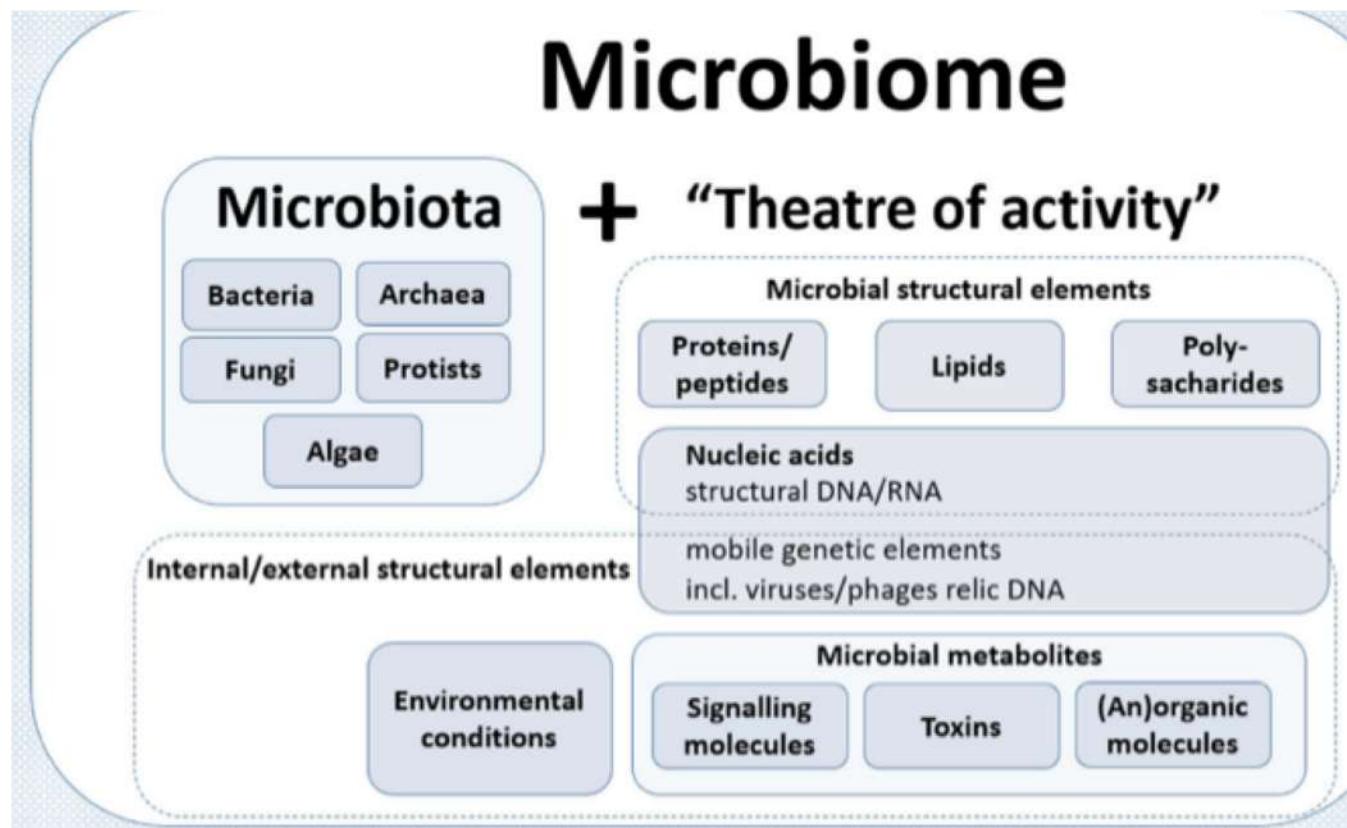
Queste tecniche sono fondamentali per lo studio del microbiota e del microbioma.

Il termine ***microbiota*** indica l'insieme dei microrganismi (batteri, archea, funghi, protisti, microalghe) che popolano un habitat ben delimitato, caratterizzato da specifiche condizioni fisico-chimiche.

Il termine ***microbioma***, invece, comprende non solo la comunità microbica caratteristica di un determinato ambiente, ma anche il suo repertorio genetico, le funzioni biologiche e le interazioni con le condizioni fisico-chimiche circostanti.

Microbiome

+ “Theatre of activity”



Biome: a reasonably well defined habitat which has distinct bio-physio-chemical properties

A queste discipline si affiancano le tecnologie omiche che utilizzano il prefisso "meta-", come la metagenomica, la metatrascrittomica e la meta metabolomica.

Il prefisso "meta-" indica uno studio che va oltre il singolo organismo, estendendosi all'analisi integrata di comunità biologiche complesse.

La **meta-tassonomica o meta-barcoding**, fornisce profili tassonomici delle comunità microbiche in un ambiente definito anche in assenza di coltivazione in laboratorio.

La **meta-genomica**, consente di esplorare la composizione genetica delle comunità microbiche in un ambiente definito, fornendo profili tassonomici e funzionali.

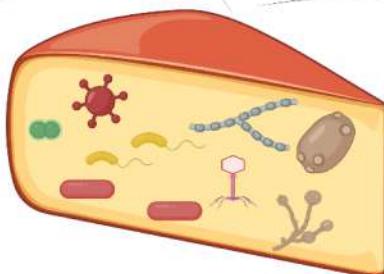
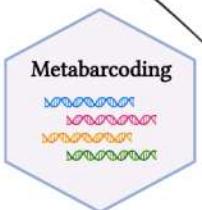
La **meta-trascrittomica**, invece, analizza l'espressione genica delle comunità microbiche, rivelando le attività biologiche in corso.

MICROBIOTA

Quali microrganismi sono presenti?

METATASSONOMIA

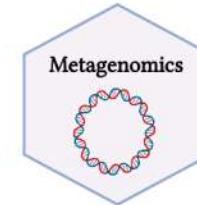
Target: 16S, ITS, 18S, 26S



Qual è il potenziale genetico?

METAGENOMICA

Target: DNA

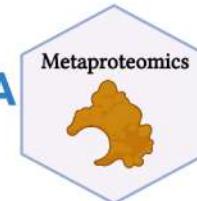


MICROBIOMA

Quali attività stanno svolgendo?

