

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Dipartimento di Scienze Ambientali

Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali

Dottorato di ricerca in Biotecnologie

Ciclo XXIV

2009-2011

METODI MOLECOLARI PER LA RILEVAZIONE DI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI E NELL'AMBIENTE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Docenti Guida:

Chiar.ma Prof.ssa Anna Maria Sanangelantoni

Dott.ssa Caterina Agrimonti

Dottoranda: Dott.ssa Laura Bortolazzi

Indice

1. Abstract	pag. 1
2. Riassunto	pag. 4
3. Sigle e abbreviazioni	pag. 7
4. L'importanza e il ruolo dei microrganismi	pag. 10
5. La microbiologia diagnostica: questioni irrisolte	pag. 11
6. L'ecologia microbica alla base dell'identificazione batterica	pag. 14
7. Metodi genotipici (molecolari): uno sguardo d'insieme	pag. 14
8. Rilevazione qualitativa e quantitativa di batteri contaminanti la carne di pollo	pag. 19
8.1 Le tossinfezioni alimentari	pag. 19
8.2 Le carni avicole: contenuto microbico e processo di lavorazione	pag. 21
8.3 Microrganismi contaminanti la carne di pollo	pag. 24
8.3.1 <i>Salmonella enterica</i>	pag. 24
8.3.2 <i>Campylobacter jejuni</i>	pag. 25
8.4 Normativa	pag. 27
8.5 Metodi classici e molecolari applicati all'analisi microbiologica della carne	pag. 31
8.5.1 <i>Rilevazione basata sul fluoroforo SYBR®GreenER™</i>	pag. 34
8.5.2 <i>Rilevazione basata sul saggio delle sonde TaqMan®</i>	pag. 36
9. Studio preliminare di comunità microbiche in una matrice ambientale complessa	pag. 38
9.1 Metodi classici e molecolari applicati all'analisi microbiologica ambientale	pag. 38
9.1.1 <i>Le tecniche tradizionali non bastano</i>	pag. 38
9.1.2 <i>PCR e Real Time PCR</i>	pag. 39
9.1.3 <i>ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) e ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)</i>	pag. 42
9.2 Il metabolismo dell'azoto e i microrganismi coinvolti	pag. 45
9.3 Perché studiare la flora microbica di sedimenti in sistemi fluviali eutrofici, in presenza-assenza di macrofite radicate	pag. 49
9.4 Eutrofizzazione: cenni storici e definizione del fenomeno in sistemi fluviali	pag. 52
9.5 Il caso di studio: Massimbona	pag. 54

9.6	<i>Vallisneria spiralis</i> : una macrofita ecologicamente interessante	pag. 56
10.	Scopo della ricerca	pag. 59
11.	Materiali e metodi	pag. 61
11.1	<i>Salmonella enterica</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> nella carne di pollo	pag. 61
11.1.1	DNA genomico batterico di riferimento	pag. 61
11.1.2	Colture di <i>Salmonella enterica</i>	pag. 61
11.1.3	Colture di <i>Campylobacter jejuni</i>	pag. 61
11.1.4	Contaminazione artificiale di filetto di pollo	pag. 62
11.1.5	Determinazione di <i>Salmonella enterica</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> nella carne di pollo tramite Real Time PCR con SYBR®GreenER™	pag. 63
	Estrazione del DNA genomico batterico	pag. 63
	Primer oligonucleotidici	pag. 64
	Real Time PCR	pag. 64
	Sviluppo di un controllo di amplificazione	pag. 65
	Prova di validazione del metodo di quantificazione in pollo di <i>S. enterica</i> e <i>C. jejuni</i> basato su SYBR®Green su macchine per PCR diverse e con operatori diversi	pag. 66
	Prova del metodo presso un'azienda del settore avicolo	pag. 67
11.1.6	Determinazione di <i>Salmonella enterica</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> nella carne di pollo tramite Real Time PCR con le sonde TaqMan® MGB	pag. 69
	Estrazione del DNA genomico batterico	pag. 69
	Primer oligonucleotidici, sonde e PCR	pag. 69
	Ottimizzazione della concentrazione dei primer	pag. 71
	Determinazione del LOD e dell'intervallo di linearità delle reazioni	pag. 71
	Prove su colture pure di <i>S. enterica</i> e <i>C. jejuni</i> e campioni di pollo contaminati con questi due microrganismi	pag. 72
11.2	La comunità microbica di sedimenti in presenza-assenza di <i>Vallisneria spiralis</i>	pag. 73
11.2.1	Microbiologia classica. Isolamento dei batteri coltivabili coinvolti nel ciclo dell'azoto	pag. 73
	Campionamento	pag. 73
	Terreni per l'arricchimento e la selezione dei batteri coinvolti nel metabolismo dell'azoto	pag. 74
	Estrazione del DNA genomico, PCR del 16S rDNA	pag. 76

ARDRA e sequenziamento	pag. 77
(A)RISA dei batteri identificati	pag. 77
11.2.2 <i>Primer specifici per batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto</i>	pag. 79
Ricerca bibliografica	pag. 79
11.2.3 <i>Informazioni ottenute sulla comunità batterica</i>	pag. 79
Campionamento ed estrazione del DNA genomico ambientale	pag. 79
PCR e ARISA	pag. 80
12. Risultati e discussione	pag. 83
12.1. <i>Salmonella enterica e Campylobacter jejuni</i> nella carne di pollo	pag. 83
12.1.1 <i>Salmonella enterica: scelta del gene invA</i>	pag. 83
12.1.2 <i>Campylobacter jejuni: scelta del gene wlaL</i>	pag. 83
12.1.3 <i>Determinazione di Salmonella enterica e Campylobacter jejuni nella carne di pollo tramite Real Time PCR con SYBR®GreenER™</i>	pag. 84
Sviluppo di un controllo di amplificazione	pag. 84
Prova di validazione del metodo di quantificazione in pollo di <i>S. enterica</i> e <i>C. jejuni</i> basato su SYBR®Green su macchine per PCR diverse e con operatori diversi	pag. 85
Prova del metodo presso un'azienda del settore avicolo	pag. 90
12.1.4 <i>Determinazione di Salmonella enterica e Campylobacter jejuni nella carne di pollo tramite PCR Real Time con le sonde TaqMan® MGB</i>	pag. 91
Ottimizzazione della concentrazione dei <i>primer</i>	pag. 91
Determinazione del LOD e dell'intervallo di linearità delle reazioni	pag. 93
Prove su colture pure di <i>S. enterica</i> e <i>C. jejuni</i> e campioni di pollo contaminati con questi due microrganismi	pag. 96
12.2 La comunità microbica di sedimenti in presenza-assenza di <i>Vallisneria spiralis</i> : informazioni preliminari	pag. 102
12.2.1 <i>Microbiologia classica. Isolamento dei batteri coltivabili coinvolti nel ciclo dell'azoto: dati raccolti</i>	pag. 102
12.2.2 <i>Ricerca bibliografica di primer specifici per batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto</i>	pag. 115
12.2.3 <i>Informazioni ottenute sulla comunità batterica</i>	pag. 116
13. Conclusioni e prospettive	pag. 128
14. Letteratura	pag. 131
Ringraziamenti e riconoscimenti	

1. Abstract

The role of microorganisms in the biosphere is invaluable. They thrive in all possible niches and play a primary role, contributing to the recycling of the essential elements for life. Microorganisms are also a source of nutrients, being at the root of all ecological food chains and networks. The modern biotechnology science and its applications are based on microbial properties and on the use of microorganisms and their processes for specific and industrial purposes. Even though most of them are beneficial to man, in certain situations they can cause damage to higher living organisms. For all these reasons, the diagnostic microbiology, dealing with identification and detection of microorganisms, plays an increasingly important role. It has long been known that the classical methods are not sufficient for this purpose, in fact, although various isolation and enrichment media have been studied for growing microorganisms involved in different metabolic pathways, only a fraction of these can be cultivated in the laboratory and analysis times are often long and tedious.

The purpose of this thesis was to develop molecular techniques for detection of well characterized bacterial species, as well as methods for studying microbial communities in complex environments, assessing the effectiveness and applicability of the methods. Two cases have been studied:

- *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in chicken meat;
- the consistency and diversity of microbial community in the sediment of an eutrophic river system, in the presence, or absence of the rooted macrophyte *Vallisneria spiralis*.

Salmonella enterica and *Campylobacter jejuni* are microorganisms contaminating the poultry meat, that can cause food-borne infections to humans, which may come into contact by ingestion of contaminated material. EFSA (European Food Safety Authority) has intensified in recent years, studies and publications related to these pathogens, controlling the occurrence of zoonoses and trying to develop systems for the implementation of diagnostic tools to monitor their presence in food. By following these guidelines, in the first phase of the thesis two methods, based on qualitative and quantitative Real Time PCR (qPCR), have been developed and tested to identify and quantify *S. enterica* and *C. jejuni* in pure cultures and in chicken samples. Since the target genes are present in single copy in the respective bacteria, it was assumed that each copy of amplicon corresponded to a single chromosome and, consequently, to a single bacterial cell. The first method, previously developed in the Division of Genetics

an Environmental Biotechnology of the Department of Environmental Sciences (University of Parma), is based on SYBR®Green, and in this work was tested in a different laboratory from the original, with real-time PCR equipments of brands different from those on which the method was originally developed. The reproducibility of the data obtained with the different equipments was evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD_R), as indicated by the *Codex Alimentarius* and by the variance analysis. The method for the quantification of *Salmonella* in artificially contaminated chicken samples with this organism, has proved transferable from one equipment to another, even if different operators have worked. For *Campylobacter*, the method should be further improved, since only one of the samples analyzed gave reproducible results on the two equipments used. However, the same method, tested at one of the leading companies in the poultry food chain, has proved to be suitable for the qualitative detection of *Campylobacter*.

A system for the detection and quantification of *S. enterica* and *C. jejuni* has also been developed using TaqMan ® probes, which, not only have higher specificity than the SYBR®Green but allows to quantify simultaneously two target DNA in the same reaction. The results of the analysis conducted on pure cultures of microorganisms and samples of chicken contaminated with them, showed a good consistence between single-and double-qPCR and conventional microbiological methods, for most of the samples analyzed.

Very interesting result is the ability to simultaneously detect, 10 copies of genomic DNA of *S. enterica* and *C. jejuni*, equal to 10^3 CFU / ml.

Results of a preliminary study on consistency and diversity of microbial community in the sediment of an eutrophic river system, in the presence, or absence of the rooted macrophyta *Vallisneria spiralis* are shown in the second part of this dissertation. Aim of this work was to develop analysis tools to be used for understanding the role, on nitrogen recycling, of the microbial community, associated to the root system of *Vallisneria*. The experimental work was done in collaboration with Dr. Elisa Soana (PhD student in Ecology) and Dr. Marco Bartoli (University of Parma, Department of Environmental Sciences). *Vallisneria spiralis* is a rooted freshwater macrophyte with the ability to grow in a eutrophic system, and yet under not limiting conditions of nitrogen and nutrients, to transfer oxygen to the root level, a feature, so far, never shown by other freshwater macrophytes. The ecological interest of this investigation is to understand the role of submerged macrophytic communities in the regulation of

biogeochemical dynamics (with particular reference to the nitrogen cycle) and relations with the microbial communities in aquatic ecosystems characterized by rapid evolution in terms of substrate characteristics and availability of inorganic nutrients.

To this end, the study of microbial communities has initially involved the isolation of bacterial species, participating to nitrogen cycle, from the sediment vegetated by *V. spiralis*; the preparation of pure cultures of the isolated bacteria and their identification, by molecular techniques. This was possible by genomic DNA extraction from each bacterial isolate, amplification of 16S rDNA, analysis of ARDRA profiles, followed by selection of uniquely represented patterns and sequencing of their 16S rDNA. The aim of this work was to obtain reference microorganisms for more detailed analysis, such as ARISA profiles.

In parallel, a bibliographic search was performed in order to select bacterial genes involved in the major reactions of biogeochemical cycle of nitrogen and select primers for the future development of a multiplex real-time PCR.

Finally, the ARISA technique was applied to sediments sampled either from vegetated, and not vegetated areas, collected in two important steps during the development of the macrophyte (in exponential phase of growth and maximum production in terms of biomass) with the aim of highlighting possible differences on the total microbial population. The results obtained, and subjected to accurate statistical analysis, evidenced that the presence of *V. spiralis* affects, albeit in a limited way, the microbial diversity, in particular according to the stage of plant development.

2. Riassunto

Il ruolo dei microrganismi nella biosfera è di inestimabile importanza. Hanno conquistato tutte le possibili nicchie ecologiche e svolgono un ruolo primario, contribuendo come primi attori al ciclo degli elementi essenziali per la vita. I microrganismi sono anche una fonte di nutrienti, essendo alla base di tutte le catene alimentari ed ecologiche. La scienza biotecnologica moderna e le sue applicazioni si basano sulle proprietà microbiche e sull'impiego dei microrganismi e dei loro processi per scopi specifici e industriali. Anche se la maggior parte di essi apporta benefici all'uomo, in determinate situazioni essi possono provocare danni agli organismi viventi superiori. Per tutti questi motivi la microbiologia diagnostica, che si occupa dell'identificazione e della rilevazione dei microrganismi, riveste un ruolo sempre più importante. E' noto ormai da tempo che i metodi classici non sono sufficienti a tale scopo, infatti per quanto siano stati studiati terreni di isolamento e arricchimento per i diversi microrganismi coinvolti nelle diverse vie metaboliche, solo una frazione di tali soggetti può essere coltivata in laboratorio e i tempi di analisi sono spesso lunghi.

Lo scopo di questa tesi è stato mettere a punto tecniche molecolari per la rilevazione di batteri conosciuti e metodi di studio di comunità microbiche in un ambiente complesso, valutandone l'efficacia e la possibile applicazione reale. Due sono i casi presi in esame:

- *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo;
- la consistenza e la diversità della comunità microbica di sedimenti di un sistema fluviale eutrofico, in presenza-assenza della macrofita radicata *Vallisneria spiralis*.

Salmonella enterica e *Campylobacter jejuni* sono microrganismi contaminanti la carne di pollo in grado di causare infezioni alimentari all'uomo, che può venirne a contatto per ingestione di materiale contaminato. L'EFSA (European Food Safety Authority) negli ultimi anni ha intensificato gli studi e le pubblicazioni relative a tali microrganismi patogeni, controllando l'insorgenza delle zoonosi e cercando di mettere a punto sistemi per lo sviluppo di metodi diagnostici per il loro rilevamento negli alimenti. Sulla base di queste indicazioni, nella prima fase del lavoro di tesi sono stati sviluppati e analizzati due metodi per identificare e quantificare *S. enterica* e *C. jejuni*, pollo basati su PCR Real Time, qualitativa e quantitativa (qPCR) in colture microbiche pure ed in campioni di pollo. Poiché i geni target sono presenti in singola copia nei rispettivi batteri, è stato assunto che ad ogni copia di amplicone corrispondesse un singolo cromosoma e, di conseguenza, una singola cellula batterica.

Il primo metodo, messo a punto in precedenza nella Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali del Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università di Parma, si basa sulla chimica del SYBR®Green e, in questo lavoro, è stato testato in un laboratorio diverso da quello originale e su macchine per Real Time PCR di marche diverse da quella su cui il metodo era stato messo a punto originariamente. La riproducibilità dei dati ottenuti dalle diverse macchine è stata valutata mediante il calcolo della deviazione standard relativa (RSD_R), secondo le indicazioni del *CODEX alimentarius* e tramite l'analisi della varianza. Il metodo per la quantificazione di *Salmonella* in campioni di pollo contaminati artificialmente con questo organismo, si è rivelato trasferibile da una macchina all'altra, anche se ad operare erano sperimentatori diversi. Per *Campylobacter*, invece, il metodo deve essere ulteriormente migliorato, in quanto solo uno dei campioni analizzati dava risultati riproducibili sulle due macchine utilizzate. Tuttavia, lo stesso metodo, provato presso una delle aziende leader nel campo della produzione e distribuzione di diversi prodotti di carne avicola, si è rivelato adeguato per la rilevazione qualitativa di *Campylobacter*.

L'altro metodo per la rilevazione e la quantificazione di *S. enterica* e *C. jejuni* è stato messo a punto utilizzando le sonde TaqMan®, che, oltre a presentare una maggiore specificità rispetto al SYBR®Green, consentono di quantificare contemporaneamente due DNA target nella stessa reazione. I risultati delle analisi, condotte su colture pure dei due microrganismi e su campioni di pollo contaminati con essi, hanno mostrato una buona concordanza tra la qPCR in singolo ed in doppio e i convenzionali metodi microbiologici, per la maggior parte dei campioni analizzati, con un limite di rilevabilità pari a 10^3 CFU per campione in entrambi i casi.

Nella seconda parte di questa tesi sono riportati i risultati di uno studio preliminare sulla consistenza e la diversità della comunità microbica del sedimento in un sistema fluviale eutrofico, in presenza o assenza della macrofita radicata *V. spiralis*.

Lo scopo di questo lavoro è stato sviluppare degli strumenti di analisi che permettano di comprendere il ruolo della comunità microbica, associata al sistema radicale di *Vallisneria*, e coinvolta nel ciclo dell'azoto.

Il lavoro sperimentale è stato svolto in collaborazione della Dott.ssa Elisa Soana (Dottoranda di Ricerca in Ecologia) e del Dott. Marco Bartoli (Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Scienze Ambientali). *Vallisneria spiralis* è un macrofita radicata d'acqua dolce che ha la capacità di crescere in un sistema eutrofico, in condizioni di azoto e nutrienti non limitanti, e nonostante ciò, di trasferire ossigeno a

livello radicale, caratteristica che altre macrofite d'acqua dolce ad oggi non hanno mostrato. L'interesse ecologico è indagare il ruolo delle comunità macrofittiche sommerse nella regolazione delle dinamiche biogeochimiche (con particolare riferimento al ciclo dell'azoto) e le relazioni con le comunità microbiche in ecosistemi acquatici caratterizzati da rapida evoluzione in termini di caratteristiche del substrato e disponibilità dei nutrienti inorganici.

A tale scopo, lo studio relativo alle comunità microbiche ha inizialmente coinvolto l'isolamento delle specie batteriche, correlate al ciclo biogeochimico dell'azoto, da sezioni di sedimento vegetate da *V. spiralis*; la preparazione delle colture pure degli isolati batterici e la loro identificazione, attraverso tecniche molecolari. Questo è stato possibile attraverso l'estrazione del DNA genomico da ciascun isolato batterico, l'amplificazione del 16S rDNA, l'analisi dei profili ARDRA seguita dalla selezione dei profili diversamente rappresentati e il sequenziamento del 16S rDNA. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di ottenere dei microrganismi di riferimento, per analisi più dettagliate, come la determinazione dei profili ARISA.

In parallelo, è stata svolta una ricerca bibliografica per la selezione dei geni batterici coinvolti nelle reazioni principali del ciclo biogeochimico dell'azoto e la selezione dei *primer* per la futura messa a punto di una Real Time PCR multiplex. Infine, la tecnica ARISA è stata applicata a sedimenti campionati da zone vegetate e sedimenti prelevati da zone non vegetate, in due momenti importanti per lo sviluppo della macrofita radicata (in fase esponenziale di crescita e alla massima produzione in termini di biomassa) per conoscere ed evidenziare possibili differenze sulla popolazione microbica totale. I risultati ottenuti, sottoposti ad un'approfondita analisi statistica, hanno dimostrato che la presenza di *V. spiralis* influisce, seppur in modo limitato, sulla diversità microbica, soprattutto in base allo stadio di sviluppo della pianta stessa.

3. Sigle e abbreviazioni

AAA terreno solido per la crescita di batteri azotofissatori (Azotobacter, Azomonas)

ANAMMOX anaerobic ammonium oxidation

AOA archeobatteri ammonio ossidanti

AOB batteri ammonio ossidanti

AOMA terreno solido per la crescita di batteri ammonio ossidanti

AOMB terreno liquido per la crescita di batteri ammonio ossidanti

API sistema miniaturizzato di test biochimici

ARDRA Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARISA Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

ATCC American Type Culture Collection

BG-11 Modified terreno per la crescita di cianobatteri azotofissatori

BGAM Brilliant Green Agar Modified

BPW Buffered Peptone Water

CARD FISH Catalyzed Reporter Deposition Fluorescent In Situ Hybridization

CE o EC Comunità Europea

CFU Colony Forming Unit

Ct ciclo soglia

DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DHPLC Denaturing High-Performance Liquid Chromatography

DNRA riduzione anaerobica dei nitrati a ioni ammonio

E efficienza della reazione di amplificazione

EFSA European Food Safety Authority

EU o UE Unione europea

FISH Fluorescent In Situ Hybridization

FSC Food Safety Criterion

GalNAc N-acetilgalattosammina

GHP Good Hygiene Practices

GPP Gross Primary Production

HACCP Hazard Analysis and Critical Control Point

ITS-RFLP ITS Restriction fragment Length Polymorphism

LGI terreno per la crescita di batteri azotofissatori (Azospirillum)

LOD Limite di Rilevabilità

LPS lipopolisaccaride

MBD terreno “bouillon” per la crescita di batteri denitrificanti
MCD terreno complesso per la crescita di batteri denitrificanti
MMD terreno minerale per la crescita di batteri denitrificanti
MNV zona non vegetata campionata in primavera
mRNA RNA messaggero
MS o SM Stati Membri
MV zona vegetata da *V. spiralis* campionata in primavera
NeuNAc l'acido N-acetilneuraminico
NFb terreno senza azoto per la crescita di batteri azotofissatori (*Azospirillum*)
NFQ-MGB: Non Fluorescence Quencher-Minor Groove Binder
NOA terreno solido per la crescita di batteri nitrito ossidanti
NOMB terreno liquido per la crescita di batteri nitrito ossidanti
NP NanoParticelle di magnetite
O/N Over Night
ORFs Open Reading Frames
OTU Unità Tassonomica Operativa
PCA Principal Component Analysis
PCR Polymerase Chain Reaction
PHC Process Hygiene Criterion
QCM Quartz Crystal Microbalance
qPCR Real Time PCR quantitativa
 R^2 coefficiente di linearità di Pearson
RAPD Random amplified Polymorphic DNA
Real Time PCR PCR in tempo reale
ROL Radial Oxygen Loss (rilascio radiale di ossigeno)
rRNA RNA ribosomale
 RSD_R deviazione relativa standard della riproducibilità
 RSD_r deviazione standard relativa della ripetibilità
RT - Real Time PCR Reverse Transcriptase - Real Time PCR
SA sedimento anossico
SAW surface acoustical wave
SN sedimento nudo
SNV zona non vegetata campionata in estate
SO sedimento ossico

SR sedimento rizosfera

SSCP Single Strand Conformation Polymorphism

SV zona vegetata da *V. spiralis* campionata in estate

TGGE Temperature Gradient Gel Electrophoresis

T-RFLP Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

UFC Unità Formanti Colonie

VBNC Viable But Non Culturable

VITEK sistema automatizzato per l'identificazione batteriologica

4. L'importanza e il ruolo dei microrganismi

Il valore dei microrganismi nella biosfera è incommensurabile. Il numero dei procarioti e la quantità totale del carbonio cellulare che apportano sulla Terra sono stimati essere $4-6 \times 10^{30}$ cellule e 350-550 Pg di carbonio (1 Pg = 10^{15} g), rispettivamente. Quindi, la quantità totale del carbonio procariote è il 60-100% del carbonio totale stimato nelle piante, e se si include il carbonio procariote nei modelli globali risulta quasi il doppio delle stime della quantità di carbonio immagazzinato negli altri organismi viventi. Inoltre, i procarioti terrestri contengono 85-130 Pg di azoto e 9-14 Pg di fosforo, ovvero circa 10 volte in più degli stessi nutrienti delle piante, rappresentando il più grande accumulo di tali elementi negli organismi viventi [Whitman *et al.*, 1998]. I microrganismi hanno conquistato tutte le possibili nicchie ecologiche: dalle sorgenti geotermali nelle profondità oceaniche ai poli glaciali artici, dall'atmosfera al sottosuolo, fino a creare importanti associazioni con tutti gli organismi viventi del dominio eucariote. Svolgono, inoltre, un ruolo importante nella biosfera, contribuendo come primi attori protagonisti al ciclo degli elementi essenziali per la vita. Costituiscono essi stessi una fonte di nutrienti, ponendosi alla base di tutte le catene alimentari e reti ecologiche. Ancor più degna di nota è la capacità fotosintetica di alcuni microrganismi, che competono con gli organismi vegetali per potere di assimilazione e cattura di anidride carbonica e liberazione di ossigeno nell'atmosfera. I microrganismi che vivono a contatto col corpo umano o al suo interno svolgono funzioni primarie, contribuendo alla digestione degli alimenti e alla sintesi di vitamine. L'uomo ha imparato a beneficiare, inoltre, delle proprietà dei microrganismi, sfruttandole per la produzione di pane, formaggi, birra, antibiotici, vaccini, vitamine, enzimi e molto ancora. La scienza biotecnologica moderna e le sue applicazioni, in effetti, si sono sviluppate sulle proprietà microbiche e sull'impiego dei microrganismi e dei loro processi per scopi scientifici e industriali.

Come è noto, la maggior parte dei microrganismi riveste ruoli benefici per l'uomo; tuttavia, alcuni di essi hanno azioni nocive provocando malattie a piante e animali.

5. La microbiologia diagnostica: questioni irrisolte

Il ruolo chiave dei microrganismi nell'infezione e nella malattia, dimostrato da Pasteur, Koch e altri, ha decisamente condotto alla necessità di rilevare e identificare i microrganismi.

I metodi di rilevazione includono tutti i sistemi usati per rilevare la presenza di batteri riconducibili ad uno specifico *taxon* precedentemente definito come *target*, ad esempio la rilevazione di *Salmonella* spp. in campioni alimentari. Anche se in microbiologia diagnostica spesso i termini "identificazione" e "rilevazione" sono usati in modo intercambiabile, va ricordato che l'identificazione tassonomica implica la ricerca per il riconoscimento di un microrganismo sconosciuto. In tal caso, non avendo un target definito a monte, non si può parlare di rilevazione in senso stretto. In generale, la microbiologia diagnostica provvede sia alla rilevazione che all'identificazione dei microrganismi [Albuquerque *et al*, 2009].

Diversamente dalle piante e dagli animali, la morfologia dei microrganismi è in generale troppo semplice per servire come base per una buona classificazione e per permettere un'identificazione attendibile. Quindi, in passato, e in buona parte anche adesso, le metodiche d'analisi standard di microbiologia diagnostica si basano sulle colture pure (o co-colture) di specie note, seguite da test sui tratti fisiologici e biochimici [Amann *et al*, 1995]. Miglioramenti nei metodi di coltura e nella manipolazione dei microrganismi in laboratorio hanno portato all'ottimizzazione di protocolli diagnostici basati sulla caratterizzazione delle vie metaboliche informative. La seguente miniaturizzazione e meccanizzazione di metodiche biochimiche ne ha permesso la standardizzazione e l'implementazione. Nella seconda metà del XX secolo, sono stati sviluppati metodi sierologici e saggi immunologici come mezzi indispensabili per la rilevazione di virus e vari microrganismi. In particolare, i saggi immunologici sono molto utilizzati per la loro specificità, la velocità di applicazione e il basso costo. Tuttavia, i metodi classici per la rilevazione e l'identificazione microbica presentano alcuni grandi svantaggi:

- non tutti i microrganismi sono coltivabili e isolabili in coltura pura;
- è spesso impossibile distinguere tra specie e ceppi strettamente correlati tra loro;
- è difficile caratterizzare nuove specie emergenti;
- i tempi di analisi sono spesso lunghi [Corsetti & Settanni, 2007].

La coltivabilità può essere definita come la capacità di moltiplicazione rilevabile per mezzo di un sistema di laboratorio validato, come la formazione di colonie visibili su un

mezzo di coltura solido (conta vitale) o la torbidità di un mezzo liquido. La coltivabilità è spesso associata alla vitalità cellulare [Barer & Harwood, 1999]. Tuttavia da tempo è stato riportato che le conte tramite microscopia diretta superano le conte cellulari vitali di diversi ordini di grandezza: “great plate count anomaly”. Sembra, infatti, che la maggior parte delle cellule visualizzate microscopicamente anche se vitali non siano in grado di formare colonie visibili su piastra.

Tabella 5.1	
Habitat	Coltivabilità (%) ^a
Acqua marina	0.001-0.1
Acqua dolce	0.25
Lago mesotrofico	0.1-1
Acque di estuario non inquinate	0.1-3
Fanghi attivi	1-15
Sedimenti	0.25
Suolo	0.3
^a Batteri coltivabili espressi in UFC.	

Tabella 5.1
Coltivabilità
determinata come
percentuale dei batteri
coltivabili rispetto alla
conta cellulare totale.

Come riportato in **Tabella 5.1**, la percentuale di batteri coltivabili (misurati in UFC, unità formanti colonie) rispetto ai batteri totali varia da un minimo di 0.001% nell’acqua marina al 15% nei fanghi attivi [Amann *et al*, 1995]. Nelle matrici alimentari semplici, come i cibi fermentati in cui i microrganismi “coltivabili” generalmente predominano, è stato dimostrato che almeno il 25-50% della comunità microbica non può essere coltivata *in vitro* anche se vitale [Justé *et al*, 2008]. E’ stato dimostrato che le condizioni ambientali in cui i batteri si trovano, possono rallentarne o inibirne la crescita, alterandone lo stato fisiologico [Kell *et al*, 1998]. Tali condizioni includono l’oligotrofia, l’incubazione a temperature di crescita esterne all’intervallo ottimale, concentrazioni osmotiche troppo elevate o basse, variazioni nelle quantità di ossigeno disponibile, la presenza di metalli pesanti o l’esposizione a luce bianca. Una risposta comune a tali stress da parte delle cellule batteriche è la loro incapacità finale di sviluppare colonie sui mezzi di coltura nei quali crescono normalmente in laboratorio; tale condizione è stata definita VBNC (viable-but-nonculturable). Come è mostrato in **Figura 5.1** la conta cellulare totale resta generalmente costante, le cellule sono vitali per lunghi periodi di tempo ma non coltivabili (questo è valutato tramite saggi che misurano l’attività metabolica o verificano l’integrità cellulare) [Oliver, 2010].

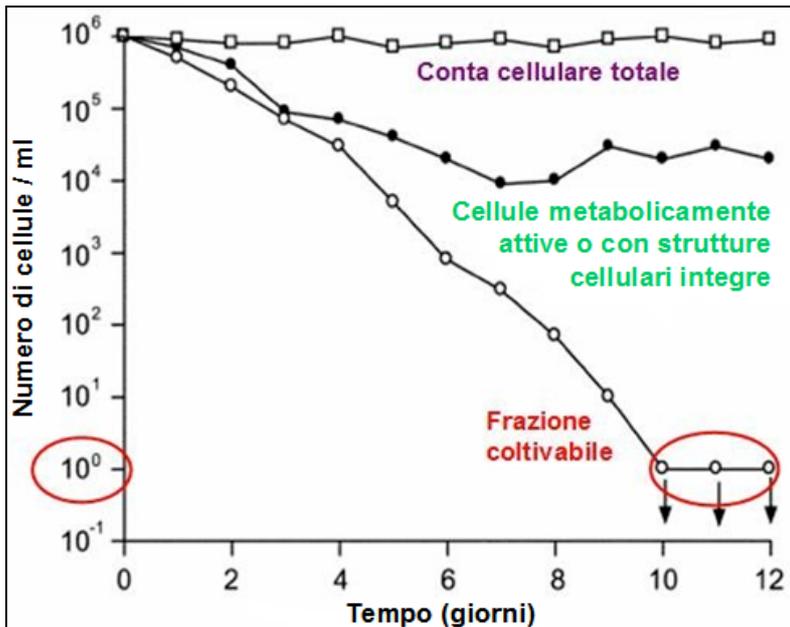


Figura 5.1
Vibrio vulnificus entra
 nello stato VBNC alla
 temperatura di
 incubazione di 5 °C.

In considerazione di quanto detto, batteri non coltivabili non sarebbero rilevabili, identificabili e neppure quantificabili con i metodi microbiologici classici.

Tuttavia, la coltivabilità non è condizione sufficiente all'identificazione, alla rilevazione batterica e, a maggior ragione, alla quantificazione. Infatti, oltre a conoscere l'identità dei membri di una comunità, nella maggior parte dei casi è utile conoscere la dimensione delle rispettive popolazioni, soprattutto se questo ha rilevanza negativa come nel caso di patogeni o positiva come nel caso di probiotici [Justé *et al*, 2008]. Quindi, le tecniche colturali attualmente disponibili non si adattano a un largo numero di batteri come le specie conosciute che entrano in uno stato fisiologico non coltivabile o le specie sconosciute che non si è ancora riusciti a coltivare [Amann *et al*, 1995].

Laddove la coltivazione è possibile, l'identificazione dei microrganismi basata su caratteristiche biochimiche e fisiologiche è spesso ambigua, anche se rappresenta il metodo standard per la maggior parte delle identificazioni batteriche. Questo sistema richiede parecchio tempo per la preparazione, la standardizzazione della tecnica e mezzi di laboratorio adeguati. Inoltre, l'analisi di un gran numero di campioni risulta complessa, considerato che generalmente 10 o più test possono essere necessari per la differenziazione delle specie all'interno di un gruppo. I kit commerciali per l'identificazione, quali l'API (sistema miniaturizzato di test biochimici per il riconoscimento della quasi totalità dei gruppi batterici e di 550 specie diverse) e come il VITEK (sistema automatizzato per l'identificazione batteriologica usato sia in campo clinico che nel controllo industriale, costituito da una card, un modulo incubatore/lettore, un computer ed una stampante), sono disponibili per il

riconoscimento dei batteri a livello della specie, in tempi relativamente rapidi. Tali saggi non sono però adatti a tutti i ceppi e specie batteriche: un riconoscimento attendibile di nuove specie emergenti può risultare impossibile per mancanza di “ceppi tipo” adeguati [Corsetti & Settanni, 2007].

6. L'ecologia microbica alla base dell'identificazione batterica

Negli ultimi anni è nata la necessità di studiare i microrganismi nei loro habitat naturali, per studiare le interazioni fra di loro, con gli organismi vegetali e animali che popolano l'habitat e con l'ecosistema in generale e le sue variazioni.

Negli habitat di origine raramente i microrganismi si trovano in specie singole, ma in comunità in cui interagiscono con altri generi o specie, in equilibrio fra di loro e con le condizioni fisico-chimiche dell'ambiente. Queste condizioni sono solitamente molto diverse da quelle usate per coltivare i microrganismi in laboratorio. Lo stesso *Bergey's Manual*, che è il più importante compendio delle proprietà delle colture pure di procarioti, prende in seria considerazione l'ecologia microbica in quanto contribuisce notevolmente ad accrescere le conoscenze relative al mondo procariotico. La comunità scientifica è sempre più convinta che la coltivazione microbica in laboratorio fornisca delle conoscenze limitate della fisiologia e, più in generale, delle potenzialità batteriche. Inoltre le condizioni artificiali della coltivazione in laboratorio possono fornire un quadro che non sempre corrisponde a quanto avviene in natura. Quindi un approccio “olistico”, basato sulle tecniche colturali classiche e supportato da quelle genetico - molecolari fondate sull'analisi degli acidi nucleici, può essere di grande utilità per comprendere la fisiologia e le abitudini naturali delle comunità microbiche [Zynder & Salyers, 2005].

7. Metodi genotipici (molecolari): uno sguardo d'insieme

I metodi molecolari basati sullo studio del DNA sono diventati i più usati per l'identificazione e la tassonomia batterica [Nocker *et al*, 2007]. Il DNA, infatti, non si modifica durante il ciclo cellulare o in seguito a mutate condizioni ambientali, come accade invece per gli acidi grassi di membrana [Corsetti & Settanni, 2007].

All'inizio (1950) il confronto fra i DNA dei diversi procarioti veniva fatto valutando semplicemente la composizione percentuale in basi (mol% G+C). Tuttavia in questo modo si ottenevano informazioni parziali e non molto discriminanti. Infatti, quando il contenuto in G+C del genoma di due batteri era molto differente, si era sicuri della loro

diversità, mentre quando la composizione percentuale in G+C era uguale fra due batteri non si poteva sostenere con certezza che essi fossero simili.

Le tecniche di ibridazione degli acidi nucleici, come la ri-associazione DNA-DNA o l'ibridazione DNA-RNA, sono state le prime vere tecniche molecolari utilizzate dai tassonomisti (1960). Questa tecnica di confronto ha risolto molti dei problemi che avevano reso difficoltosa la risoluzione tassonomica dei batteri a livello di specie, ma risultava piuttosto inutile per stimare relazioni fra i procarioti più distanti (a livello di genere, famiglia e anche oltre). Solo dopo gli anni '60 cominciarono a svilupparsi, con molta lentezza, metodi di classificazione capaci di estrarre l'informazione filogenetica racchiusa nella sequenza di molecole conservate come gli RNA ribosomali (16S, 18S) per creare raggruppamenti (*taxa*) che fossero omogenei non dal punto di vista morfologico e/o metabolico, ma dal punto di vista evolutivo.