METAPROTEOMICA

Target: Proteine

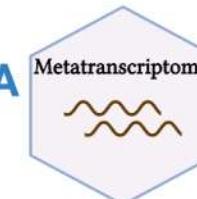


METABOLOMICA

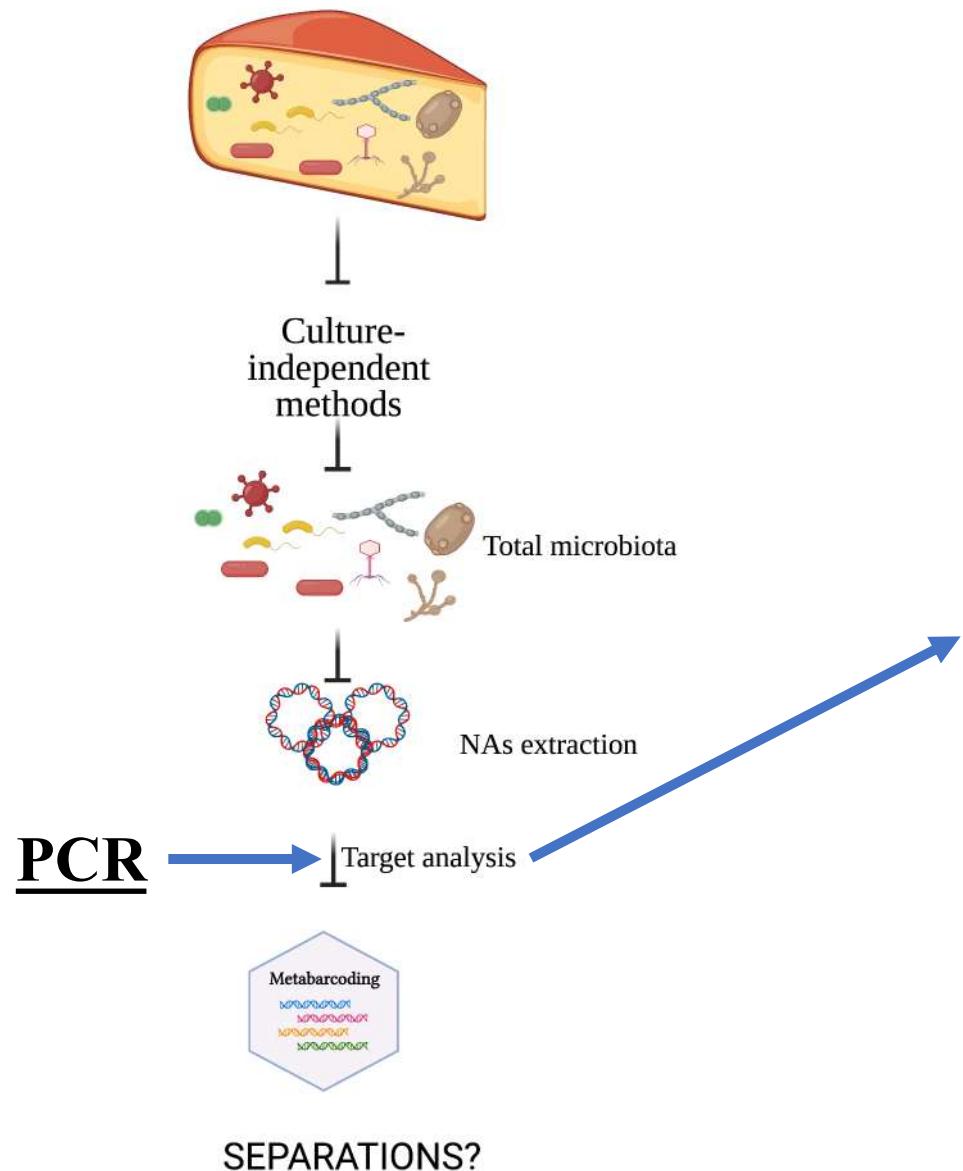
Target: Metaboliti

METATRANSCRITTOMICA

Target: RNA



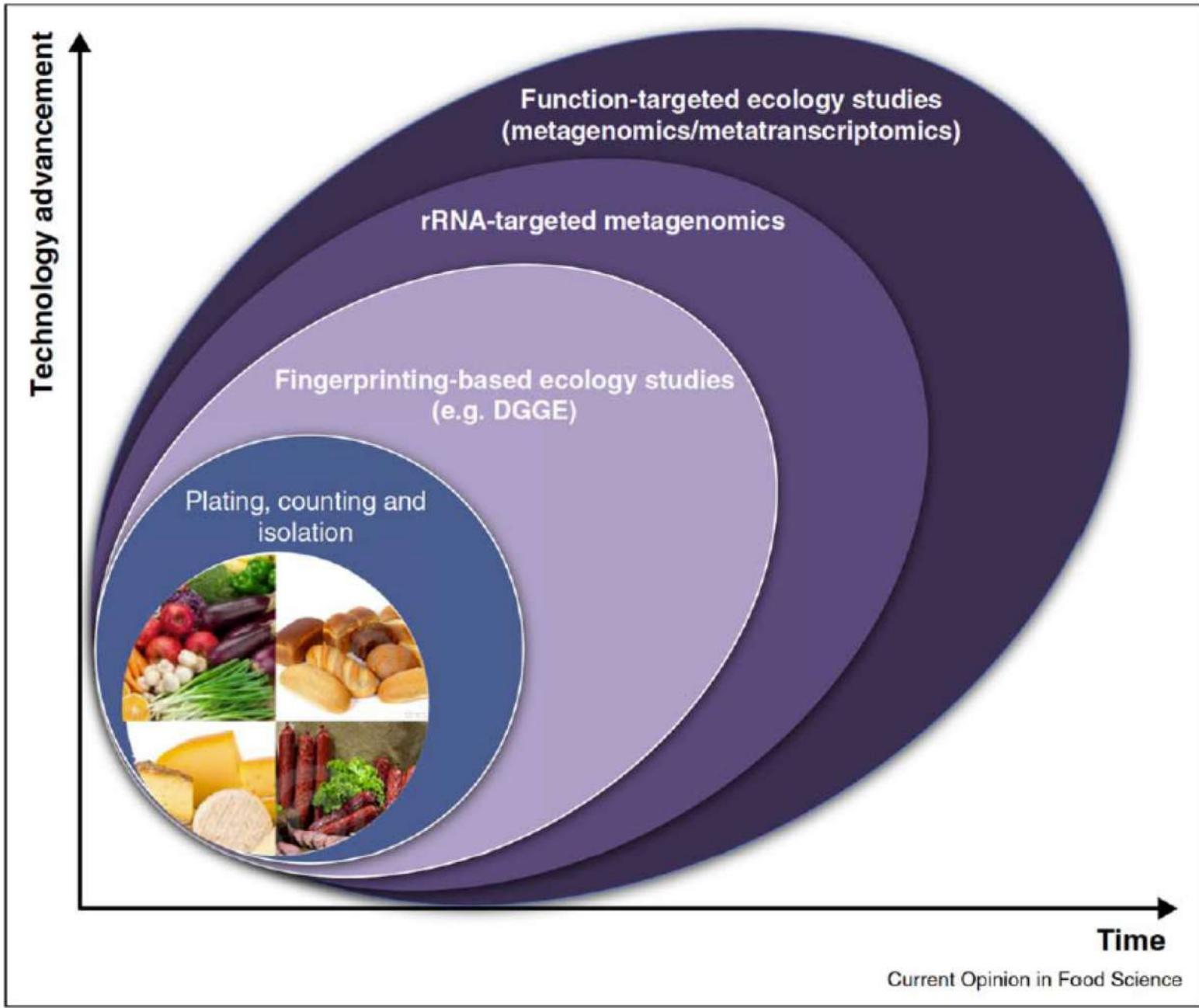
La meta-tassonomica o meta-barcoding



L'applicazione della tecnica prevede, inizialmente, un'estrazione diretta del DNA (o RNA) microbico da un campione biologico, ottenendo una miscela contenente DNA delle diverse specie microbiche ricorrenti.

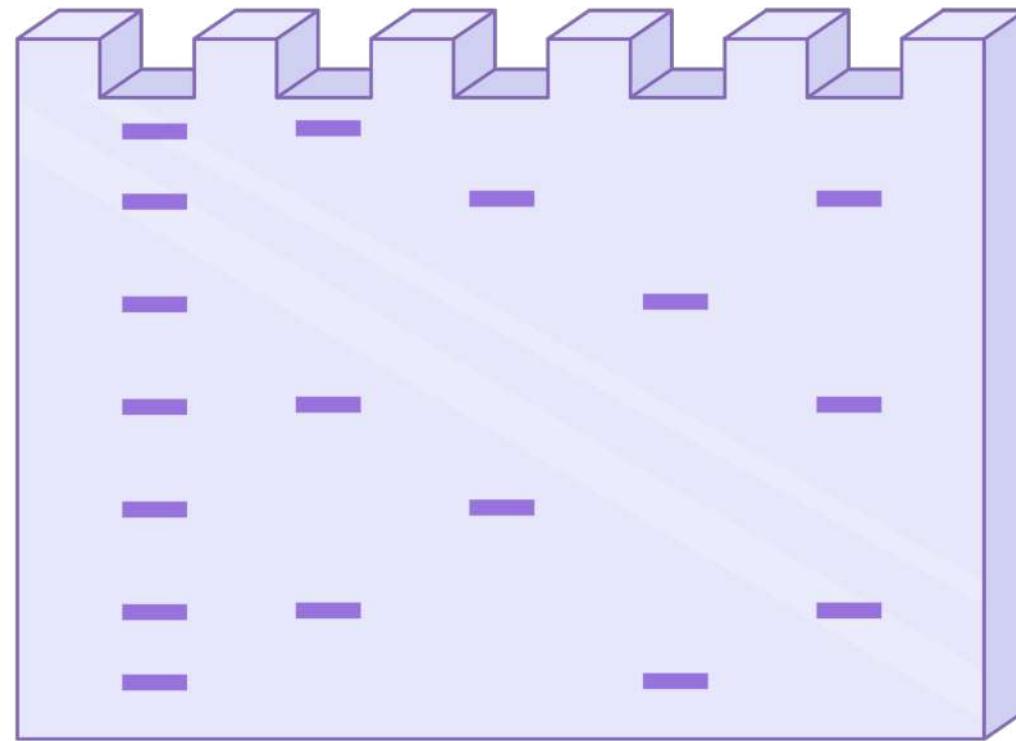
Successivamente, la miscela di DNA (o RNA) è utilizzata per l'amplificazione PCR, ottenendo una miscela di ampliconi tutti della stessa lunghezza, ma di sequenza diversa in funzione della specie microbica.

COME SEPARO GLI AMPLICONI?



Le tecniche di fingerprinting molecolare barcoding

Si basano sull'amplificazione degli acidi nucleici, tramite PCR, che sono poi separati mediante tecniche elettroforetiche. La tecnica più comune è la Polymerase Chain Reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE).

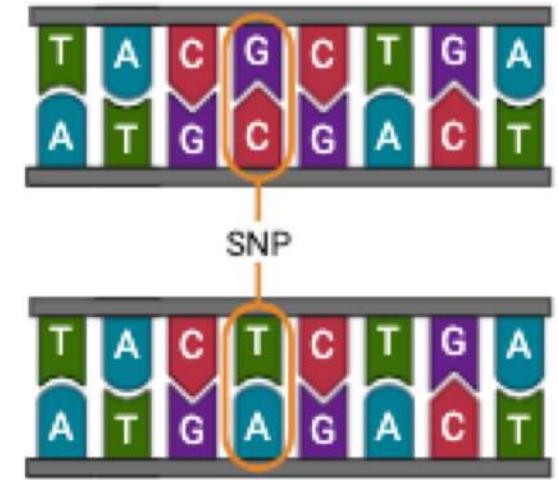


PRINCIPIO Questa tecnica è basata sulla separazione di ampliconi PCR della stessa lunghezza, appartenenti a specie microbiche diverse.

Attraverso la DGGE **possono essere separati frammenti di DNA della stessa lunghezza, ma con una sequenza di basi nucleotidiche differente.**

Nel caso dei batteri, specie diverse hanno differenti sequenze del gene ribosomiale 16S e per questo motivo ampliconi 16S di diverse specie migrano differentemente in elettroforesi con gel di poliacrilammide con gradienti di urea e formammide (DGGE) oppure se sottoposti a un gradiente di denaturazione termico (TGGE).

Consente di ottenere un fingerprint della comunità microbica da un campione biologico, fotografandone la diversità in specie microbiche senza ricorso all'isolamento



- Analisi della **diversità microbica (microbiota)** in campioni biologici
 - Identificazione dei **microorganismi dominanti e minoritari** senza la necessità di coltivarli in laboratorio (tracking).
- . Identificazione di **microorganismi specifici**

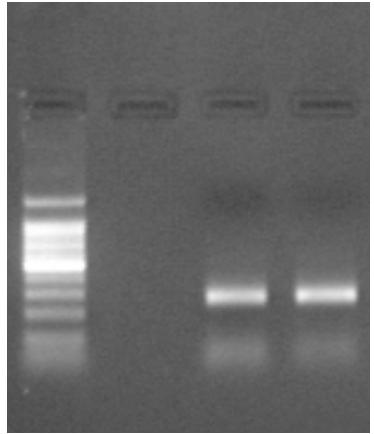
Vantaggi della DGGE

- Permette di studiare microorganismi **non coltivabili**.
- Offre una **visione globale della comunità microbica**.
- È relativamente **rapida**.