Le sonde ad acido nucleico sono diventate un metodo standard per l'identificazione di batteri ad oggi ancora non coltivabili, difficili o a crescita lenta e hanno rappresentato i metodi di prima generazione [Amann & Schleifer, 2005]. Negli ultimi tempi sono state sviluppate tecniche affini per rilevare i microrganismi direttamente in campioni complessi senza la necessità di un passaggio di arricchimento iniziale come la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) e la CARD- FISH: la prima utilizza sonde marcate con un fluoroforo che legano in modo molto specifico l'organismo target e sono poi rilevate tramite microscopia a fluorescenza o citometria di flusso; la seconda tramite un "catalyzed reporter deposition" rende il segnale meno dipendente dallo stato di crescita o dall'attività metabolica cellulare [Albuquerque *et al*, 2009].

I metodi basati sulla PCR (Polymerase Chain Reaction) costituiscono le tecniche di seconda generazione. Da quando la tecnica della PCR è stata inventata, nella seconda metà degli anni '80, è diventata uno strumento fondamentale per la microbiologia diagnostica e per lo studio delle comunità microbiche. Il DNA, sia della specie isolata che dell'intera comunità microbica, serve da stampo per l'amplificazione di specifiche sequenze. Mentre i metodi di ibridazione del DNA utilizzavano sonde molecolari che ibridavano il DNA omologo, i metodi che utilizzano la PCR amplificano sequenze specifiche, utilizzando primer, che possono essere sia specifici, cioè mirati ad una singola specie, che universali, in grado quindi di amplificare geni di un'ampia gamma di organismi diversi. La molecola che è stata ad oggi usata maggiormente per lo studio della diversità microbica è il gene codificante l'RNA ribosomale 16S.

L'utilizzo di geni funzionali permette invece lo studio di sub-popolazioni con determinate capacità fisiologiche (geni che codificano per ammonio monossigenasi, subunità β dell'RNA polimerasi, nitrogenasi, ecc.).

Queste tecniche condividono l'estrazione diretta iniziale del DNA totale della comunità che serve poi come template per l'amplificazione tramite PCR di certe sequenze che servono a definire profili. Tali sequenze, caratteristiche delle varie specie, hanno una regione conservata su cui si disegnano e si legano i primer per la PCR e regioni variabili interne necessarie alla differenziazione filogenetica.

I prodotti di PCR possono essere o clonati e sequenziati, o sottoposti ad un'ampia serie di metodi di analisi diretta dei vari profili genetici che include le seguenti tecniche: ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography). Tutti questi metodi di genotipizzazione sono comunemente usati per lo studio della diversità microbica negli ecosistemi e per aumentare le conoscenze relative alla fisiologia e alla genetica dei microrganismi non coltivabili.

La metagenomica è un potente strumento che può essere usato per analizzare le comunità microbiche a prescindere dalla capacità degli organismi membri di essere coltivati in laboratorio. La metagenomica si basa sull'analisi genomica del DNA microbico che viene estratto direttamente dalla comunità presente in campioni ambientali. Questa tecnologia - genomica su larga scala - consente la realizzazione di uno studio dei microrganismi differenti presenti in un ambiente specifico, come l'acqua, il suolo, ecc.. Integrando le informazioni raccolte dalle sequenze, con le informazioni sulle funzioni biologiche all'interno della comunità, si può esaminare la struttura delle comunità microbiche di un determinato ambiente [Handelsman, 2004]. L'analisi dei metagenomi fornisce informazioni rilevanti sulla diversità genetica, sulla ricchezza in specie e sulla struttura della popolazione. Permette inoltre un confronto incrociato tra più comunità, il monitoraggio delle variazioni nel tempo dovute a modifiche delle condizioni ambientali, la valutazione dell'impatto di un trattamento di bioremediazione e la formulazione di modelli ecologici [Nocker *et al*, 2007].

La tecnica PCR consente anche la rilevazione di tratti genici funzionali, come i fattori di virulenza o i determinanti antigenici. La ricerca di geni che codificano tratti fenotipici

specifici implica una conoscenza integrata della biologia del batterio in modo da poter dedurre l'unicità di tali tratti e permette di distinguere i batteri fino a un livello di sottospecie. Questa strategia può essere applicata su batteri molto studiati, la cui struttura, fisiologia e virulenza siano ben conosciuti (*Salmonella* spp, ecc).

Negli ultimi vent'anni, quindi, le innovazioni tecnologiche nella biologia molecolare, principalmente lo sviluppo dell'amplificazione del DNA tramite PCR, il miglioramento dei metodi di sequenziamento, la maggiore disponibilità di risorse e informazioni, come i database online, hanno permesso lo studio delle comunità microbiche in un'ampia varietà di ambienti (vedi **Figura 7.1**) [Albuquerque *et al*, 2009]. Infatti l'efficienza di approcci bioinformatici, ad oggi sviluppati per la selezione di tratti di DNA, dipende dalla quantità di informazione genetica disponibile nei database, che, grazie ai miglioramenti apportati alle tecnologie di sequenziamento, è sempre maggiore.

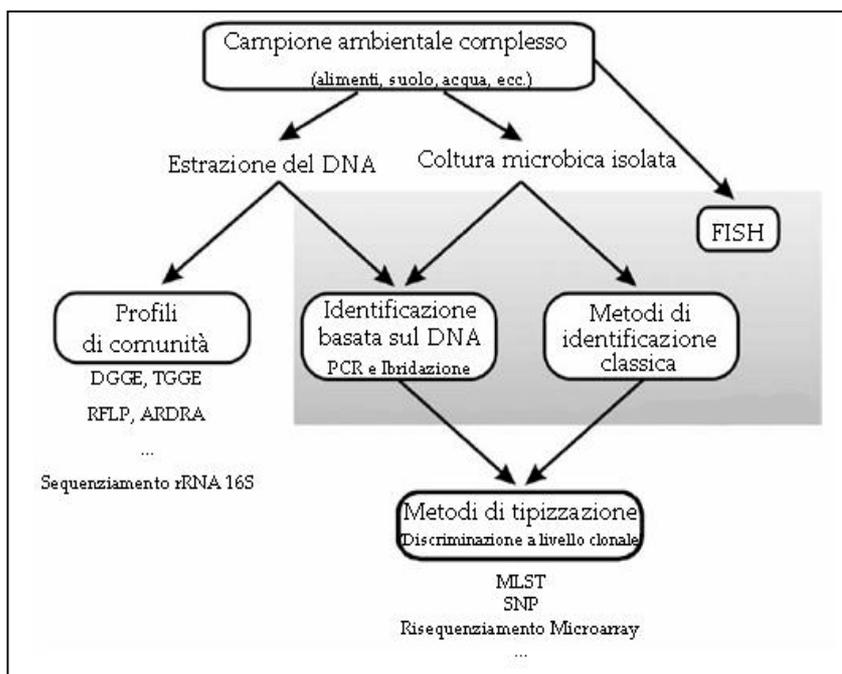


Figura 7.1
Insieme dei metodi molecolari per l'identificazione batterica in campioni ambientali complessi. Diversi livelli di discriminazione tassonomica e ecologica sono presi in considerazione (specie, ceppo, *biovar* o comunità).

I metodi di tipizzazione basati sui profili genetici sono particolarmente utili per lo studio della diversità microbica in ambienti naturali complessi ma non molto per la rilevazione e l'identificazione [Albuquerque *et al*, 2009].

Va infine considerato che metodi molecolari basati sull'analisi del DNA si limitano alla rilevazione del microrganismo ma non dicono nulla circa la presenza di tossine e altri prodotti extracellulari. Sono quindi necessarie nuove tecniche in grado di combinare l'accuratezza e l'ampio spettro dei metodi microbiologici tradizionali con l'aumentata precisione e sensibilità dei metodi molecolari. Negli ultimi anni si parla sempre più di biosensori che non contengano passaggi legati alla PCR. Questi si basano sull'affinità

tra una sonda e un analita. La specificità dell'interazione tra sonda e analita è fondamentale per disegnare un biosensore efficace. La piattaforma del sensore rileva l'interazione e genera un segnale misurabile che deve essere abbastanza sensibile da individuare l'agente infettivo in tempo reale, anche a basse concentrazioni. In generale le interazioni sonda - analita sono misurate monitorando la perturbazione delle caratteristiche ottiche, le variazioni di risonanza indotte dalla massa, o le proprietà elettriche [Dover *et al*, 2009]. I sensori piezoelettrici (vedi **Figura 7.2**) sono una classe di biosensori utilizzati nel rilevamento dei patogeni. naturale.

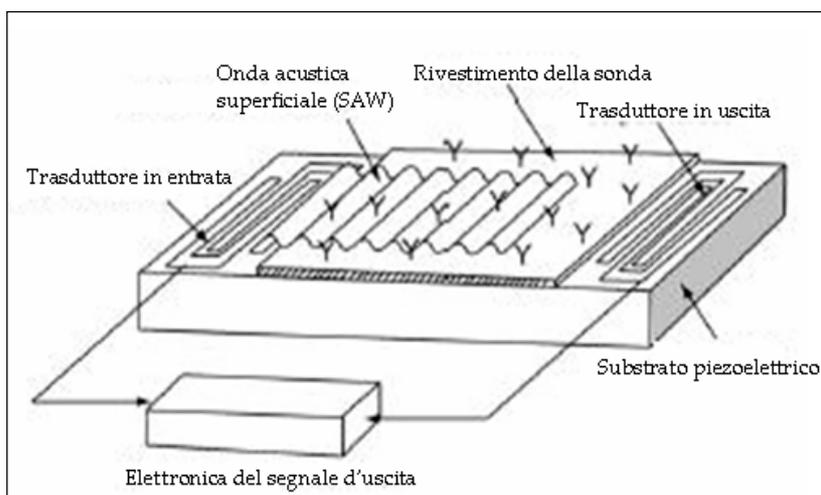


Figura 7.2
Schema del principio del sensore ad onda acustica di superficie. Tipico dispositivo costituito da un substrato di quarzo piezoelettrico con trasduttori ingresso/uscita e un rivestimento della sonda.

Questi rivelatori massa-sensibili generano e trasmettono onde acustiche con un cristallo oscillante, che risuona al principio della frequenza di risonanza.

Recentemente, dopo il quarzo, il niobato di litio è stato incluso nella lista delle materie prime piezoelettriche. La superficie del sensore piezoelettrico è rivestita con anticorpi specifici batterici. Il legame dei batteri con gli anticorpi porta a un aumento di massa del cristallo di quarzo e alla diminuzione proporzionale della frequenza di oscillazione, che viene rilevata dalla microbilancia di cristallo di quarzo (QCM) sulla superficie del trasduttore. Questo tipo di biosensore è molto interessante, come tecnica d'analisi semplice e in tempo reale per la rilevazione di agenti patogeni di origine alimentare. In un lavoro sono state usate sonde modificate con anticorpi proteina-A per rilevare la presenza di *Salmonella typhimurium*, un batterio altamente piezoelettrico, sulla superficie del biosensore piezoelettrico [Arora *et al*, 2011].

Non esiste quindi “la tecnica” perfetta. E' necessario sviluppare un approccio polifasico che tenga conto, oltre allo scopo dell'analisi, di molteplici fattori affinché il metodo risulti veloce, mirato e il più accurato possibile.

8. Rilevazione qualitativa e quantitativa di batteri contaminanti la carne di pollo

8.1 Le tossinfezioni alimentari

Le intossicazioni alimentari sono malattie acute contratte attraverso il consumo di alimenti contaminati da agenti chimici esogeni (es. metanolo, pesticidi, metalli pesanti, ecc.) oppure contenenti sostanze nocive organiche endogene (es. tossine); per tossinfezioni alimentari s'intendono invece le malattie provocate dall'ingestione di alimenti contaminati da microrganismi nocivi oppure inquinati da tossine prodotte da questi ultimi; la loro presenza negli alimenti stessi costituisce il presupposto affinché insorga la tipica sintomatologia.

Sono incluse nel loro ambito:

- **infezioni:** la sintomatologia è provocata dall'ingestione di microrganismi vivi e vitali, che si moltiplicano all'interno dell'organismo (es. *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*);
- **tossinfezioni a sfondo tossico:** la sintomatologia è provocata da una tossina preformata dal microrganismo nell'alimento, prima che questo venga ingerito (es. *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*);
- **infestazioni:** la sintomatologia è provocata dall'ingestione di parassiti pluricellulari (es. *Trichinella spiralis*).

Sia in ambiente domestico che negli esercizi di ristorazione, le tossinfezioni alimentari rappresentano ancora oggi un problema sanitario importante in quanto, in Italia coinvolgono annualmente migliaia di persone. Ma è necessario puntualizzare che non tutti i microrganismi sono pericolosi: moltissimi contaminanti alimentari non producono infatti alcun danno per l'uomo; alcuni di questi sono anzi utili, come ad esempio la flora batterica intestinale che favorisce la corretta digestione degli alimenti e permette la sintesi della vitamina K; altri sono contenuti normalmente in alcuni alimenti quali ad esempio yogurt e formaggi e ne consentono la conservazione valorizzandone le proprietà nutritive.

Al contrario, esistono alcuni contaminanti, definiti patogeni, che sono pericolosi in quanto, se presenti oltre un certo numero negli alimenti, possono essere fonte di malattie a volte gravi.

I contaminanti alimentari patogeni causano malattie nell'uomo quando si moltiplicano fino a raggiungere un numero elevato e/o producono tossine all'interno degli alimenti.

I patogeni possono essere già presenti nell'alimento (alimenti mal lavati, carni contaminate, acqua inquinata) o contaminare successivamente l'alimento a causa di errori nella preparazione o nella conservazione quali:

- mani sporche o non lavate;
- utensili e superfici di lavoro non adeguatamente puliti;
- contatto con altri alimenti contaminati;
- non rispetto della corretta temperatura di conservazione;
- tempi lunghi intercorrenti tra la preparazione e il consumo;
- uso di acqua contaminata o non potabile.

Nella prevenzione delle tossinfezioni alimentari due fattori si distinguono per importanza: la temperatura e il tempo.

La temperatura di conservazione è fondamentale per impedire la moltiplicazione di microrganismi eventualmente presenti sull'alimento. Infatti, se al di sotto dei 5 °C l'accrescimento è molto ridotto o impedito, al di sopra di questo valore la velocità di moltiplicazione aumenta in modo considerevole (soprattutto tra i 20 e i 45 °C). Da ciò deriva che un alimento, se lasciato a temperatura ambiente, può inquinarsi nel giro di poco tempo.

Per quanto riguarda invece il tempo, è buona regola consumare subito l'alimento preparato, poiché con il passare del tempo, in condizioni inadeguate di conservazione, i patogeni si accrescono raggiungendo così un numero sufficiente per causare la malattia nell'uomo [Aureli & Orefice, 2006].

Nel corso degli anni, lo scenario epidemiologico delle malattie trasmesse da alimenti è profondamente mutato a causa del cambiamento delle abitudini alimentari, come è l'aumento dei pasti consumati fuori casa, l'incremento di consumo dei cibi a lunga conservazione e la globalizzazione dei mercati, con l'arrivo sulle tavole di alimenti non sempre di origine certa e adeguatamente controllati. Quest'ultimo punto soprattutto fa sì che alimenti contaminati vengano distribuiti su grandi aree geografiche il che rende estremamente difficoltosa l'indagine epidemiologica tesa all'individuazione della fonte. Bisogna inoltre tenere in considerazione la comparsa dei cosiddetti "patogeni emergenti" la cui responsabilità nell'insorgenza di focolai diventa sempre più importante: basti pensare all'encefalite spongiforme nei Paesi Europei, alle infezioni da *C. jejuni*, alla emergenza di nuovi sierotipi di Salmonella [Skovgaard, 2007].

8.2 Le carni avicole: contenuto microbico e processo di lavorazione

Le carni avicole possono essere considerate veri e propri serbatoi di batteri contaminanti. Le carni da pollame fresche hanno un pH compreso tra 5.8 e 6.2 e valori di attività dell'acqua (A_w) tra 0.995 e 0.985. La contaminazione microbica di macchinari e attrezzature, durante le operazioni di macellazione e sezionamento è continua. I microrganismi psicotrofi hanno la tendenza a colonizzare e formare biofilm che spesso resistono alle normali procedure di pulizia. L'adattamento all'ambiente di lavorazione condiziona, accrescendola, la capacità di moltiplicazione dei batteri che contaminano le carni refrigerate durante il processo di macellazione e di preparazione [Trevisani *et al*, 2002].

I batteri contaminanti possono raggruppare sia specie deterioranti, quindi alteranti le qualità organolettiche, che specie patogene, in grado di causare malattia.

I generi batterici che sono maggiormente riscontrabili nella carne di pollo a monte della contaminazione sono principalmente tra i Gram negativi: *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*; tra i Gram positivi troviamo invece: *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Listeria* e *Vagococcus*. In generale le specie batteriche che possono essere presenti includono *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium* e *Bacillus* [Dave & Abdel, 2011]. E' stato riscontrato inoltre che la popolazione preponderante di batteri che si trova nella carne refrigerata deteriorata e nel pollame è costituita di organismi psicotrofi (microrganismi che crescono alla temperatura di 0°C ma presentano una temperatura ottimale di crescita di 20-30°C), come *Pseudomonas* spp.. Altri studi hanno riportato che i batteri sulla carne di pollo immediatamente dopo l'elaborazione sono *Micrococci* (50%), bacilli Gram-positivi (14%), *Flavobacteria* (14%), Enterobacteriaceae (8%), *Pseudomonas* (2%), *Acinetobacter* (7%), e altri organismi non identificati (5%). Di questi generi, soprattutto *Pseudomonas* e *Acinetobacter* crescono bene a temperatura di refrigerazione: infatti, dopo la conservazione di campioni di carne a 1 ° C per 10 - 11 giorni, la flora batterica diventa prevalentemente psicotrofa, con il 90% di *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas* e *Shewanella*), il 7% *Acinetobacter*, e il 3% Enterobacteriaceae [Charles *et al*, 2006].

Alcuni di questi batteri sono stati identificati come responsabili della produzione di cattivi odori e sapori, di scolorimento, produzione di patine e puntinature e produzione di gas. Un pH che favorisce la crescita di batteri deterioranti la carne ha valori nell'intervallo di 5.5-7.0. La formazione di sostanze viscosi, la degradazione delle

componenti strutturali, la produzione di odori e il cambiamento dell'aspetto sono caratteristiche ritrovate nella carne a causa di microbi cresciuti in questo intervallo di pH. Vari composti derivano dal deterioramento batterico tra i quali si possono citare la metilammina, la dimetilammina e la trimetilammina; poiché il metabolismo microbico produce acidi grassi, chetoni e alcoli, compaiono odori fruttati e dolci; la generazione di acido solfidrico, metilsolfuro e dimetilsolfuro accompagna l'emissione di odori di putrefazione e di uova marce. Le diammine, la cadaverina e la putrescina (i sottoprodotti metabolici del deterioramento della carne) sono stati studiati come indicatori del deterioramento della carne [Dave & Abdel, 2011].

Le Enterobacteriaceae possono costituire una parte significativa della microflora alterante quando la temperatura è prossima ai 10-15 °C. I membri di tale famiglia sono quindi significativamente rappresentati tra la microflora delle carni avicole nei primi giorni (prima che gli psicotrofi superino la fase di adattamento) e successivamente nei prodotti mantenuti a temperature di refrigerazione superiori a 7 °C [Trevisani *et al*, 2002].

Come accennato, tra i batteri contaminanti non esistono solo batteri deterioranti. In una pubblicazione l'EFSA (European Food Safety Authority) ha affrontato il tema della zoonosi di origine alimentare e identificato i principali agenti causali: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* VTEC, *Yersinia*, *Trichinella*, *Echinococcus*, *Toxoplasma* e *Cysticercus* [EFSA, 2006]. I primi due sono gli organismi più comunemente riportati in caso di infezioni nell'uomo ed è riconosciuto che la loro principale fonte d'origine è la carne avicola. Secondo l'EFSA, la carne di pollo è la principale fonte di campilobatteriosi sporadiche: l'agente eziologico è *Campylobacter*, un batterio termofilo Gram-negativo. L'infezione si verifica principalmente a causa della contaminazione di carne di pollo per piatti pronti, del contatto mano-bocca e della carne poco cotta. In **Figura 8.1** sono riportati i casi di campilobatteriosi dal 1999 al 2007.

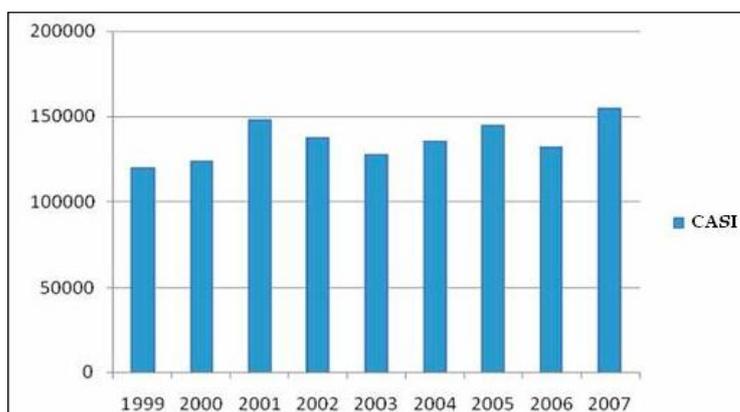


Figura 8.1
I casi di campilobatteriosi
in 9 Stati Membri (MS)
dell'Unione Europea (EU)
riportati nel periodo 1999 -
2007 (Austria, Danimarca,
Finlandia, Germania,
Irlanda, Spagna, Svezia,
Olanda, Regno Unito)
[EFSA, 2010a].

Il contenuto intestinale del bestiame (bovini, suini, ovini) spesso contamina le carcasse durante la macellazione. Ciò è particolarmente vero per la carne di pollo, dove la natura del processo di macellazione facilita una più estesa contaminazione fecale rispetto ai mammiferi. Se l'animale è colonizzato da *Campylobacter* e si verifica una contaminazione della carcassa, questi microrganismi si distribuiranno sulla superficie della carcassa e sopravviveranno alle condizioni umide e a bassa temperatura di stoccaggio, fino alla vendita al dettaglio. A causa dei metodi di trasformazione e di conservazione, le carni rosse (manzo, agnello e maiale), hanno meno probabilità di contaminazione della carne di pollame. [EFSA, 2010a].

Poche centinaia di batteri sono considerati sufficienti per causare la malattia. L'EFSA sostiene perciò che vi è la necessità di migliorare e creare nuovi metodi applicati alla tipizzazione di *Campylobacter*, per avere una sorgente di informazioni aggiornata sia qualitativa che quantitativa sulla sua presenza nelle catene alimentari [Pasquali *et al*, 2011].

La carne di pollo è anche una fonte di salmonellosi, causata da *Salmonella* spp. Esistono solo due specie di Salmonella: *S. enterica* e *S. bongori*. Tuttavia, sono stati descritti più di 2500. I sierotipi più comuni in UE sono *S. infantis*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium* [EFSA, 2010b]. Il più alto numero di epidemie coinvolge *S. enteritidis* e molte altre dipendono da *S. typhimurium*. Altri batteri, come *Escherichia coli* e *Listeria*, rappresentano importanti fonti di contaminazione durante la produzione e distribuzione di carne avicola e durante la preparazione.

Il raggiungimento di concentrazioni critiche di microrganismi in grado di alterare le caratteristiche delle carni avicole dipende da numerosi fattori, i più importanti dei quali sono la contaminazione iniziale, i fattori di crescita batterica nelle fasi produttive (temperatura, attività dell'acqua, pH, integrità anatomica), le fasi del confezionamento e infine le condizioni di trasporto e conservazione.

Il numero di alcuni microrganismi può essere utilizzato come indice della qualità organolettica dei prodotti carnei avicoli (indicatori della *shelf-life*, cioè la vita di un alimento "sullo scaffale").

Il livello di contaminazione iniziale delle carni avicole dipende soprattutto dall'igiene del personale e dalle attrezzature, dai macchinari e dal processo. Tra le fasi del processo è particolarmente importante l'immersione in vasca di scottatura e l'asportazione delle penne e delle piume. Il processo di scottatura multifase (immissione delle carcasse in vasche contenenti acqua a temperature dai 50 ai 55 °C), permette di ridurre

progressivamente il carico di materia organica e la contaminazione microbica nelle fasi successive alla vasca di scottatura. E' importante anche la cinetica del processo; cioè il volume d'acqua deve essere adeguato al numero di capi macellati. Una temperatura maggiore (56 °C piuttosto che 51 °C) permetterebbe di ridurre il livello di contaminazione microbica, ma tale processo danneggerebbe l'aspetto della pelle e non è perciò consigliato per le industrie che commercializzano anche prodotti con pelle.

Durante la fase di spennatura è importante che non vi sia contatto tra i capi, che la rimozione delle penne sia completa, che l'aerosol non favorisca la diffusione della contaminazione batterica. Dopo la spennatura, la rimozione della contaminazione è più difficile, perché i batteri aderiscono rapidamente alla cute e perché si annidano nei follicoli della pelle e nelle irregolarità della pelle.

Fattori essenziali per prevenire una rapida crescita batterica sono la temperatura nell'intera catena di produzione e il grado di umidità superficiale delle carni. Il raffreddamento della superficie delle carni deve avvenire quanto prima possibile, in quanto questo fattore estende la fase di adattamento (fase di latenza) dei batteri. La velocità del raffreddamento dipende dalla temperatura dell'aria e dalla sua umidità. L'utilizzo di acqua come *spray* piuttosto che l'immersione in vasca (che dà luogo a problemi igienici) permette di ridurre i tempi di raffreddamento. Durante il raffreddamento è anche importante prevenire la condensazione dell'acqua sulla superficie del prodotto, favorita dall'ammassamento delle carni e dalle fluttuazioni della temperatura [Doyle & Erickson, 2006].

8.3 Microrganismi contaminanti la carne di pollo

8.3.1 *Salmonella enterica*

Il genere *Salmonella* (da Salomon, che nel 1895 descrisse *Salmonella choleraesuis*), contiene numerosi batteri enterici differenziabili sulla base dei diversi antigeni o sierotipi somatici (antigene O), capsulari (antigene Vi) e flagellari (antigene H), catalogati nello schema di Kauffmann-White, dal nome degli studiosi che hanno posto le basi per questo tipo di analisi [Popoff & Le Minor, 2005]. Le salmonelle sono microrganismi potenzialmente patogeni di origine zoonosica che riconoscono uno specifico ospite e/o ospiti diversi.

I ceppi specie-specifici causano in genere infezioni sistemiche nella specie bersaglio; i ceppi ospite-adattati sono così definiti poiché sono tipici di un particolare ospite animale, ma possono infettare più specie animali, tra le quali l'uomo, e determinare la

malattia; infine i ceppi ubiquitari provocano spesso infezioni prive di sintomi negli animali, mentre nell'uomo sono responsabili di infezioni gastroenteriche, di solito acquisite attraverso l'ingestione di alimenti contaminati: a questa categoria appartengono *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enterica* [Wallis & Galyov, 2000].



Figura 8.2
Salmonella enterica.

Per i ceppi di *Salmonella* a diffusione ubiquitaria il serbatoio di infezione è rappresentato da animali di varie specie; l'uomo acquisisce l'infezione attraverso alimenti come carne, prodotti caseari e uova, che possono essere contaminati all'origine oppure in seguito, nel corso delle fasi di preparazione e conservazione. La specie più rappresentativa è *S. enterica* (**Figura 8.2**), distinta in sei sottospecie, che comprende il 95% dei sierotipi presenti in materiali patologici umani [Graziani *et al*, 2005].

Nelle carni avicole, la contaminazione da *Salmonella* dipende principalmente dalle modalità di allevamento del pollame. Ogni allevamento può infatti contenere migliaia di capi e, questa concentrazione di potenziali ospiti fornisce alle salmonelle l'opportunità di diffondere in modo molto rapido tra gli animali. La stessa condizione si ritrova durante il trasporto dall'allevamento al luogo di macellazione, che avviene spesso in condizioni di sovraffollamento. Durante la macellazione, poi, le salmonelle possono passare da un carcassa all'altra, in seguito a fenomeni di contaminazione crociata che si verificano durante la lavorazione [Graziani *et al*, 2005].

8.3.2 *Campylobacter jejuni*

La campilobatteriosi è una malattia infettiva causata da membri di un gruppo di batteri Gram negativi mobili a forma S o curvilinea. Questi batteri sono stati inizialmente riconosciuti agli inizi del XX secolo come agenti patogeni veterinari che causano l'aborto infettivo nel bestiame e furono chiamati "*Vibrios*". Qualche decennio più tardi, patogeni simili ("*related-vibrios*") sono stati ritrovati in campioni di sangue umano proveniente da individui affetti da enterite. Metodi diagnostici per caratterizzare con

maggior precisione questi batteri sono stati sviluppati alla fine del 1970, ed hanno contribuito a stabilire l'origine microbica di alcune zoonosi nel 1981, durante il Primo Workshop internazionale sul *Campylobacter*.

Il genere *Campylobacter* comprende attualmente 17 specie, la maggior parte delle quali sono microaerofile, cioè crescono preferenzialmente in presenza di basse concentrazioni di ossigeno. La maggior parte dei casi di campilobatteriosi sono causate da due specie: *Campylobacter jejuni* e gli strettamente correlati *Campylobacter coli*. Queste due specie sono spesso definite come "termofile" o *Campylobacter* "termotolleranti" poiché crescono preferenzialmente a 42 ° C. Le particolari esigenze di crescita di questi organismi ne consentono l'isolamento e la coltura dalla flora intestinale su terreno selettivo. Un'altra specie di *Campylobacter*, come *C. fetus.*, può anche causare malattie enteriche, ma sono relativamente rare e di solito non sarebbe rilevabile con metodi di coltura ordinari. Quindi le principali cause di malattia sono *C. coli* e *C. jejuni* (vedi **Figura 8.3**).



Figura 8.3
Campylobacter jejuni

C. jejuni e *C. coli* sono componenti comuni della flora intestinale di tutti gli animali a sangue caldo compreso il bestiame (bovini, ovini e suini), animali domestici e animali selvatici, ma per entrambe le specie l'intestino aviario, con una temperatura di 42 ° C, sembra essere una nicchia preferenziale. Nonostante le analisi microbiologiche classiche non permettano di identificare tutti i ceppi di *Campylobacter* a livello della specie, alcune differenze interessanti nella distribuzione di *C. jejuni* e *C. coli* nei vari serbatoi ospite sono state riportate. Per esempio, i dati dell'UE segnalati per il 2007 indicano che *C. jejuni* è stato identificato nel 42.5%, 86.8% e il 2.1% degli isolati batterici da campioni di pollo da carne, bovini e suini rispettivamente, mentre *C. coli* è stato identificato nel 13.1%, 9.5% e 87.1% degli isolati batterici delle medesime specie animali. Poche altre specie di *Campylobacter* sono state identificate in tali isolati, tuttavia circa il 46.4%, 3.1% e 10.7% degli isolati batterici in pollo da carne, bovini e

suini sono stati segnalati come specie "non specificate" di *Campylobacter*. La percentuale di isolati non identificati varia tra gli stati membri e nelle specie animali. Alcuni dati sono disponibili anche da indagini nazionali. Per esempio, in Gran Bretagna, in un sondaggio nazionale su bovini, ovini e suini al macello, *C. coli* è stato individuato nel 9%, 34% e il 90% degli isolati batterici di *Campylobacter*, rispettivamente, mentre il *C. jejuni* è stato identificato nel 81%, 65% e 4% rispettivamente. Sempre in Gran Bretagna negli allevamenti di pollame a macellazione, il 77% dei *Campylobacter* appartenevano alla specie *jejuni* ed il 23% alla specie *coli*, mentre i risultati corrispondenti in Norvegia erano al 91% *C. jejuni*, *C. coli* 7% e 2% *C. lari*. Questi risultati suggeriscono un'associazione preferenziale e differenziale tra queste specie di *Campylobacter* e gli ospiti animali. Le basi di tali differenze ecologiche sono ancora sconosciute.

Nella maggior parte dei casi, i microrganismi sono costantemente riversati nelle feci da animali asintomatici. Anche se i campilobatteri non crescono al di fuori dell'intestino ospite, hanno la capacità di sopravvivere per lunghi periodi specialmente in ambienti umidi, freschi e lontano dalla luce solare diretta. Di conseguenza, *C. jejuni* e *C. coli* sono ubiquitari nell'ambiente. Quindi ci sono molti serbatoi in cui il microrganismo si moltiplica e molti veicoli con cui il microrganismo può raggiungere il suo prossimo ospite.

Campylobacter può essere trasmesso da questi serbatoi all'uomo attraverso molte vie diverse. Possono essere trasportati direttamente dagli animali, dalla pelle all'uomo attraverso le mani, per esempio toccando il cibo dopo un contatto con l'animale. Inoltre *Campylobacter* è disperso nell'ambiente dagli animali vivi e può quindi essere ingerito da esseri umani, per esempio, bevendo acqua non trattata, attraverso il contatto occasionale con acque superficiali o mangiando verdura cruda contaminata. Inoltre *Campylobacter* potrebbe raggiungere l'uomo attraverso vettori, come le mosche, che potrebbero depositare i batteri sul cibo. Anche la carne ha un ruolo importante diretto e indiretto nella trasmissione di *Campylobacter* [EFSA, 2010a].

8.4 Normativa

La sicurezza degli alimenti è garantita principalmente da un approccio preventivo, come l'applicazione delle "Buone Pratiche Igieniche" (GHP) e l'applicazione di procedure basate sui principi del sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point). Nella legislazione dell'UE, i FSC (Food Safety Criterion) sono utilizzati anche come un modo per comunicare il livello di controllo dei rischi che dovrebbe essere raggiunto.

La maggior parte dei FSC si basano su campionamenti di 5 o 10 unità per campione testato, ad eccezione di alimenti per lattanti in cui 30 unità sono testate ([Jarquin *et al*, 2009]. Pertanto, per gli agenti patogeni presenti nel cibo a bassa frequenza, il basso numero di unità testate aumenta il rischio di non rilevare lotti di alimenti contaminati. Nell'UE, i FSC per *Salmonella* sono stati precedentemente stabiliti per alimenti come carni macinate e preparati di carne, alimenti per lattanti e diversi tipi di cibi pronti. I dettagli di tali parametri, in particolare quelli relativi alla carne, sono riportati nella **Tabella 8.1**, dove *n* è uguale al numero di campioni e *c* è il numero massimo di unità di campionamento ammesso che produce risultati non conformi ai regolamenti.

Tabella 8.1 Criteri di sicurezza alimentare relativi a <i>Salmonella</i> applicati a diversi tipi di carne e preparazioni derivate [Regolamento (CE) N. 1441/2007, 2007].		
Tipo di prodotto	Piano di campionamento	Limiti
Carne macinata e preparati a base di carne destinati a essere consumati crudi	n=5, c=0	Assente in 25 g
Carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame destinate ad essere consumate cotte	n=5, c=0	Dal 01.01.2010 Assente in 25 g
Carne macinata e preparazioni di carne a base di animali diversi dal pollame destinate ad essere consumate cotte	n=5, c=0	Assente in 10 g
Carni separate meccanicamente (CSM)	n=5, c=0	Assente in 10 g
Prodotti a base di carne destinati ad essere consumati crudi, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di salmonella	n=5, c=0	Assente in 25 g
Prodotti a base di carne di pollame destinati ad essere consumati cotti	n=5, c=0	Dal 01.01.2010 Assente in 25 g

Il regolamento (CE) N. 2160/2003 sul controllo delle zoonosi si prefigge la riduzione di *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, in alcune popolazioni animali come allevamenti di galline ovaiole, polli da carne e tacchini.

Il regolamento (CE) N. 2073/2005 stabilisce i criteri microbiologici per le derrate alimentari [Regolamento (CE) N. 2073/2005, 2005].

Il regolamento (CE) N. 2073/2005 sui criteri microbiologici prescrive le frequenze di campionamento ed analisi solo per carni macinate, carni separate meccanicamente e

preparazioni di carni, lasciando la libertà di adattare il numero delle analisi al rischio, con la possibilità di incoerenza nei test e nel controllo. Non è quindi possibile collegare quantitativamente i FSC, così come sono attualmente in uso, al rischio e, successivamente, alle implicazioni per la salute pubblica, per cui sarebbe opportuno, al fine di stabilirne un collegamento, specificare oltre ai criteri microbiologici anche le frequenze di campionamento. Inoltre, informazioni quantitative dovrebbero essere disponibili sulla variabilità del numero di agenti patogeni nei diversi lotti dei prodotti alimentari.

Un PHC (Process Hygiene Criterion) dell'UE dà indicazioni su, ed è un indicatore del funzionamento accettabile di lavorazione, manipolazione e dei processi di distribuzione basati sull'HACCP. Esso imposta i valori di contaminazione indicativi oltre i quali azioni correttive sono necessarie per mantenere l'igiene del processo in conformità con la normativa alimentare.

La natura del PHC è simile a quella dei cosiddetti criteri del "prodotto finale". In altre parole, la maggior parte dei PHC dati, in realtà, non fornisce informazioni sui rapporti tra la contaminazione iniziale e quella finale nei processi, ma solo sui risultati di processo. Questo potrebbe essere un vantaggio o uno svantaggio a seconda che lo scopo sia quello di caratterizzare microbiologicamente il processo stesso, o di caratterizzare lo stato microbiologico solo del prodotto finale.