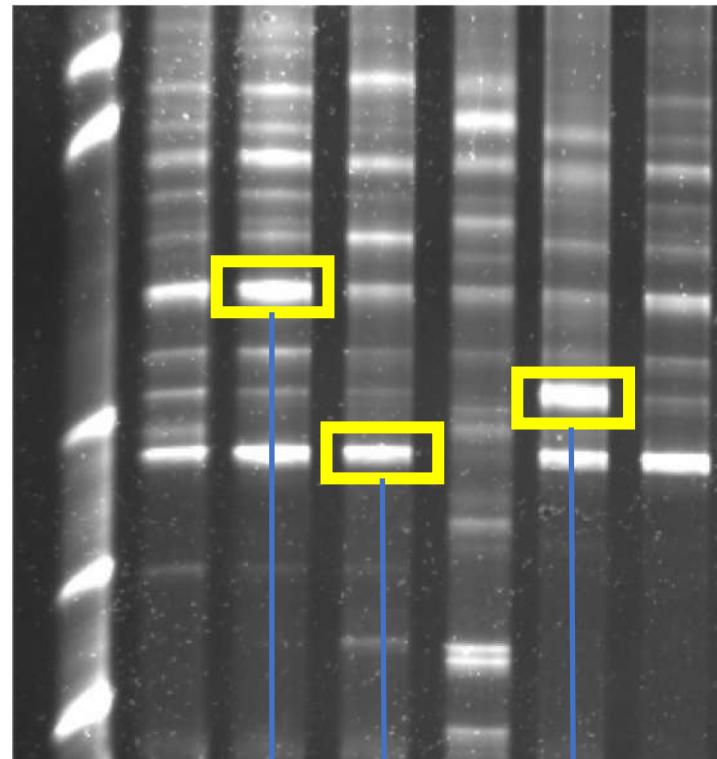
Limiti

- Non fornisce informazioni quantitative precise.
- La risoluzione può essere limitata per comunità molto complesse.
- Spesso è seguita da **sequenziamento del DNA** per l'identificazione precisa dei ceppi.

Gel d'agarosio



DGGE

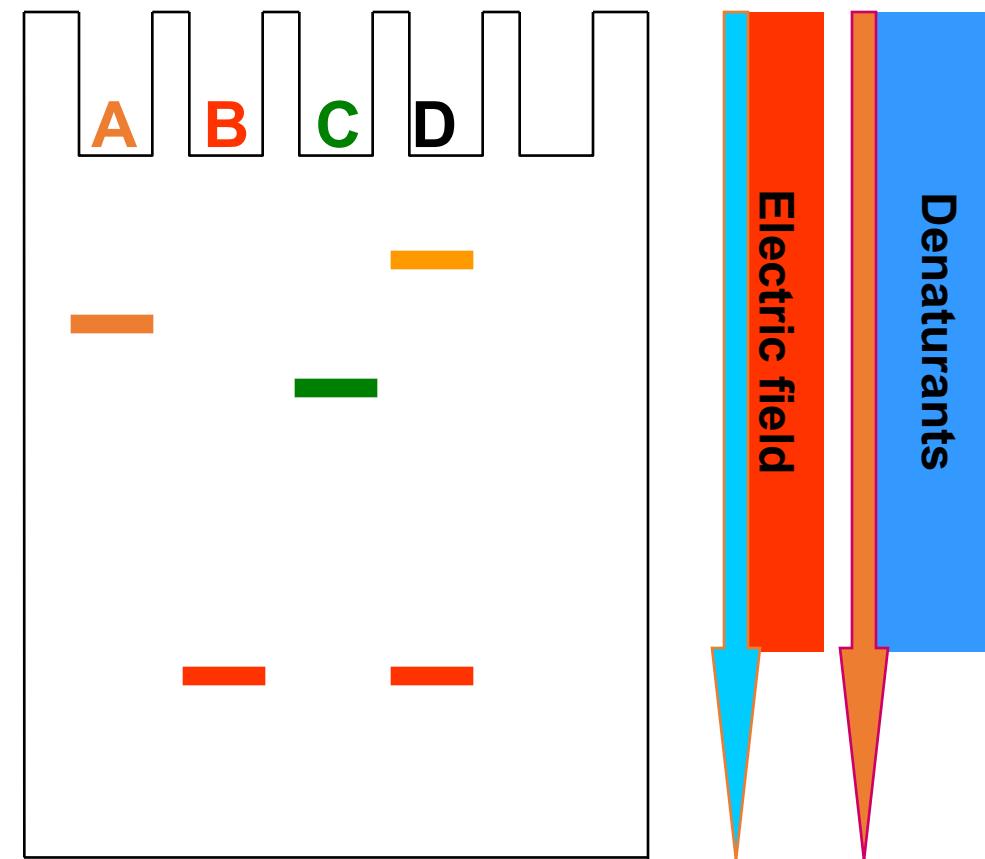
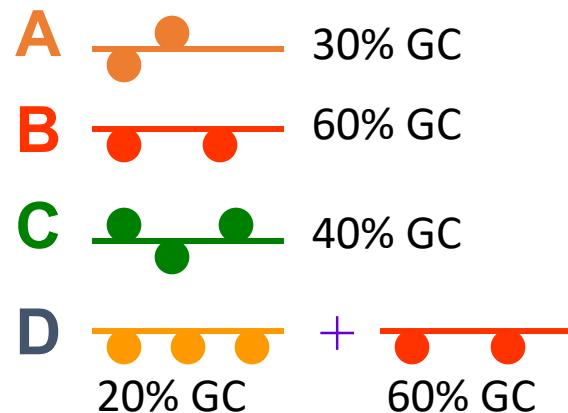


Dopo elettroforesi mediante DGGE, il risultato è un fingerprint specifico per il campione analizzato in cui si ha un numero di bande correlato al numero di specie microbiche originariamente presenti nel campione di partenza, mentre la migrazione delle bande nel gel sarà funzione della sequenza nucleotidica.

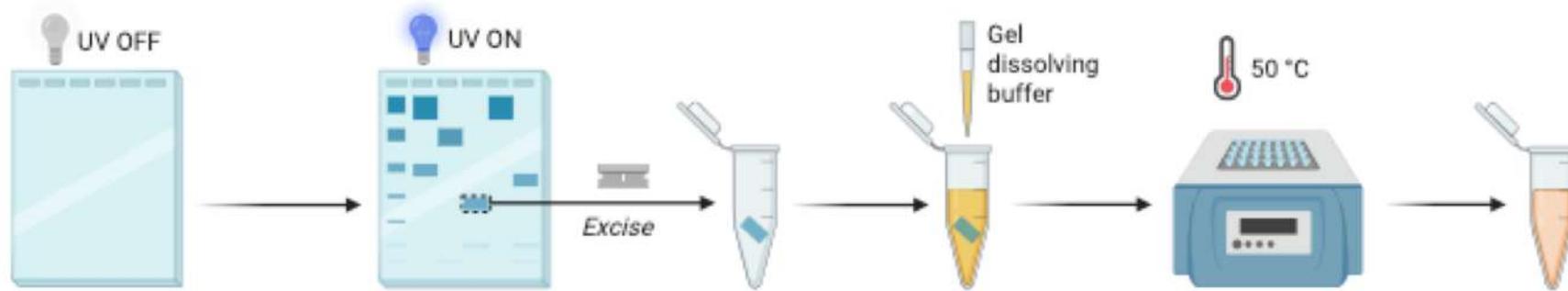
IDENTIFICATION

DGGE separation

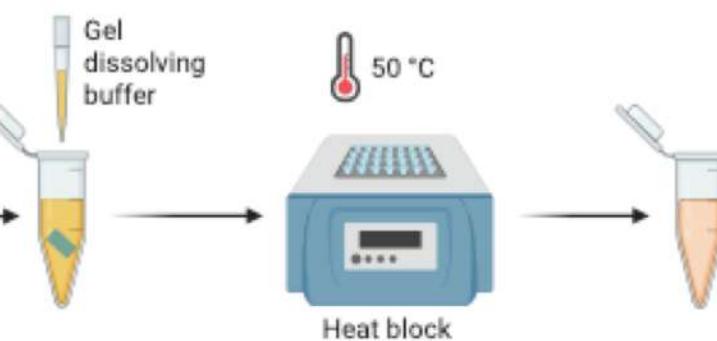
PCR products with different nucleotide sequence



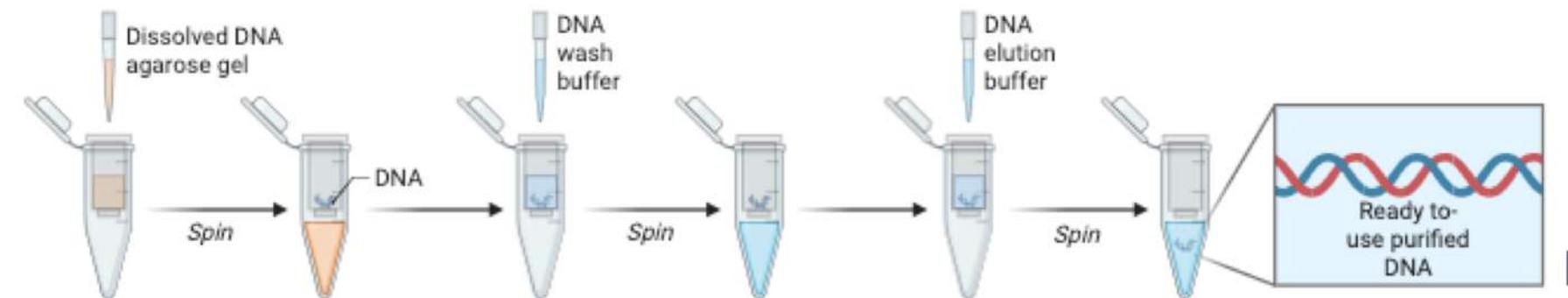
1 Excise band of interest



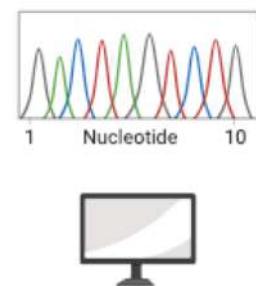
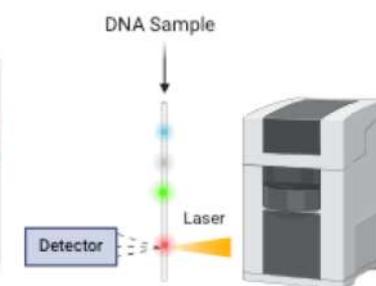
2 Dissolve agarose