Un PHC per *Salmonella* è fissato per le carcasse di polli da carne dopo la refrigerazione di 25 g di un campione aggregato di pelle del collo. Sessioni di campionamento sono svolte un giorno della settimana su base settimanale. Ad ogni sessione di campionamento, le pelli del collo di 15 carcasse sono raccolte e raggruppate in 5 gruppi ciascuno dei quali pesa 25 g. I risultati vengono registrati per un periodo continuo di 10 settimane, e i criteri sono $n = 50$, $c = 7$, $m =$ assenza di *Salmonella* in 25 g (dove m è la concentrazione massima del microrganismo accettata). Il metodo di analisi deve essere conforme alla norma EN / ISO 6579:2002. In caso di risultati non conformi ai parametri di igiene occorre rivedere i punti critici della filiera, come pure accertarsi dell'origine degli animali e verificare la sicurezza biologica nella fattoria d'origine. Secondo l'articolo 10 del regolamento (CE) N. 2073/2005, i criteri microbiologici dovrebbero essere rivisti alla luce dei cambiamenti osservati relativi alla presenza e alla distribuzione di *Salmonella*.

Nei riguardi dei polli da carne, il Regolamento (CE) N. 646/2007 ha per obiettivo la riduzione dell'1% o meno negli allevamenti restanti positivi a *Salmonella enteritidis* o

Salmonella typhimurium entro la fine del 2011. Il Regolamento armonizza anche il protocollo di campionamento per il monitoraggio in tutti gli stati membri dall'inizio del 2009. I dettagli del protocollo possono essere trovati nell'annesso del Regolamento (CE) N. 646/2007 [EFSA, 2010b].

Come già detto in precedenza, un altro microrganismo importante per la filiera del pollame è il *Campylobacter*, considerando che un totale di 175561 casi di **campilobatteriosi** nell'uomo sono stati segnalati nel 2006 nell'Unione Europea ed è la più frequente zoonosi riportata e che la carne di pollame è considerata una delle principali fonti di infezione.

Il 27 gennaio 2005, su richiesta della Commissione Europea, un gruppo di esperti sulle infezioni alimentari, ha raccomandato fortemente di ridurre le contaminazioni di *Campylobacter* negli allevamenti di pollame e nei prodotti derivati.

Conformemente alla decisione della Commissione (CE) N. 516/2007, tutti gli stati membri stanno attualmente conducendo un'indagine sulla prevalenza e resistenza agli antimicrobici del *Campylobacter* spp. in allevamenti di polli da carne e carcasse di pollo, eseguendo analisi qualitative e quantitative. L'indagine ha fornito i valori comparabili tra gli stati membri, al fine di prendere le misure necessarie lungo la catena di produzione della carne di pollo. I risultati sono stati trasmessi all'EFSA alla fine di aprile del 2009.

Prima di decidere sulle misure di gestione del rischio e la definizione di obiettivi di prestazione, la commissione ha effettuato un'analisi costi / benefici. Una valutazione quantitativa dei benefici della salute pubblica e delle opzioni di controllo potenziale è stata effettuata [EFSA, 2010a].

I risultati degli studi di rischio su *Campylobacter* negli animali e nelle derrate alimentari, nella catena di produzione dei polli da carne di *Gallus gallus* hanno concluso che la manipolazione, la preparazione e il consumo di polli da carne sono responsabili del 20-30% dei casi umani di campilobatteriosi, mentre il 50-80% possono essere attribuiti al pollo come serbatoio nel suo complesso. Questi dati forniscono una buona base di partenza per definire i criteri microbiologici volti a precisare e ridurre il rischio di contaminazione da *Campylobacter*, stabilendo, fatto più importante, la massima concentrazione accettabile [Pasquali *et al*, 2011].

Il 5 dicembre del 2007 è uscito il Regolamento (CE) N. 1441/2007 che modifica il regolamento (CE) N. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, ma i criteri stabiliti precedentemente per *Salmonella* spp. e *Campylobacter*

jejuni in carne e prodotti a base di carne restano invariati [Regolamento (CE) N. 1441/2007, 2007].

8.5 Metodi classici e molecolari applicati all'analisi microbiologica della carne

I metodi ISO per il rilevamento di microrganismi fino ad ora citati nei campioni alimentari richiede l'allestimento di una coltura microbica, seguito da una coltura di arricchimento selettivo e infine dall'isolamento e conferma del batterio in esame e ulteriore caratterizzazione basata su metodi biochimici e sierologici. Più di sette giorni sono normalmente richiesti per l'intera procedura [Jarquin *et al*, 2009].

La **PCR**, introdotta nel **Capitolo 7**, offre, rispetto ai metodi tradizionali, due principali vantaggi: tempi ridotti di analisi e la possibilità di rilevare un numero di cellule microbiche molto basso, anche senza arricchimento, essendo una tecnica in grado di rilevare anche poche molecole di DNA (**Figura 8.4**). Ciò è rilevante nel caso di microrganismi difficilmente o non coltivabili [Birch *et al*, 2001; Keer & Beer, 2003]. Inoltre l'utilizzo di *primer* specifici per sequenza di un determinato microrganismo, conferisce a questa tecnica un'elevata specificità, come riportato in diversi lavori [Mullis *et al*, 1986; Denis *et al*, 2001; Maciorowski *et al*, 2005].

Negli ultimi tempi, l'invenzione della PCR in tempo reale (**Real Time PCR**) in cui è possibile visualizzare l'amplicone durante la sua formazione e anche quantificare le molecole di DNA microbico presenti in un campione, e quindi il numero di cellule batteriche, ha notevolmente influenzato la diagnostica in tutti i campi. [Kubista *et al*, 2006].

La Real Time PCR, evita inoltre l'elettroforesi *post* amplificazione, e l'uso di reagenti pericolosi come il bromuro di etidio. La visualizzazione in tempo reale dell'amplicone consente un'ulteriore riduzione dei tempi di analisi (**Figura 8.4**).

Con la Real Time PCR è possibile monitorare la cinetica della reazione di amplificazione grazie all'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue l'andamento della PCR. La fluorescenza emessa viene misurata in tempo reale da un apposito rivelatore e il suo accumulo si traduce in una curva di amplificazione che è composta da tre fasi distinte:

- iniziale, in cui non si osserva aumento della fluorescenza;
- esponenziale, in cui il prodotto di amplificazione aumenta seguendo l'equazione esponenziale $x = 2^n$;
- lineare, in cui il consumo dei reagenti porta al rallentamento della reazione;

- stazionaria o planare, in cui la reazione di amplificazione termina per mancanza di reagenti e il prodotto di amplificazione inizia a degradarsi.

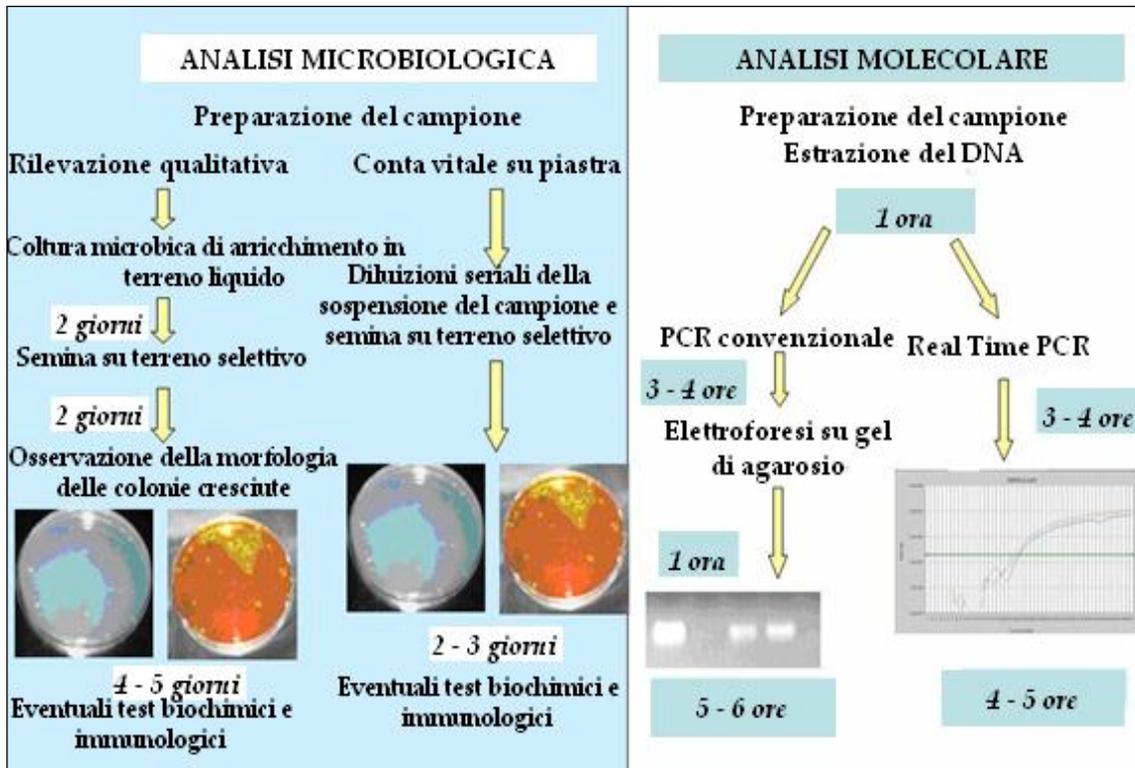


Figura 8.4
I tempi dei metodi microbiologici e molecolari utilizzati per la rilevazione di microrganismi.

La fluorescenza non viene visualizzata immediatamente, ma solo dopo un certo numero di cicli che dipende dalla quantità originale di DNA.

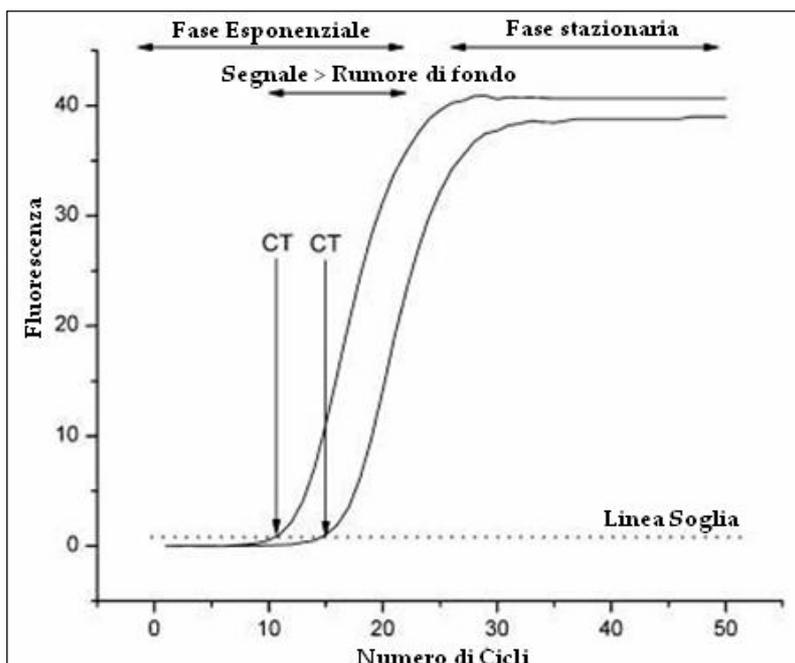


Figura 8.5
Curve di risposta della Real Time [Kubista *et al*, 2006].
In ordinata è riportata la fluorescenza espressa come R_n , in ascissa il numero di cicli.

Il ciclo a cui la fluorescenza supera il 5% del livello di base viene indicato come ciclo soglia (Ct). Se si amplificano più campioni a diverse quantità di DNA iniziale è possibile tracciare la “linea soglia” che interseca le curve di amplificazione dei vari campioni al loro ciclo soglia (vedi **Figura 8.5**).

Esiste una relazione di proporzionalità inversa tra i Ct e il logaritmo decimale della quantità iniziale di DNA nel campione: più questa è bassa, più la visualizzazione della fluorescenza viene ritardata e quindi il Ct ha un valore elevato. Questo principio è alla base della Real Time PCR quantitativa (qPCR).

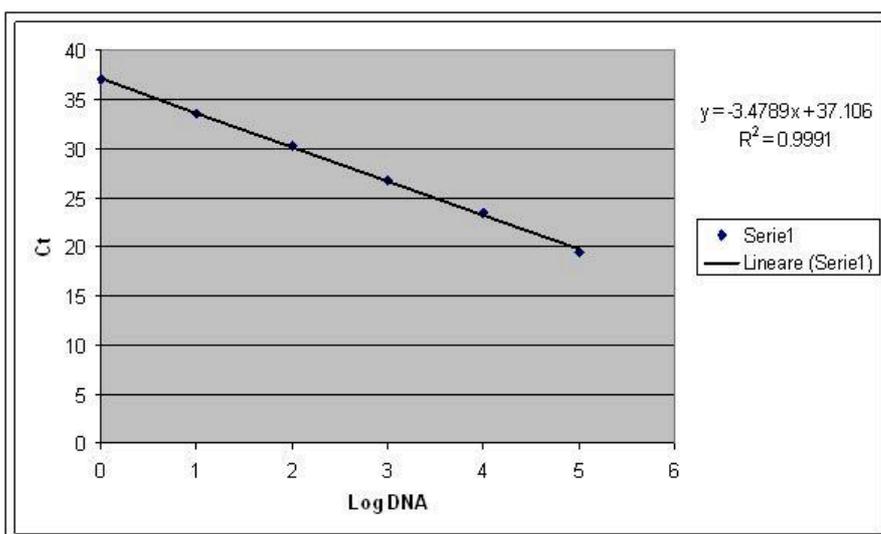


Figura 8.6
Curva standard generata da una serie di diluizioni seriali di DNA a concentrazione nota con pendenza e R².

Utilizzando diluizioni seriali di DNA a concentrazione nota è possibile costruire una retta di riferimento in cui il log₁₀ della quantità iniziale di DNA è posto in relazione coi Ct (**Figura 8.6**) [Botteldoorn *et al*, 2008; Novinscak & Surette, 2007; O’Regan *et al*, 2008], tramite la formula seguente:

$$10^{[(MCt - q) / m]}$$

Dove MCt rappresenta la media dei Ct corrispondenti ad un determinato campione; q ed m sono rispettivamente il valore dell’intercetta e del coefficiente angolare ricavati dall’equazione relativa alla retta di taratura costruita mediante gli standard.

Dalla curva standard è possibile ricavare una serie di informazioni importanti:

- l’efficienza della reazione (E): per determinarla è utilizzata la pendenza della curva standard (m nell’equazione della retta $y=mx+q$); $E = 10^{(-1/m)} - 1$. Sono accettati valori di m compresi tra -3.1 e -3.6 e di E compresi tra il 90 e il 110 %;
- la precisione: è determinata tramite il coefficiente di Pearson R²; costituisce il riscontro di tutti i dati rispetto alla curva standard rappresentata e può essere

influenzato dalla precisione della serie di diluizione e dalla sensibilità generale dell'esperimento (> 0.985);

- la sensibilità: i valori di pendenza (m) e di R^2 della curva standard aiutano a determinare la sensibilità di uno specifico esperimento. In pratica definisce qual è il numero minimo di copie di DNA che si possono rilevare in un campione.

Da questa retta è infine possibile estrapolare la concentrazione di DNA del campione in esame.

La Real Time PCR può essere condotta con diversi fluorofori e con diversi approcci. Di seguito ne sono descritti alcuni.

8.5.1 Rilevazione basata sul fluoroforo SYBR®GreenER™

La soluzione più economica è rappresentata dall'agente intercalante SYBR® Green I. Si tratta di un colorante fluorescente simile all'etidio bromuro che intercalandosi nella doppia elica, nel solco minore del DNA, incrementa di circa cento volte la sua fluorescenza, generando quindi un segnale visibile dal rivelatore proporzionale al numero di copie presenti. Il SYBR® Green I (e più recentemente il SYBR® GreenER™) fa parte dei coloranti aspecifici sviluppati per le reazioni di PCR Real-Time: si tratta di una molecola fluorescente, in particolare una cianina asimmetrica, la cui fluorescenza aumenta significativamente quando essa si trova complessata con il DNA a doppia elica: la molecola assorbe luce blu ($\lambda_{max} = 498 \text{ nm}$) ed emette luce verde ($\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$) (vedi **Figura 8.7**).

Il legame del fluoroforo al DNA avviene secondo due modalità diverse: il SYBR® Green, infatti, è in grado sia di intercalarsi tra le coppie di nucleotidi della doppia elica, sia di legarsi al solco minore che si forma nella molecola di DNA [Zipper *et al*, 2004]. Questo modo di legare il DNA rende questo intercalante un reporter generalmente aspecifico, che permette di monitorare l'andamento della reazione, ma non consente di riconoscere a priori il prodotto amplificato che determina la comparsa del segnale di fluorescenza: basandosi solamente sul grafico di amplificazione non è possibile sapere se la fluorescenza è data dal target voluto o da un prodotto aspecifico, è però possibile riconoscere i vari prodotti in base all'analisi delle curve di dissociazione (curve di *melting*).

Per Temperatura di *melting* (T_m) si intende la temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA in un campione sono denaturate. Essa dipende soprattutto dalla lunghezza della molecola di DNA e dalla loro sequenza (ordine delle basi e percentuale di GC), ed è quindi caratteristica di un frammento. Questo permette di identificare gli

ampliconi prodotti nella stessa reazione ed eventuali prodotti aspecifici, come i dimeri di *primer*.

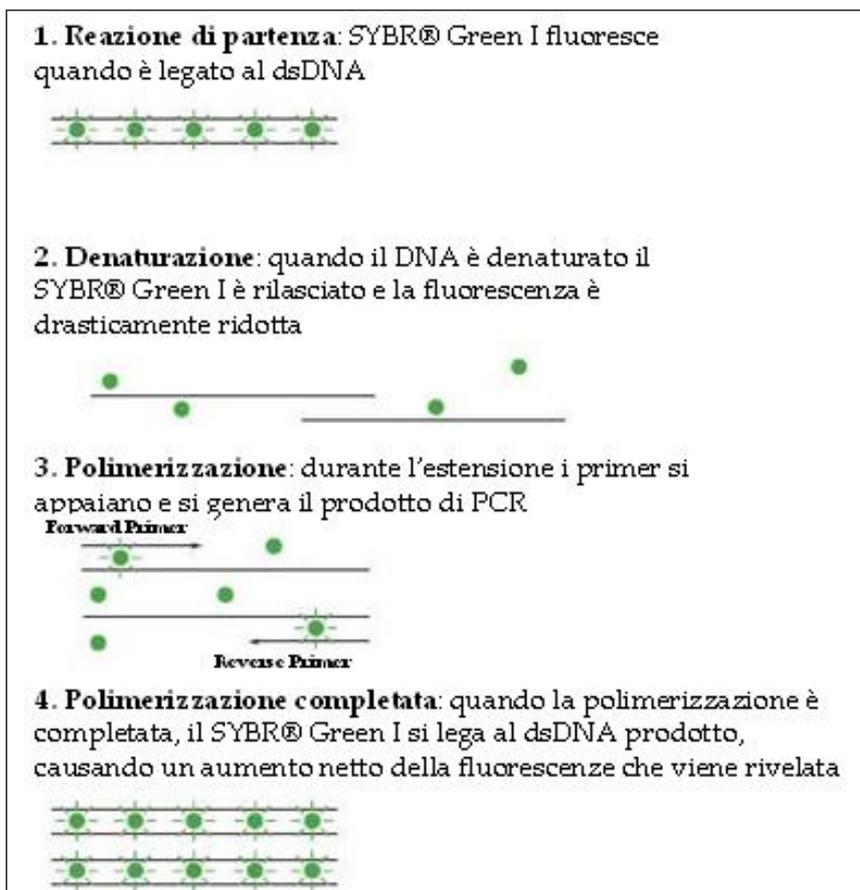


Figura 8.7
Rappresentazione schematica della Real-Time PCR con fluoroforo SYBR® Green I. SYBR® Green I dopo il legame con il dsDNA rilascia un segnale fluorescente alla luce UV che consente la visualizzazione degli ampliconi a filamento doppio. (immagine proveniente da www.appliedbiosystems.com)

L'analisi della curva di dissociazione viene fatta dallo strumento al termine della reazione di amplificazione e consiste in un graduale innalzamento della temperatura, a partire da una temperatura prefissata (ad esempio 60°C) fino ad arrivare a circa 90-95°C. All'aumentare della temperatura il SYBR® Green si separa lentamente dalle molecole di DNA, ma in corrispondenza della T_m , al momento della denaturazione dei due filamenti si ha un drastico calo della fluorescenza che viene rilevato come punto di flesso nella curva di dissociazione. Un algoritmo apposito trasforma i dati relativi alla curva di *melting* nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale: ne risulta un grafico che mostrerà un picco in corrispondenza della temperatura di *melting* di quello specifico amplicone (**Figura 8.8**).

Basandosi su questo principio, è quindi possibile sviluppare reazioni di Real-Time PCR multiplex con un numero anche elevato di target, purché i frammenti amplificati abbiano delle T_m sufficientemente differenti da essere distinguibili. Questo approccio, che aumenta notevolmente l'efficienza della Real Time PCR è stato utilizzato per rilevare la presenza di batteri patogeni contaminanti acque, alimenti e feci [Fukushima *et al*, 2003].

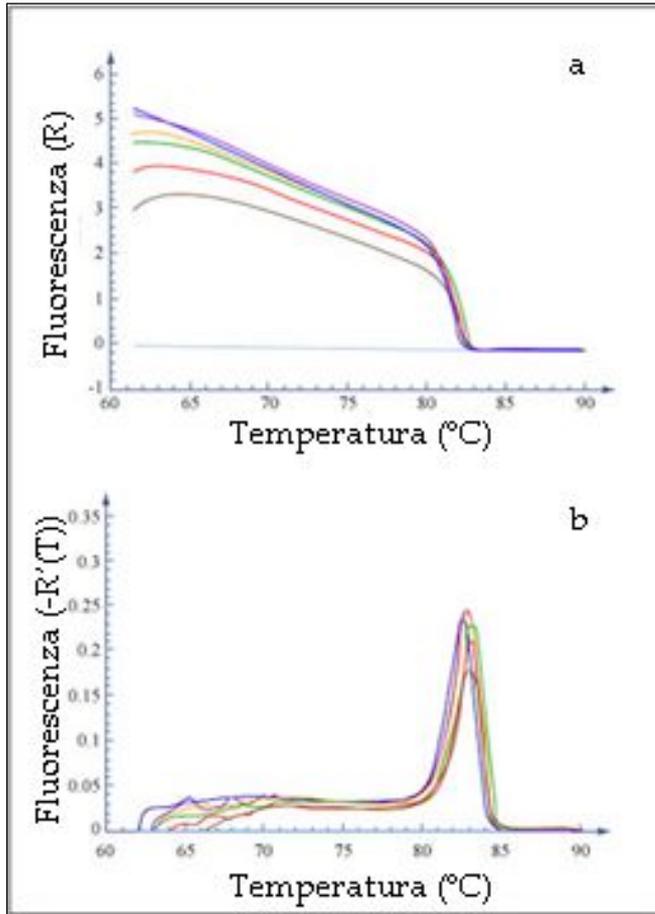


Figura 8.8

a. Il cambiamento del segnale di fluorescenza grezza è riportato graficamente in funzione della temperatura.

b. La derivata prima negativa della fluorescenza grezza è riportata graficamente rispetto all'aumento di temperatura durante la curva di dissociazione (*melting*).

8.5.2 Rilevazione basata sul saggio delle sonde TaqMan®

Nel saggio TaqMan® [Heid *et al*, 1996; Chen *et al*, 2009] la sonda fluorogena (**Figura 8.9**) presenta all'estremità 5' un fluoroforo detto *reporter* (R) ed all'estremità 3' una molecola detta *quencher* (Q), in una configurazione di questo tipo, la molecola quencher impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del fluoroforo reporter. La sonda è complementare alla sequenza del DNA bersaglio compresa tra i due *primer* e quindi prima dell'avvio della PCR vi si ibrida e ne impedisce l'amplificazione.

Durante l'estensione del *primer*, la DNA polimerasi incontra la sonda ibridata alla sequenza bersaglio e la degrada utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica, portando così a termine la copiatura del frammento. Ogni qualvolta una sonda viene degradata dalla *Taq polimerasi*, si libera in soluzione la molecola *reporter* che emette il segnale di fluorescenza rivelabile dallo strumento. Per ogni copia di prodotto PCR, una sonda viene degradata.

Le sonde TaqMan®, rispetto al SYBR® Green, sono più specifiche, in quanto la selettività della sonda si aggiunge a quella dei *primer*; inoltre consentono una quantificazione più precisa, poiché, a differenza di ciò che avviene con i fluorofori

aspecifici, non si visualizzano dimeri di *primer* che possono interferire con la quantificazione.

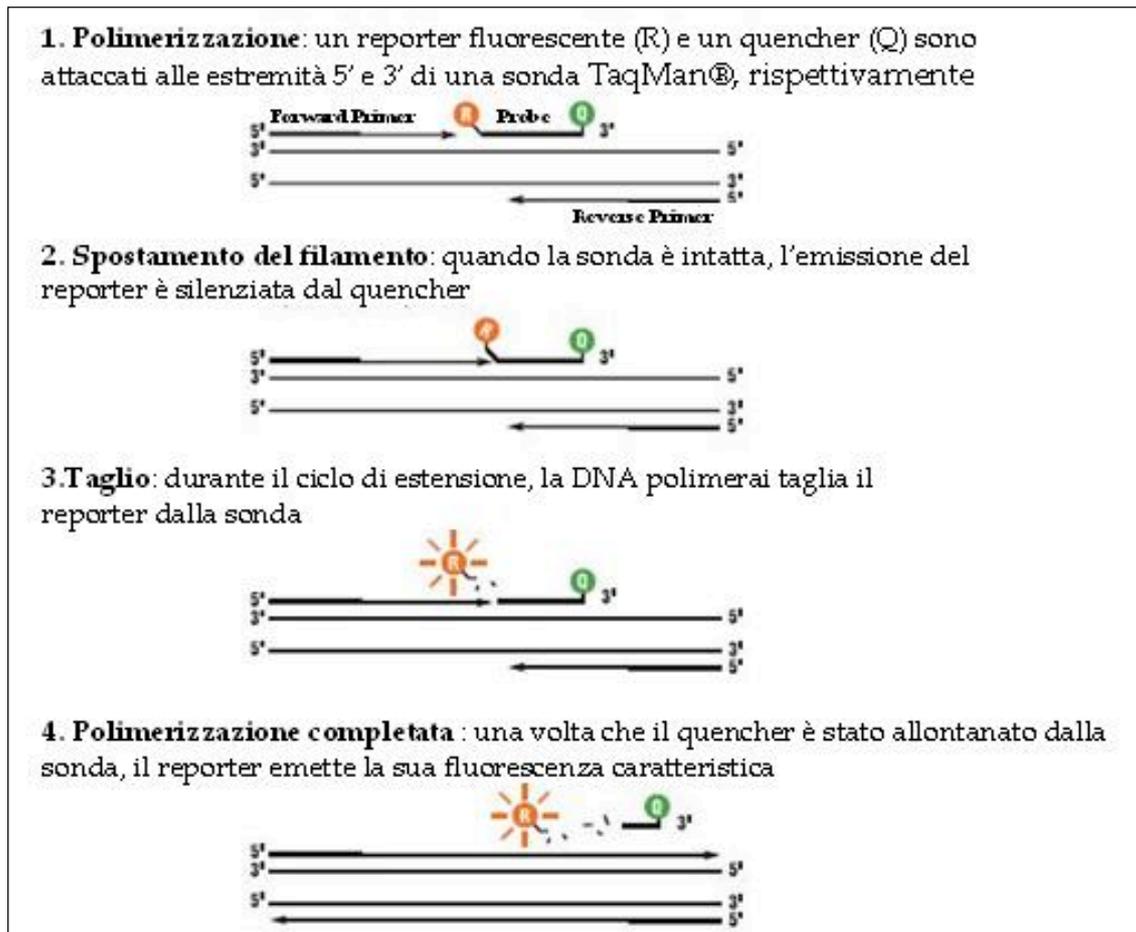


Figura 8.9

Rappresentazione schematica della real-time PCR con sonde TaqMan®. In una sonda TaqMan® intatta, l'energia è trasferita mediante risonanza da un fluoroforo (R) posto ad una delle estremità ad un altro fluoroforo (Q) posto nell'altra estremità che silenzia il segnale generato dal primo. In seguito al legame con una sequenza di ssDNA complementare alla sonda, l'attività esonucleasica della *Taq polimerasi* excide, separandoli, i fluorofori, generando fluorescenza. (immagine proveniente da www.appliedbiosystems.com).

9. Studio preliminare di comunità microbiche in una matrice ambientale complessa

9.1 Metodi classici e molecolari applicati all'analisi microbiologica ambientale

9.1.1 Le tecniche tradizionali non bastano

Studiare la composizione e le dinamiche delle comunità microbiche in suoli e acque, anche contaminati, è importante per comprendere gli ecosistemi e i loro equilibri. Tuttavia questi studi sono limitati dalla difficoltà che si incontra nel coltivare i microrganismi da campioni ambientali. Per quanto siano stati studiati terreni di isolamento e arricchimento per ogni possibile gruppo metabolico, ancora oggi molti microrganismi non sono coltivabili e non possono essere isolati in coltura pura e studiati. Si stima che la comunità microbica in un grammo di suolo sia composta da oltre un migliaio di specie batteriche diverse, delle quali solo l'1% è coltivabile. E' stato osservato che gli organismi che crescono più velocemente o i ceppi meglio adattati a determinate condizioni di coltivazione crescono in modo preferenziale rispetto agli altri e quindi non rappresentano accuratamente la composizione della comunità microbica dei siti di studio. Quindi nello studio di comunità microbiche ambientali, ancor di più che nel campo della rilevazione in senso stretto, è necessario complementare, e ove possibile sostituire, le tecniche microbiologiche classiche, con tecniche molecolari indipendenti dalla necessità di isolare e coltivare le singole specie che compongono le comunità [Kent & Triplett, 2002].

Le tecniche molecolari oggi utilizzate si basano sulla caratterizzazione di componenti cellulari come gli acidi nucleici, le proteine, gli acidi grassi e altre molecole *taxa*-specifiche che possono essere estratte direttamente dai campioni ambientali senza la necessità di coltivare i microrganismi. L'analisi di queste molecole (informative) può essere usata per chiarire la composizione della comunità microbica. Un altro vantaggio della caratterizzazione molecolare indipendente dalla coltivazione è la possibilità di analizzare il campione senza troppe manipolazioni e senza modificare (con lunghi trattamenti) la sua composizione microbica, così come è stata prelevata. In questo modo il quadro che emerge dalle analisi è più completo e corrispondente alla situazione reale al momento del campionamento.

Ad oggi, non esiste un'unica tecnica molecolare in grado di descrivere in modo adeguato l'intera diversità microbica. Ogni tecnica molecolare ha i suoi limiti perché può introdurre errori analitici [Malik *et al*, 2008].

Per poter valutare e monitorare un determinato fenomeno ecologico è importante affiancare una tecnica che possa mostrare un quadro generale della comunità microbica, presente in un determinato contesto ambientale, ad esempio tramite un'analisi di profilo, a un metodo in grado di rilevare ed eventualmente quantificare particolari popolazioni interessanti a livello funzionale.

Di seguito sono quindi riportate alcune considerazioni sull'applicazione, in ambito ecologico-ambientale, di PCR e di Real Time PCR e sull'utilizzo di due importanti metodi per l'analisi del profilo genetico delle comunità.

9.1.2 PCR e Real Time PCR

La PCR è una tecnica che ha la capacità di produrre milioni di copie di una porzione di un gene desiderato, dell'intero gene o di un cluster di geni, con alta fedeltà di duplicazione ed entro 3 o 4 ore. Metodi basati sulla PCR sono, da tempo, utilizzati nella individuazione e quantificazione dei microrganismi del suolo e dell'acqua. La tecnica può essere applicata inoltre per l'analisi di geni catabolici coinvolti nella biodegradazione di sostanze organiche contaminanti o per la rilevazione di geni metabolici in generale.

Per la rilevazione di organismi o geni in ambienti, sono spesso utilizzati due varianti della tecnica PCR: la PCR semplice e la PCR *multiplex*. La PCR semplice utilizza una coppia di *primer* in una singola reazione di amplificazione, mentre la PCR *multiplex* utilizza più coppie di *primer* per amplificare contemporaneamente diversi geni in una singola reazione.

L'efficacia della PCR dipende dalla estrazione e purificazione degli acidi nucleici da campioni ambientali, con sufficienti rese e buona qualità. Un'insufficiente lisi cellulare potrebbe, ad esempio, comportare l'estrazione del DNA preferenzialmente dai batteri Gram-negativi, mentre trattamenti troppo vigorosi potrebbero comportare la frammentazione del DNA dalle cellule più facilmente lisate. Inoltre, l'efficienza di amplificazione può essere gravemente ostacolata dalla presenza di sostanze inibenti che spesso sono co-estratte con gli acidi nucleici, come gli acidi umici, particelle di materia organica e argilla, nel caso di suolo e sedimenti.

I metodi impiegati per il campionamento, il trasporto e la conservazione dei campioni, a monte dell'estrazione degli acidi nucleici, sono importanti perché una scorretta gestione di queste fasi può portare ad errori nelle analisi successive. Particolare attenzione va posta alla temperatura alla quale sono conservati i campioni e la loro esposizione all'ossigeno. Con una prolungata conservazione dei campioni, entrambi questi fattori

possono alterare la composizione microbica e nasce da qui la necessità di estrarre DNA / RNA subito dopo la raccolta del campione.

La tecnica PCR classica viene anche definita PCR *end-point* poiché gli ampliconi sono analizzati solo dopo aver completato tutti i cicli della reazione di amplificazione e, in questo modo, le proporzioni degli ampliconi ottenuti non necessariamente riflettono la reale abbondanza delle sequenze presenti in quel determinato campione ambientale, a causa di errori che possono essere introdotti dalla PCR stessa e che sono associati anche alla facilità di amplificazione dei *target* da DNA templatato di diverse origini [Smith & Osborn, 2009].

Esempi di applicazione della PCR *multiplex* sono stati pubblicati nell'ambito del rilevamento della popolazione microbica di batteri idrocarburo ossidanti in un suolo contaminato da petrolio [Knaebel & Crawford, 1995]. La stessa tecnica è stata impiegata per lo studio dei geni codificanti naftalene diossigenasi, bifenile diossigenasi, toluene diossigenasi, xilene monoossigenasi, fenolo monoossigenasi e toluene monoossigenasi anello idrossilante in un'unica reazione di PCR [Baldwin & Nakatsu, 2003].

Anche se la PCR *multiplex* può far risparmiare tempo e risorse nella rilevazione di microrganismi attraverso l'amplificazione contemporanea di più geni specie specifici, la buona riuscita della reazione dipende dalla combinazione ottimale di coppie di *primer* diversi, nell'ipotesi che questi siano in grado di funzionare in modo affidabile in un'unica reazione. E' possibile che si verifichi la formazione di dimeri di *primer* e questo può portare a scarsa sensibilità del sistema analitico e all'amplificazione preferenziale di taluni *target* e non di altri [Malik *et al*, 2008].

Per tale motivo, negli ultimi anni si è preferito usare la **Real Time PCR** (ben descritta nel **Capitolo 8, paragrafo 8.5**). Nel 2000 Takai e Horikoshi, hanno quantificato il numero dei geni codificanti per il 16S rRNA in campioni provenienti da sorgenti idrotermali di mare profondo, sorgenti di acqua calda e sedimenti di sorgenti calde e di acqua dolce [Takai & Horikoshi, 2000]. La tecnica permette, grazie all'amplificazione di regioni del 16S rDNA altamente conservate, di quantificare il numero di "batteri totali" (e/o archea) mentre l'amplificazione di sequenze *taxa*-specifiche all'interno delle regioni ipervariabili del gene, permette di quantificare i batteri e/o gli archea dal livello tassonomico superiore (*phylum*) fino al livello della specie. Per questo è indispensabile che siano disponibili dati di sequenza che permettano il disegno dei *primer* adatti e delle sonde opportune [Nadkarni *et al*, 2002; Suzuki *et al*, 2000].

Oltre a dati quantitativi basati su marcatori tassonomici come gli rRNA, la Real Time PCR permette la quantificazione di geni funzionali presenti nel campione ambientale analizzato. La rilevazione e quantificazione di geni funzionali che codificano enzimi chiave di vie anaboliche o di vie cataboliche, permettono di saggiare il potenziale (genetico) per una particolare funzione microbica in un determinato ambiente. Per comprendere il ruolo, in un certo ambiente, delle popolazioni microbiche e studiarlo a livello molecolare, è essenziale non solo conoscere quali geni sono presenti e la diversità di tali geni, ma anche determinare la loro abbondanza e distribuzione all'interno dell'ambiente. A questo scopo è stata utilizzata la tecnica di Real Time PCR per comprendere processi biochimici ambientali mediati da microrganismi tramite la quantificazione di geni funzionali coinvolti nell'ossidazione dell'ammonio, nella riduzione del nitrato (denitrificazione), nella solfato riduzione, nella metanogenesi e nell'ossidazione del metano [Smith & Osborn, 2009].

I vantaggi che offre la Real Time PCR sono la velocità, la sensibilità, la precisione e la possibilità di automazione robotica. Tuttavia, anche se la Real Time PCR può essere in grado di misurare la quantità dei geni presenti nell'ambiente e quindi il numero di microrganismi che possiedono questi geni, i risultati ottenuti non possono essere direttamente correlati all'espressione di una specifica attività microbica dovuta alla parte attiva della popolazione. Per ottenere queste informazioni la Real Time PCR deve essere eseguita estraendo RNA messaggeri (mRNA) e analizzandoli tramite RT- Real Time PCR in cui, a monte dell'amplificazione, è inserito un passaggio di retrotrascrizione. Spesso però gli mRNA di una specifica popolazione microbica sono estratti in scarse quantità dai campioni di suolo e acqua e non rappresentano tutta la popolazione microbica in esame. Si sa che l'amplificazione differenziale dei geni codificanti il 16S rRNA può generare errori in studi della biodiversità basati solo sulla PCR. Per esempio, si pensa che le sequenze con minore contenuto G+C si separino in modo più efficiente nel passaggio di denaturazione della PCR e quindi possano essere amplificate preferenzialmente. Inoltre sia i prodotti da PCR *end-point* visualizzati su gel che quelli in tempo reale possono essere il risultato di artefatti o della formazione di prodotti di PCR chimerici. Infine, essendo la PCR una tecnica molto sensibile, in alcuni casi possono essere introdotti falsi segnali positivi o falsi negativi a causa del fenomeno della contaminazione [Malik *et al*, 2008].

In ogni caso le tecniche molecolari che usano la PCR, pur con i loro limiti, hanno completamente rivoluzionato gli studi di ecologia microbica grazie alla possibilità di

individuare DNA / RNA specifici e sono comunemente utilizzati per la facilità con la quale possono essere analizzati molti campioni e per la possibilità che queste tecniche offrono all'analisi di microrganismi particolari, e non coltivati (come possono essere, ad esempio, i batteri "anamnox") o *taxa* di interesse attraverso l'uso di *primer* universali o di *primer* "gruppo" specifici.

Numerosi metodi di *fingerprinting* della comunità microbica sono stati comunemente utilizzati in questi ultimi anni in studi di ecologia microbica per valutare le differenze nella composizione della comunità tra campioni o trattamenti diversi, o per valutare i cambiamenti della comunità microbica nel tempo. Tali tecniche come ARISA, DGGE, TGGE, SSCP, ITS-RFLP (ITS Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random amplified Polymorphic DNA) o ARDRA forniscono dei profili di comunità piuttosto complessi che non offrono direttamente informazioni tassonomiche, ma consentono l'analisi e il confronto di diverse comunità [Nocker *et al*, 2007]. Le differenze nei profili elettroforetici tra i campioni riflettono le differenze nella composizione della comunità e l'abbondanza delle popolazioni microbiche individuali in una comunità. Anche se "l'impronta digitale" (*fingerprint*) ottenuta da un campione ambientale non può rivelare direttamente la composizione tassonomica di una comunità microbica, l'informazione genetica relativa a membri particolari della comunità può essere ottenuta isolando, in alcuni casi, le bande d'interesse e analizzandone le sequenze [Kent & Triplett, 2002]. Tutti questi metodi utilizzano come stampo il DNA estratto direttamente dal campione ambientale.

9.1.3 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) e ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Nell'analisi **ARDRA** gli rDNA 16S, amplificati tramite PCR, sono frammentati con enzimi di restrizione e l'insieme dei frammenti digeriti che ne risulta è separato mediante elettroforesi su gel. Le sequenze di rDNA 16S amplificate da batteri appartenenti a specie diverse verranno tagliate in punti diversi e questo si tradurrà in un profilo unico della comunità oggetto di analisi. Il metodo è semplice, rapido ed economico, ma i profili di comunità che si ottengono sono di difficile interpretazione. La tecnica ARDRA è utilizzata in modo più proficuo sui singoli cloni batterici per differenziarli (**Figura 9.1**).

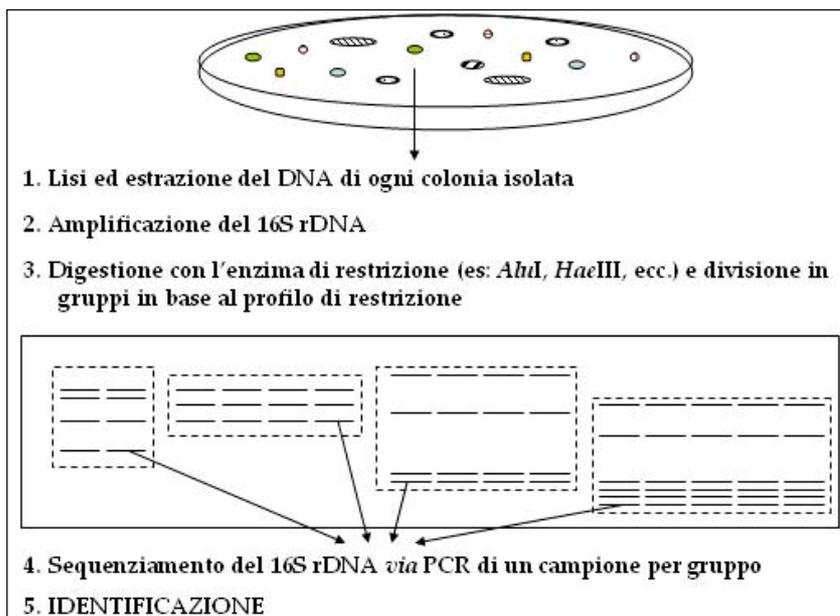


Figura 9.1
Descrizione
schematica
dell'approccio
molecolare
ARDRA utilizzato
per la
caratterizzazione
di singole colonie
batteriche.

Considerata la facilità di esecuzione dell'analisi ARDRA diversi studi che sfruttano tale tecnica sono stati riportati soprattutto nell'ambito dello studio di ambienti contaminati. La composizione e la successione della comunità microbica in un falda esposta a fenolo, toluene e idrocarburi alifatici clorurati sono state valutate mediante analisi ARDRA con l'obiettivo di identificare la comunità microbica dominante coinvolta nella biodegradazione di tricloroetene (TCE) a seguito di un trattamento di biostimolazione. L'ARDRA ha mostrato che i membri della comunità microbica dominante erano stabili e potevano essere rappresentati dalle bande del profilo prodotte sul gel [Fries *et al*, 1997]. In un altro studio, la tecnica ARDRA è stata sfruttata per esaminare le differenze nelle comunità microbiche di fanghi attivi provenienti da impianti di trattamento di acque reflue domestiche e industriali. È stato osservato che le comunità batteriche in fanghi attivi erano diverse negli impianti di trattamento delle acque reflue domestiche rispetto a quelle industriali [Gich *et al*, 2000].

La tecnica ARDRA può essere utile per la rilevazione di cambiamenti strutturali della comunità microbica, ma non è in grado di misurare la diversità microbica o identificare gruppi filogenetici specifici all'interno di un profilo di comunità. Di conseguenza, può essere richiesta un'ulteriore ottimizzazione per produrre modelli di profilo caratteristici della comunità microbica che, tuttavia, diventano troppo complessi. In studi recenti di caratterizzazione della comunità microbica da fonti contaminate, ARDRA è stato combinato con altre tecniche molecolari come la DGGE [Malik *et al*, 2008]. Un'evoluzione della metodica ARDRA è l'analisi T-RFLP che prevede l'amplificazione con uno o entrambi i *primer* marcati con un fluorocromo e l'analisi elettroforetica

tramite un sistema automatizzato, con un rivelatore laser dei frammenti terminali fluorescenti generati dalla digestione degli ampliconi con enzimi di restrizione.

L'analisi **RISA** è un altro metodo di analisi della comunità microbica. Originariamente introdotta per l'analisi dei batteri del suolo, la RISA è stata più recentemente usata anche per esaminare la diversità microbica nella rizosfera e negli ambienti marini [Borneman & Triplett, 1997; Sigler & Zeyer, 2002].

Il metodo, utilizzando come stampo il DNA della comunità microbica, amplifica, tramite PCR, le regioni intergeniche tra il gene codificante l'RNA ribosomiale 16S e il gene codificante l'RNA ribosomiale 23S nell'operone ribosomiale, usando *primer* diretti alle regioni conservate nei geni 16S e 23S (ITS, vedi **Figura 9.2**).

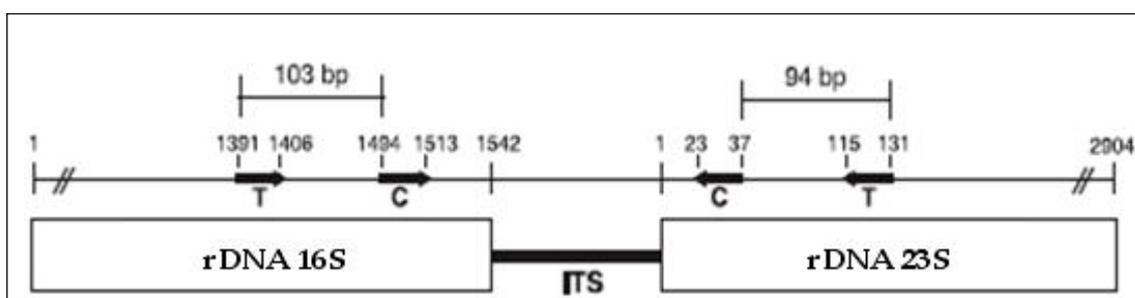


Figura 9.2

In questa figura sono riportate le posizioni, sull'operone procariotico, dei primer utilizzati in questo studio. Le linee in grassetto indicano siti di appaiamento dei primer usati secondo la numerazione in *E.coli*.

T, coppia di primer 1406f/23Sr [Fisher & Triplett, 1999]

C, coppia di ITSf / ITSReub primer [Cardinale *et al*, 2004]

ITS, sequenza intergenica trascritta tra **rDNA 16S-23S**

L'eterogeneità di lunghezza nella sequenza ITS viene utilizzata per distinguere le popolazioni microbiche in ARISA. Il set di primer 1406f/23Sr amplifica altre 197 basi rispetto a quella amplificata dalla coppia di primer ITS / ITSReub (basato su standard di *E. coli*). Questo valore è stato aggiunto ai dati di ITSf / ITSReub genera l'cITSf / ITSReub insieme di dati e permette un confronto diretto dei dati prodotti dai due set di primer [Stuart *et al*, 2007].

La regione intergenica 16S-23S, che può contenere geni per alcuni tRNA in base alla specie batterica, mostra un'eterogeneità significativa sia di lunghezza che di sequenza. Entrambi i tipi di variazione sono stati molto usati per distinguere i ceppi batterici e le specie strettamente correlate. Nell'analisi RISA è analizzata la diversità nella lunghezza di questi spaziatori intergenici. Il prodotto di PCR (una miscela di frammenti generati dai membri della comunità) è separato su un gel di agarosio o di poliaccrilammide per visualizzare, tramite elettroforesi, un profilo di bande. Il risultato è complesso e fornisce un profilo specifico per comunità, dove ogni banda corrisponde almeno a un organismo del gruppo originale. Sebbene RISA fornisca una stima relativamente rapida della

composizione della comunità, eseguire una perfetta elettroforesi su gel di poliacrilammide può essere molto laborioso. Inoltre è necessaria, per l'analisi, una grande quantità di prodotti di PCR e la risoluzione tende ad essere bassa. La versione automatizzata, **ARISA**, supera tali limiti. Il passo iniziale, in entrambi i casi, è l'estrazione del DNA del campione ambientale, seguito dall'amplificazione delle ITS, come si fa nell'analisi RISA, ma, in questo caso, la PCR è condotta con un *primer* oligonucleotidico marcato con un fluoroforo. L'elettroforesi avviene in un sistema automatizzato, con un rivelatore laser dei frammenti di DNA fluorescenti. La PCR-ARISA può generare frammenti di DNA fino a 1400 bp in lunghezza [Fisher & Triplett, 1999].

Questo approccio molecolare è stato applicato allo studio di sedimento fluviale in presenza, o assenza, di una macrofita radicata d'acqua dolce di interesse ecologico per la capacità di crescere e rilasciare ossigeno attraverso le radici, in un ambiente eutrofico. Il lavoro svolto è un passo iniziale per lo studio e il monitoraggio della comunità microbica legata al ciclo biogeochimico dell'azoto in sedimenti fluviali popolati da questa macrofita.

9.2 Il metabolismo dell'azoto e i microrganismi coinvolti

L'azoto non è solo l'elemento più abbondante nell'atmosfera, ma rappresenta anche un fondamentale elemento nelle macromolecole della cellula come le proteine e gli acidi nucleici. Il ciclo dell'azoto è un ciclo prevalentemente gassoso, a controllo essenzialmente biologico, nel quale l'azoto è convertito dalla sua forma inerte, che è nella forma molecolare (N₂) di cui l'atmosfera è molto ricca, in forme utili ai processi biologici.

L'atomo di azoto può entrare a far parte di numerose molecole in vari stati di ossidazione:

- NO ₃ ⁻	n. ox +5	azoto nitrico
- NO ₂ ⁻	n. ox +3	azoto nitroso
- N ₂	n. ox 0	azoto elementare
- NH ₃	n. ox -3	azoto ammoniacale
- --NH ₂	n. ox +3	azoto amminico

Come mostrato in **Figura 9.3**, l'utilizzazione dell'azoto in natura è un processo ciclico che prevede diverse tappe:

- fissazione dell'azoto con incorporazione dell'ammoniaca prodotta in molecole organiche;
- ammonificazione, che è la degradazione della materia organica azotata ad opera di decompositori (restituisce l'ammoniaca all'ambiente);
- nitrificazione: ossidazione dell'ammoniaca a nitrito e nitrato;
- riduzione assimilativa del nitrato;
- denitrificazione: riduzione del nitrato a nitrito e azoto molecolare.

Il ciclo biogeochimico dell'azoto è svolto in gran parte da microrganismi e alcuni passaggi, come la fissazione dell'azoto elementare e la denitrificazione, sono compiuti solo da microrganismi.

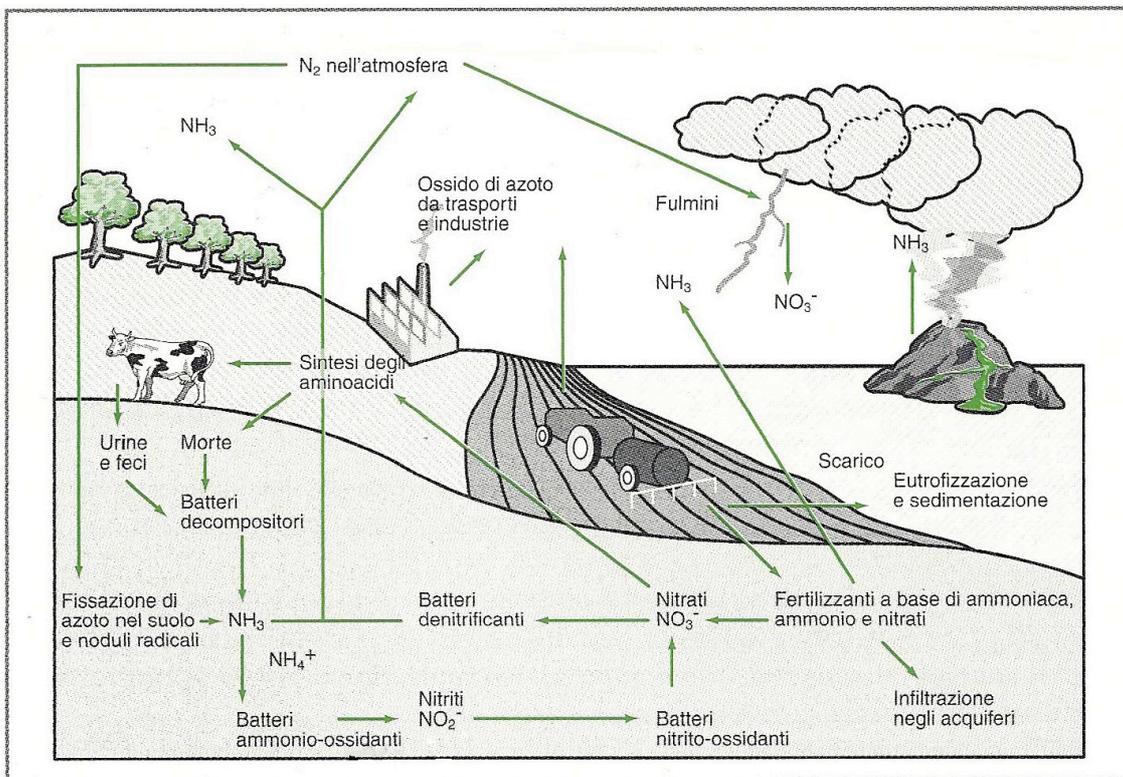


Figura 9.3

Il ciclo dell'azoto. Mostra la distribuzione dell'azoto nelle varie sue forme, all'interno dei comparti terrestri-acquatici e dell'atmosfera e in relazione alla popolazione microbica presente.

La **fissazione biologica** dell'azoto è svolta solo da procarioti, appartenenti a diversi generi di *Bacteria* e *Archea*. I fissatori di azoto operano liberi nell'ambiente o associati a piante o ad altri microrganismi in simbiosi come quelle fra i rizobi e le piante leguminose; fra gli attinomiceti e le piante non leguminose, fra i cianobatteri e i funghi (nei licheni) ecc. Fissano azoto a vita libera, in ambienti acquatici, nei suoli e nei sedimenti, batteri sia aerobi che anaerobi: *Azotobacter* e *Beijerinckia*; i fotosintetizzanti

come *Chromatium*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Chlorobium*; Gram-positivi come *Bacillus* e *Clostridium* e molti attinomiceti, Gram-negativi, come *Azospirillum*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Thiobacillus*. In ambienti acquatici i principali fissatori di azoto sono i cianobatteri, come i generi filamentosi che formano eterocisti: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Calotrix*, *Scytonema*, *Tolypothrix*. Fissano l'azoto anche i generi non eterocistati *Oscillatoria*, *Microcoleus* e *Lyngbya*.

I microrganismi fissatori dell'azoto ne trasformano la forma elementare in ammonio o ammoniaca che viene direttamente usato dal microrganismo stesso, e dagli eventuali organismi simbiotici, in un processo molto importante del ciclo dell'azoto detto assimilazione dell'ammoniaca.

Tutte le piante, gli animali e i microrganismi sono in grado di convertire l'azoto organico in ammonio. In tutti gli esseri viventi la forma di azoto prevalente è quella ridotta. Gli animali trasformano l'azoto delle proteine e degli acidi nucleici nel loro metabolismo producendo come scarto, a seconda dell'animale, ammoniaca, urea o acido urico. Urea e acido urico possono essere fonte di azoto per microrganismi dotati di ureasi o uricasi: le prime attaccano l'urea liberando ammoniaca e CO₂, le seconde agiscono sull'acido urico. Molti batteri sia aerobi che anaerobi come *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Clostridium* possiedono uricasi.

Microrganismi nel suolo dotati di proteasi e peptidasi, sono in grado di idrolizzare le proteine degli organismi morti e, per successiva deaminazione degli amminoacidi, liberare ammoniaca. Inoltre, in anaerobiosi e in ambiente acido alcuni microrganismi sintetizzano decarbossilasi i cui prodotti di degradazione degli amminoacidi sono CO₂ e ammine primarie maleodoranti (putrefazione).

In ambienti ben aerati, gli ioni ammonio che si liberano durante la mineralizzazione della sostanza organica, sono ossidati a NO₃⁻, in breve tempo, mediante i processi di **nitrificazione**. La nitrificazione ha luogo in ambienti sufficientemente ossigenati, a pH neutro, grazie all'attività di due gruppi distinti di batteri aerobi chemioautotrofi, ampiamente diffusi nei suoli e nelle acque, che utilizzano ammonio e nitriti come donatori di elettroni nel loro metabolismo energetico e assimilano CO₂ come fonte di carbonio. I batteri ammonio-ossidanti, come *Nitrosomonas*, ossidano l'ammoniaca a nitrito, i batteri nitrito-ossidanti, come *Nitrobacter*, ossidano i nitriti a nitrati. Anche se sono compiute da microrganismi diversi, le due reazioni sono strettamente accoppiate e raramente si verificano accumuli di nitriti nell'ambiente.

Esiste anche un processo di ossidazione anaerobia dell'ammonio. I batteri che svolgono tale processo sono chiamati *anammox* (*anaerobic ammonium oxidation*) e a partire da ammoniaca ottengono azoto molecolare. Un microorganismo in grado di condurre il processo anammox è *Brocardia anammoxidans*, appartenente al *phylum* Planctomycetes del dominio dei *Bacteria*.

La maggior parte dell'azoto nitrico che si trova in natura deriva dall'ossidazione dell'ammoniaca operata dai batteri ammonio ossidanti (AOB) e archeobatteri ammonio ossidanti (AOA) [Könneke *et al*, 2005]. Gli ioni nitrato possono essere assimilati da numerosi organismi e microrganismi (batteri, funghi e alghe) attraverso il processo di **riduzione assimilativa del nitrato**.

In ambiente anaerobio, e quindi in mancanza di ossigeno per l'attività respiratoria, gli ioni nitrato possono fungere da accettori terminali di elettroni della catena di trasporto nel processo di **riduzione dissimilativa o denitrificazione**, nella quale il nitrato è convertito a diversi prodotti finali più ridotti (a seconda del microorganismo che svolge il processo) e la sostanza organica è ossidata. Esistono due tipi di riduzione dissimilativa del nitrato: molti batteri anaerobi facoltativi come *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Spirillum*, *Staphylococcus* e *Vibrio* riducono, con una nitrato riduttasi di membrana, il nitrato a nitrito, che poi viene escreto; altri, come *Paracoccus denitrificans* e alcune *Pseudomonas*, svolgono la reazione che porta alla produzione di azoto molecolare. Quest'ultima è la denitrificazione

propriamente detta.

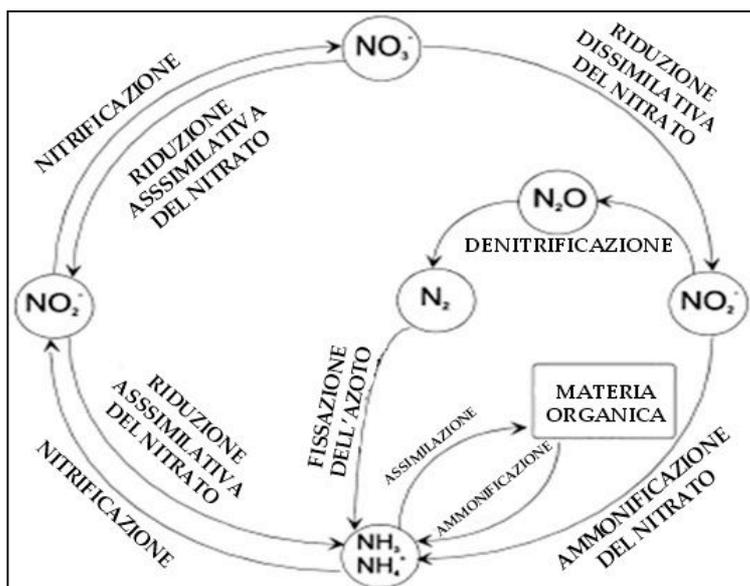


Figura 9.4
Schema riassuntivo delle reazioni chimiche che coinvolgono l'azoto, nei vari stadi di ossidazione dell'elemento, in aerobiosi e anaerobiosi.

Il nitrato può essere anche ridotto a nitrito e il nitrito ulteriormente ridotto ad ammonio in un processo definito **ammonificazione microbica o DNRA** (riduzione anaerobica dei nitrati a ioni ammonio, **Figura 9.4**), condotto soprattutto da batteri fermentanti anaerobi obbligati come quelli appartenenti al genere *Clostridium* [Sanangelantoni, 2008].

9.3 Perché studiare la flora microbica di sedimenti di sistemi fluviali eutrofici, in presenza-assenza di macrofite radicate

I fenomeni di eutrofizzazione delle acque e le conseguenze che vi sono associate in termini di cambiamento della composizione della comunità di fanerogame sommerse e della comunità planktonica e microalgale, sono stati principale oggetto della ricerca svolta negli ultimi anni in ambienti acquatici superficiali. La perdita di praterie di rizofite ad esempio è una delle conseguenze dell'eccesso di materia organica e di nutrienti, dell'aumento di torbidità dell'acqua e delle condizioni riducenti che si stabiliscono a livello del sedimento [Pinardi *et al*, 2009].

Le dinamiche dei nutrienti nei sedimenti sono fortemente controllate dal metabolismo che svolge a livello della rizosfera delle piante radicate. In particolare è fondamentale, per la sopravvivenza delle radici e per la detossificazione dei sedimenti, il trasporto di ossigeno dalle parti aeree alle radici. Le quote di ossigeno superiori alle richieste metaboliche delle piante e delle radici vengono rilasciate direttamente nelle acque interstiziali (ROL, rilascio radiale di ossigeno) creando micronicchie ossiche nei comparti sedimentari anossici e stimolando processi aerobi [Vartapetian & Jackson, 1997; Colmer, 2003]. Gli effetti della ROL sulle reazioni biogeochimiche redox-dipendenti sono stati ampiamente indagati in sistemi oligotrofici [Carpenter *et al*, 1987; Heilman & Carlton, 2001], mentre sono ad oggi scarsamente esplorati in sistemi eutrofici.

Le praterie di macrofite radicate assumono un ruolo fondamentale nel controllo dei nutrienti azotati, regolando non solo assimilazione e ritenzione nelle biomasse ma anche nitrificazione e denitrificazione accoppiata, processi chiave nelle dinamiche biogeochimiche di ecosistemi lentici e lotici caratterizzati da un progressivo aumento dello stato trofico [Bernot & Dodds, 2005]. Le fanerogame radicate immobilizzano azoto nella biomassa mediante processi di assimilazione sia da parte dell'apparato radicale sia da quello fogliare in ragione delle concentrazioni di azoto inorganico in acqua [Touchette & Burkholder, 2000; Cedergreen & Madsen, 2003; Clarke, 2002]. L'ammonificazione viene stimolata all'interno dei letti di macrofite che agiscono da

trappola per il particolato organico, favorendone la sedimentazione e la successiva decomposizione [Sand-Jensen & Borum, 1991]. La presenza di ossigeno a livello dei sedimenti sub-superficiali, veicolata dai sistemi radicali, favorisce i processi accoppiati di nitrificazione e denitrificazione e quindi la perdita di azoto in forma gassosa [Caffrey & Kemp, 1992]. La denitrificazione è inoltre stimolata dalla disponibilità di materiale particolato, detrito vegetale ed essudati radicali, substrati per le comunità denitrificanti eterotrofe [Hernandez & Mitsch, 2007]. Le macrofite possono infatti influenzare i tassi di denitrificazione direttamente o indirettamente. Direttamente, in quanto forniscono l'area superficiale per l'attacco di *biofilm*, dove le eterogenee condizioni di ossigeno possono favorire sia la nitrificazione che la denitrificazione; la denitrificazione resta comunque la più favorita perché la maggior parte dell'area è esposta verso il sedimento tendenzialmente ipossico o anossico. Indirettamente, le macrofite influenzano i tassi di denitrificazione cambiando le concentrazioni dei nutrienti attraverso l'assorbimento e il rilascio durante la crescita e la senescenza, influenzando i livelli di ossigeno, il pH e la disponibilità del carbonio organico nel sedimento e nella colonna d'acqua. In questo modo le macrofite radicate sommerse possono favorire il processo accoppiato di nitrificazione-denitrificazione nel sedimento instaurando condizioni di ossigeno eterogenee nella zona radicale e eliminando carbonio organico attraverso le loro radici. In parallelo, la macrofite sommerse possono inibire la denitrificazione quando i livelli di ossigeno generati dalla fotosintesi diventano troppo alti e attraverso la competizione per il nitrato con i batteri denitrificanti [Veraart *et al*, 2011].

Le comunità microbiche coinvolte nella nitrificazione-denitrificazione accoppiata sono state ben studiate in sedimenti di risaia, mentre minori informazioni sono disponibili in sedimenti di ecosistemi di acqua dolce, tra cui prevalentemente laghi oligotrofici. Il rilascio di ossigeno dalle radici di specie di macrofite come *Littorella uniflora* (L.) Asch., *Lobelia dortmanna* L., e *Glyceria maxima* Holmb. stimola la nitrificazione e la nitrificazione-denitrificazione accoppiata nella rizosfera rispetto a quella nel sedimento non vegetato [Herrmann *et al*, 2009]. Queste interazioni sono di elevata rilevanza ecologica, poiché la perdita di azoto a causa di una maggiore denitrificazione associata alla rizosfera può ritardare l'eutrofizzazione naturale e la successione delle comunità vegetali.

Il primo passo fondamentale della nitrificazione-denitrificazione accoppiata, l'ossidazione dell'ammoniaca a nitrito, è catalizzata dai batteri ammonio ossidanti e, solo recentemente riconosciuti, gli archeobatteri ammonio ossidanti [Könneke *et al*,

2005]. Per entrambi i gruppi, il gene che codifica per la subunità alfa dell'ammonio monoossigenasi (*amoA*) è stato ampiamente utilizzato come marcatore funzionale per analizzare la composizione delle comunità di ammonio ossidanti; studi recenti hanno dimostrato l'ubiquità di AOA e il loro predominio su AOB in diversi ambienti. AOA, ma non AOB, sono stati riscontrati in quantità elevate anche nella rizosfera delle macrofite d'acqua dolce *Littorella uniflora* in un lago mesotrofo danese, suggerendo che AOA fossero i principali responsabili degli elevati tassi di nitrificazione nella rizosfera di questa specie vegetale. Inoltre, le comunità ammonio-ossidanti differivano tra rizosfera e sedimento non vegetato, indicando un effetto pianta specifico sulla composizione della comunità di AOA e AOB. La composizione della comunità di AOA in sedimenti, sia oligotrofici che mesotrofici, è fortemente determinata da fattori correlati allo stato trofico del lago come il pH, la disponibilità di ammonio e il contenuto di C organico e N del sedimento. Le macrofite *L. uniflora* e *Juncus bulbosus* L. supportano in modo particolare alti numeri di AOA probabilmente grazie al rilascio di ossigeno e essudati radicali organici nelle loro rizosfere [Herrmann *et al*, 2009].

In ambienti oligotrofici la competizione nel comparto sedimentario tra *uptake* di azoto da parte delle macrofite e dissipazioni batteriche controlla le perdite di azoto dai sistemi, le quali risultano generalmente contenute [Risgaard-Petersen *et al*, 1998].

La transizione dei sistemi acquatici interni verso condizioni eutrofiche dove, sia a livello di acque interstiziali che a livello di acque superficiali, l'azoto inorganico non è mai in condizioni limitanti, sta determinando un cambiamento nel comparto preferenziale di assorbimento dei nutrienti da parte delle macrofite radicate. In ragione delle elevate concentrazioni di nutrienti azotati presenti nella colonna d'acqua, l'assimilazione dalle fronde potrebbe risultare favorita rispetto a quella dalle acque interstiziali ad opera delle radici [Barko *et al*, 1991; Bedford *et al*, 1991]. Questo può causare un'attenuazione della competizione tra macrofite e batteri nell'assimilazione di nutrienti azotati ed incentivare le perdite di azoto dai sistemi tramite processi accoppiati di nitrificazione-denitrificazione e *anammox*. La dimostrazione di questo nuovo modo di regolazione in sistemi caratterizzati da un progressivo aumento dello stato trofico avrebbe rilevanti implicazioni sulla conservazione delle praterie di fanerogame sommerse in ecosistemi acquatici interni.

9.4 Eutrofizzazione: cenni storici e definizione del fenomeno in sistemi fluviali

Questo fenomeno è comune sia agli ambienti di acqua dolce (laghi e fiumi) che agli ambienti marini. E' utile una breve presentazione del concetto di eutrofizzazione nei diversi ambienti, prima di soffermarsi sul fenomeno che si verifica a livello fluviale.

Nel 1907, Weber per primo utilizzò i termini **eutrofo**, **mesotrofo**, **oligotrofo** per descrivere lo stato trofico della comunità vegetale della torbiera. Nel 1919, Naumann utilizzò questi termini per descrivere due tipi di laghi: i laghi **eutrofici** con alta produttività e **oligotrofici** con bassa produttività, che stabilirono la nascita del moderno sistema di classificazione degli *stati trofici* dei laghi. Nel 1918 e nel 1921, quando si classificavano i laghi attraverso la fauna bentica specialmente chironomidi, Thinemann arrivò alla stessa conclusione e scelse di utilizzare gli stessi termini di Naumann per descrivere due tipi di laghi specifici. Di seguito, nel 1942, Lindeman descrisse il fenomeno dell'eutrofizzazione lacustre puntualizzando come tale fenomeno fosse un processo di evoluzione naturale, in cui la sostanza organica si accumula continuamente e il lago diventa sempre più superficiale finché non muore, pubblicando alla fine uno dei suoi principali lavori "*The Trofic-dynamic aspect of ecology*". Pensava che l'eutrofizzazione fosse l'ultimo stadio di un normale processo di sviluppo. Questo è stato il primo concetto definito di eutrofizzazione lacustre. Oggi per eutrofizzazione lacustre si intende il processo in cui l'ecosistema del lago degenera fino ad un deterioramento della qualità dell'acqua a causa dell'eccessivo arricchimento di nutrienti. E' un processo continuo e dinamico, nonostante i vari stadi possano essere descritti da indici quantitativi. Oltre ai nutrienti, all'ecosistema e alla qualità dell'acqua, il concetto di eutrofizzazione contiene in sé anche gli effetti dell'attività antropica. Si è visto che, con l'aumento del contenuto di nutrienti (da oligotrofico, a mesotrofico e infine eutrofico), l'ecosistema degenera gradualmente causando una modifica delle popolazioni vegetali sommerse, da lago dominato da macrofite a lago principalmente popolato da alghe, con costante deterioramento della qualità dell'acqua [Cheng & Li, 2006].

Anche gli ambienti marini costieri sono soggetti a fenomeni di eutrofizzazione che è generalmente accettata come la principale causa del deterioramento globale osservato. Nelle aree costiere, dove si trovano centri di alta densità abitativa e di industrializzazione e dove si concentrano tutti i nutrienti che arrivano dalla terra, i tipici sintomi del processo d'eutrofizzazione sono evidenti. Tra questi, i cambiamenti nelle comunità vegetali marine e, in particolare, lo sviluppo di massa o fioritura di micro o

macroalghe sono gli effetti più rilevanti dell'aumento del carico di nutrienti [Schramm, 1999].

L'interesse verso il processo di eutrofizzazione nei sistemi fluviali inizia a metà del secolo scorso. Nella maggior parte dei paesi sviluppati, i fiumi sono notevolmente influenzati dalle attività antropiche attraverso la costruzione di dighe, prelievo di acqua per l'irrigazione, deviazioni trans-bacino, disturbo di connettività laterale e longitudinale. Nei fiumi regolamentati, l'alterazione dell'idrologia influenza il trasporto solido e i tassi di sedimentazione e possono essere amplificati gli effetti di eccessivi carichi di nutrienti, inducendo processi di eutrofizzazione [Pinardi *et al*, 2009].

Nel 1947 si pensava che la progressiva eutrofizzazione di un fiume, nel suo percorso dalla sorgente al mare, avvenisse attraverso gli scarichi dai quartieri abitati e delle aree coltivate come un processo naturale, quasi inevitabile. Infatti, sebbene le attuali preoccupazioni circa l'eutrofizzazione dei fiumi si concentrino principalmente sull'arricchimento di azoto (N) e fosforo (P), i primi studi sulla qualità dell'acqua e l'arricchimento dei nutrienti (C) si sono focalizzati sulle acque reflue non trattate. Nel 1960 si osservò che la maggior parte della fauna presente immediatamente a valle di un emissario di acque reflue scompariva a causa delle condizioni anossiche che si creavano (causate dall'alto consumo di ossigeno necessario a metabolizzare i nutrienti apportati dai reflui) e che, nel momento in cui l'ossigeno rientrava in circolo, un'alta densità della popolazione animale tollerante all'inquinamento ricompariva. Nel momento in cui l'influenza delle acque reflue a valle diminuiva, era previsto un ritorno alle comunità di animali d'acqua pulita trovati a monte del depuratore. L'arricchimento da fosforo e azoto sono stati presi quindi come modello, prevedendo una presenza di cianobatteri ed *Euglena* nella zona anossica e, più a valle, quella dell'alga verde *Cladophora*. Solo nel 1970 si rilevò realmente che l'arricchimento di nutrienti avrebbe potuto verificarsi nei fiumi e torrenti come conseguenza diretta delle attività umane per alterato uso del suolo, con l'aumentato utilizzo di fertilizzanti, oltre che degli scarichi diretti dagli impianti di depurazione.

Negli ultimi tre decenni ci sono stati progressi relativi alla definizione di "stato trofico" e alla caratterizzazione dell'eutrofizzazione in acque lotiche, ad esempio con la proposta di suddividere in diverse regioni, in base alle quantità di nutrienti legati alla geologia, alla topografia e agli usi del suolo. Negli ultimi tre decenni di conseguenza sono stati avviati numerosi programmi di ricerca per correlare l'arricchimento dei nutrienti agli aumenti di biomassa autotrofa in fiumi e torrenti. Ad oggi Dodds propone di definire

l'eutrofizzazione in habitat lotici come l'aumento di uno o più fattori nutritivi che portano ad un maggiore metabolismo autotrofo (misurato alla luce come GPP, Gross Primary Production, tasso al quale i produttori di un ecosistema acquisiscono e immagazzinano una data quantità di energia chimica sottoforma di biomassa in un determinato intervallo di tempo) o eterotrofo (misurato solitamente al buio come domanda media di ossigeno o tasso di respirazione) dell'intero sistema. Tali stati (autotrofo ed eterotrofo) non si escludono a vicenda; un sistema con attività autotrofa limitata avrà probabilmente un'alta attività eterotrofa e certamente un alto tasso di respirazione [Dodds, 2006].