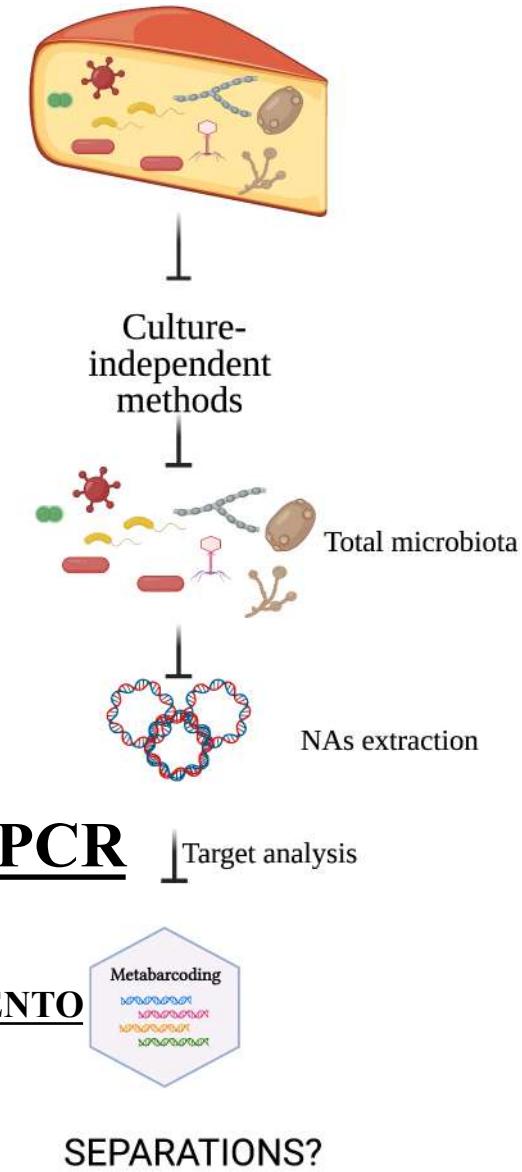
3 Bind DNA to matrix



4 Elute DNA



La meta-tassonomica o meta-barcoding o amplicon sequencing

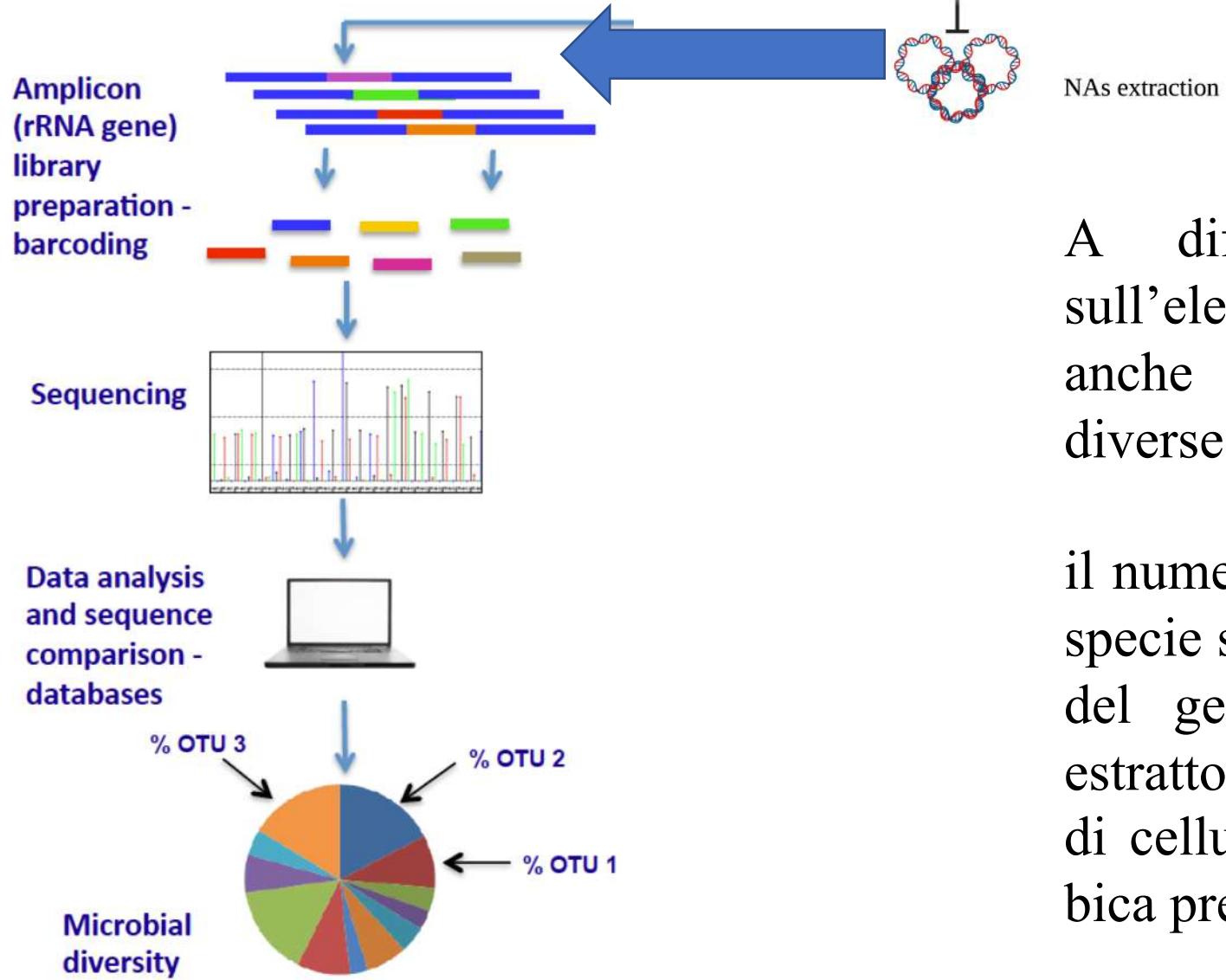


Il **meta-barcoding o amplicon sequencing** rappresenta una tecnica innovativa di sequenziamento target che consente di identificare le specie in modo rapido, standardizzato e affidabile attraverso l'analisi di brevi sequenze di DNA, generalmente comprese tra 400 e 800 paia di basi.

Queste sequenze, chiamate *barcode* funzionano come marcatori univoci: regioni del genoma sufficientemente variabili da distinguere organismi diversi, ma al tempo stesso stabili all'interno della stessa specie, in modo da garantire un riconoscimento accurato.

I geni più frequentemente impiegati come *barcode* variano a seconda del regno di appartenenza: COI (cytochrome c oxidase I) negli animali, matK nelle piante, 16S rRNA nei procarioti e la regione ITS nei funghi.

Microbiota



A differenza degli approcci basati sull'elettroforesi, sarà possibile ottenere anche una quantificazione relativa delle diverse specie

il numero di sequenze ottenuto per ciascuna specie sarà proporzionale al numero di copie del gene amplificato presenti nel DNA estratto (e quindi, indirettamente, al numero di cellule di una determinata specie micobica presenti nel campione).

Lo scopo principale del ***meta-barcoding o amplicon sequencing*** è fornire un metodo standardizzato e universale per l'identificazione micròbica.

Si tratta di uno strumento particolarmente utile in tutti quei casi in cui la determinazione morfologica è difficile o impossibile. In queste situazioni, l'approccio molecolare permette di superare i limiti delle tecniche tradizionali, fornendo risposte affidabili anche in contesti complessi.

Un altro punto di forza è la capacità di distinguere specie strettamente affini, spesso morfologicamente indistinguibili, note come “specie gemelle”.

sarà possibile ottenere l'abbondanza relativa di ciascuna specie nel campione analizzato.

A ciò si aggiungono i vantaggi pratici della tecnica: rapidità, economicità e riproducibilità, che hanno contribuito alla sua rapida adozione a livello internazionale.

Le applicazioni del DNA barcoding sono molteplici e spaziano in ambiti diversi:

Ricerca scientifica – identificazione rapida delle specie, studi filogenetici ed evolutivi, valutazione della biodiversità in ecosistemi complessi.

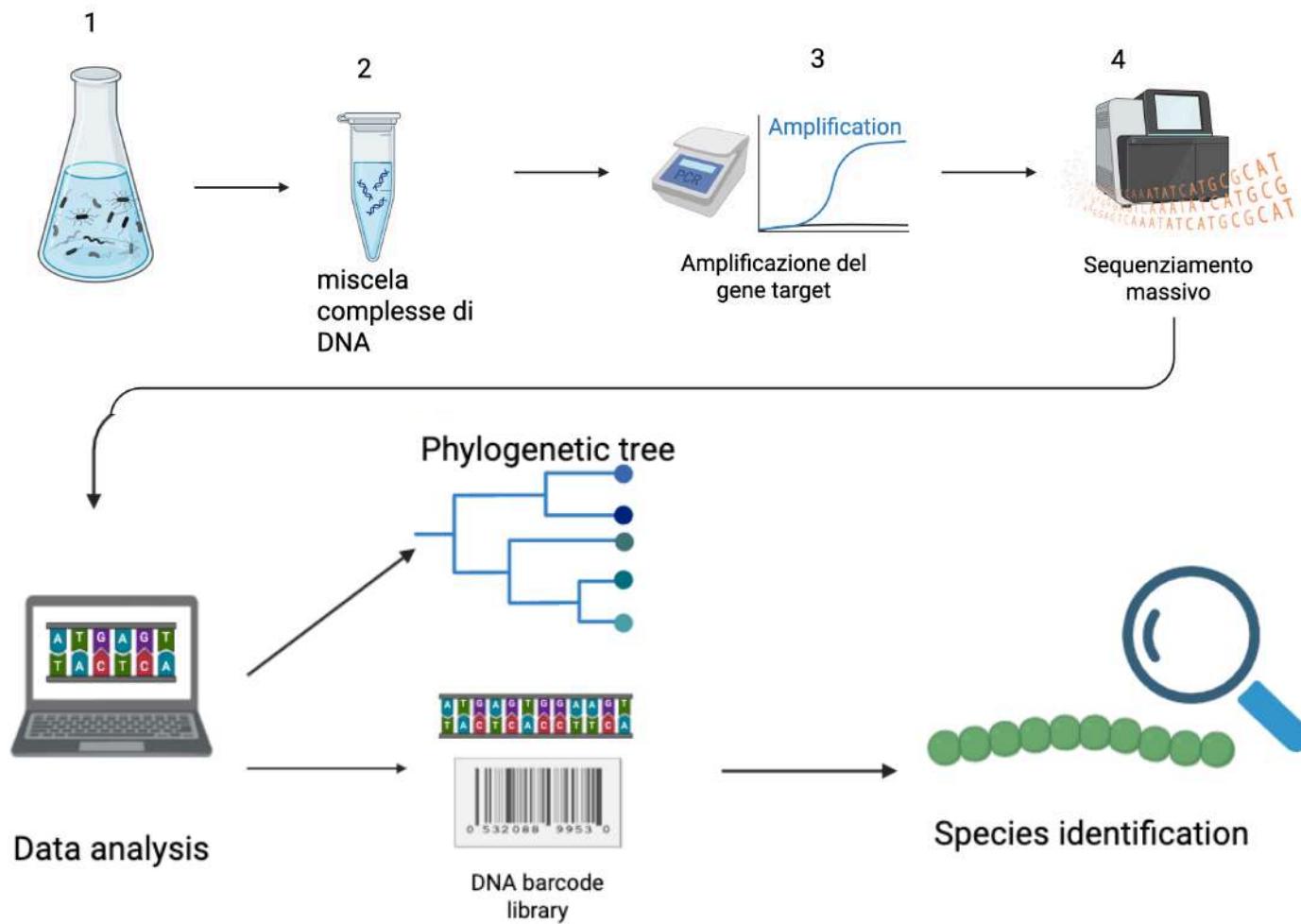
Conservazione – monitoraggio di specie a rischio, rilevamento di organismi invasivi, gestione e protezione degli habitat naturali.

Scienze forensi – analisi di campioni biologici in indagini criminali o nel contrasto al traffico illegale di fauna selvatica.

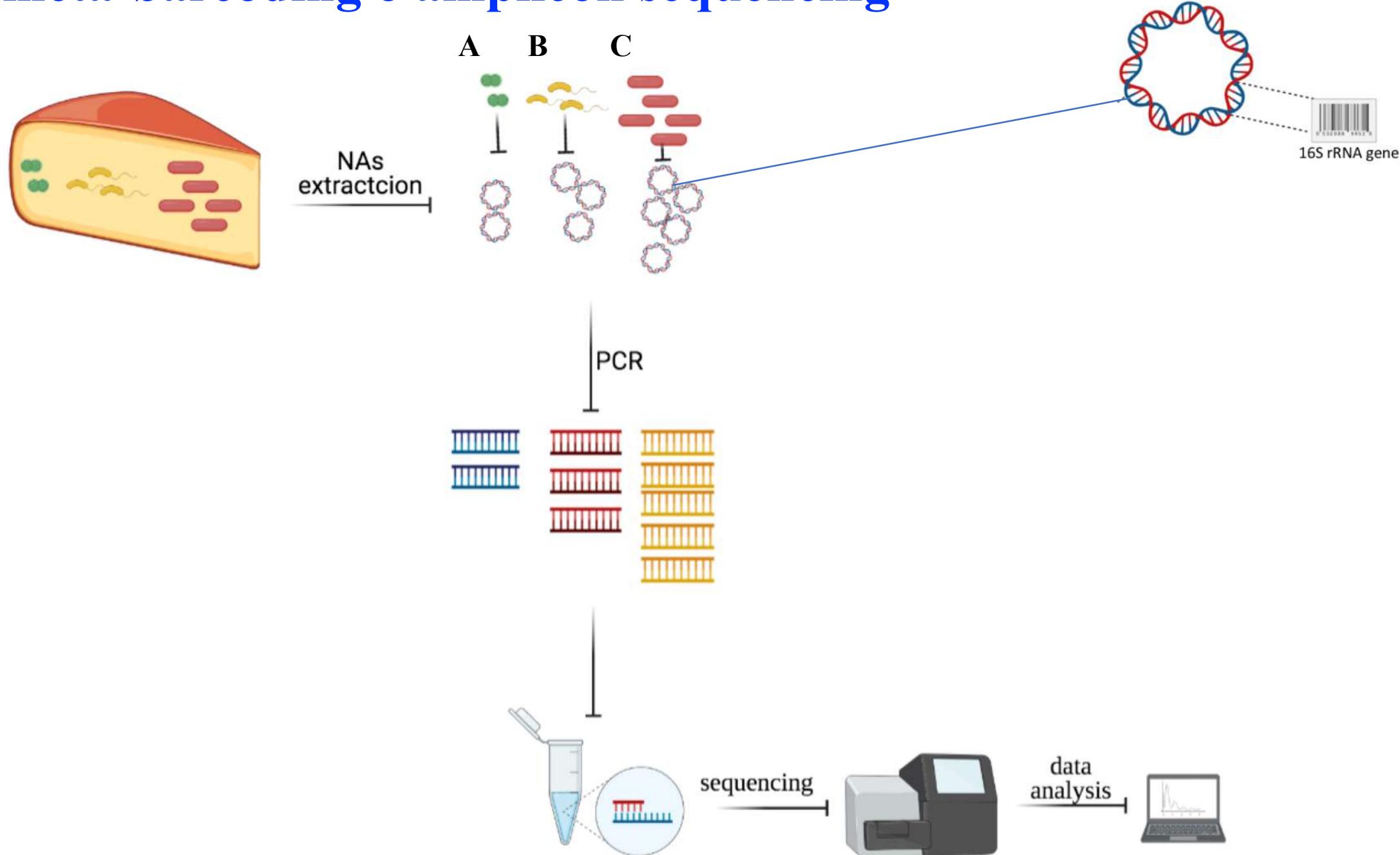
Industria – controllo di qualità e autenticità di alimenti, farmaci, prodotti naturali e materie prime.

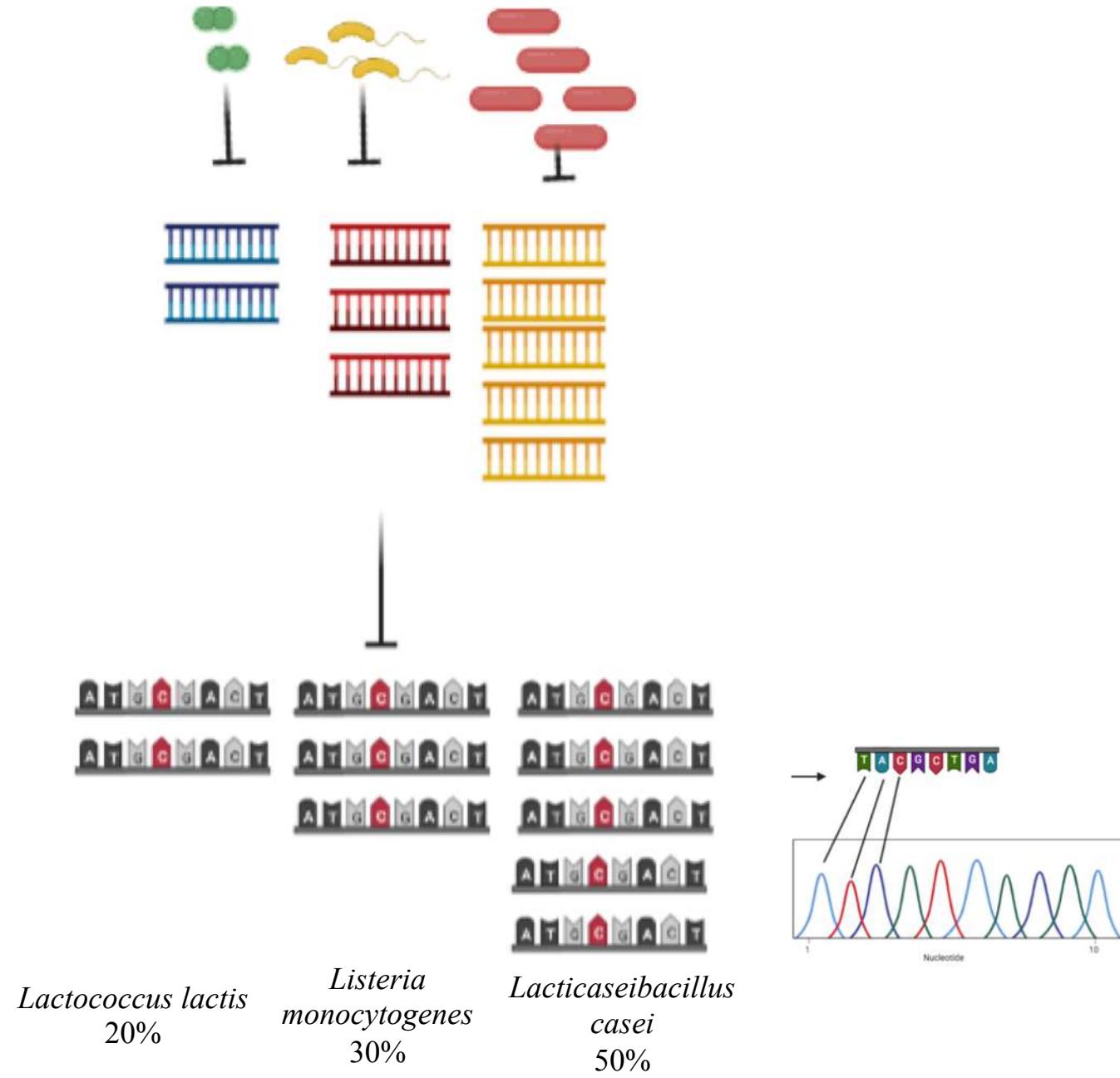
Citizen science – progetti partecipativi in cui i cittadini contribuiscono raccogliendo campioni e arricchendo le banche dati, migliorando la conoscenza della biodiversità a scala locale e globale.