L'eutrofizzazione fluviale è quindi un concetto relativamente vecchio ma il suo sviluppo e i relativi effetti non sono ancora pienamente compresi, a causa delle complesse interazioni che si vengono a stabilire tra fattori biotici e fisici, in condizioni idrologiche alterate. Inoltre, gli studi sugli effetti di un aumentato carico di nutrienti o di modifiche all'idrologia, sono rivolti principalmente all'analisi della biodiversità delle macrofite, alla successione delle specie nei fiumi, alle interazioni tra epifite e macrofite nei fiumi, mentre, ad oggi ancora pochi studi si sono concentrati sul metabolismo bentonico e sulle capacità di tamponamento dei sedimenti [Pinardi *et al*, 2009].

9.5 Il caso di studio: Massimbona

Il sito nel quale si è pensato di studiare la comunità microbica in relazione alla presenza-assenza della macrofita *Vallisneria spiralis*, appartiene al tratto nord del fiume Mincio, presso le località di Massimbona, come mostrato in **Figura 9.5**.

Il fiume Mincio, affluente di sinistra del fiume Po, si origina dal Lago di Garda presso Peschiera (VR) e attraversa per circa 75 km un territorio caratterizzato da colline moreniche a nord e zona alluvionale a sud prima di immettersi nel fiume Po all'altezza di Governolo (MN). E' caratterizzato dalla presenza di numerose opere idrauliche e canali artificiali, che regolano il deflusso di tutto il corso del fiume con lo scopo principale di distribuire l'acqua nei periodi irrigui e di proteggere la città di Mantova dai deflussi del lago di Garda e dai rigurgiti di piena del Po: diga di Monzambano, diversivo a Casale di Sacca, fornice di Formigosa e chiuse a Governolo.

Il sito di Massimbona (D) si trova a valle della diga di Monzambano e del depuratore delle acque reflue urbane di Peschiera (330.000 A.E.) che scarica direttamente in Mincio, di conseguenza sia le caratteristiche del sedimento che la qualità e quantità delle acque dei due siti differiscono. Il sedimento è limoso ed organico, lo scarico del depuratore comporta un maggiore trasporto e deposito di particellato da Monzambano a

Massimbona che va ad influenzare il sedimento della stazione D, rendendolo più organico e ricco di nutrienti. I nutrienti disciolti sono elevati non solo a causa dello scarico ma anche perché il fiume attraversa un territorio fortemente sfruttato dall'attività agro-zootecnica e di natura ghiaiosa e permeabile, risultando vulnerabile all'inquinamento da nitrati causato dall'uso elevato di fertilizzanti. Il sito D può essere definito mesotrofico con concentrazione di azoto inorganico maggiori di $50 \mu\text{M}$.



Figura 9.5
Massimbona: sito d'indagine del tratto nord del fiume Mincio, a valle dello scarico del depuratore di Peschiera del Garda (VR).

Il regime idrologico del fiume Mincio dipende dall'erogazione delle acque del Lago di Garda dalla diga di Monzambano, costruita per mantenere i livelli di invaso del lago necessari a rispondere alle esigenze turistiche del lago stesso e a quelle dei comparti agricolo (irrigazione) ed industriale (produzione di energia elettrica). Nei mesi invernali l'acqua è trattenuta per invasare il lago di Garda ed in Mincio scorrono $10-12 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, mentre nel periodo estivo i rilasci arrivano a $50-70 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, di cui circa il 25-30% defluisce nell'alveo naturale del Mincio, mentre la quota restante è immediatamente

derivata da canali artificiali. L'alveo fluviale del tratto nord, lungo circa 30 km, è costituito da materiale ciottoloso ed è colonizzato lungo le sponde da banchi di vegetazione naturale. Le zone marginali sono invece ricoperte da sedimento limoso e fangoso che permette la crescita e l'espansione di letti di macrofite sommerse tra cui *Vallisneria spiralis*, *Potamogeton crispus*, *P. trichoides*, *P. perfoliatus*, *P. pectinatus*, *Myriophyllum spicatum*, *M. verticillatum*, *Ranunculus trichophyllus*, *Elodea canadensis*.

La macrofita dominante è la specie stolonifera *Vallisneria spiralis*, capace di crescere rapidamente per estensione clonale. Questa pianta fino a trent'anni fa era confinata nei tratti più meridionali, caratterizzati da una scarsa velocità della corrente; ora invece questi tratti risultano dominati da comunità fitoplanctoniche e le praterie di macrofite sommerse stanno "migrando" verso nord [Racchetti, 2009].

9.6 *Vallisneria spiralis*: una macrofita ecologicamente interessante

Le macrofite comprendono numerose specie vegetali che hanno in comune le dimensioni macroscopiche e l'essere rinvenibili sia in prossimità sia all'interno di acque dolci superficiali. Sono da considerarsi macrofite sia le specie appartenenti alla vegetazione acquatica sia quelle che costituiscono il raggruppamento delle erbacee pioniere di greto. Le macrofite sono costituite in massima parte da fanerogame, ma ne fanno parte anche un piccolo contingente di pteridofite, numerose briofite e alghe macroscopiche.

Le fanerogame radicate hanno un ben riconosciuto ruolo di regolatori bentonici dei cicli biogeochimici, con implicazioni anche per la fauna bentonica e le comunità ittiche. Sono in grado di convertire i nutrienti inorganici in forme organiche dissolte e particolato, di controllare la crescita del fitoplancton, di trattenere il particolato sospeso, stabilizzare i sedimenti superficiali e fornire aree di *nursery* per invertebrati e pesci.

Inoltre, il rilascio radiale di ossigeno (ROL) dalle radici rende tale gas disponibile ai sedimenti anossici, supportando la riossidazione dei composti ridotti, come ammonio, metano e solfuri, la precipitazione di fosforo reattivo solubile con ferro ferrico e la rimozione di azoto ammoniacale tramite nitrificazione-denitrificazione accoppiata. Grazie all'importanza ecologica di tali caratteristiche, le fanerogame marine sono state studiate in zone salmastre e di transizione e in ambienti costieri in tutto il mondo [Touchette & Burkholder, 2000].

Studi condotti su macrofite d'acqua dolce hanno rivelato come l'aumento del carico organico dei sedimenti risulti inversamente correlato ai tassi di crescita vegetale e

determini una progressiva atrofizzazione dell'apparato radicale con perdita netta della capacità di trasporto dell'ossigeno [Barko & Smart, 1986; Sand-Jensen *et al*, 2005]. Questo fa capire, quindi, come la vegetazione bentica possa controllare i processi biogeochimici del sedimento solo in sistemi oligotrofici, mentre in condizioni eutrofiche si ritiene che il ROL venga compensato da una elevata domanda respiratoria dei sedimenti [Sand-Jensen & Borum, 1991; Hemminga, 1998].

Da qui nasce l'interesse per la macrofita *Vallisneria spiralis*, la quale cresce molto bene in un sistema altamente eutrofico, come quello in studio, senza avere sintomi di atrofizzazione dell'apparato radicale e mostrando comunque un notevole ROL. Ricerche preliminari svolte su *Vallisneria spiralis*, infatti, ne hanno evidenziato la sua capacità di colonizzazione di una grande varietà di substrati (da litici a sedimenti tendenzialmente riducenti) e l'influenza sulle caratteristiche delle acque interstiziali in un intervallo di carico organico molto più ampio di quello riportato in letteratura per altre macrofite d'acqua dolce [Pinardi *et al*, 2009; Racchetti *et al*, 2010].



Figura 9.6

Vallisneria spiralis (<http://luirig.altervista.org>).

E' possibile notare i particolari fiori femminili di *Vallisneria spiralis* derivati dai peduncoli filiformi spiralati.

V. spiralis (**Figura 9.6**) è in grado di crescere rapidamente per estensione clonale [Les *et al*, 2008], sviluppa estese praterie monospecifiche sia in ambienti di acque correnti sia in aree marginali a scarso ricambio idrico ed è abbondante nei tratti di media-alta pianura dei fiumi del nord Italia e nelle aree litoranee dei grandi laghi alpini.

Nello studio di Pinardi *et al* [Pinardi *et al*, 2009], il quoziente fotosintetico di *V. spiralis* durante l'intero periodo vegetativo risulta significativamente inferiore all'unità, facendo ipotizzare un costante trasporto di ossigeno verso la rizosfera. Il trasporto di ossigeno e il rilascio radiale di ossigeno di *V. spiralis* sono stati ulteriormente evidenziati con esperimenti condotti in laboratorio [Racchetti *et al*, 2010].

Le praterie di *Vallisneria* sono state dimostrate essere in grado di regolare l'assimilazione di nitrato e la denitrificazione, processi biogeochimici chiave nel contesto attuale di inquinamento da nitrati, prevalentemente di origine diffusa, che interessa numerosi sistemi fluviali. I letti di macrofite radicate sommerse possono costituire una trappola, seppur temporanea, di azoto, fissando annualmente in biomassa quantità confrontabili a quelle perse dal sistema tramite denitrificazione.

I tassi denitrificazione e di assimilazione stimati in questo studio sono rilevanti rispetto a quelli riportati in altre ricerche, sebbene risultino di alcuni ordini di grandezza inferiori rispetto ai carichi di NO_3^- transitanti nel sistema fluviale [Pinardi *et al*, 2009].

10. Scopo della ricerca

La microbiologia diagnostica è di fondamentale importanza in quanto provvede sia alla rilevazione che all'identificazione dei microrganismi, i quali hanno un ruolo chiave a livello ecologico, in quanto sono alla base di tutte le catene e reti ecologiche; nella biosfera, essendo la fonte principale dei nutrienti primari degli organismi viventi; e nella scienza biotecnologica moderna e tutte le sue applicazioni, sia per gli effetti positivi ma anche per quelli nocivi che essi possono portare all'uomo e agli altri essere viventi.

La microbiologia diagnostica, ad oggi, si basa ancora principalmente sulla coltivazione di specie note, seguita da test fisiologici e biochimici che sono applicabili solo ad un ristretto numero di microrganismi e con tempi piuttosto lunghi. Inoltre è stato osservato che gli organismi che crescono più velocemente, o i ceppi meglio adattati a determinate condizioni di coltivazione, crescono in modo preferenziale rispetto agli altri, e quindi non vengono riprodotte le condizioni naturali.

Per queste ragioni questo lavoro di tesi è stato finalizzato allo sviluppo e alla valutazione di tecniche molecolari per la rilevazione di batteri rilevanti per la filiera alimentare e lo studio di comunità microbiche in un ambiente complesso prendendo in esame i seguenti casi:

- *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo;
- la consistenza e la diversità della comunità microbica di sedimenti di un sistema fluviale eutrofico, in presenza-assenza della macrofita radicata *Vallisneria spiralis*.

Nel primo caso sono stati sviluppati e validati metodi basati sulla PCR Real Time, utilizzando il sistema basato sull'agente intercalante SYBR®GreenER™ e sulle sonde TaqMan®, in reazioni singole e duplex. La robustezza del metodo è stata valutata a diversi livelli:

- 1) misura della riproducibilità;
- 2) confronto dei valori ottenuti in reazioni singole e duplex;
- 3) confronto coi metodi colturali tradizionali.

Nel secondo caso, il lavoro, in fase preliminare, ha coinvolto l'isolamento su terreni selettivi e il riconoscimento con tecniche molecolari di microrganismi correlati al ciclo biogeochimico dell'azoto, presenti in sezioni di sedimento raccolte in presenza di *Vallisneria spiralis*. Parallelamente, sono stati ricercati in letteratura i geni batterici coinvolti nelle reazioni principali del ciclo biogeochimico dell'azoto e i relativi *primer*, come elementi base per la futura messa a punto di una Real Time PCR multiplex in grado di monitorare le popolazioni microbiche e fornirne un possibile ruolo ecologico,

in relazione a parallele informazioni chimiche sui bilanci dei nutrienti presenti. Infine si è voluto conoscere l'effetto della presenza della macrofita radicata, assieme all'effetto dello stadio di sviluppo della pianta stessa, sulla popolazione microbica presente nei sedimenti analizzati tramite la tecnica ARISA.

Per poter valutare e monitorare un determinato fenomeno ecologico è infatti importante affiancare una tecnica che possa mostrare un quadro generale della comunità microbica, presente in un determinato contesto ambientale, a un metodo in grado di rilevare e quantificare le popolazioni interessanti a livello funzionale.

11. Materiali e metodi

11.1 *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo

11.1.1 DNA genomico batterico di riferimento

Il DNA genomico puro di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 700720D e il DNA genomico puro di *Campylobacter jejuni* ATCC 33560D sono stati acquistati dalla ditta LGC Standards (Milano, Italia). Entrambi i DNA genomici sono stati utilizzati per costruire le rette di taratura standard per la quantificazione sia nel metodo Real Time PCR con SYBR®Green che nel metodo con sonde TaqMan®.

11.1.2 Colture di *Salmonella enterica*

Il ceppo batterico utilizzato per l'estrazione del DNA e le prove di contaminazione controllata *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium SA2380 ATCC35987 è stato acquistato presso American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

Colture crio-conservate in glicerolo di *S. enterica* sono state risospese in BPW (Buffered Peptone Water (per 1 litro): 10 g peptone; 5 g NaCl, 3.5 g di Na₂HPO₄; 1.5 g di KH₂PO₄) e fatte crescere, in condizioni aerobiche, in incubatore INNOVA 4230 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) a 37 °C per 24 ore, ad una velocità di agitazione di 140 rpm (**Figura 11.1**).

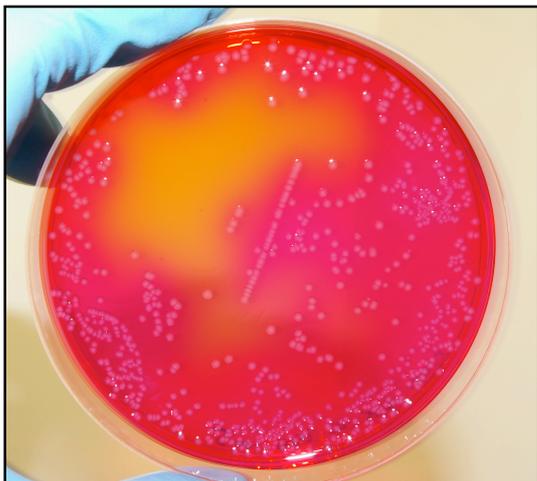


Figura 11.1
Colonie di *Salmonella enterica* cresciute su BGAM.

11.1.3 Colture di *Campylobacter jejuni*

Il ceppo batterico utilizzato per l'estrazione del DNA e le prove di contaminazione controllata *C.jejuni* ATCC 33291 è stato acquistato presso American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

Colture crio-conservate in glicerolo di *C. jejuni* sono state risospese in Preston Broth (Nutrient Broth N°2, Preston Antimicrobial Supplement II, Campylobacter Growth Supplement, Sangue lisato di cavallo; Biolife Italiana, Milano, Italia) e fatte crescere, in condizioni microaerofile (giara assieme al supporto CampyGen™, Oxoid Ltd, Hampshire, England), in incubatore INNOVA 4230 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) a 42 °C per 24 ore, ad una velocità di agitazione di 140 rpm (**Figura 11.2**).

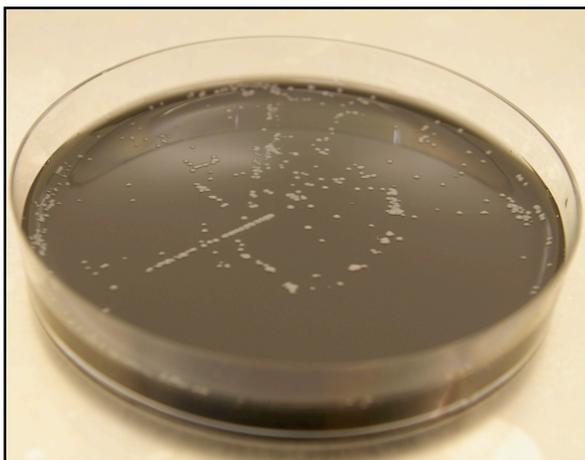


Figura 11.2
Colonie di *C. jejuni* cresciute su KARMALI.

11.1.4 Contaminazione artificiale di filetto di pollo

Gli esperimenti sono stati condotti su campioni di filetto di pollo acquistati nei supermercati locali. Per eliminare la contaminazione di *Salmonella* e *Campylobacter* eventualmente presente, la superficie dei campioni è stata sterilizzata con ipoclorito di sodio al 5.25% (v/v) per 10 minuti e le sezioni interne sono state utilizzate per gli esperimenti di contaminazione.

Per gli esperimenti relativi a *Salmonella* le colture cresciute a 37 °C per 24 ore hanno raggiunto una carica microbica di 7.38×10^8 CFU/ml (Colony Forming Unit). Le colture di *Campylobacter*, cresciute a 42 °C per 48 ore, hanno raggiunto una carica microbica di 1.54×10^7 CFU/ml. Per entrambi i microrganismi il procedimento è identico, descritto come segue.

Diluizioni seriali dell'ordine di 10, di valori compresi tra 10^1 e 10^6 , sono state preparate in soluzione fisiologica (NaCl 0.9%). Di ciascuna diluizione un'aliquota di 1.1 ml è stata utilizzata per contaminare 0.5 g di filetto di pollo. 5 minuti dopo l'inoculo, ogni campione è stato vigorosamente mescolato al vortex e centrifugato a 2000 giri per 1 minuto, per raccogliere la matrice sul fondo. Il surnatante è stato quindi trasferito in una microprovetta da 1.5 ml: 100 µl di ciascun campione è stato piastrato, rispettivamente

su BGAM per *Salmonella* e su KARMALI per *Campylobacter*, per stimare il numero di cellule recuperato dal campione e 1 ml è stato usato per l'estrazione.

Un'aliquota separata di 1.1 ml di ciascuna diluizione originale, sia per le colture di *S. enterica* che le colture di *C. jejuni*, è stata usata per esperimenti di controllo, in assenza del filetto di pollo: 1 ml per l'estrazione, 100 µl per la semina su piastra.

Le diluizioni seriali delle colture pure e delle sospensioni batteriche recuperate dai campioni contaminati di filetto di pollo, sono state quindi centrifugate a 13000 giri per 20 minuti per raccogliere in forma di *pellet* le cellule dei microrganismi in esame.

Il surnatante è stato eliminato, mentre il *pellet* è stato conservato per le fasi successive.

Nel caso delle contaminazioni con entrambi i microrganismi, le stesse quantità, in termini di diluizioni delle colture batteriche, di *Salmonella* e *Campylobacter* sono state utilizzate simultaneamente per la contaminazione del filetto di pollo o unite assieme prima di procedere alla fase di estrazione. Alla fine si sono così ottenute con le stesse diluizioni delle colture batteriche i *pellet* dei singoli microrganismi, i *pellet* dei campioni contaminati da un unico batterio, i *pellet* di entrambi i batteri, e i *pellet* dei campioni di filetto di pollo contaminati con entrambi i microrganismi. *Pellet* derivati anche da sola matrice pollo sono stati preparati come controlli, utilizzando al posto della diluizione della coltura batterica, la stessa quantità di soluzione fisiologica.

11.1.5 Determinazione di Salmonella enterica e Campylobacter jejuni nella carne di pollo tramite Real Time PCR con SYBR®GreenER™

Estrazione del DNA genomico batterico

Nel caso in esame, i *pellet* di pollo contaminato e non, e dalle diluizioni delle colture pure sono stati utilizzati tal quali per la fase di estrazione. Il metodo utilizzato si basa su nanoparticelle di magnetite (NP).

Un'aliquota di 400 µl di LYSIS BUFFER (100 mM di TrisHCl pH 8, 50 mM di EDTA, 0.5 % di Triton X 100) e 10 µl di PROTEINASI K sono stati aggiunti al *pellet* e mescolati vigorosamente al vortex. Dopo una fase di incubazione di 30 minuti a 65 °C, in agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 10000 xg per 5 minuti, per rimuovere i residui cellulari e della carne. Il surnatante è stato quindi trasferito in una microprovetta da 1.5 ml sterile. A questo punto 400 µl di BINDING BUFFER (20 % PEG 6000 in NaCl 4 M) e 25 µl di NP (precedentemente ben risospese) sono stati miscelati assieme al surnatante, invertendo la microprovetta, e il tutto è stato incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Immobilizzate le NP su appositi supporti magnetici e tolto il

surnatante, sono stati effettuati due lavaggi con WASHING BUFFER (etanolo 70%), seguite da una fase di completa eliminazione dell'alcool, per evaporazione a temperatura ambiente. Rimosso il campione dal supporto magnetico il DNA legato alle NP è stato eluito in 100 µl di acqua bidistillata sterile ed incubato per 5 minuti. Una volta immobilizzate le NP sul supporto magnetico il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in una microprovetta sterile per la PCR, o eventualmente conservato a – 20 °C.

Primer oligonucleotidici

I *primer* utilizzati per le reazioni di Real Time PCR con SYBR®Green sono stati precedentemente disegnati tramite il programma Primer Express (versione 3.0, Applied Biosystems) [Agrimonti *et al*, manoscritto in preparazione]. I geni di riferimento sono rispettivamente *invA* e *wlaL* per *S. enterica* e *C. jejuni*, le sequenze e i dati relativi ai *primer* sono riportati in **Tabella 11.1**.

Tabella 11.1					
Proprietà dei primer SA4 e CAMP1.					
Gene	Nome	Sequenze	T annealing	Lunghezza amplicone	T melting amplicone
<i>invA</i>	SA4	FOR 5'- CCAATGGCGGCGAATTAC-3' REV 5'- GGATCCCTTTGCGAATAACATC- 3'	61 °C 60 °C	69 bp	75.2 °C
<i>wlaL</i>	CAMP1	FOR 5'- TGGTAATGTTTTAGGTTCTAGTG GTAGTG-3' REV 5'- TTCACAGGCTTACCCATATCCA- 3'	59 °C 60 °C	201 bp	77.6 °C

Real Time PCR

Ciascuna reazione di Real Time PCR è stata svolta utilizzando come *master mix* SYBR®GreenER™ qPCR SuperMix per ABI PRISM® (Invitrogen, Milano, Italia) e i *primer* sintetizzati dalla ditta SIGMA Life Science (SIGMA ALDRICH, Milano, Italia). Il profilo termico di reazione ha previsto 50 °C per 2 minuti e 10 minuti a 95 °C, seguiti da 40 cicli a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 60 secondi, seguito da un protocollo di dissociazione finale compreso tra 60 e i 95 °C con un incremento di temperatura di 2 °C al minuto o stabilito in base allo strumento. Le specifiche della macchina, le concentrazioni dei *primer*, i volumi finali di reazione e di templatò e le repliche dei

campioni, con controlli positivi e negativi annessi, sono descritti caso per caso. ROX è il fluoroforo usato come riferimento.

La quantificazione tramite Real Time PCR è stata svolta sulla base della costruzione di rette di taratura da diluizioni seriali di DNA genomico standard contenente 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 copie di genoma del microrganismo ricercato, il cui numero di copie è stato calcolato tramite la seguente formula: $m = (n) \cdot (1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp})$, dove n è il numero di numero di paia di basi (bp) e m è la massa di DNA (g) [Woods *et al*, 2008]. L'efficienza di reazione (E) è stata calcolata secondo la formula $E = 10^{(-1/m)} - 1$, dove in questo caso "m" è la pendenza della retta di taratura, mentre la linearità è stata calcolata in base al coefficiente di Pearson (R^2).

Sviluppo di un controllo di amplificazione

Per il metodo relativo alla rilevazione di *S. enterica*, una sequenza esterna (un frammento di *Allium cepa* clonato all'interno del vettore p-GEM®-T Easy Vector) è stata scelta come controllo di PCR (controllo interno di amplificazione, IAC, non competitivo [Hoorfar *et al*, 2004]). I primer per questa sequenza sono stati testati per evitare amplificazioni aspecifiche con DNA di pollo e *Salmonella*.

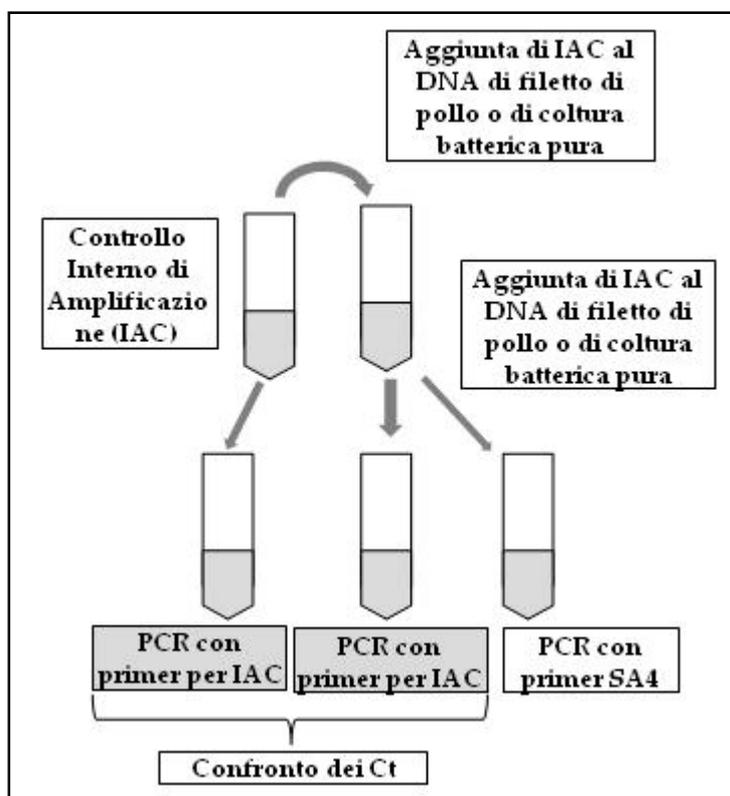


Figura 11.3
Schema sperimentale per lo sviluppo in un controllo interno non competitivo.

Un numero pari a 100, 200, 300, 400, 500 copie di IAC sono stati aggiunti a campioni estratti da colture pure di *Salmonella* e a campioni di DNA di pollo, amplificati assieme

ai *primer* specifici per *S. enterica*, secondo lo schema riportato in **Figura 11.3**. Ogni quantità di IAC è stata testata in sei replicati.

L'effetto matrice è stato valutato confrontando attraverso il t-test la media dei cicli soglia (mCt) dello IAC puro o mescolato con il DNA dei campioni di pollo contaminato. Le caratteristiche dei *primer* e dell'amplicone di IAC sono raccolte in **Tabella 11.2**.

Tabella 11.2 Proprietà dello IAC costruito per <i>S. enterica</i>.				
Nome	Sequenze	T annealing	Lunghezza amplicone	T <i>melting</i> amplicone
IAC	FOR 5'- CCAGGAAAGGCAACAAGT TT-3' REV 5'- AGCTTCAAATCTCCACTGC AC-3'	60 °C 60 °C	128 bp	77.0 °C

Prova di validazione del metodo di quantificazione in pollo di *S. enterica* e *C. jejuni* basato su SYBR®Green su macchine per PCR diverse e con operatori diversi

La prova è stata attuata nel contesto del progetto europeo CHILL ON (www.chill-on.com) presso i laboratori di “Institute for Biological Information Systems” (BIBIS), “Technology Transfer Center” (TTZ) e Q-Bioanalyti GmbH situati a Bremerhaven (in Germania).

I termociclatori utilizzati per gli esperimenti sono stati STRATAGENE Mx4000™ (La Jolla, USA) e ABI PRISM® HT7900 (California, USA) che di seguito verranno abbreviati in STRATAGENE (S), ABI (A).

Per *Salmonella* e *Campylobacter* sono stati analizzati due campioni, rispettivamente SX/SY e CX/CY, contaminati con un numero incognito di CFU delle due specie batteriche esaminate. Questi campioni sono stati distribuiti ad un operatore che ha estratto il DNA con il metodo delle NP, descritto nel paragrafo precedente.

Il DNA è stato quindi distribuito ai quattro operatori, ciascuno dei quali ha poi allestito due reazioni di PCR per ogni campione sulle diverse macchine. Sulla base delle rette standard si è proceduto alla determinazione del numero di copie di genomi per ciascun campione.

Il volume di eluizione finale del DNA è stato aumentato a 150 µl nel caso di *Campylobacter* per permettere ai 4 operatori di preparare e caricare la stessa reazione su

3 macchine diverse, cosa che non è stata possibile per *Salmonella*, dove il volume di estrazione è rimasto 100 µl e quindi solo 3 operatori hanno analizzato tali campioni sulle 3 diverse macchine di PCR.

Su ogni piastra per PCR oltre al DNA dei campioni, erano presenti due repliche per ciascun genomico standard (da 10 a 10⁵ copie) e due repliche di controllo negativo (acqua sterile al posto del templatato).

Il volume finale di amplificazione utilizzato è di 25 µl, con 5 µl di templatato per entrambi i microrganismi, la concentrazione delle coppie di *primer* SA4 e CAMP1 di 300 nM per ogni singola reazione. La *master mix*, il profilo termico e di dissociazione sono quelli precedentemente descritti impostati sulle specifiche macchine.

Il numero di copie di genoma batterico per ciascun campione è stato calcolato moltiplicando numero di copie rilevato nella reazione per il fattore di diluizione realtivo al volume di estrazione (20 e 30 per *Salmonella* e *Campylobacter* rispettivamente). Poiché in prove precedenti è stata riscontrata una buona corrispondenza tra copie di genoma batterico ed unità formanti colonia (CFU) su piastra, è stato assunto che il numero di genomi corrisponda al numero di CFU.

Per ogni campione è stata calcolata:

- la media dei CFU ottenuta su ciascuna macchina da tutti gli operatori;
- la media di CFU complessiva.

La riproducibilità dei dati ottenuti dalle diverse macchine è stata valutata mediante il calcolo della deviazione standard relativa (RSD_R), espressa come rapporto tra la deviazione standard della media di CFU complessiva e il valore della media di CFU complessiva (espressa in percentuale) secondo le indicazioni del CODEX alimentarius [Codex Alimentarius Commission, 2009].

Per aumentare la robustezza delle analisi, i dati ottenuti dai diversi operatori e dalle diverse macchine, sono stati confrontati mediante analisi della varianza (ANOVA).

Prova del metodo presso un'azienda del settore avicolo

Il metodo per il rilevamento di *Campylobacter* e *Salmonella*, basato sulla Real Time PCR con SYBR®GreenER™ è stato provato presso AIA in Verona, una delle aziende leader nel campo della produzione e distribuzione di diversi prodotti di carne avicola.

Poiché la legislazione corrente non prevede la quantificazione di *Campylobacter* e *Salmonella* in tale materiale, l'analisi è stata condotta per verificare semplicemente la presenza o assenza dei microrganismi, senza però effettuare l'arricchimento culturale.

Per *Salmonella enterica* sono stati analizzati 8 campioni di pollo in totale, 4 in 2 repliche, ottenuti dalla contaminazione di 10 g di pelle del collo con 10, 100, 1000, 10000 CFU effettuata dalla ditta stessa (considerato che la contaminazione reale possibile si aggira su valori inferiori a 10 CFU/25 g di campione). Per *Campylobacter*, invece, poiché nel 60-70% dei campioni di pelle è stata rilevata la sua presenza, non è stata eseguita alcuna contaminazione ma è stata effettuata direttamente l'analisi su 10 campioni prelevati casualmente dopo la macellazione.

I campioni con *Salmonella* sono stati omogeneizzati in 50 ml di BPW per 1 minuto a 230 rpm, il surnatante recuperato è stato centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti. A tale processo è seguita l'estrazione del DNA con il sistema NP e l'amplificazione in Real Time PCR.

Alcune modifiche al protocollo sono state effettuate, in corso d'opera per i campioni relativi a *C. jejuni*, poiché è stato osservato, durante l'estrazione del DNA di *Salmonella* che il grasso della pelle faceva agglomerare le NP. In questo caso, quindi, ciascun campione di 10 g di pelle è stato sospeso in 35 ml di PBS (pH 7.5, 10mM) e miscelato in presenza di microsfere di vetro e polvere di quarzo per 1 minuto. Il surnatante è stato recuperato e centrifugato a 2000 rpm per 3 minuti per eliminare i residui di pelle. Un altro passaggio di centrifugazione a 3000 rpm per 20 minuti è stato infine svolto sul surnatante recuperato, per recuperare i batteri. La prima fase dell'estrazione con NP, la lisi a 65 °C in presenza di proteinasi K, è stata quindi attuata O/N, mentre nei passaggi successivi il protocollo d'estrazione non ha subito modifiche. Ogni campione è stato quindi analizzato in Real Time PCR.

Per entrambi i microrganismi, la macchina usata per la PCR è stata una StepOnePlus™ (ABI PRISM®, California, USA). La reazione è stata condotta in un volume finale di 20 µl con 2 µl di templat e 18 µl di mix. Una variazione è stata apportata solamente alla concentrazione dei *primer* per *Campylobacter* la cui concentrazione è stata di 150 nM per reazione. Per ogni PCR, la retta di taratura per ogni microrganismo è stata costruita con triplicati di DNA genomico standard (da 1 a 10⁵ copie); inoltre sono stati preparati 2 controlli negativi, con acqua sterile al posto del templat, per ogni PCR.

11.1.6 Determinazione di *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo tramite Real Time PCR con le sonde TaqMan® MGB

Estrazione del DNA genomico batterico

I *pellet* ottenuti come descritto nel **paragrafo 10.2.4.**, sono stati risospesi in 200 µl di acqua sterile. Il DNA è stato quindi estratto tramite il sistema *AccuPrep*® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Alameda, CA) secondo le istruzioni riportate dalla ditta. Il DNA è stato quindi eluito in 200 µl di acqua *nuclease free* e usato in aliquote di 2 µl per la reazione di PCR, per ciascuno dei microrganismi ricercati.

Primer oligonucleotidici, sonde e PCR

I *primer* e le sonde per la rilevazione e la quantificazione di *S. enterica* e *C. jejuni* in Real Time PCR sono stati selezionati utilizzando il programma Primer Express (versione 3.0, Applied Biosystems) secondo le indicazioni fornite dalla ditta stessa per la quantificazione con il sistema TaqMan® MGB (Minor Groove Binder) per cui:

- le **sonde** devono avere lunghezza compresa tra 13/18 e 25/30 bp, una *T melting* maggiore di 10 °C rispetto ai *primer* con cui lavorano, in caso di reazioni *multiplex* le sonde devono avere la stessa *T melting*, un contenuto di GC compreso tra 30 e 80%; mentre non devono avere G al 5', nucleotidi CC al centro, ed un numero di guanine superiore a 4;
- i **primer** devono avere lunghezza compresa tra 18/30 bp, un ΔT *melting* inferiore a 4 °C; un contenuto in GC compreso tra 40-60 %; un numero di G-C minore di 3 al 3', mentre non devono avere nessuna struttura secondaria e complementarità tra di loro;
- l'**amplicone** deve avere una lunghezza tra i 50 e i 150 bp, con un contenuto in GC compreso tra 30-80% e deve essere privo di strutture secondarie.

In base ai parametri mostrati sono stati quindi costruiti i *primer* e le sonde specifici, per *Salmonella* e *Campylobacter*, le cui caratteristiche sono riassunte rispettivamente in **Tabella 11.3** e **Tabella 11.4**. Le sonde sono state sintetizzate da Applied Biosystems Italia (Milano, Italia), i *primer* sono stati sintetizzati dalla ditta SIGMA Life Science (SIGMA ALDRICH, Milano, Italia).

Tabella 11.3 Proprietà dei primer costruiti per l'analisi Real Time PCR TaqMan® MGB di <i>S. enterica</i> e <i>C. jejuni</i>.			
Gene	Nome	Sequenze	T annealing
<i>invA</i>	Saen	FOR 5'-TTGTCCTCCGCCCTGTCTAC-3'	61 °C
		REV 5'-TGGGCGACAAGACCATCA-3'	61 °C
<i>wlaL</i>	Caje	FOR 5'-GATAGTGCTGTGGCGGCTTT-3'	61 °C
		REV 5'-CCTATAGTTCCACCTGCTCCACTT-3'	60 °C

Tabella 11.4 Caratteristiche delle sonde e dell'amplicone atteso, per l'analisi Real Time PCR TaqMan® MGB di <i>S. enterica</i> e <i>C. jejuni</i>.			
Nome	Sequenza	T melting sonda	Lunghezza amplicone
SAEN	5'-6FAM-TATACCATGCTGACCATTG-NFQ-MGB-3'	69 °C 69 °C	59 bp
CAJE	5'-VIC-AAAGACAAGGTAGTTTTGG-NFQ-MGB-3'	69 °C 69 °C	68 bp

La macchina usata per ogni prova effettuata è ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Il profilo termico di amplificazione ha previsto 50 °C per 2 minuti e 10 minuti a 95 °C, seguiti da 40 cicli a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 60 secondi. ROX è il fluoro foro usato come riferimento. La *master mix* adoperata è la TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Italia, Milano, Italia).