Gli step principali prevedono la raccolta dei campioni biologici, l'estrazione del DNA/RNA, l'amplificazione mediante PCR, il sequenziamento e l'analisi dei dati

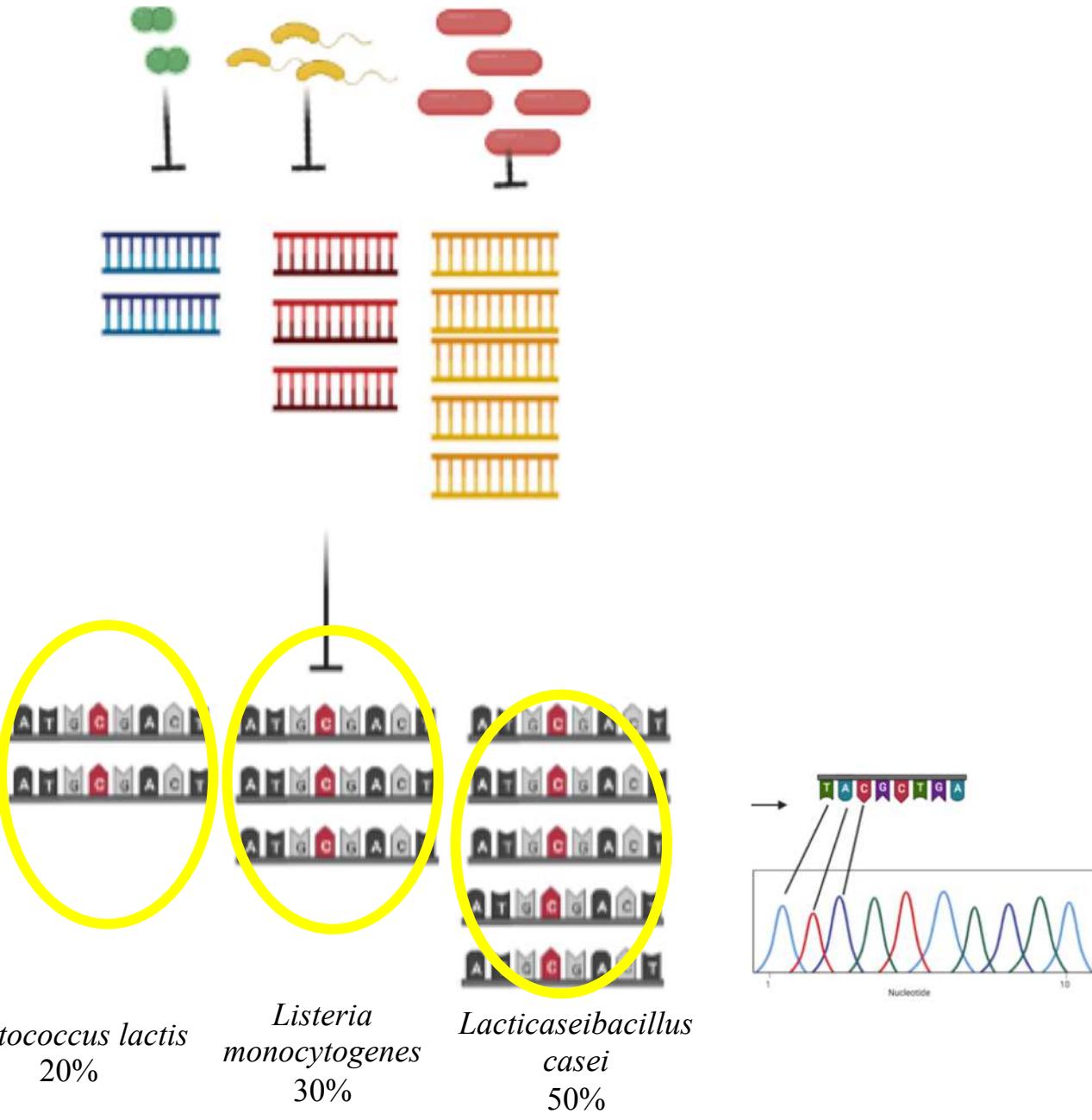


meta-barcoding o amplicon sequencing



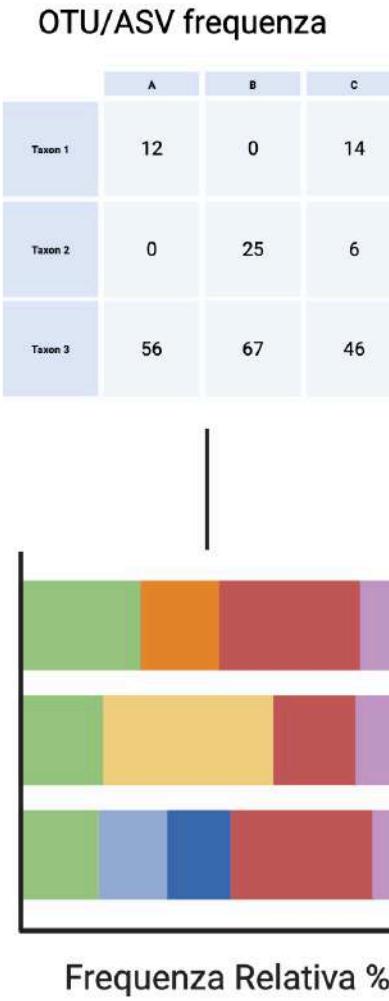
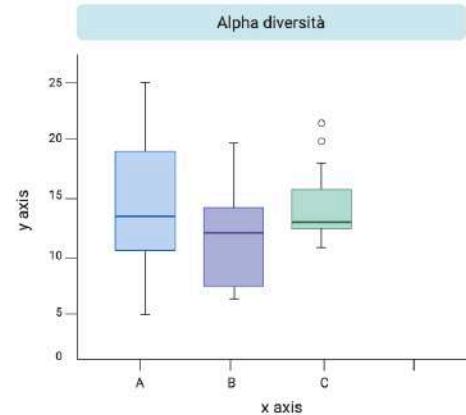


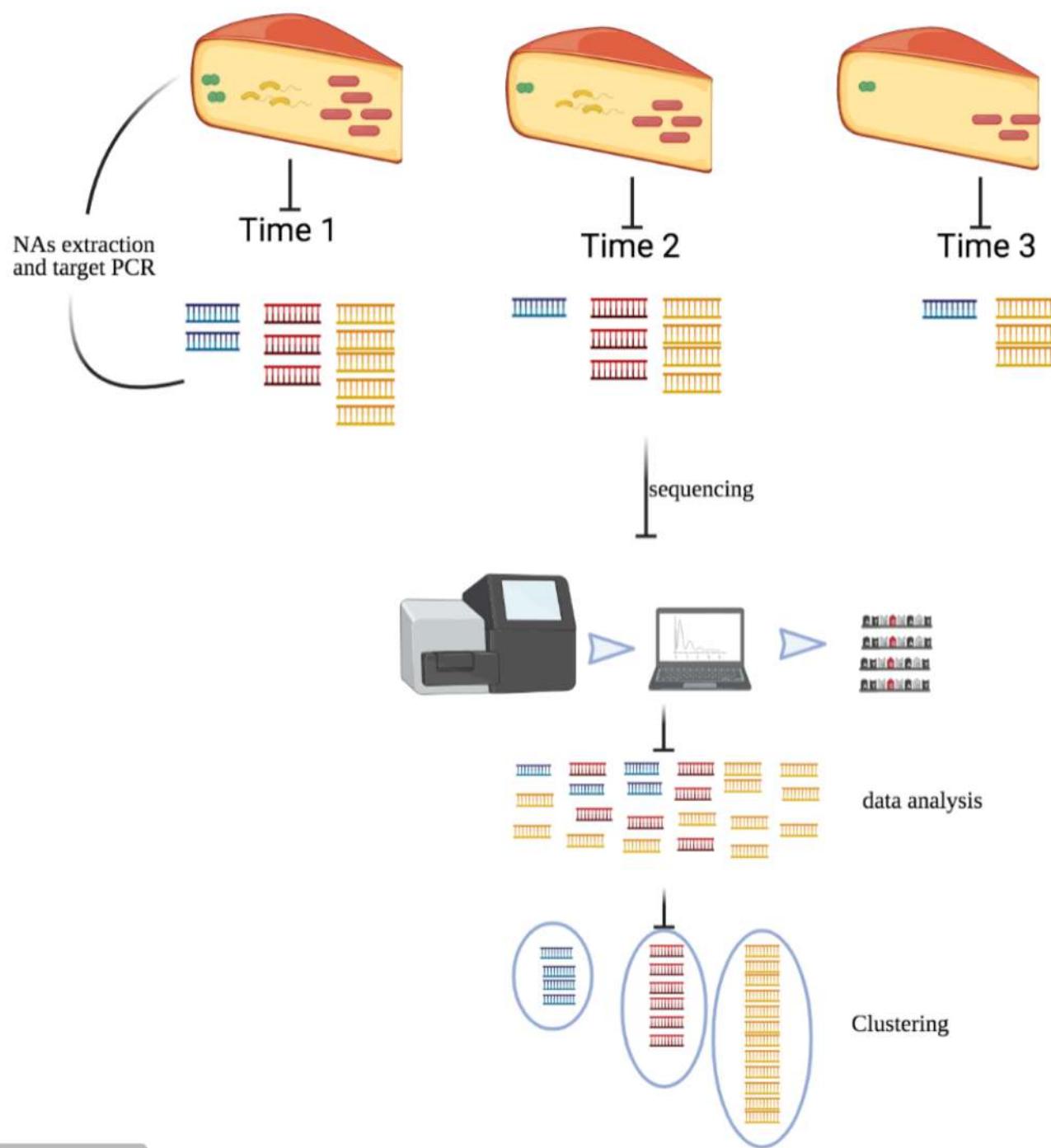
Le sequenze ottenute possono essere raggruppate in cluster le OTU (Unità Operative Tassonomiche), che raggruppano le sequenze in base a una soglia di similarità (es. 97%),

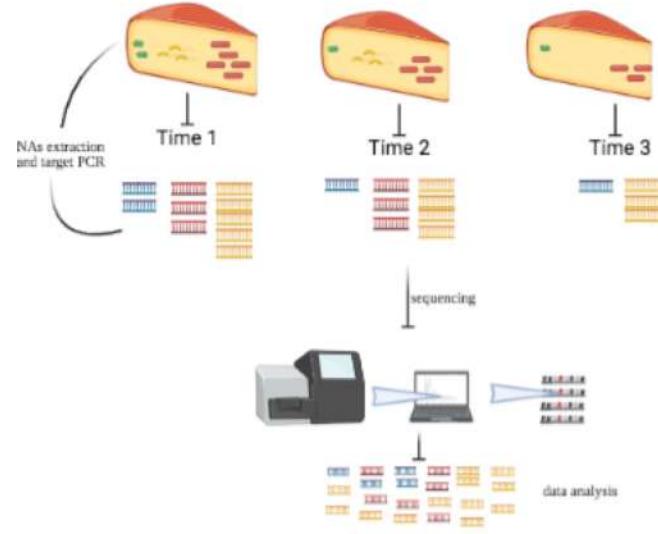


Dopo l'assegnazione tassonomica, si costruisce una tabella campione-per-OTU, in cui ogni riga rappresenta un'unità tassonomica e ogni colonna un campione. I valori della tabella indicano il numero di sequenze assegnate a ciascuna unità.

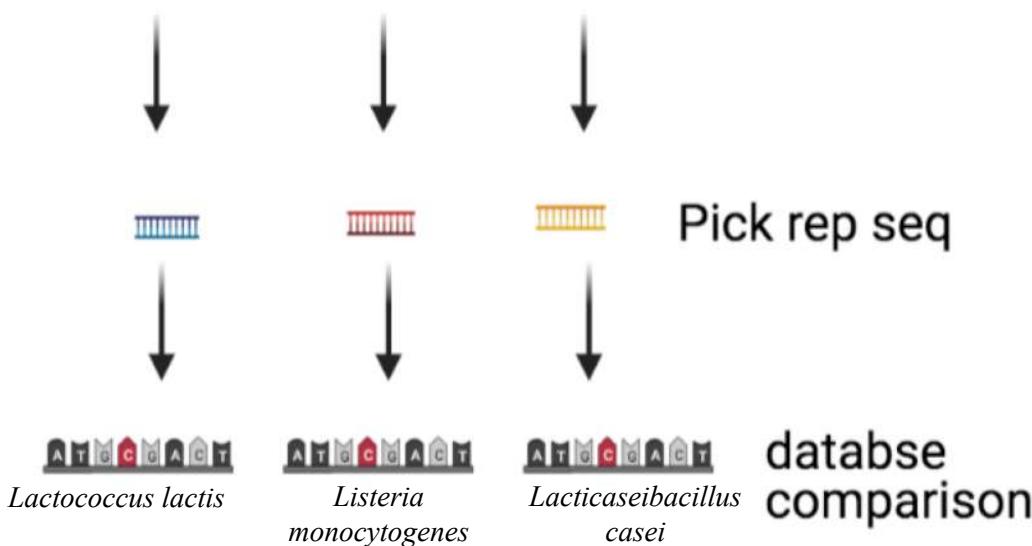
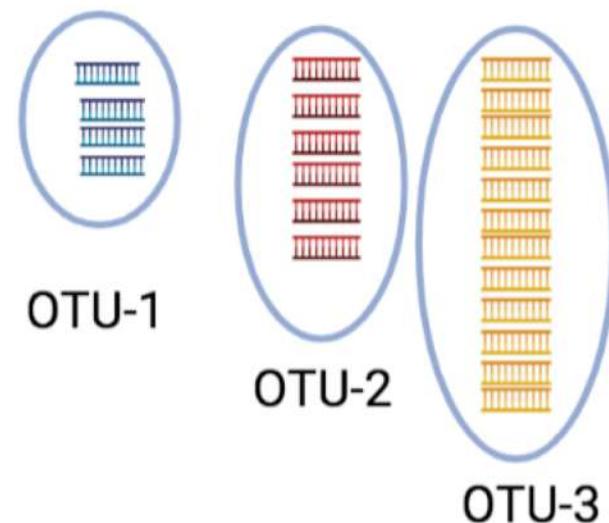
Le tabelle di frequenza relativa costituiscono anche la base per calcolare la diversità alfa (la complessità all'interno di un singolo campione) o beta (le differenze tra comunità di campioni diversi).

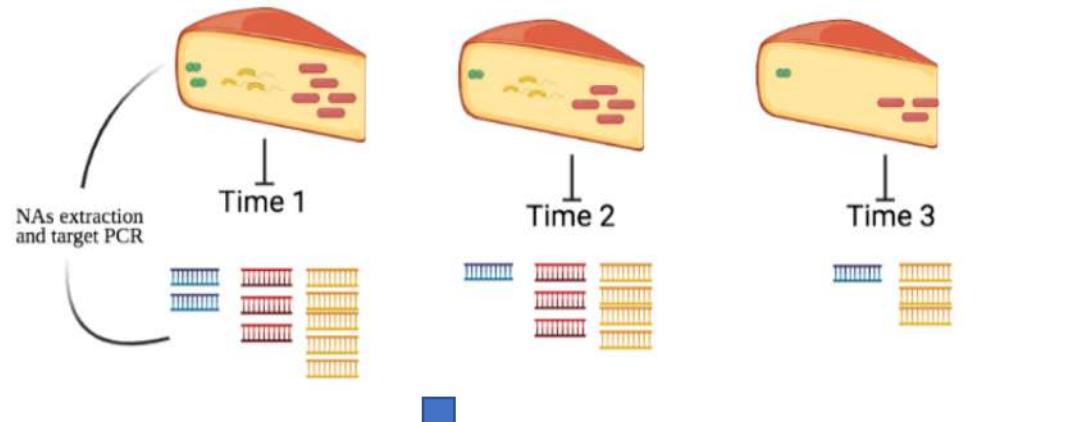




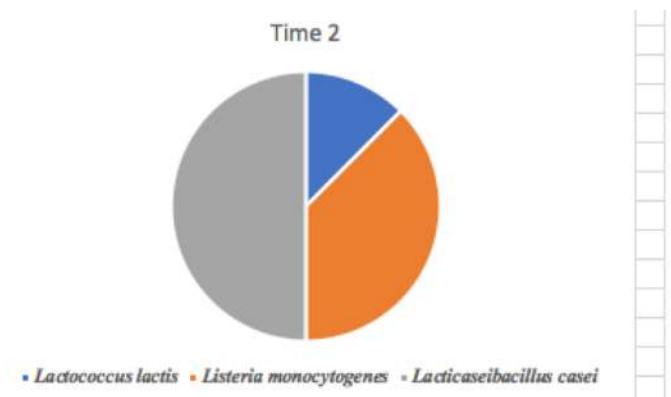
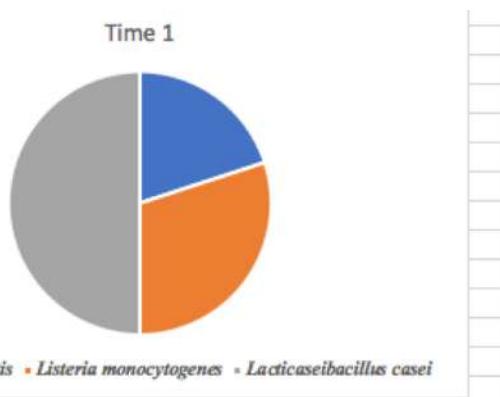
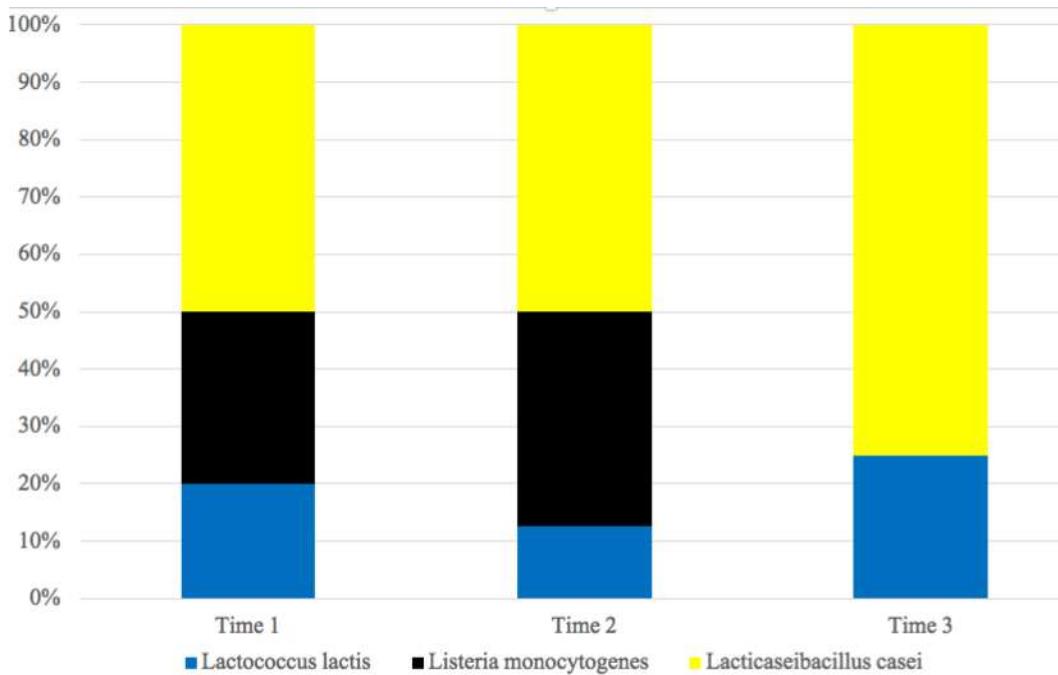