La specificità dei *primer* è stata inizialmente testata *in silico*, comparandone le sequenze con quelle presenti nella banca dati GenBank attraverso l'algoritmo BLASTN, disponibile sul sito NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Il funzionamento dei *primer* è stato verificato in seguito, tramite reazioni in Real Time PCR con SYBR®Green, seguendo il protocollo descritto precedentemente, in presenza di 100000 copie di DNA genomico standard del batterio in esame e i *primer* alla concentrazione di 500 nM, in un volume finale di reazione di 25 µl. Sono stati quindi verificati il funzionamento e la specificità della sonda, singolarmente, per entrambi i batteri, utilizzando i *primer* alla concentrazione di 500 nM, la sonda alla concentrazione di 250 nM, un controllo positivo (100000 copie di DNA genomico standard del microrganismo in esame), due controlli negativi (acqua sterile e 100000 copie di DNA genomico standard dell'altro microrganismo) in un volume finale di reazione di 20 µl.

Da questo momento in poi il volume finale di reazione è sempre stato di 20 µl, di cui 2 µl di template (o acqua *nuclease free*) e 18 µl di *mix* per le reazioni in singolo e 2 µl di ciascun template (o acqua *nuclease free*) e 16 µl di *mix* per le reazioni in duplex. La

concentrazione della sonda utilizzata per ogni prova è stata pari a 250 nM, per ciascuno dei due batteri.

Ottimizzazione della concentrazione dei *primer*

L'ottimizzazione della concentrazione dei *primer* è stata effettuata prima in singolo e poi in *duplex*. Per l'ottimizzazione in singolo è stata costruita una matrice in cui concentrazioni di 50, 300, 600 nM dei *primer forward* e *reverse*, microrganismo sono state combinate tra di loro. Sono stati usati una quantità fissa di DNA genomico standard (100000 copie) e di sonda. Ogni reazione è stata svolta in doppio, allestendo un controllo negativo per ogni concentrazione testata. La migliore concentrazione è stata scelta in base ai valori di medi Ct e di ΔRn forniti dal Software ABI Prism 7000 SDS, Per l'ottimizzazione in *duplex*, sempre tramite la costruzione di una matrice, sono state valutate le concentrazioni delle coppie di *primer* Saen e Caje: 50, 300, 600 nM. Per ogni combinazione è stata svolta la reazione in doppio e in presenza di una quantità fissa di DNA genomico standard (100000 copie) e di sonda più un controllo negativo (acqua sterile).

Determinazione del LOD e dell'intervallo di linearità delle reazioni

Il limite di rilevabilità (LOD), cioè la più piccola quantità o concentrazione di analita rilevabile in un campione, è stato valutato testando una serie di diluizioni di DNA genomico standard con un numero di copie compreso tra 1 e 100000. Tale parametro è stato rilevato nella stessa reazione di amplificazione, in singolo e in *duplex*. Per la rilevazione di LOD in *duplex* sono state allestite reazioni in cui quantità scalari di DNA genomico standard di *S. enterica* (10, 100, 1000, 10000, 100000 copie) e *C. jejuni* (10, 100, 1000, 10000, 100000 copie) sono state combinate. Ogni reazione è stata svolta in doppio.

La quantificazione tramite Real Time PCR è stata svolta sulla base di rette di taratura ottenute da diluizioni seriali di DNA genomico standard contenenti 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ copie di genoma del microrganismo in esame, il cui numero di copie è stato calcolato tramite la seguente formula: $m = (n) \cdot (1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp})$, dove n è il numero di paia di basi (bp) e m è la massa di DNA (g) [Woods *et al*, 2008]. L'efficienza di reazione (E) è stata calcolata secondo la formula $E = 10^{(-1/m)} - 1$, dove in questo caso "m" è la pendenza della retta di taratura. L'intervallo di linearità delle reazioni è stato valutato tramite il coefficiente di Pearson R².

Prove su colture pure di *S. enterica* e *C. jejuni* e campioni di pollo contaminati con questi due microrganismi

Il protocollo di Real Time con le sonde TaqMan® è stato applicato a campioni di colture pure di *S. enterica* e *C. jejuni* e su campioni di pollo contaminati con questi due microrganismi, da cui era stato estratto il DNA con il sistema prodotto dalla ditta Bioneer descritto all'inizio di tale paragrafo. Le analisi statistiche sono state condotte mediante il programma Excel (vs 2007) e con il programma SPSS (vs 17).

11.2 La comunità microbica di sedimenti in presenza-assenza di *Vallisneria spiralis*

11.2.1 Microbiologia classica. Isolamento dei batteri coltivabili coinvolti nel ciclo dell'azoto

Per comprendere il ruolo delle comunità microbiche presenti nelle praterie di *Vallisneria spiralis*, con particolare riferimento alle dinamiche relative al ciclo dell'azoto, si è deciso inizialmente di isolare e coltivare in laboratorio i batteri denitrificanti, i batteri nitrificanti (batteri ammonio-ossidanti e batteri nitrito-ossidanti), i batteri azotofissatori e i cianobatteri azotofissatori.

L'analisi microbiologica è stata complementata dall'analisi molecolare necessaria per l'identificazione degli isolati attraverso:

- estrazione del DNA genomico da ciascuno dei 48 ceppi isolati;
- amplificazione tramite PCR del rDNA 16S;
- analisi ARDRA dei ceppi la cui amplificazione è risultata positiva;
- scelta dei profili ARDRA unici, sequenziamento del rDNA 16S e confronto con le banche dati tramite BLAST dei ceppi aventi un profilo ARDRA significativo.

Campionamento

Come mostrato in **Figura 11.4** è stata prelevata una carota di 20 cm di diametro, 40 cm di altezza e contenente 15 cm di sedimento in cui era presente la macrofita radicata *V. spiralis* nel sito di Massimbona, localizzato nel tratto nord del fiume Mincio (vedi **Figura 9.5** del capitolo introduttivo relativo). Il campione di sedimento è stato conservato al freddo, in box con acqua prelevata *in situ* e trasportato in laboratorio entro poche ore dalla raccolta.



Figura 11.4
Carota di sedimento analizzata nella fase iniziale.

E' stato conservato in una stanza, nelle medesime condizioni O/N, prima di essere utilizzato per le analisi successive. Eliminata lentamente l'acqua dal basso, per evitare spostamenti nella stratificazione del sedimento, la carota è stata suddivisa in quattro sottosezioni (**Figura 11.5**):

- SA = Sedimento Anossico, posto sul fondo della carota;
- SR = Sedimento Rizosfera, situato attorno all'apparato radicale;
- SN = Sedimento Nudo, individuato lontano dalle radici nella zona intermedia;
- SO = Sedimento Ossico, superficiale a contatto con l'acqua;

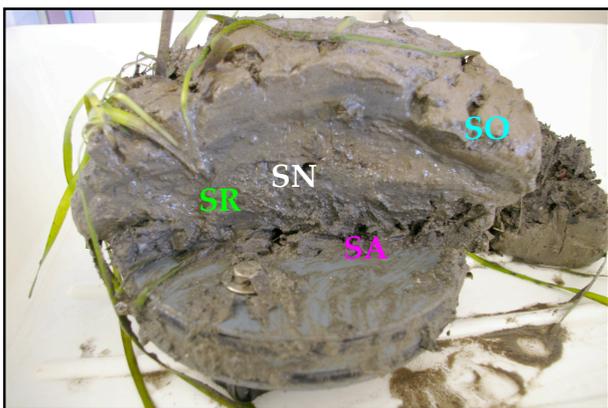


Figura 11.5
Sottosezioni della carota individuate per la ricerca dei batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto.

Una quantità di sedimento compresa tra 1-3 g è stata risospesa in una provetta da 15 ml contenente 8 ml di soluzione di sodio pirofosfato ($\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0.3% e mescolata immediatamente in modo vigoroso tramite vortex per 1 minuto, e in seguito per 3 ore a 250 rpm, a T ambiente in apposito sistema.

Dopo aver lasciato sedimentare, ogni campione è stato sottoposto a un doppio ciclo di centrifugazione a 1000 rpm per 30 secondi. Il surnatante è stato quindi recuperato e utilizzato direttamente per la semina nei diversi terreni di crescita utilizzati.

Terreni per l'arricchimento e la selezione dei batteri coinvolti nel metabolismo dell'azoto

Da ogni campione è stato possibile recuperare circa 7 ml di surnatante che è stato inoculato secondo lo schema seguente nei diversi terreni per la ricerca di batteri ammonio ossidanti, batteri nitrito ossidanti, batteri denitrificanti, batteri azotofissatori e cianobatteri azotofissatori:

- 1 ml in una beuta contenente 50 ml di terreno liquido per batteri ammonio ossidanti (AOMB);
- 1 ml in una beuta contenente 50 ml di terreno liquido per batteri nitrito ossidanti (NOMB);

- 1 ml in una provetta contenente 15 ml di terreno minerale (MMD) per batteri denitrificanti;
- 1 ml in una provetta contenente 15 ml di terreno complesso (MCD) per batteri denitrificanti;
- 1 ml in una provetta contenente 15 ml di terreno “bouillon” (MBD) per batteri denitrificanti;
- 100 µl per piastra di terreno per gli azotofissatori appartenenti ai generi *Azotobacter* spp. e *Azomonas* (AAA);
- 100 µl per piastra di due terreni semisolidi per azotofissatori appartenenti al genere *Azospirillum*, (NFb, LGI);
- 1 ml per provetta contenente 5 ml di terreno liquido per cianobatteri (BG-11 modificato);
- 100 µl per piastra di terreno solido per cianobatteri (BG-11 modificato);

La crescita di ciascuna popolazione è stata condotta nelle seguenti condizioni:

- i batteri ammonio ossidanti e i batteri nitrito ossidanti sono stati fatti crescere al buio, in agitazione a 140 rpm e alla temperatura di 30 °C per almeno 1 mese, poi si è proceduto all’isolamento sul medesimo terreno ma in forma solida, in piastra;
- i batteri denitrificanti sono stati fatti crescere per un mese, al buio, in assenza di agitazione; da ciascuna provetta sono stati isolati i batteri nei medesimi terreni agarizzati;
- i batteri azotofissatori, isolati subito in piastra, hanno subito diversi passaggi di isolamento prima di essere identificati attraverso terreni selettivi e terreni di arricchimento; temperatura di crescita 30 °C;
- i cianobatteri sono stati coltivati in condizioni di luce continua, in apposita camera, per tre settimane, a temperatura ambiente prima di essere isolati dalla brodo coltura in piastra e identificati.

Le composizioni dei terreni sono state ricavate dalla seguente bibliografia:

- terreno per batteri ammonio ossidanti (AOMA, agar – AOMB, brodo) da “Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry” [Alef & Nannipieri, 1995] pag 132; unica fonte di carbonio CaCO₃ e fonte di azoto (NH₄)₂SO₄;
- terreno per batteri nitrito ossidanti (NOA, agar – NOMB, brodo) da “Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry” [Alef & Nannipieri, 1995] pag 132; unica fonte di carbonio CaCO₃ e fonte di azoto NaNO₂;

- terreni per batteri denitrificanti (MMD, MCD; MBD) da “Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry” [Alef & Nannipieri, 1995] pag 133; fonte di azoto KNO₃;
- terreno per gli azotofissatori appartenenti ai generi *Azotobacter* spp. e *Azomonas* (AAA) da “Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry” [Alef & Nannipieri, 1995] pag 134; assenza della fonte di azoto;
- terreni semisolidi per azotofissatori appartenenti al genere *Azospirillum*, (NFb, LGI) da “Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry” [Alef & Nannipieri, 1995] pag 137; assenza della fonte di azoto;
- Terreno per cianobatteri azotofissatori, liquido e solido, segue la composizione del mezzo BG-11 (ATCC Medium 616) in assenza della fonte di azoto (BG-11 modificato).

Alcune variazioni alla composizione dei terreni per i batteri ammonio e nitrito ossidanti sono state apportate, per ovviare alla bassa solubilità del CaCO₃, riducendone la quantità da 6 g a 1 g per litro di terreno, senza dover modificare il pH del terreno.

Estrazione DNA genomico, PCR del 16S rDNA

Da ciascuna colonia batterica isolata è stata effettuata l'estrazione del DNA genomico utilizzando il sistema *AccuPrep*® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Alameda, CA) secondo le istruzioni riportate dalla ditta.

Per procedere all'identificazione dei batteri isolati è stata eseguita l'amplificazione del 16S rDNA seguita da analisi ARDRA. I *primer* utilizzati sono il 27F e 1492R [Lane, 1991]. La PCR è stata effettuata come segue: 250 nM di ciascun *primer*; 0.2 mM di dNTP; 1X PCR buffer, 1 mM di MgCl₂ e 0.1 µl di GoTaq®Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, USA) in un volume finale di 20 µl di cui 2 di templatato (DNA genomico estratto). Il profilo termico di amplificazione ha compreso 1 ciclo di 5 minuti a 94 °C seguito da 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 1 minuto, appaiamento a 56°C per 1 minuto ed estensione a 72 °C per 1 minuto e 30 secondi; terminando con un ciclo di estensione finale a 72 °C per 8 minuti. Il termociclature usato è un Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), 96-Well Thermal Cycler 0.2 ml. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio a concentrazione 0.8 % (w/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in tampone di corsa TAE 1X contenente 1µg/ml di GelRed™ (Biotium, Hayward, CA). I gel sono stati visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA).

ARDRA e Sequenziamento

Gli amplificati ottenuti sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *HaeIII* secondo il protocollo che segue: 5 µl di prodotto di PCR, 2.5 µl di Buffer 10X, 0.2 µl di BSA (10 mg/ml), 0.4 µl di *HaeIII* (10 u/µl) per un volume finale di 25 µl. La digestione è stata effettuata O/N a 37 °C. Per il controllo dei prodotti di digestione è stato utilizzato l'agarosio *low melting* NuSieve® GTG® Agarose (Cambrex Bio Science Rockland Inc, Maine) al 2.5% in tampone TBE 0.5 %, contenente 1µg/ml di GelRed™ (Biotium, Hayward, CA). La corsa è stata effettuata a 65 Volt per 3 ore. I gel sono stati visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA).

Analizzati i singoli profili di digestione, sono stati selezionati e purificati i corrispondenti ampliconi del rDNA 16S tramite il sistema commerciale Wizard® SV Gel PCR Clean-UP System (Promega, USA) e inviati alla ditta BMR Genomics (Padova, Italia) per il sequenziamento. Le sequenze sono state confrontate con le banche dati tramite NCBI BLASTN disponibile *online* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) per l'identificazione.

(A)RISA dei batteri identificati

L'analisi molecolare dei ceppi identificati è stata approfondita determinandone il profilo (A)RISA. La tecnica è stata ottimizzata a partire dalle informazioni presenti in letteratura [Fisher & Triplett 1999; Cardinale *et al*, 2004; Stuart *et al*, 2007] attraverso numerose prove e la modifica di alcuni parametri, relativi sia alla fase di amplificazione delle ITS che alla fase di visualizzazione tramite elettroforesi, su gel o automatizzata, delle sequenze amplificate.

DNA genomici standard dei batteri noti e ben studiati *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni*, sono stati utilizzati come template per l'ottimizzazione della PCR delle ITS, in quanto tali sequenze sono conosciute.

Sono stati utilizzati per l'amplificazione i *primer* ITS_F e ITS_R largamente discussi da Cardinale *et al* [Cardinale *et al*, 2004], sintetizzati dalla ditta SIGMA *Life Science* (SIGMA ALDRICH, Milano, Italia).

Le varie prove di amplificazione sono state condotte su un termociclature Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), 96-Well Thermal Cycler 0.2 ml. Il profilo termico di reazione è stato ottimizzato variando la T di appaiamento tra 58 e 63 °C tramite un gradiente di temperature creato tramite la macchina di PCR.

La reazione è stata condotta sempre in un volume finale di 20 µl, utilizzando 0.2 mM di dNTP; 1X PCR buffer e 0.1 µl di GoTaq®Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, USA), con 2 µl di templat. Sono stati testati, invece, la concentrazione ottimale dei *primer* (100 nM, 150 nM, 200nM, 300 nM) e la concentrazione di MgCl₂ (1.0 mM, 1.5 mM, 3.0 mM).

Nelle fasi di ottimizzazione, i profili delle ITS sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio a concentrazione 2.5 % (w/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in tampone di corsa TAE 1X contenente 1µg/ml di GelRed™ (Biotium, Hayward, CA). I gel sono stati visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA).

La PCR per amplificare le ITS dei singoli isolati è stata effettuata come segue: 100 nM di ITS_F e 100 nM di ITS_R, 0.2 mM di dNTP; 1X PCR buffer, 1.5 mM di MgCl₂ e 0.1 µl di GoTaq®Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, USA) in un volume finale di 20 µl di cui 2 di templat (DNA genomico estratto da ogni singolo isolato batterico). Il profilo termico è costituito da una fase di denaturazione iniziale di 3 minuti a 94 °C, seguita da 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 45 secondi, appaiamento a 58 °C per 1 minuto e estensione a 72 °C per 2 minuti, e un'estensione finale di 7 minuti a 72 °C.

Per applicare la tecnica in versione automatizzata, tramite elettroforesi capillare, le ITS sono state amplificate con il *primer* ITS_R-6FAM al posto dell'omonimo non marcato, sintetizzato dalla ditta SIGMA *Life Science* (SIGMA ALDRICH, Milano, Italia).

Una volta ottenuti gli amplificati, questi sono stati purificati tramite il sistema commerciale Wizard® SV Gel PCR Clean-UP System (Promega, USA). Ogni campione è stato analizzato con il sequenziatore automatico ABI Prism 310 di Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) dopo essere stato sottoposto a un passaggio di denaturazione di 3 minuti a 95°C in presenza del marcatore molecolare GeneScan-2500 ROX™ Size Standard (utilizzato in condizioni denaturanti) e di Hi-Di™ Formamide Genetic Analyses Grade, forniti dalla ditta produttrice della macchina, nei seguenti volumi: 2 µl : 0.5 µl : 11.5 µl rispettivamente. Il polimero utilizzato per l'analisi dei frammenti nella corsa è il POP-4™ Performance Optimized Polymer.

I dati raccolti dal software Gene Mapper, sono stati trasferiti su file Microsoft Excel per l'analisi seguente. Nel caso degli isolati batterici, sulla base di quanto riportato in letteratura, si è deciso di escludere ogni picco che, in termini di fluorescenza, rappresentasse meno dell'1 % della fluorescenza totale dei picchi [Hewson & Fuhrman,

2004; Brown *et al*, 2005; Popa *et al*, 2009], questo per evidenziare le ITS rappresentative di ciascun ceppo identificato.

11.2.2 Primer specifici per batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto

Ricerca bibliografica

Tramite NCBI PubMed, risorsa presente *online*, è stato possibile fare una ricerca dei geni e dei *primer* ad oggi disegnati per l'amplificazione specifica dei geni batterici coinvolti nelle principali reazioni del ciclo biogeochimico dell'azoto.

Per il disegno di *primer* specifici sono stati scelti i geni:

- *nosZ* per la denitrificazione vera e propria (codifica per l'enzima ossido nitroso reductasi in grado di ridurre N_2O a N_2);
- *nrfA* per la DNRA dove il nitrito è ridotto ad ammonio dall'enzima codificato da tale gene;
- *amoA* per gli ammonio ossidanti (l'ossidazione dell'ammonio è il passo iniziale della nitrificazione);
- *nxrA* per i nitrito ossidanti (la nitrito ossido reductasi è l'enzima chiave responsabile per l'ossidazione del nitrito a nitrato in tali batteri);
- *hzo* gene che codifica per l'idrazina ossido reductasi enzima chiave del processo *anammox*);
- *nifH* per tutti gli azotofissatori (es: *Klebsiella* sp, *Azomonas* sp, *Rhizobium* sp);
- *nifD* per i cianobatteri azotofissatori (es: *Nostoc* sp).

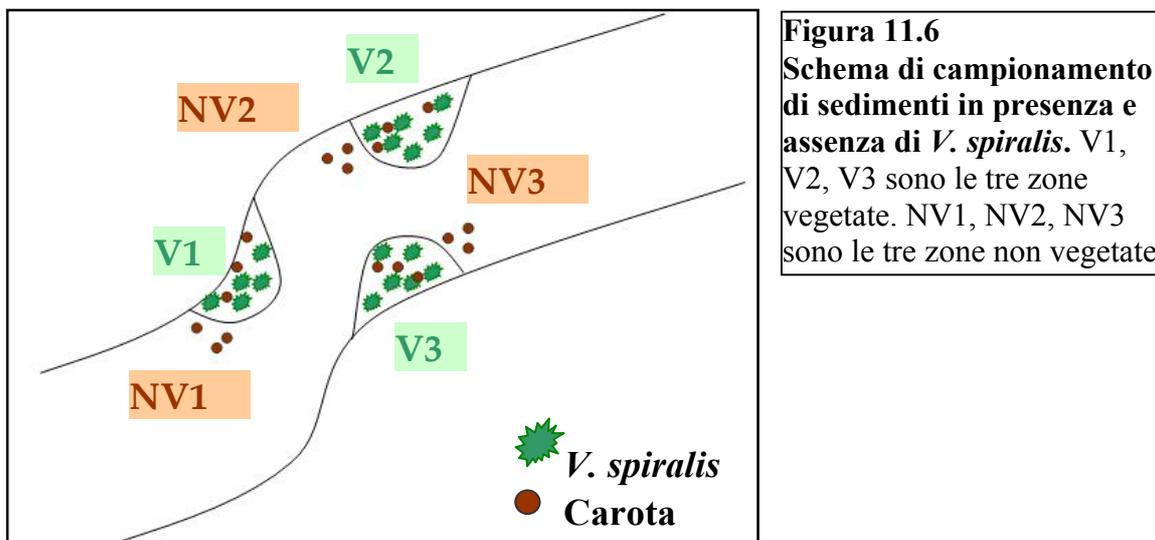
11.2.3 Informazioni ottenute sulla comunità batterica

Campionamento ed estrazione del DNA genomico ambientale

L'analisi dell'intera comunità microbica nei sedimenti campionati in presenza e in assenza di *Vallisneria spiralis* è stata svolta applicando la tecnica ARISA su campioni ottenuti schematizzato in **Figura 11.6**:

- 3 aree vegetate a *V. spiralis*; 3 aree adiacenti non vegetate presso il sito di Massimbona, nel tratto nord del fiume Mincio;
- per ciascuna area sono state raccolte 3 carote intatte di sedimento utilizzando liner in plexiglass trasparente (diametro 4 cm, altezza 20 cm), in totale 9 campioni per la zona vegetata e 9 per la zona non vegetata;
- da ogni campione sono state fatte due estrazioni del DNA genomico ambientale (18 estrazioni per la zona vegetata, 18 estrazioni per la zona non vegetata);

- questo lavoro è stato ripetuto in due momenti chiave della crescita di *V. spiralis*, in primavera e in tarda estate (36 campioni totali per ogni stagione);



L'estrazione del DNA genomico è stata condotta quindi su 36 campioni per la stagione primaverile (18 della zona non vegetata e 18 della zona vegetata) e 36 campioni della stagione estiva (18 della zona non vegetata e 18 della zona vegetata) seguendo il protocollo FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH).

PCR e ARISA

Sono stati confrontati due tipi di sedimenti (in presenza e in assenza della macrofita radicata, rispettivamente V e NV) e due momenti importanti nello sviluppo della pianta acquatica sommersa (maggio: fase esponenziale della crescita, M; settembre: fase della massima produzione di biomassa vegetale nell'anno corrente, S) tra loro nelle seguenti combinazioni: MV, MNV, SV, SNV.

Le varie prove di amplificazione sono state condotte utilizzando il profilo termico precedentemente descritto per le ITS dei singoli isolati batterici, su un termociclizzatore Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) 96-Well Thermal Cycler 0.2 ml, secondo il protocollo seguente: 100 nM di ITSF e 100 nM di ITSReub, 0.2 mM di dNTP; 1X PCR buffer, 1.5 mM di MgCl₂ e 0.1 µl di GoTaq®Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, USA) in un volume finale di 20 µl di cui 2 di templat (DNA genomico del sedimento opportunamente diluito). La concentrazione del DNA genomico è infatti stata valutata tra quella estratta tal quale fino a una diluizione di 1:1000000.

Da ogni zona (V1, V2, V3, NV1, NV2, NV3) sono stati ottenuti 6 estratti di riferimento (2 estrazioni X 3 carote di sedimento per zona). Per ogni stagione, i 6 DNA genomici

estratti dalla medesima zona sono stati opportunamente diluiti e miscelati prelevando 5 μ l da ciascuna replica per ottenere i seguenti campioni, analizzati tramite ARISA: MV1, MV2, MV3, MNV1, MNV2, MNV3 per la stagione primaverile e SV1, SV2, SV3, SNV1, SNV2, SNV3 per la stagione estiva.

5 μ l di ciascun campione così costituito è stato sottoposto a denaturazione, 95 °C per 3 minuti, in presenza di 1.25 μ l di GeneScan-2500 ROX™ Size Standard e di 7.75 μ l di Hi-Di™ Formamide Genetic Analyses Grade prima di essere caricato nell'analizzatore di sequenze automatico ABI Prism 310 di Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), in cui il DNA è stato sottoposto a elettroforesi capillare usando il polimero POP-4™ Performance Optimized Polymer.

Gli elettroferogrammi analizzati da Gene Mapper hanno fornito i dati che sono stati trasferiti su Microsoft Excel per essere analizzati.

Allo scopo di escludere dall'analisi gli artefatti si è deciso, anche sulla base di quanto riportato in letteratura, di escludere ogni picco che, in termini di fluorescenza, rappresentasse meno dello 0.1% della fluorescenza totale dei picchi [Hewson & Fuhrman, 2004; Brown *et al*, 2005; Popa *et al*, 2009].

I picchi più grandi di 1000 bp e inferiori a 82 bp (somma tra le dimensioni dei *primer* e la lunghezza delle sequenze non appartenenti alle regioni ITS, ma ai geni per gli rRNA 16S e 23S) non sono stati considerati [Popa *et al*, 2009]. Con i frammenti è stata eseguita una operazione di raggruppamento (*binning*) secondo le indicazioni riportate in letteratura [Brown *et al*, 2005; Kovacs *et al*, 2010]:

- 3 bp \pm 1 bp per frammenti fino ai 700 bp;
- 5 bp per frammenti tra i 700 e i 1000 bp.

Sui dati così ottenuti, raccolti in forma di matrice binaria, è stata applicata un'analisi statistica multivariata, tramite PCA utilizzando il programma NTSYS 2.0 [Rohlf, 1998].

Per avere ulteriore conferma di tali informazioni, un altro programma disponibile *online* [Garcia-Vallve *et al*, 1999], basato sul metodo di *clustering* UPGMA è stato utilizzato, usando gli indici di Jaccard e Pearson.

E' stata quindi calcolata la ricchezza per ogni campione, espressa come numero totale di picchi all'interno dell'elettroferogramma.

Infine sono stati calcolati diversi indici ecologici (basati sulla presenza-assenza del picco o proporzionali all'abbondanza relativa di ciascun picco) secondo i seguenti riferimenti:

- indice ecologico di Simpson ($1-D = 1 - \sum p_i^2$) dove D l'indice di dominanza di Simpson e p_i è il rapporto tra l'intensità di fluorescenza di ciascun picco e l'intensità totale della fluorescenza di ciascun campione [Cardinale *et al*, 2004; Danovaro *et al*, 2006; Corno *et al*, 2008] (per correttezza è stato calcolato sia usando le aree che le altezze); p_i è anche chiamato fluorescenza relativa o abbondanza relativa o importanza relativa;
- indice di Shannon – Wiener $H = -\sum p_i(\log_{10} p_i)$; p_i è la fluorescenza relativa [Hewson & Fuhrman, 2004; Danovaro *et al*, 2006; Corno *et al*, 2008];
- indice di Jaccard ($S_j = W / (a_1 + a_2 - W)$) dove W è il numero di picchi condiviso tra due popolazioni; a_1 e a_2 sono rispettivamente il numero totale delle diverse lunghezze di ITS nelle popolazioni 1 e 2; 0 indica completa differenza 1 indica identità [Hewson & Fuhrman, 2004];
- indice di Sorenson $C_s = 2j / (a + b)$ è un coefficiente di similarità dove j è il numero di frammenti comuni in entrambi i campioni, mentre a e b sono il numero totale di frammenti rispettivamente nei campioni a e b ; un valore di C_s pari a 0 indica che i due campioni sono completamente diversi, mentre pari a 1 significa che sono identici [Fisher & Triplett, 1999];
- indice di associazione di Whittaker $S_w = 1 - \sum [(b_{i1} - b_{i2}) / 2]$ dove $b_i = p_i$ rispettivamente per due popolazioni confrontate (1,2) [Hewson & Fuhrman, 2004].

12. Risultati e discussione

12.1 *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo

12.1.1 *Salmonella enterica*: scelta del gene *invA*

Per la rilevazione di *Salmonella enterica* nella carne di pollo, tramite la tecnica di Real Time PCR, è stato scelto come *target* il gene cromosomico di riferimento *invA* (**Figura 12.1**). La sequenza del gene *invA* codifica per una proteina della membrana interna associata alla capacità di invadere l'epitelio intestinale, caratteristica comune alla maggior parte delle specie di *Salmonella* spp., e, nel caso in esame di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (Numero di accessione: M90846 in GenBank). Le basi molecolari del fenotipo invasivo del patogeno intracellulare facoltativo *Salmonella* spp. si conoscono da diverso tempo [Galan *et al*, 1992] e diversi studi di rilevazione ad oggi sono stati sviluppati a partire dal gene *invA* [Rahn *et al*, 1992; Novinscak *et al*, 2007] o dall'mRNA ad esso associato [González-Escalona *et al*, 2009; García *et al*, 2010].

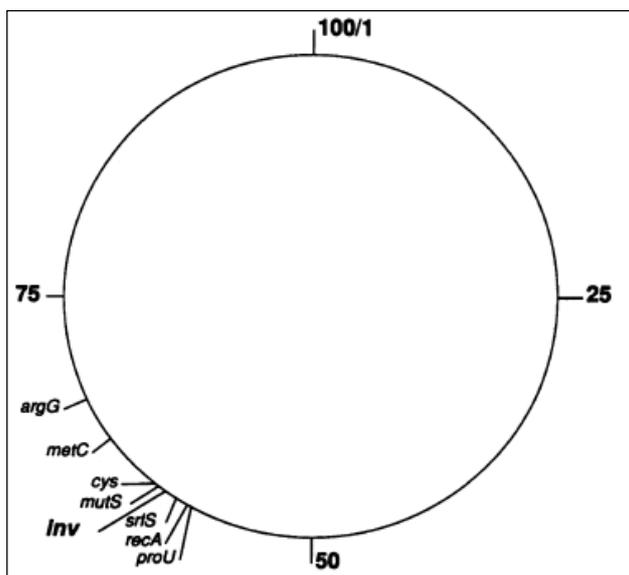


Figura 12.1
Localizzazione del locus *invA* sul cromosoma di *Salmonella*.

12.1.2 *Campylobacter jejuni*: scelta del gene *wlaL*

Per la rilevazione di *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo, tramite la tecnica di Real Time PCR, è stato scelto il gene di riferimento *wlaL* (Numero di Accessione : Y11648 in GenBank) che appartiene al *cluster* genico cromosomico, *wla* (**Figura 12.2**) [Fry *et al*, 1998], che contiene 11 geni che codificano per proteine con alta omologia a quelle presenti in altri batteri che codificano per la complessa struttura lipopolissacaridica presente sulla membrana esterna dei batteri Gram negativi. Le basi molecolari del

fenotipo patogeno che causa gastroenteriti, assieme alle capacità endotossiche della struttura LPS, sono ben conosciute [Fry *et al*, 1998; Szymanski *et al*, 1999] anche se non molti lavori descrivono specificamente il gene *wlaL* [Palyada *et al*, 2004].

La sequenza del gene *wlaL* codifica per una proteina transmembrana (contiene domini idrofobici) che si pensa essere coinvolta nella sintesi di glicoproteine come l'N-acetilgalattosammina (GalNAc) e l'acido N-acetilneuraminico (NeuNAc) di *Campylobacter jejuni*.

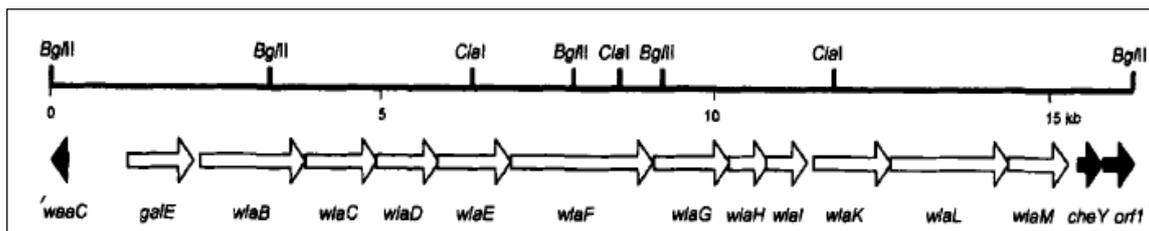


Figura 12.2
Regione di 16 kb contenente il cluster *wla* (freccie aperte) e i geni fiancheggianti di *C.jejuni* 81116. Le ORFs (*Open Reading Frames*) *waaC* e *orf1* sono incomplete su tale frammento.

12.1.3 Determinazione di *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo tramite Real Time PCR con SYBR®GreenER™

Sviluppo di un controllo di amplificazione

Per la rilevazione di *S. enterica*, allo scopo di verificare la presenza di inibitori della PCR derivati dal microrganismo stesso o dalla carne di pollo (effetto matrice) [Olsen, 2000; Corry *et al*, 2007; Demeke & Jenkins, 2010], un frammento di *Allium cepa* clonato all'interno del vettore p-GEM®-T Easy Vector, è stato utilizzato come controllo di PCR (controllo interno di amplificazione, IAC, non competitivo [Hoorfar *et al*, 2004]). I primer per questa sequenza sono stati testati attentamente per evitare amplificazioni aspecifiche con DNA di pollo e *Salmonella*. Aliquote contenenti 100, 200, 300, 400, 500 copie di IAC sono stati aggiunti a campioni estratti da colture pure di *Salmonella* e a campioni di DNA di pollo, amplificati assieme ai primer specifici per *S. enterica*. Ogni quantità di IAC è stata testata in sei replicati, la quantità di 500 copie che dava la minore variabilità nei valori di Ct ed è stata aggiunta a tutti i campioni analizzati e la media dei Ct per lo IAC puro è stata confrontata con la media dei valori di Ct ottenuti nel caso di IAC e *S. enterica*, e IAC e pollo. L'applicazione del test statistico t di Student non ha evidenziato differenze significative tra questi valori,

dimostrando che la matrice in questo caso non influisce in modo rilevante sulle reazioni di PCR.

Prova di validazione del metodo di quantificazione in pollo di *S. enterica* e *C. jejuni* basato su SYBR®Green su macchine per PCR diverse e con operatori diversi

Due metodi basati sulla tecnica Real Time PCR, la chimica del Sybr®GreenER™ e l'uso di primer specie specifici, precedentemente messi a punto rispettivamente per la rilevazione e la quantificazione di *Salmonella enterica* [Agrimonti *et al*, manoscritto in preparazione] e *Campylobacter jejuni* nella carne di pollo, sono stati provati in un test di validazione, che prevedeva l'uso di macchine di PCR diverse da parte di operatori diversi.

Gli esperimenti, come spiegato nel **Capitolo 11**, sono stati svolti presso l'istituto di trasferimento tecnologico (TTZ) di Bremerhaven (Germania), da 4 diversi operatori (C, E, K, L), ciascuno dei quali ha condotto l'estrazione del DNA e l'allestimento delle reazioni di PCR per 2 diverse macchine (A, S) (**Tabella 12.1**).

Tabella 12.1		
Dati relativi a macchine e operatori coinvolti nel test di validazione.		
Laboratori	Operatori	Nazione
Q-Bioanalytic GmbH Bremerhaven	Katrin Hameister (K)	Germania
(BIBIS) TTZ Bremerhaven	Christina Cordes (C)	Germania
MATIS Reykjavik	Eyjolfur Reynisson (E)	Islanda
Dipartimento di Scienze Ambientali Università degli Studi di Parma	Laura Bortolazzi (L)	Italia
Macchine di Real Time PCR utilizzate		
STRATAGENE Mx4000 (S)	ABI PRISM HT7900 (A)	

Le analisi sono state effettuate su campioni di filetto di pollo contaminate artificialmente con un numero noto di batteri di *S. enterica* e *C. jejuni*, ignorata dagli operatori (*blind test*).

Poiché i geni target sono presenti in singola copia nei rispettivi batteri, è stato assunto che ad ogni copia di amplicone corrispondesse un singolo cromosoma e, di conseguenza, una singola cellula batterica. Poiché in esperimenti precedenti [Agrimonti *et al*, manoscritto in preparazione] *S. enterica* e *C. jejuni* era stata riscontrata una buona corrispondenza tra il numero di genomi batterici determinati per qPCR e il numero di colonie batteriche contate su piastra, il numero di batteri quantificato è stato designato come CFU (Colony Forming Unit).