Sequence clustering into Operational taxonomic units OTUs





	Time 1	Time 2	Time 3
<i>Lactococcus lactis</i>	2	1	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	3	0
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	5	4	3



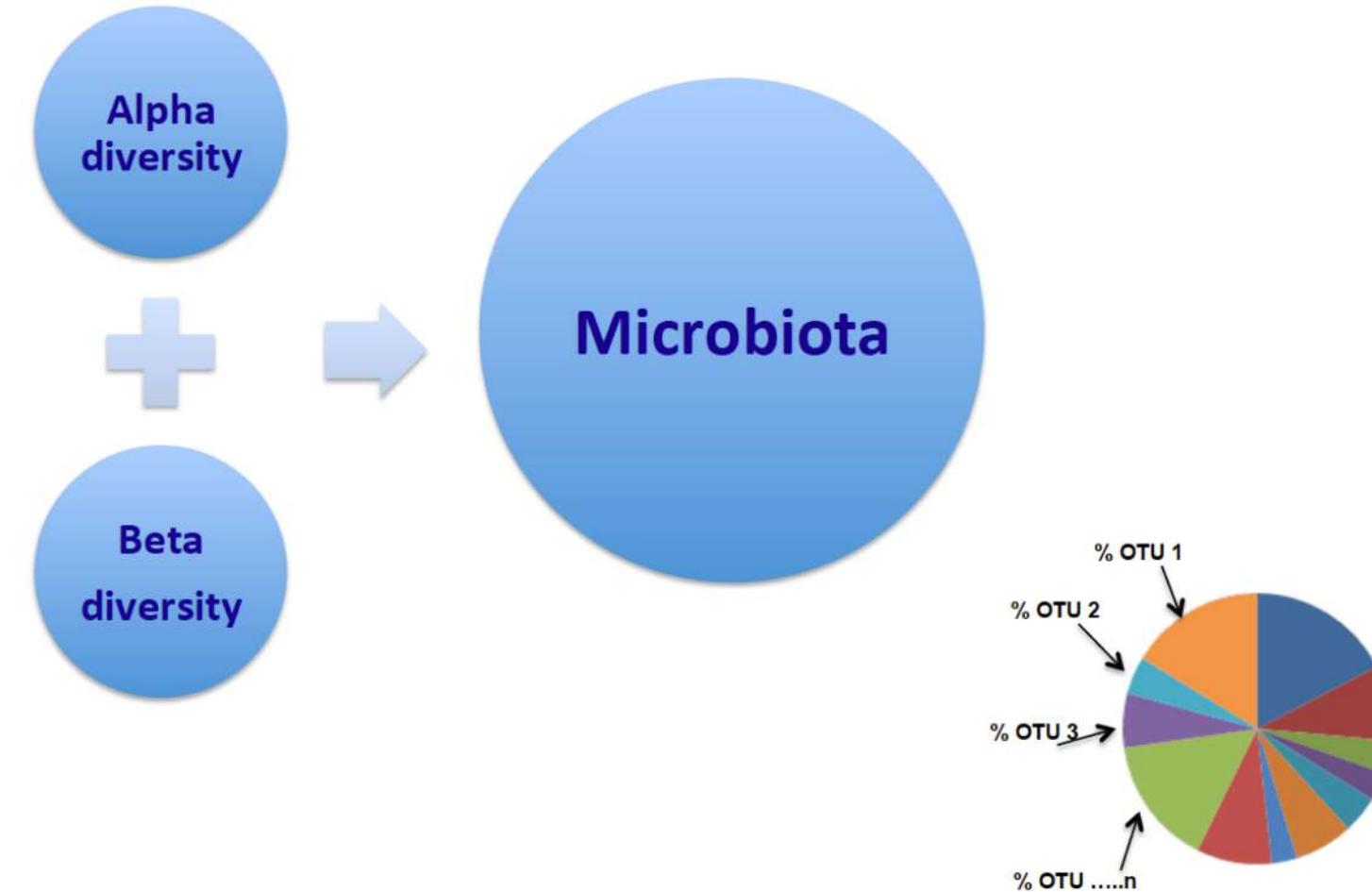
DIVERSITÀ MICROBIICA

Quando si fa **amplicon sequencing**, si ottiene una “fotografia” delle comunità microbiche presenti in un campione biologico.

Le diversità si possono misurare a due livelli principali:

Alpha Diversity (diversità interna al campione)

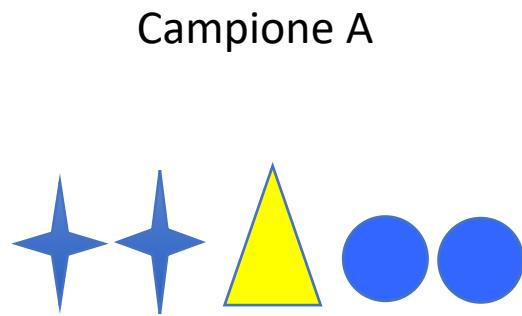
Beta Diversity (diversità tra campioni)



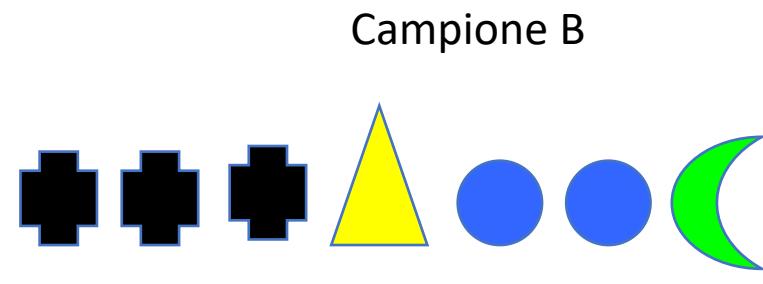
Alpha Diversity (diversità interna al campione)

È la ricchezza e uniformità di specie (o di OTUs) all'interno di un singolo campione.
In altre parole:

“Quante specie diverse ci sono e quanto sono equilibrate tra loro nel mio campione?”



Alpha diversity=3



Alpha diversity=4

Alpha Diversity (diversità interna al campione)

Prodotto	Descrizione	Risultato atteso
Yogurt artigianale vs industriale	Si confrontano due yogurt prodotti con diverse colture starter.	?
Formaggio durante la stagionatura	Analisi del microbiota a 0, 30, 90 giorni.	?
Prosciutto crudo	Confronto tra la parte superficiale e quella interna.	?

Prodotto	Descrizione	Risultato atteso
Yogurt artigianale vs industriale	Si confrontano due yogurt prodotti con diverse colture starter.	L'artigianale può avere alpha diversity più alta , perché contiene una comunità più ricca di batteri lattici autoctoni.
Formaggio durante la stagionatura	Analisi del microbiota a 0, 30, 90 giorni.	L'alpha diversity aumenta nei primi stadi (sviluppo di microflora) e poi diminuisce quando poche specie diventano dominanti.
Prosciutto crudo	Confronto tra la parte superficiale e quella interna.	La superficie ha maggior diversità , per esposizione a aria e contaminazioni ambientali.

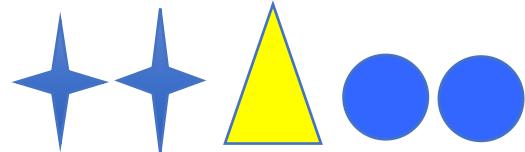
Beta Diversity (diversità tra campioni)

Misura quanto sono diverse le comunità microbiche tra campioni diversi.

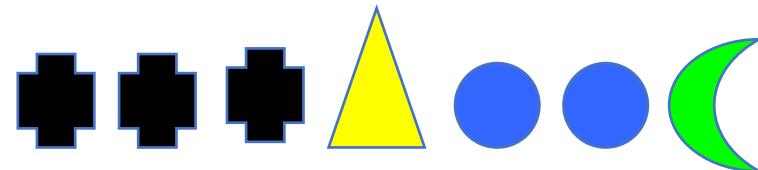
In altre parole:

“Quanto differisce la composizione microbica di un alimento rispetto a un altro?”

Sample A



Sample B



Specie condivise = 2 (triangolo, cerchio)

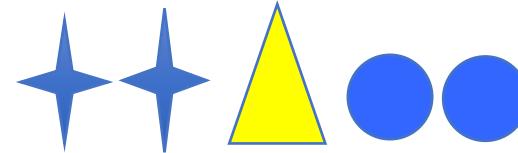
Specie uniche = 3 (stella, croce, mezzaluna)

Totale specie osservate = 5

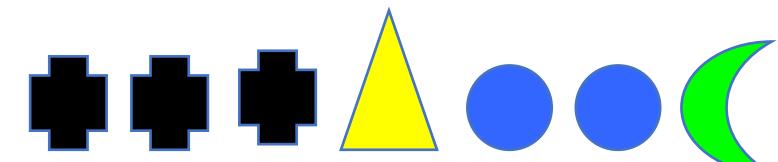
Specie condivise = 2

Beta Diversity = $1 - (2/5) = 0.6$

Sample A



Sample B



Totale specie osservate = 5

Specie condivise = 2

Beta Diversity = $1 - (2/5) = 0.6$

Valore 0 = comunità identiche

Valore 1 = completamente diverse

0.6 indica una differenza moderatamente alta: i due campioni condividono parte delle specie, ma ciascuno ha anche specie uniche.

Pane con lievito madre vs pane con lievito di birra

Analizzare come cambia la comunità microbica tra due processi.

Alta **beta diversity** → comunità molto diverse (più batteri lattici nel lievito madre).

Campioni di birra artigianale in diversi lotti

Controllo di qualità.

Bassa **beta diversity** = produzione stabile e coerente nel tempo.