Per ogni campione è stata calcolata:

- la media dei CFU ottenuta su ciascuna macchina da tutti gli operatori;
- la media di CFU complessiva.

La riproducibilità dei dati ottenuti con le diverse macchine è stata valutata mediante il calcolo della deviazione standard relativa (RSD_R), espressa come rapporto tra la deviazione standard dalla media dei CFU complessiva e il valore della media di CFU complessiva (espressa in percentuale) secondo le indicazioni del *CODEX alimentarius* [Codex Alimentarius Commission, 2009], e tramite analisi della varianza (ANOVA).

Tabella 12.2				
Parametri della Real Time PCR ricavati su DNA standard, nelle due diverse macchine di PCR utilizzate.				
Target	Intervallo di linearità analizzato (termociclatore)	Pendenza (m)	Efficienza della PCR (E) %	Linearità (Coefficiente di Pearson) R^2
<i>S. enterica</i>	10 – 10 ⁵ (A)	-3.527	92.1	0.976
<i>S. enterica</i>	10 – 10 ⁵ (S)	-3.9155	80.1	0.998
<i>C. jejuni</i>	10 – 10 ⁵ (A)	-3.8341	82.3	0.995
<i>C. jejuni</i>	10 – 10 ⁵ (S)	(-5.43)	(52.8)	(0.996)

Nella **Tabella 12.2** sono riportati i parametri della PCR determinati sui DNA standard dei due microrganismi in esame, nelle due diverse macchine utilizzate. L'affidabilità delle reazioni di PCR è stata valutata calcolando l'efficienza (E), la pendenza e il coefficiente di Pearson (R^2) della retta ottenuta da due serie di 5 diluizioni di DNA batterico, contenenti da 10⁵ a 10 copie di genomico.

Come si evince dalla tabella, ad eccezione della macchina A per *S. enterica*, i valori si discostano un po' da quelli ottimali che devono essere compresi tra 90 e 110% per l'efficienza e -3.1 e - 3.6 per la pendenza della retta. I valori di R^2 sono invece tutti al di

sopra del valore di accettabilità (> 0.985), ad eccezione del valore ottenuto per *S. enterica* con la macchina A, che è leggermente inferiore.

Il discostarsi dei valori della pendenza della retta e dell'efficienza da quelli ottimali, è stato attribuito ad una parziale degradazione dei DNA genomici che può essere avvenuta durante il trasporto, essendo già pronti nelle rispettive diluizioni seriali nei laboratori di origine degli operatori.

E' interessante osservare che i valori ottenuti con la macchina A sono migliori di quelli ottenuti con la macchina S.

Poiché i Ct dei campioni incogniti erano comunque compresi nel range dinamico di quelli dei DNA genomici di riferimento usati per costruire le rette di taratura, si è proceduto alla quantificazione dei batteri nei campioni sia per *S. enterica* che per *C. jejuni*.

Per quanto riguarda *Salmonella enterica* sono stati analizzati due campioni incogniti (SX, SY). L'estrazione del DNA batterico è stata condotta da un singolo operatore in un volume di eluizione di 100 μ l. SX e SY sono stati analizzati sulle macchine A ed S da tre operatori (C, K, E). Ogni operatore ha caricato sulla stessa macchina due repliche dello stesso campione, per cui su ogni macchina sono state analizzate 6 repliche dello stesso campione.

Tabella 12.3 Medie dei valori di CFU di <i>S. enterica</i> stimati per ogni campione (SX, SY).	Media CFU (Dev. Standard) Campione SX	Media CFU (Dev. Standard) Campione SY
Operatore C, macchina Stratagene	1.74E+06 (1.37E+05)	1.35E+05 (4.46E+04)
Operatore C, macchina ABI	1.15E+06 (3.09E+05)	7.85E+04 (1.76E+04)
<i>Media per operatore C tra le macchine</i>	1.44E+06 (4.17E+05)	1.07E+05 (3.99E+04)
Operatore E, macchina Stratagene	2.57E+06 (1.92E+05)	1.61E+05 (9.36E+03)
Operatore E, macchina ABI	1.76E+06 (4.88E+04)	1.16E+05 (1.50E+04)
<i>Media per operatore E tra le macchine</i>	2.16E+06 (5.70E+05)	1.39E+05 (3.15E+04)
Operatore K, macchina Stratagene	1.11E+06 (7.36E+04)	1.02E+05 (9.69E+03)
Operatore K, macchina ABI	1.15E+06 (6.34E+04)	8.04E+04 (5.93E+03)
<i>Media per operatore K tra le macchine</i>	1.13E+06 (2.73E+04)	9.10E+04 (1.49E+04)
Media per macchina Stratagene tra gli operatori	1.80E+06 (7.33E+05)	1.32E+05 (2.97E+04)
Media per macchina ABI tra gli operatori	1.35E+06 (3.55E+05)	9.17E+04 (2.13E+04)
MEDIA TOTALE (Dev. Standard)	1.58E+06 (3.20E+05)	1.12E+05 (2.88E+04)
Deviazione Standard Relativa alla media complessiva (RSD_R)	20.27%	25.69%

Nella **Tabella 12.3** sono riportate le CFU medie per ogni campione, ottenute dai vari operatori e sulle singole macchine, come pure la media totale e l'RSD_R. Il test effettuato per la rilevazione di *S. enterica* risulta essere riproducibile per entrambi i campioni, infatti i valori di RSD_R, 20.27% e 25.69%, rispettivamente per SX e SY, sono inferiori al valore del 35%, al di sotto del quale un metodo viene considerato riproducibile [Codex Alimentarius Commission, 2009]. I dati ottenuti dalle repliche condotte sulle 2 macchine sono stati confrontati mediante il test ANOVA, per stabilire se esistono differenze significative tra i risultati ottenuti con le due macchine.

Tabella 12.4 ANOVA tra le medie dei valori di CFU raccolti dalle due macchine e dai diversi operatori, per ciascun campione (SX, SY).		Significativo?
P _{SX} (medieS vs medieA)	0.3904	No
P _{SY} (medieS vs medieA)	0.1260	No

Il riassunto dei dati raccolti per i campioni (SX e SY) è riportato in **Tabella 12.4**, dove P rappresenta la probabilità che le differenze siano casuali e cioè che sia vera l'ipotesi nulla secondo la quale i dati sono uguali.

Poiché P ha valori maggiori a 0.05 si può affermare che le differenze calcolate tra i valori medi ottenuti dalle due macchine non sono significative a quel livello, confermando quanto indicato dai valori di RSD_R.

Un piano sperimentale analogo è stato eseguito per *Campylobacter jejuni*: anche in questo caso sono stati analizzati due campioni (CX, CY) di pollo contaminati con un numero incognito di batteri. L'estrazione del DNA batterico è stata condotta da un singolo operatore in un volume finale di eluizione di 150 µl. CX e CY sono stati analizzati sulle stesse due macchine utilizzate per la *Salmonella* (A, S), in questo caso da quattro operatori (C, K, E, L). Ogni operatore ha caricato sulla stessa macchina due repliche dello stesso campione, per cui su ogni macchina per *C. jejuni* sono state analizzate 8 repliche dello stesso campione.

Nella **Tabella 12.5** sono riportate le CFU medie per ogni campione, ottenute dai singoli operatori e sulle singole macchine, come pure la media totale e l'RSD_R.

Il test effettuato per la rilevazione di *C.jejuni* risulta non essere riproducibile per entrambi i campioni. Infatti i valori di RSD_R del 38.04% e del 58.27% rispettivamente per CX e CY, sono superiori, seppure di poco nel caso del campione X, al limite di accettabilità stabilito (35%) [Codex Alimentarius Commission, 2009].

Tabella 12.5 Medie dei valori di CFU di <i>C. jejuni</i> stimati per ogni campione (CX, CY).	Media CFU Campione CX (Dev. Standard)	Media CFU Campione CY (Dev. Standard)
Operatore C, macchina Stratagene	4.59E+06 (4.40E+05)	2.22E+05 (4.65E+03)
Operatore C, macchina ABI	8.31E+06 (6.70E+05)	6.74E+04 (1.03E+04)
<i>Media per operatore C tra le macchine</i>	<i>6.45E+06 (2.63E+06)</i>	<i>1.44E+05 (1.09E+05)</i>
Operatore E, macchina Stratagene	5.45E+06 (3.43E+05)	2.21E+05 (1.59E+04)
Operatore E, macchina ABI	1.29E+07 (2.19E+05)	1.00E+05 (2.13E+03)
<i>Media per operatore E tra le macchine</i>	<i>9.18E+06 (5.27E+06)</i>	<i>1.61E+05 (8.55E+04)</i>
Operatore K, macchina Stratagene	2.55E+06 (4.26E+05)	1.27E+05 (7.24E+03)
Operatore K, macchina ABI	2.97E+06 (4.15E+05)	3.37E+04 (1.84E+04)
<i>Media per operatore K tra le macchine</i>	<i>2.76E+06 (2.96E+05)</i>	<i>8.05E+04 (6.61E+04)</i>
Operatore L, macchina Stratagene	4.49E+06 (1.88E+05)	1.74E+05 (1.51E+04)
Operatore L, macchina ABI	5.47E+06 (1.87E+06)	1.08E+05 (5.52E+03)
<i>Media per operatore L tra le macchine</i>	<i>4.98E+06 (6.91E+05)</i>	<i>1.41E+05 (4.66E+04)</i>
Media per macchina Stratagene tra gli operatori	4.27E+06 (3.22E+06)	1.86E+05 (4.25E+04)
Media per macchina ABI tra gli operatori	7.41E+06 (1.23E+06)	7.75E+04 (4.51E+04)
MEDIA TOTALE (Dev. Standard)	5.84E+06 (2.22E+06)	1.32E+05 (7.68E+04)
Deviazione Standard Relativa alla media complessiva (RSD_R)	38.04%	58.27%

I dati ottenuti dalle repliche condotte sulle 2 macchine sono stati confrontati mediante il test ANOVA, per stabilire se esistono differenze significative tra i vari risultati ottenuti con le due macchine.

Tabella 12.6 ANOVA tra le medie dei valori di CFU raccolti dalle due macchine e dai diversi operatori, per ciascun campione (CX, CY).		Significativo?
P _{CX} (medieS vs medieA)	0.6794	No
P _{CY} (medieS vs medieA)	0.0018	Sì

Come si vede nella **Tabella 12.6**, nel caso di CX le differenze non sono significative, mentre nel caso di CY le differenze risultano significative, infatti P è minore di 0.05., quindi si può affermare che il metodo risulta riproducibile solo per un campione. Questo sistema di validazione ha consentito di formulare le seguenti osservazioni:

- il trasporto e la conservazione del materiale, in particolare delle diluizioni del DNA standard, è risultato essere un punto critico per il successo delle procedure analitiche eseguite, per cui è preferibile liofilizzare i campioni, se possibile, ed evitare il trasporto di DNA eccessivamente diluito;
- il metodo di rilevazione per *Salmonella* si è rivelato trasferibile a macchine diverse, mentre il metodo per *Campylobacter* deve essere ulteriormente migliorato.

Prova del metodo presso un'azienda del settore avicolo

Il metodo per il rilevamento di *Campylobacter* e *Salmonella*, basato sulla PCR Real Time con SYBR®GreenER™ è stato provato presso AIA in Verona, una delle aziende leader nel campo della produzione e distribuzione dei prodotti di carne avicola.

Il test è stato condotto secondo le modalità previste dalla legge, su campioni di pelle prelevati dal collo di dieci polli macellati il giorno stesso. La pelle del collo è la matrice su cui, secondo le procedure vigenti, devono essere effettuati gli esami microbiologici. Poiché la legislazione corrente non prevede la quantificazione di *Campylobacter* e *Salmonella* in tale materiale, l'analisi è stata condotta per verificare semplicemente la presenza o assenza dei microrganismi, senza però effettuare l'arricchimento culturale.

Il test è stato effettuato per stabilire se il metodo provato su campioni contaminati artificialmente in laboratorio può essere trasferito in modo efficace alle aziende del settore.

La prova, inizialmente condotta per quantificare *Salmonella* in campioni contaminati artificialmente non ha dato risultati positivi, in quanto il metodo di estrazione del DNA microbico, sviluppato sulla carne del petto non è applicabile alla pelle, il cui alto contenuto di grassi provoca il collasso delle nanoparticelle inibendone il legame con il DNA.

Poiché per *Campylobacter* la legislazione corrente non ne prevede la quantificazione nel pollo, l'analisi è stata condotta per verificare semplicemente la presenza o assenza di questo microrganismo, senza però effettuare l'arricchimento culturale, previsto dai protocolli standard. In seguito ad alcune modifiche del protocollo di estrazione, descritte nei materiali e metodi, il test ha dato risultati conformi a quelli solitamente rilevati in azienda con i metodi microbiologici tradizionali: infatti il 60% dei campioni analizzati ha rilevato la presenza di *C. jejuni*, ciò è conforme anche a quanto stabilito da un'indagine dell'EFSA [EFSA, 2010c]. Il metodo si è perciò rivelato promettente per la determinazione qualitativa di *Campylobacter jejuni* da parte delle aziende in quanto

consentirebbe un notevole risparmio di tempo, non essendo necessario l'arricchimento colturale.

12.1.4 Determinazione di Salmonella enterica e Campylobacter jejuni nella carne di pollo tramite PCR Real Time con le sonde TaqMan® MGB

Un sistema per la rilevazione e la quantificazione di *S. enterica* e *C. jejuni* è stato messo a punto utilizzando le sonde TaqMan®. Rispetto al Sybr®Green le sonde TaqMan® presentano una maggiore specificità, dovuta oltre che ai *primer*, alle sonde, ed una maggiore precisione nella quantificazione in quanto non presentano il problema dei *primer dimer*. Per contro, il metodo risulta più costoso e non è possibile verificare le caratteristiche dell'amplicone atteso mediante l'analisi della curva di dissociazione. Tuttavia, l'uso di sonde con due fluorofori diversi, consente di quantificare contemporaneamente due DNA *target* nella stessa reazione, con risparmio di tempo e materiale.

In questo lavoro le sonde TaqMan® sono state utilizzate per quantificare prima singolarmente e poi in reazioni duplex, *S. enterica* e *C. jejuni* in colture pure e in campioni di pollo artificialmente contaminati.

Lo sviluppo del metodo si è svolto attraverso le seguenti fasi:

- la costruzione dei *primer* e della sonda mediante l'utilizzo del programma Primer Express descritto nel **Capitolo 11**, in cui sono riportate le caratteristiche di entrambi. Il funzionamento dei *primer* è stato inizialmente verificato tramite una reazione col Sybr®GreenER™;
- un test di specificità dei *primer* e delle sonde volto a verificare che essi non riconoscano in modo aspecifico i DNA delle due specie batteriche;
- l'ottimizzazione della concentrazione dei *primer* in singolo e in duplex;
- la determinazione del LOD (*Limit Of Detection*) e dell'intervallo di linearità (*range dinamico*) delle reazioni in singolo e in duplex;
- un serie di prove su colture pure di *S. enterica* e *C. jejuni* e campioni di pollo contaminati artificialmente con entrambi i batteri.

Ottimizzazione della concentrazione dei *primer*

Per concentrazione ottimale dei *primer* si intende la concentrazione a cui si osserva il valore più elevato di fluorescenza al Ct più basso. Il saggio di ottimizzazione è stato condotto prima in singolo e poi in duplex, in presenza di quantità fisse di DNA (100000 copie di genoma) e di sonda per *Salmonella* e *Campylobacter*, ma con combinazioni

diverse di concentrazioni di *primer*. Come si vede nella **Figura 12.3**, la concentrazione ottimale dei *primer*, per le reazioni in singolo, è di 600 nM sia per *Salmonella* che per *Campylobacter*.

L'ottimizzazione è stata condotta in modo analogo per la reazione in duplex, con la differenza che si sono cercate quelle concentrazioni che oltre a soddisfare ai criteri prima descritti, originassero i Ct per le due specie batteriche con valori il più possibile simili. Come si vede nella **Figura 12.4**, la concentrazione ottimale è di 300 nM per ogni *primer*. I Ct sono risultati abbastanza simili per *Salmonella* e *Campylobacter*, 21.65 e 22.28, rispettivamente.

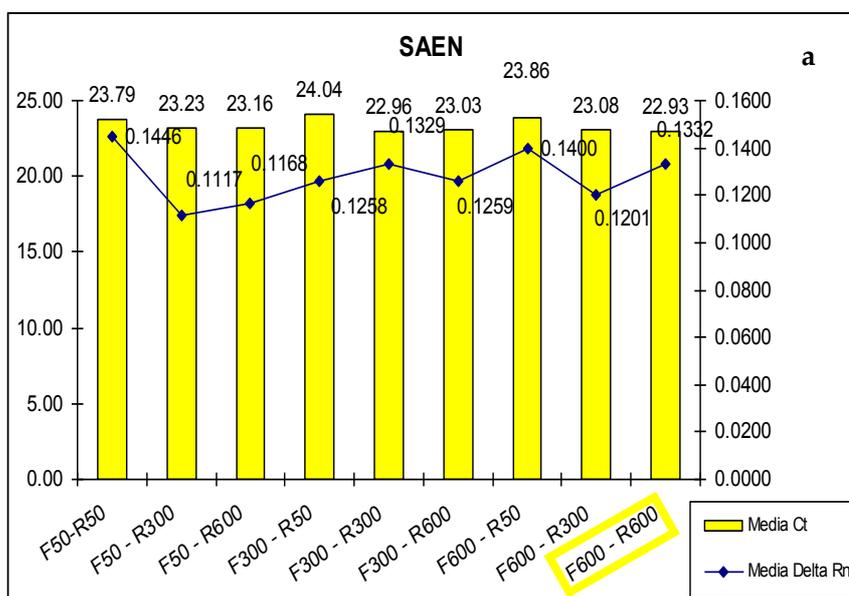
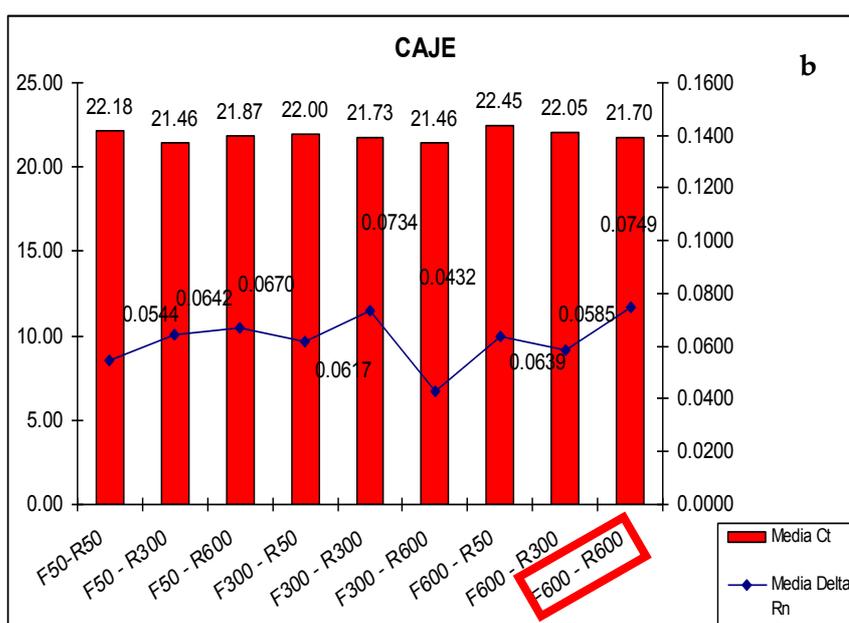


Figura 12.3
Ottimizzazione delle concentrazioni di primer forward (F) e reverse (R), nell'amplificazione in singolo, per *S. enterica* (a) e *C. jejuni* (b). in ascissa sono riportate le varie combinazioni di concentrazioni di primer,; in ordinata: a sinistra i Ct mentre a destra la media dei deltaRn.



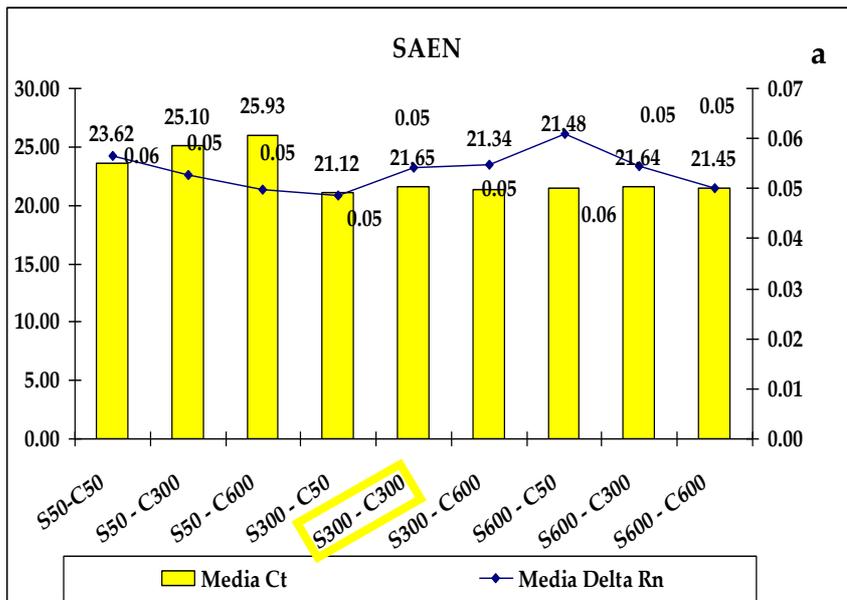
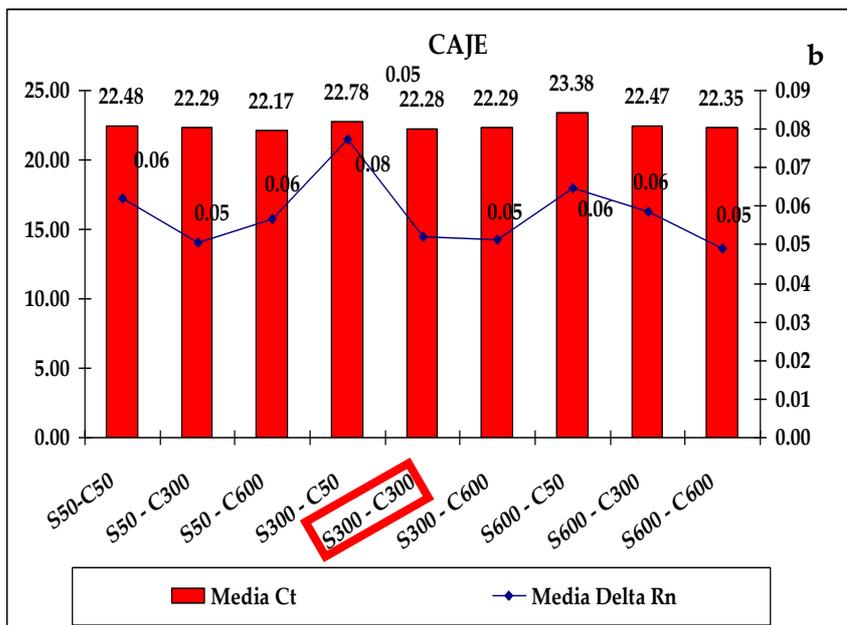


Figura 12.4
Ottimizzazione delle
concentrazioni delle
coppie di primer (S,
C)
nell'amplificazione
in duplex,
rispettivamente per
***S. enterica* (a) e**
***C. jejuni* (b).** In ascissa
 sono riportate le varie
 combinazioni delle
 concentrazioni di
 coppie di primer, in
 ordinata a sinistra i Ct
 mentre a destra la
 media dei deltaRn.



Determinazione del LOD e dell'intervallo di linearità delle reazioni

La fase successiva è stata quella di individuare il limite di rilevabilità (LOD) cioè la più piccola quantità o concentrazione di analita rilevabile in un campione. Per convenzione, si intende che una quantità di DNA è rilevabile in PCR quando viene amplificata in almeno due repliche su tre [Bustin *et al*, 2009].

Per rilevare il LOD è stata testata una serie di diluizioni di DNA genomico standard con un numero di copie compreso tra 1 e 100000. Tale parametro è stato rilevato nella stessa reazione di amplificazione, in singolo e in duplex. Nelle reazioni in singolo, per ciascun microrganismo, LOD è pari a 10 copie sia per *S. enterica* che per *C. jejuni*.

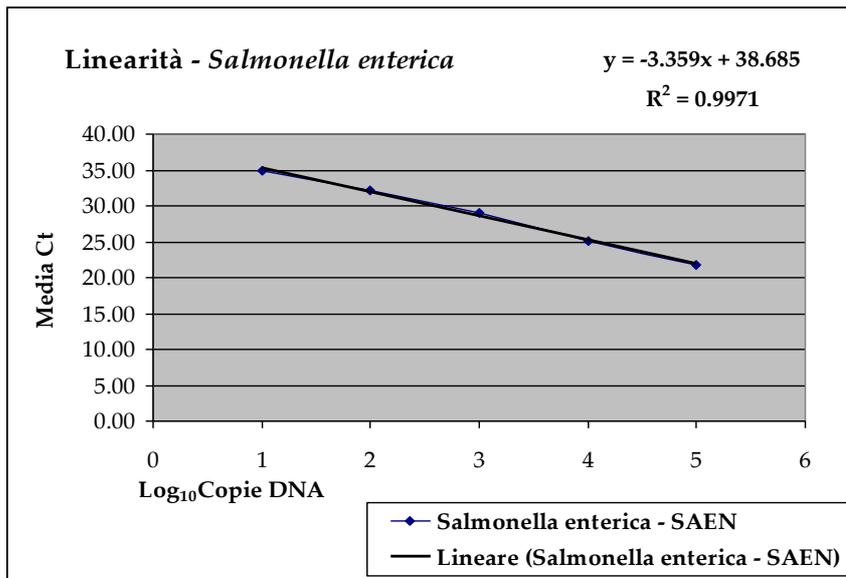
Per determinare invece il limite di rilevabilità in reazioni duplex sono state allestite reazioni in cui quantità scalari di DNA genomico standard di *S. enterica* e *C. jejuni*

erano state combinate secondo lo schema riportato nelle **Tabelle 12.7** e **12.8**. Questo è stato fatto per verificare se il DNA di un batterio influisce sulla quantificazione dell'altro. Come si vede nelle **Tabelle 12.7** e **12.8** il LOD per entrambi i batteri è influenzato, in parte, dalla quantità di DNA dell'altra specie presente nella reazione. Per *Salmonella*, il LOD è pari a 10 copie di genomi quando nella reazione sono presenti solo 10 copie di genoma di *Campylobacter*, con l'aumentare del numero di copie di quest'ultimo si ha una sovrastima crescente del numero di genomi di *Salmonella* (**Tabella 12.7**). Per *Campylobacter* si osserva invece una generalizzata sottostima del numero di copie genomiche in presenza di *Salmonella*, tuttavia, visto che il LOD è la quantità minima di DNA rilevabile, ma non quantificabile, si può affermare che anche in questo caso, il LOD corrisponde a 10 copie di genomi, considerato che la PCR ha avuto sempre successo con questa quantità di DNA (**Tabella 12.8**).

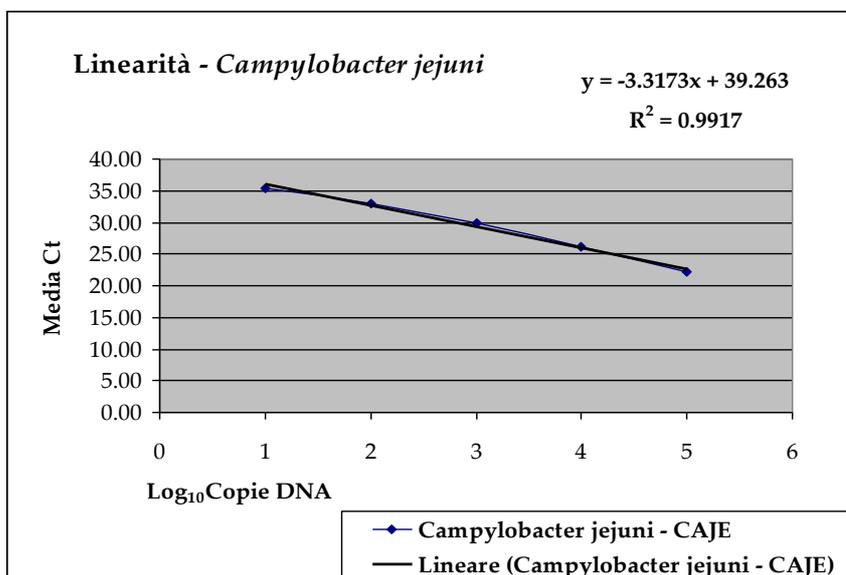
Tabella 12.7 Quantificazione del numero di genomi di <i>S. enterica</i> in reazioni duplex contenenti un numero crescente di genomi di <i>C. jejuni</i> . Le reazioni sono state condotte con DNA genomici standard.							
Copie DNA genomico <i>C. jejuni</i>	Copie DNA genomico <i>Salmonella enterica</i>						R²
		10	100	1000	10000	100000	
	10	11	121	896	11663	85344	0.9986
	100	23	117	1021	9659	76920	0.9971
	1000	66	154	933	10176	114742	0.9715
	10000	127	173	1008	11130	66497	0.9538
	100000	2028	1187	1546	10677	102710	0.7231

Tabella 12.8 Quantificazione del numero di genomi di <i>C. jejuni</i> in reazioni duplex contenenti un numero crescente di genomi di <i>S. enterica</i> . Le reazioni sono state condotte con DNA genomici standard.							
Copie DNA genomico <i>S. enterica</i>	Copie DNA genomico <i>Campylobacter jejuni</i>						R²
		10	100	1000	10000	100000	
	10	4	61	827	10102	141382	0.9998
	100	308	72	1186	11541	150417	0.8344
	1000	5	96	1321	13962	145166	0.9976
	10000	252	93	695	6795	99119	0.842
	100000	9	4	72	131	148812	0.7556

L'intervallo di linearità nelle reazioni singole risulta compreso tra 10 e 100000 copie per entrambi i batteri, con parametri delle rette standard che si avvicinano molto ai valori ottimali (**Figura 12.5**).



Saen	
R ²	0.997
m	-3.359
q	38.685
E	0.985



Caje	
R ²	0.992
m	-3.317
q	39.263
E	1.002

Figura 12.5

Rette di taratura che mostrano l'intervallo di linearità, con l'efficienza delle reazioni di amplificazione per entrambi i microrganismi in reazione singola.

Per quello che riguarda invece le reazioni in duplex, la quantificazione del DNA di una specie risulta in parte influenzata dalla contemporanea presenza dell'altra specie. Per *Salmonella*, la quantificazione è lineare e vicina ai valori attesi in presenza di 10 copie di genoma di *Campylobacter*, con l'aumentare di queste ultime, si ha una progressiva perdita di linearità, come indicato dai valori di R² delle rette standard che vanno da 0.999 fino a 0.723 (**Tabella 12.7**). Tuttavia, la presenza di un elevato numero di copie di *Campylobacter* non sembra influenzare la quantificazione di un numero di copie di genoma di *Salmonella* compreso tra 1000 e 100000. Si può quindi concludere che la presenza di un alto numero di copie di DNA di *Campylobacter* progressivamente restringe l'intervallo di linearità per la quantificazione di *Salmonella*.

Per quel che riguarda *Campylobacter*, si osserva una buona linearità nell'intervallo compreso tra 100 e 100000 copie, in presenza di 10-10000 copie di *Salmonella*, quando il valore di queste è pari a 100000, si osserva una sottostima dei valori e solo il punto 5 risulta vicino al valore atteso (**Tabella 12.8**). Tuttavia, visto che quantità così elevate di entrambi i batteri che devono essere assenti in 25 g di campione di pollo, difficilmente sono riscontrabili in carni che non si presentano visibilmente deteriorate, i parametri osservati sono stati ritenuti accettabili.

Prove su colture pure di *S. enterica* e *C. jejuni* e campioni di pollo contaminati con questi due microrganismi

Il metodo descritto precedentemente è stato applicato in singolo ed in duplex per quantificare *S. enterica* e *C. jejuni* in colture pure ed in campioni di pollo contaminati artificialmente con questi microrganismi.

Poiché l'estrazione è condotta in modo tale da eluire il DNA in 200 µl (vedi **Capitolo 11**) e l'amplificazione è sempre stata condotta a partire con 2 µl di template, in finale tutte le reazioni, per avere il numero effettivo di CFU nel campione bisogna moltiplicare per 100 le CFU rilevate nella singola reazione. Per questo motivo, anche laddove si riuscissero a rilevare 3 copie di DNA (limite minimo attendibile, [Bustin *et al*, 2009]) quantificabile nella reazione, non è possibile rilevare più di 300 copie nel campione.

Nel **primo caso** relativo a *S. enterica* sono state confrontate le medie di CFU/ml misurate tramite qPCR in reazione singola e conte su piastra in terreno selettivo, e tramite qPCR su campioni di colture pure sia di *S. enterica* che *C. jejuni* presenti nelle medesime quantità nei campioni analizzati.

La quantificazione è stata svolta su cinque campioni contenenti diluizioni seriali delle colture descritte con valori di CFU/ml compresi tra 10^2 e 10^6 .

Nella **Tabella 12.9** sono riportate le CFU/ml medie ottenute dalla quantificazione di diluizioni di una coltura pura di *S. enterica*.

I campioni contenenti diluizioni seriali di *S. enterica* compresi tra 10^2 e 10^3 secondo l'analisi della varianza non mostrano differenze significative tra i dati ottenuti con i tre metodi.

Come si evince dalla **Tabella 12.9**, il metodo, in singolo e in *duplex*, è in grado di rilevare un numero di batteri pari a 1800-1760, che corrispondono a 17-18 copie nella reazione, in linea con il LOD misurato con il DNA standard.

L'analisi della varianza mostra invece differenze significative per i campioni contenenti diluizioni seriali di *S. enterica* compresi tra 10^4 e 10^6 . Il test di Bonferroni-Holm ha

messo in evidenza (**Tabella 12.10**) che non esistono differenze significative tra i risultati ottenuti tramite qPCR in singolo e in duplex, mentre esistono differenze significative tra i risultati delle conte su piastra e le reazioni qPCR condotte in singolo, per tutti e tre i campioni. I risultati ottenuti tramite qPCR duplex si differenziano in modo significativo da quelli ottenuti da conta su piastra solo per il campione “a”.

Tabella 12.9					
Confronto attraverso ANOVA tra i valori medi di CFU/ml di coltura pura di <i>S. enterica</i> tramite qPCR in singolo e in duplex, e conta delle colonie su terreno di crescita selettivo per i campioni analizzati (a, b, c, d, e).					
Campione	Media CFU/ml (Dev. Standard) Singolo	Media CFU/ml (Dev. Standard) Duplex	Media CFU/ml (Dev. Standard) Conte su piastra	P_{se}	Significativo?
Campione a	2.44E+06 (3.76E+05)	2.84E+06 (8.00E+05)	7.28E+06 (1.03E+06)	0.0005	Si
Campione b	1.48E+05 (1.63E+04)	2.54E+05 (1.20E+05)	6.76E+05 (2.46E+05)	0.0144	Si
Campione c	2.87E+04 (8.56E+03)	5.11E+04 (2.20E+04)	7.22E+04 (4.80E+03)	0.0243	Si
Campione d	1.24E+04 (6.90E+03)	8.39E+03 (3.27E+03)	8.17E+03 (1.46E+03)	0.4682	No
Campione e	1.86E+03 (5.64E+02)	1.76E+03 (1.29E+03)	7.37E+02 (7.77E+01)	0.2514	No

Tabella 12.10			
Confronto tra i risultati di quantificazione dei campioni di <i>Salmonella</i> ottenuti con i diversi metodi utilizzati.			
		P	Significativo?
Campione a	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (conte)	0.0016	Si
	CFU/ml medi (duplex) vs CFU/ml medi (conte)	0.0041	Si
	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (duplex)	0.4814	No
Campione b	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (conte)	0.0207	Si
	CFU/ml medi (duplex) vs CFU/ml medi (conte)	0.0558	No
	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (duplex)	0.2031	No
Campione c	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (conte)	0.0015	Si
	CFU/ml medi (duplex) vs CFU/ml medi (conte)	0.1799	No
	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (duplex)	0.1745	No

Si può concludere quindi che in campioni con elevate quantità di coltura pura di *S. enterica* espressa in CFU/ml, le quantificazioni possono essere considerate riproducibili per le analisi svolte in qPCR, ma mostrano significative differenze con i valori attesi dalle conte su piastra in terreno selettivo.

Nel **secondo caso**, il metodo basato sulle sonde TaqMan® è stato applicato su tre campioni di filetto di pollo contaminati contemporaneamente con *S. enterica* e *C. jejuni*. I risultati ottenuti sono visualizzati nella **Tabella 12.11**.

Tabella 12.11 Confronto attraverso ANOVA tra le medie dei valori di CFU raccolti dalle reazioni per la quantificazione tramite qPCR in singolo e in duplex, di <i>S. enterica</i> in campioni di filetto di pollo artificialmente contaminati (a,b,c).				
Campione	Reazione qPCR	Media CFU (Dev. Standard)	$P_{Se+pollo}$	Significativo?
Campione a	singolo	5.50E+04 (6.40E+03)	0.0040	Sì
	duplex	2.64E+04 (5.33E+03)		
Campione b	singolo	6.24E+03 (1.65E+03)	0.5630	No
	duplex	8.06E+03 (4.72E+03)		
Campione c	singolo	2.61E+03 (2.16E+03)	0.9595	No
	duplex	2.53E+03 (9.25E+02)		

In questo caso il confronto tra il metodo applicato in singolo e in *duplex* mostra differenze significative solo nel caso del campione “a”, in cui la reazione in duplex ha sottostimato i valori rispetto alla reazione singola. Negli altri campioni non sono state riscontrate differenze significative tra i valori delle quantificazioni ottenuti con le due tipologie di reazioni, dimostrando che il metodo è affidabile sia in singolo che in *duplex*. Per verificare qual è l’efficienza di recupero del DNA batterico nei tre campioni di pollo analizzati, un confronto statistico è stato fatto tra i valori medi di CFU quantificati tramite qPCR, in singolo e in *duplex*, nella coltura originale usata per la contaminazione e quelli quantificati nei campioni di pollo contaminati con la stessa. Come si vede nella **Tabella 12.12**, non si osservano differenze significative tra i CFU quantificati nella coltura originale ed i CFU quantificati nei campioni di pollo contaminati, dimostrando che il metodo di estrazione è in grado di rimuovere con efficacia i batteri dalla matrice.

Tabella 12.12 Confronto per mezzo di ANOVA tra i valori medi di CFU raccolti dalle reazioni per la quantificazione di <i>S. enterica</i> tramite qPCR in singolo e in duplex, a partire sia da campioni di coltura pura che di filetto di pollo artificialmente contaminati con le stesse diluizioni di coltura (a, b, c).		P	Significativo?
Campione a	CFU medi (<i>S. enterica</i>) vs CFU medi (pollo+<i>S. enterica</i>)	0.9381	No
Campione b	CFU medi (<i>S. enterica</i>) vs CFU medi (pollo+<i>S. enterica</i>)	0.2301	No
Campione c	CFU medi (<i>S. enterica</i>) vs CFU medi (pollo+<i>S. enterica</i>)	0.3077	No

Un piano sperimentale analogo è stato seguito per *Campylobacter jejuni*. Nel **primo caso** analizzato sono state confrontate le medie di CFU/ml misurate per la quantificazione in coltura pura, tramite qPCR in reazione singola e conte su piastra in terreno selettivo, e tramite qPCR su campioni di colture pure sia di *C. jejuni* che *S. enterica* presenti nelle medesime quantità.

La quantificazione è stata svolta su cinque campioni contenenti diluizioni seriali delle colture descritte con valori di CFU/ml compresi tra 10^2 e 10^6 .

Nella **Tabella 12.13** sono riportati le CFU/ml medie ottenute dalla quantificazione di diluizioni di una coltura pura di *C. jejuni*.

Tabella 12.13 Confronto attraverso ANOVA tra i valori medi di CFU/ml di coltura pura di <i>C. jejuni</i> tramite qPCR in singolo e in duplex, e conta delle colonie su terreno di crescita selettivo per i campioni analizzati (a, b, c, d, e).					
Campione	Media CFU/ml (Dev. Standard) Singolo	Media CFU/ml (Dev. Standard) Duplex	Media CFU/ml (Dev. Standard) Conte su piastra	P_{Cj}	Significativo?
Campione a	1.93E+06 (2.61E+05)	1.02E+06 (4.66E+05)	1.54E+06 (5.65E+05)	0.1213	No
Campione b	6.44E+05 (1.70E+05)	1.67E+05 (4.77E+04)	1.68E+05 (8.55E+04)	0.0031	Sì
Campione c	1.31E+04 (8.17E+03)	4.78E+04 (3.00E+04)	1.55E+04 (4.50E+03)	0.1019	No
Campione d	2.26E+03 (1.12E+03)	1.04E+04 (6.43E+03)	1.70E+03 (6.82E+02)	0.0534	No
Campione e	1.82E+03 (1.30E+03)	1.05E+04 (3.04E+03)	1.68E+02 (7.86E+01)	0.0012	Sì

Il confronto attraverso ANOVA tra i valori medi di CFU/ml ottenuti tramite i tre metodi non mostra differenze significative in “a”, “c” e “d”, mentre differenze significative sono state osservate tra la quantificazione tramite qPCR in singolo e la conta su piastra

nel campione “b”, e la quantificazione tramite qPCR duplex nel campione “e”. Per entrambi i campioni sono state riscontrate differenze significative tra i due metodi di qPCR (Tabella 12.14).

In questo caso, il metodo in singolo è in grado di rilevare circa 1800 cellule nel campione, corrispondenti a 18 copie di DNA nella reazione, in accordo con il LOD rilevato con il DNA puro.

Tabella 12.14 Evidenza della presenza di significatività nel test della varianza applicato ai sottogruppi dei valori medi di CFU/ml relativi ai campioni di coltura pura di <i>C. jejuni</i> (b, e).		P	Significativo?
Campione b	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (conte)	0.0124	Si
	CFU/ml medi (duplex) vs CFU/ml medi (conte)	0.9920	No
	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (duplex)	0.0096	Si
Campione e	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (conte)	0.0938	No
	CFU/ml medi (duplex) vs CFU/ml medi (conte)	0.0042	Si
	CFU/ml medi (singolo) vs CFU/ml medi (duplex)	0.0105	Si

Nel **secondo caso**, *C. jejuni* è stato quantificato mediante qPCR in singolo e in duplex nei tre campioni di pollo contaminati contemporaneamente con *S. enterica*. I risultati ottenuti sono visualizzati nella **Tabella 12.15**.

Tabella 12.15 Confronto attraverso ANOVA tra le medie dei valori di CFU raccolti dalle reazioni per la quantificazione tramite qPCR in singolo e in duplex, di <i>C. jejuni</i> in campioni di filetto di pollo artificialmente contaminati (a,b,c).				
Tabella 12.15	Reazione qPCR	Media CFU (Dev. Standard)	P_{Cj+pollo}	Significativo?
Campione a	singolo	1.94E+06 (6.64E+05)	0.0575	No
	duplex	9.18E+05 (7.74E+04)		
Campione b	singolo	3.83E+04 (5.97E+03)	0.0453	Si
	duplex	2.18E+04 (7.95E+03)		
Campione c	singolo	3.05E+03 (5.75E+02)	0.1723	No
	duplex	6.09E+03 (3.12E+03)		

In questo caso, l’analisi della varianza ha mostrato che esistono differenze significative tra i due metodi solo per il campione “b”.

Come per *S. enterica*, un confronto statistico è stato fatto tra i valori medi di CFU quantificati, tramite qPCR in singolo e in duplex, nella coltura originale usata per la contaminazione e quelli quantificati nei campioni di pollo contaminati con la stessa.

Come si vede nella **Tabella 12.16**, non si osservano differenze significative tra i CFU quantificati nella coltura originale ed i CFU quantificati nei campioni di pollo contaminati, dimostrando che il metodo di estrazione è in grado di rimuovere con efficacia i batteri dalla matrice.

Tabella 12.16 Confronto per mezzo di ANOVA tra i valori medi di CFU raccolti dalle reazioni per la quantificazione di <i>C. jejuni</i> tramite qPCR in singolo e in duplex, a partire sia da campioni di coltura pura che di filetto di pollo artificialmente contaminati con le stesse diluizioni di coltura (a, b, c).		P	Significativo?
Campione a	CFU medi (<i>C. jejuni</i>) vs CFU medi (pollo+<i>C.jejuni</i>)	0.8995	No
Campione b	CFU medi (<i>C. jejuni</i>) vs CFU medi (pollo+<i>C.jejuni</i>)	0.9770	No
Campione c	CFU medi (<i>C. jejuni</i>) vs CFU medi (pollo+<i>C.jejuni</i>)	0.5197	No

12.2 La comunità microbica di sedimenti in presenza-assenza di *Vallisneria spiralis*: informazioni preliminari

La presente attività sperimentale è stata svolta nell'ambito di un lavoro di collaborazione con la Dott.ssa Elisa Soana (Dottoranda di Ricerca in Ecologia) e con il Dott. Marco Bartoli (Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Scienze Ambientali) che ha lo scopo di “*indagare il ruolo delle comunità di macrofite sommerse nella regolazione delle dinamiche biogeochimiche (con particolare riferimento al ciclo dell’azoto) e le relazioni con le comunità microbiche in ecosistemi acquatici caratterizzati da rapida evoluzione in termini di caratteristiche del substrato e disponibilità di nutrienti inorganici*”. Ogni riferimento ad aspetti di eco-fisiologia di *V. spiralis* con aspetti ecosistemici relativi alle dinamiche biogeochimiche di ambienti colonizzati da questa macrofita e alla loro capacità di metabolizzare i carichi eutrofizzanti (di azoto in particolare) è basato su dati raccolti dalla Dott.ssa Elisa Soana nell’ambito del suo Progetto di Ricerca di Dottorato, tuttora in atto.

Per iniziare a comprendere il ruolo delle comunità microbiche presenti nelle praterie di *Vallisneria spiralis*, con particolare riferimento alle dinamiche relative al ciclo dell’azoto, si è deciso inizialmente di isolare, dal sito scelto per questo studio, e coltivare in laboratorio, rappresentanti di specie batteriche coinvolte nel ciclo dell'azoto (batteri denitrificanti, batteri ammonio-ossidanti e batteri nitrito-ossidanti, batteri azotofissatori e cianobatteri azotofissatori). Dalle specie batteriche isolate in questa prima fase del lavoro è stato estratto il DNA genomico in modo da creare dei riferimenti interni. In particolare si è pensato di utilizzare questi isolati per amplificare geni specifici d’interesse metabolico da usare come controlli positivi per analisi più mirate alla rilevazione e monitoraggio dei microrganismi coinvolti nel ciclo dell’azoto in presenza/ assenza di *V. spiralis*.

12.2.1 Microbiologia classica. Isolamento dei batteri coltivabili coinvolti nel ciclo dell’azoto: dati raccolti

Questa prima parte del lavoro, come spiegato nel **Capitolo 11**, è stata svolta su una carota di sedimento prelevata nel sito di Massimbona, in una zona vegetata da *V. spiralis*. Il campione ottenuto è stato suddiviso in quattro strati in modo da raccogliere il maggiore numero di informazioni possibili sulla comunità microbica.

Le quattro sottosezioni (SA = Sedimento Anossico; SR = Sedimento Rizosfera; SN = Sedimento Nudo; SO = Sedimento Ossico superficiale; **Figura 12.6**) sono state

innanzitutto analizzate tramite metodiche di microbiologia classica e successivamente con analisi molecolari.

E' interessante notare come già dalla colorazione del sedimento si possano riconoscere le sezioni di sedimento ossiche, superficiale (SO) e della rizosfera (SR), in quanto di un colore marrone chiaro e quelle anossiche, sedimento lontano dalla rizosfera, a metà tra la superficie e la parte anossica, (SN) e il sedimento anossico vero e proprio (SA) di colore marrone scuro.

L'approccio microbiologico classico, è consistito nell'isolamento e arricchimento, in terreni selettivi, di batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto, ovvero denitrificanti, nitrificanti, (ammonio ossidanti e nitrito ossidanti), azotofissatori (anche cianobatteri) e ha permesso di isolare 48 ceppi cresciuti negli specifici terreni di arricchimento e selezione, che presentavano, nella crescita su terreno solido, morfologie di colonia diverse.

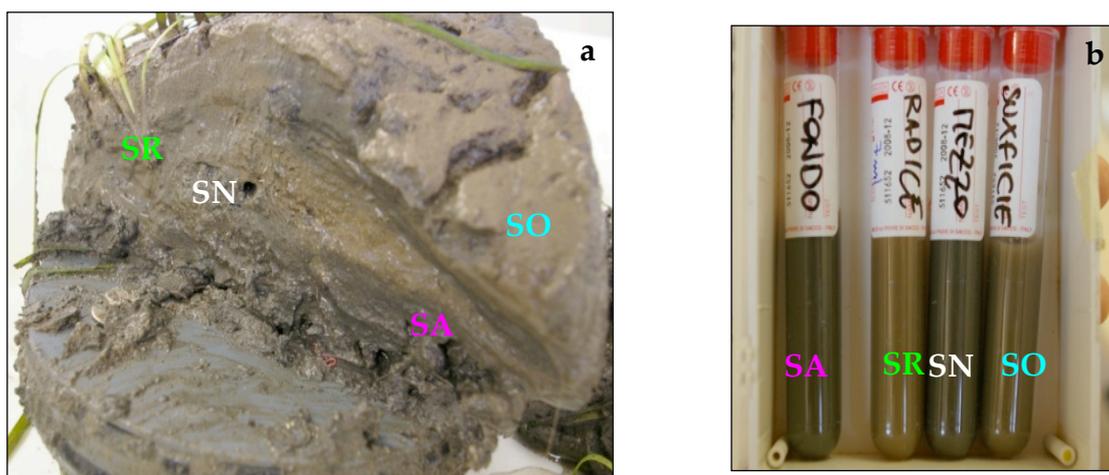


Figura 12.6

a. Le quattro sezioni analizzate per la ricerca dei batteri coinvolti nel ciclo biogeochimico dell'azoto. b. Provette contenenti il surnatante delle sospensioni di sedimento in sodio pirofosfato 0.3 %, utilizzato per le semine in appositi terreni di coltura, per ciascuna delle sezioni (SA, SR, SN, SO).

Per isolare i diversi gruppi batterici sono stati utilizzati i seguenti terreni :

- per i batteri ammonio ossidanti un terreno minerale, di arricchimento $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (brodo, AOMB – agar, AOMA);
- per i batteri nitrito ossidanti un terreno minerale, di arricchimento NaNO_2 , (brodo, NOMB – agar, NOA);
- per i batteri denitrificanti un terreno minerale, di arricchimento KNO_3 , (MMD);
- per i batteri denitrificanti un terreno complesso (MCD) e il terreno MBD;

- per gli azotofissatori appartenenti ai generi *Azotobacter* spp. e *Azomonas*, un terreno solido selettivo (AAA);
- per gli azotofissatori appartenenti al genere *Azospirillum* spp., due terreni selettivi (NFb, LGI);
- per i cianobatteri azotofissatori il terreno BG - 11 privo della fonte di azoto (**Figura 12.7**).

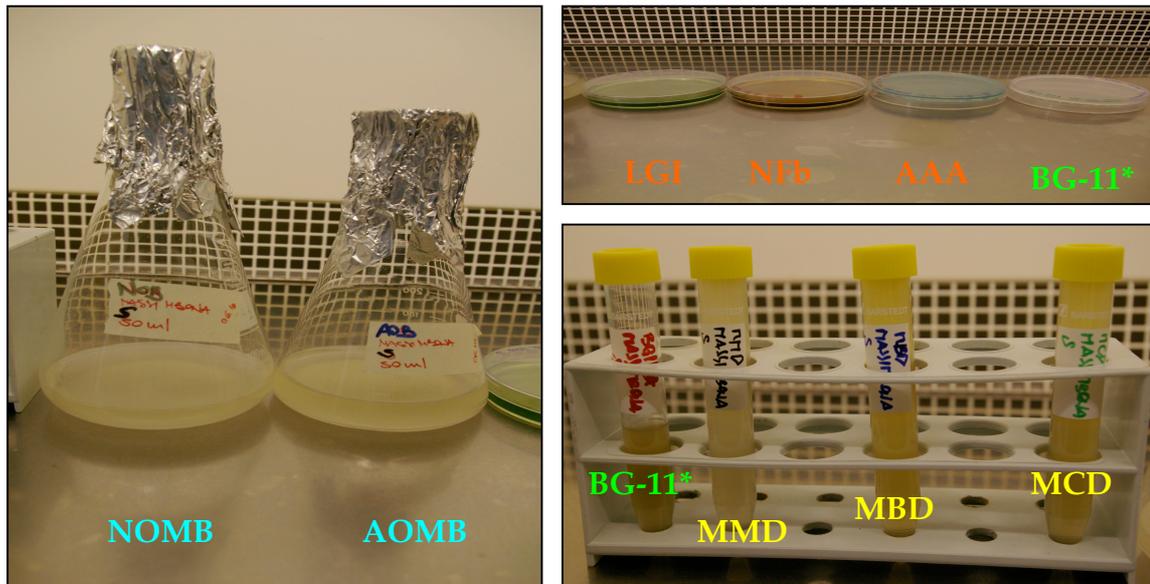


Figura 12.7
Alcuni dei terreni usati per l'arricchimento e l'isolamento di batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto, dalle diverse sezioni di sedimento analizzate.

Tabella 12.17
Numero delle specie batteriche isolate e raggruppate per tipo di metabolismo (in base al diverso terreno di isolamento impiegato) e per frazione di sedimento da cui sono state isolate.

Sottosezione	Nitrificanti	Denitrificanti	Azotofissatori	Ciano batteri	Totale per sezione
Sed. Ossico	1	5	2	1	9
Sed. Rizosfera	2	3	3	3	11
Sed. Nudo	3	-	5	3	11
Sed. Anossico	2	6	3	6	17
Totale Batteri	8	14	13	13	48

L'isolamento di specie batteriche legate a ad ogni fase del ciclo dell'azoto ha richiesto la preparazione di terreni specifici, per lo più minerali, e particolare attenzione al controllo del pH e delle condizioni di crescita. Sono stati necessari numerosi passaggi di isolamento con un rischio di perdita di informazione molto elevato, se si considera soprattutto che negli ambienti naturali, i batteri vivono normalmente in stretta associazione con altri organismi.

Per quanto riguarda i batteri nitrificanti, siano essi ammonio ossidanti che nitrito ossidanti, la procedura di coltivazione su terreni artificiali è risultata particolarmente lunga e complessa. L'isolamento di tali batteri, come risaputo, richiede fino a 55 giorni per i batteri nitrosanti (ammonio ossidanti) e fino a 100 giorni per i batteri nitrificanti (nitrito ossidanti). La maggiore difficoltà è stata riscontrata nell'individuare la composizione del terreno più adatta per facilitarne la crescita, che deve avvenire al buio a circa 28 °C.

Analizzando i dati riportati in **Tabella 12.17** non è possibile fare confronti quantitativi per ciascun gruppo di batteri isolato, a causa delle numerose variabili che hanno giocato un ruolo nella buona riuscita dell'isolamento, dal tipo di terreno preparato, alle condizioni più o meno favorevoli.

Se si confrontano gli strati in cui la disponibilità di ossigeno è maggiore (SO, SR) con gli strati anossici (SA, SN), sempre considerando che 48 isolati sono un numero molto piccolo per fare valutazioni quantitative, tuttavia si nota una distribuzione piuttosto diffusa di tutti i diversi tipi metabolici. Si sa, d'altra parte, che i batteri denitrificanti sono anerobi facoltativi e quindi possono trovarsi sia nei sedimenti anossici che negli strati più ossigenati e nella rizosfera. L'isolamento, nella zona anossica, di cianobatteri (fotosintetici ossigenici e aerobi) che solitamente colonizzano ambienti ossigenati e luminosi è probabilmente dovuta alla presenza di acineti (forme di resistenza prodotte da alcuni cianobatteri, come *Nostoc*, in condizioni avverse).

Complessivamente sembra che, in presenza della macrofita acquatica, tutti i gruppi dei batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto siano egualmente rappresentati, interessante se si considera che il sito analizzato si trova in condizioni di nutrienti, e in particolare di azoto, non limitanti, e quindi dagli studi ecologici ad oggi svolti, ci si aspetterebbe una maggiore abbondanza di batteri nitrificanti, indirettamente dedotta dal tasso potenziale di nitrificazione misurato e dalle condizioni ossiche del sedimento dovute all'elevata capacità di trasporto di ossigeno a livello radicale di *V. spiralis*. Per tasso di nitrificazione potenziale si intende infatti la massima velocità di ossidazione da parte dei batteri nitrificanti presenti in uno *slurry* di sedimento (sospensione di una quantità nota di sedimento in un volume noto di soluzione) incubato in condizioni standard (saturazione di ossigeno, buio, temperatura costante di 20 °). E' altrettanto vero che la macrofita è in grado di creare, tramite l'apparato radicale e la capacità di trasporto di ossigeno alla rizosfera, vere e proprie stratificazioni di comparti ossici e anossici, fornendo un supporto su cui i batteri possono sviluppare una rete complessa di reazioni

metaboliche, tra le quali la denitrificazione, considerata la preponderanza nella comunità batterica isolata è di microrganismi anaerobi facoltativi.

L'analisi microbiologica è stata complementata dall'analisi molecolare necessaria per l'identificazione dei batteri isolati attraverso:

- estrazione del DNA genomico da ciascuno dei 48 ceppi isolati;
- amplificazione tramite PCR del rDNA 16S;
- analisi ARDRA dei ceppi la cui amplificazione è risultata positiva;
- scelta dei profili ARDRA unici, tramite BLASTN disponibile dal sito NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), sequenziamento del rDNA 16S e confronto delle sequenze con le banche dati.

L'estrazione del DNA genomico è stata possibile solo da 40 campioni su 48 e non dai ceppi isolati come nitrificanti. L'analisi dei diversi profili ARDRA ottenuti digerendo gli ampliconi con l'enzima di restrizione *HaeIII* ha permesso di scegliere 15 diversi ceppi batterici per il sequenziamento e l'identificazione (**Figura 12.8**) 8 dei quali erano stati isolati come possibili batteri denitrificanti, 6 come batteri azotofissatori e infine un cianobatterio azotofissatore.

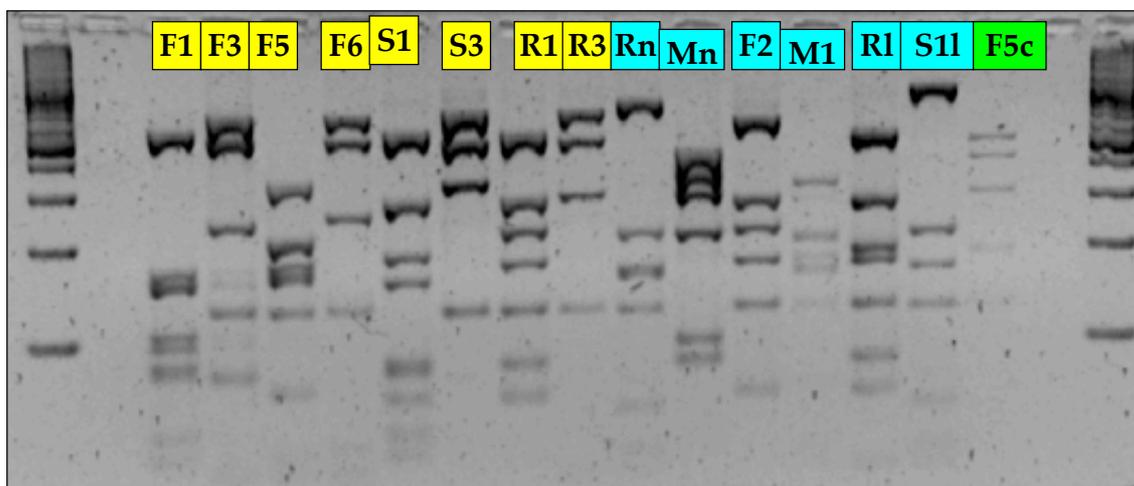


Figura 12.8
Elettroforesi su gel di agarosio *low melting* al 2.5%, TBE 0.5X dei frammenti ARDRA generati dalla digestione del 16S rDNA dei batteri scelti per il sequenziamento e l'identificazione. Il marcatore molecolare è un 100 bp.

Una breve descrizione dei batteri identificati è riportata di seguito: ognuno è stato nominato con una sigla che corrisponde alla sottosezione origine di isolamento e al tipo di microrganismo atteso in base al terreno utilizzato.

Il ceppo **F1den**, isolato come denitrificante nello strato anossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: Y13826.1 in *GenBank*), come *Paracoccus*

solventivorans, un α -proteobatterio appartenente alla famiglia delle Rhodobacteraceae. *P. solventivorans* è stato descritto tassonomicamente per la prima volta nel 1996 da Lipsi *et al* [Lipsi *et al*, 1996] tra i ceppi isolati da biofiltri usati per il trattamento di gas di scarico. Nel 1998 è stato isolato come batterio nitrato riducente, degradante l'acetone, nel suolo circostante un'azienda di gas naturale [Siller *et al*, 1998]. I *Paracoccus* sono batteri metabolicamente versatili e giocano un ruolo importante nei cicli biogeochimici degli elementi [Bartosik *et al*, 2003].

Il ceppo **F3den**, isolato come denitrificante nello strato anossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: AF519464.1 in *GenBank*), come *Bacillus pichinotyi*, un Firmicutes appartenente alla famiglia delle Bacillaceae. Tassonomicamente questa specie non è stata ancora caratterizzata. E' citato solo in un articolo non pubblicato di Garcia *et al*, in cui sembra essere stato isolato come denitrificante da suoli di risaia tropicali [Garcia *et al*, *unpublished*].

Il ceppo **F5den**, isolato come denitrificante nello strato anossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: AB548826.1 in *GenBank*), come *Citrobacter freundii*, un γ -proteobatterio appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae. A livello tassonomico ha diversi sinonimi, tuttavia è stato riconosciuto da Skerman *et al* nella lista approvata della nomenclatura batterica nel 1980 [Skerman *et al*, 1980]. In articoli più recenti è riportata la sua presenza in sistemi d'acqua dolce impattati dallo scarico di acque reflue di depurazione [Rhodes *et al*, 2000] e in uno studio sulla tolleranza all'alchilbenzene sulfonato da parte di isolati batterici provenienti da sedimenti di corpi idrici tropicali inquinati da detersivi [Eniola & Olayemi, 2008].

Il ceppo **F6den**, isolato come denitrificante nello strato anossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: HQ418455.1 in *GenBank*), come *Uncultured Bacillaceae bacterium*, un Firmicutes, appartenente alla famiglia delle Bacillaceae. Tale ceppo è stato isolato recentemente dalla comunità microbica che vive nelle cavità ossee di una carcassa di bisonte al Parco Nazionale di Yellowstone [Reeb *et al*, 2011]. Non sono presenti in letteratura altre informazioni a riguardo.

Il ceppo **S1den**, isolato come denitrificante nello strato ossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: CP000490.1 in *GenBank*), come *Paracoccus denitrificans*, (classe α – proteobatteri, famiglia Rhodobacteraceae). E' un'altra specie appartenente al genere *Paracoccus*, che è stata ridefinita a livello tassonomico da Donovan *et al* nel 2006, pur essendo stato inizialmente isolato da suolo da Beijerinck

nel 1910 come *Micrococcus denitrificans* e studiato nel 1954 relativamente alla riduzione dissimilativa del nitrato (denitrificazione) [Donovan *et al*, 2006]. Nel 2009 è riportato in un lavoro che descrive l'ecofisiologia di batteri isolati da sedimenti lacustri di acqua dolce [Muehe *et al*, 2009].

Il ceppo **S3den**, isolato come denitrificante nello strato ossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: DQ779961.1 in *GenBank*), come *Enterococcus avium*, un Firmicutes, appartenente alla famiglia delle Enterococcaceae. A livello tassonomico è stato rinominato nel 1984 da Collins *et al*, a partire dal genere *Streptococcus* [Collins *et al*, 1984]. In base a quanto riportato nell'articolo, questa specie non è in grado di ridurre il nitrato mentre, da ricerche in banche dati, il genere *Enterococcus* presenta delle specie denitrificanti come dimostrato dal presente lavoro.

Il ceppo **R1den**, isolato come denitrificante nello strato della rizosfera, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: NR_026443.1 in *GenBank*), come *Aquamicrobium defluvii*, appartenente alla classe degli α -proteobatteri e alla famiglia delle Phyllobacteriaceae. Questo microrganismo è stato isolato e caratterizzato per la prima volta nel 1998 da Bambauer *et al* come batterio in grado di metabolizzare il tiofene 2-carbossilato come unica fonte di carbonio, in presenza di nitrato come accettore di elettroni, isolato da fanghi attivi e inserito nello stesso anno come nuovo genere [Bambauer *et al*, 1998; Validation List No. 66, 1998].

Il ceppo **R3den**, isolato come denitrificante nello strato della rizosfera, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: HQ293070.1 in *GenBank*), come *Enterococcus faecium*, che appartiene alla classe dei Firmicutes e alla famiglia delle Enterococcaceae. Tassonomicamente tale specie è stata trasferita dal genere *Streptococcus* nel 1984 da Schleifer e Kilpper-Bälz [Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984]. In lavori più recenti è stato studiato come indicatore di contaminazione fecale nei sedimenti di lago di acqua dolce, nell'Europa occidentale [Thevenon *et al*, 2011].

Il ceppo **Rnfb**, isolato come azotofissatore nello strato della rizosfera, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: HQ848377.1 in *GenBank*), come *Pseudomonas putida*, che appartiene alla classe dei γ -proteobatteri e alla famiglia delle Pseudomonadaceae. La specie *Pseudomonas putida* è stata identificata per la prima volta nel 1889 da Trevisan *et al*, e compare nella lista approvata della nomenclatura batterica del 1980 [Skerman *et al*, 1980]. Su *Pseudomonas putida* sono stati compiuti negli anni '80 i primi studi sulla degradazione di idrocarburi aromatici. In particolare, questo ceppo è menzionato in un lavoro del 2011 relativo a suoli

contaminati da petrolio, per la capacità di crescere con etilbenzene come unica fonte di carbonio e di energia [Kim & Lee, 2011]. In generale, tale specie è riportata in lavori recenti relativi alla bioremediazione di tetraclorobisfenolo A [Yuan *et al*, 2010], di idrocarburi policiclici aromatici [Hale *et al*, 2010] e di corpi idrici inquinati da detergenti come gli alchilbensensulfonati [Eniola & Olayemi, 2008].

Il ceppo **Mnfb**, isolato come azotofissatore nello strato di sedimento interno, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: EU196522.1 in *GenBank*), come *Achromobacter xylosoxidans*, un β -proteobatterio, appartenente alla famiglia delle Alcaligenaceae. Specie conosciuta dagli anni '70, le ultime precisazioni a livello di nomenclatura tassonomica sono riportate nel 1998 da Yabuuchi *et al* [Yabuuchi *et al*, 1998]. Il ceppo in questione è menzionato in un articolo non pubblicato. In letteratura, i lavori relativi a tale specie si ritrovano sia in ambito clinico, in quanto connesso a batteriemie [Spear *et al*, 1988], sia in ambito ambientale correlata alla comunità batterica in grado di trasformare biogeochimicamente contaminanti radionuclidi [Lin *et al*, 2011].

Il ceppo **F2aaa**, isolato come azotofissatore nello strato anossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: HQ218443.1 in *GenBank*), come *Agrobacterium sp.*, appartenente alla classe degli α -proteobatteri e alla famiglia delle Rhizobiaceae. Batteri del genere *Agrobacterium* sono citati per la capacità di mineralizzazione del fenantrene [Xia *et al*, 2011].

Il ceppo **M1aaa**, isolato come azotofissatore nello strato di sedimento interno, è stato riconosciuto, con un'identità del 98% (*Accession Number*: GQ416630.1 in *GenBank*), come *Klebsiella sp.* non coltivato, appartiene alla classe dei γ -proteobatteri e alla famiglia delle Enterobacteriaceae. In particolare questo ceppo è riportato in un studio sulla comunità microbica di sistemi biologici di sgrassaggio, nell'ambito di una ricerca per testare il potenziale rischio dei lavoratori che vengono a contatto con questa tecnologia [Boucher *et al*, 2011].

Il ceppo **Rlgi**, isolato come azotofissatore nello strato della rizosfera, è stato riconosciuto, con un'identità del 98% (*Accession Number*: DQ454123.3 in *GenBank*), come *Rhizobium sp. J3-A127*, un α -proteobatterio, appartenente alla famiglia delle Rhizobiaceae, isolato dalla rizosfera del riso e proposto come una nuova specie, *Rhizobium pseudoryzae* [Zhang *et al*, 2011].

Il ceppo **S1lgi**, isolato come azotofissatore nello strato ossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: AB175652.1 in *GenBank*), come *Azomonas*

agilis, appartenente alla classe dei γ -proteobatteri e alla famiglia delle Pseudomonadaceae. Il ceppo in questione è citato solamente in un articolo non pubblicato, tuttavia tale specie è spesso menzionata come indicatore biologico usato in saggi di tossicologia ambientale su acqua o suolo derivati da siti contaminati [Leitgib *et al*, 2007].

Infine, il ceppo **F5ciano**, isolato come cianobatterio nello strato anossico, è stato riconosciuto, con un'identità del 99% (*Accession Number*: AM711549.1 in *GenBank*), come *Nostoc sp. TO1S01*, appartenente al *phylum* dei cianobatteri, famiglia delle Nostocaceae. Una precisa descrizione delle specie appartenenti al genere *Nostoc* è riportata Papaefthimiou *et al*, che ne descrive la capacità di vivere in simbiosi con diverse piante e funghi [Papaefthimiou *et al*, 2008].

Concludendo, possiamo dire che le caratteristiche metaboliche dei batteri selezionati con specifici terreni di coltura, sono state generalmente confermate dall'identificazione svolta a livello molecolare.

L'analisi molecolare dei ceppi isolati e identificati è stata approfondita mediante determinazione dei loro profili ARISA.

Tale metodica è stata ottimizzata a partire dalle informazioni presenti in letteratura [Fisher & Triplett 1999; Cardinale *et al*, 2004; Stuart *et al*, 2007] attraverso numerose prove e la scelta finale dei parametri di seguito illustrati. L'ottimizzazione è stata possibile grazie a controlli interni costituiti da DNA genomici di batteri noti e ben studiati *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni*, le cui ITS sono state sequenziate e quindi utilizzabili come validi riferimenti.

L'analisi ARISA, come riportato nell'introduzione, prevede l'amplificazione delle regioni ITS e le loro analisi.

Sono stati utilizzati per l'amplificazione i *primer* ITS_F e ITS_R largamente discussi da Cardinale *et al* [Cardinale *et al*, 2004], utilizzando però un programma di amplificazione totalmente rinnovato, con un numero di cicli di amplificazione maggiore, 35 invece che 30, e una temperatura di appaiamento di 58 °C rispetto a 55 °C. La scelta della temperatura di *annealing* è stata effettuata valutando un gradiente tra 58 e 63 °C in base alle *T melting* suggerite dalla ditta fornitrice dei *primer*; contemporaneamente è stata valutata la concentrazione ottimale dei *primer* (tra 100, 150, 200 e 300 nM), in relazione alla diluizione del template (dalla concentrazione tale quale del DNA genomico estratto direttamente dal sedimento fino a diluizioni di 1:1000000). Nel caso degli estratti di DNA genomico direttamente dagli isolati batterici,

la diluizione non è necessaria, in quanto tale fase è indispensabile per ridurre gli inibitori dell'amplificazione eventualmente presenti nel sedimento (es: acidi umici), che ovviamente sono assenti dal DNA purificato dalla coltura pura di batteri con i kit commerciali.

La concentrazione ottimale dei *primer* è risultata quindi essere 100 nM e la diluizione ottimale del template 1:100.

Un'ultima fase di ottimizzazione ha previsto la scelta del tempo di appaiamento e la concentrazione di magnesio, in modo da rendere più efficiente l'attività enzimatica della DNA polimerasi: 1 minuto a 58 °C e una concentrazione di MgCl₂ pari a 1.5 mM sono i parametri scelti.

A partire da tali parametri, e tenendo come riferimento *S. enterica* e *C. jejuni*, sono state amplificate le ITS di ciascun ceppo identificato. In **Figura 12.9** sono riportati i profili ottenuti dall'amplificazione delle ITS separate tramite elettroforesi su gel (RISA).

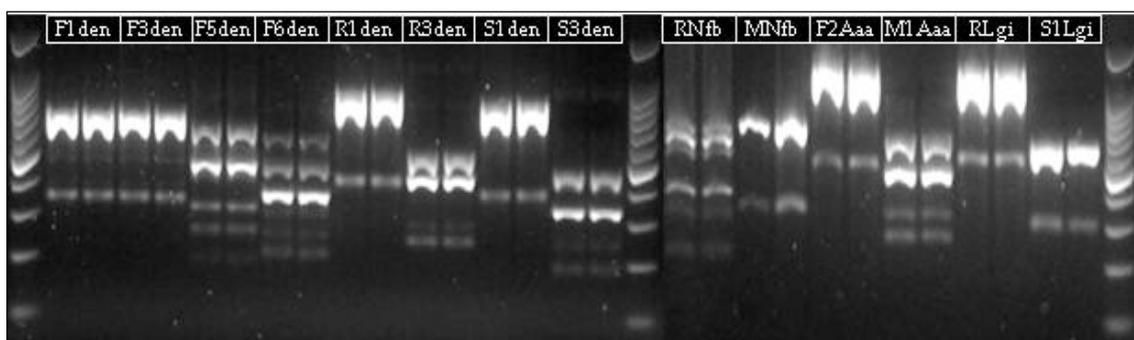


Figura 12.9
Analisi RISA sui ceppi batterici isolati: elettroforesi su gel di agarosio 2.5%, TAE 1X degli ampliconi delle ITS purificate. Il marcatore molecolare è un 100 bp.

Manca, nell'analisi RISA effettuata, il profilo del cianobatterio *Nostoc* sp. TO1S01 perchè è l'unico, fra i batteri identificati, per il quale non è avvenuta amplificazione di sequenze ITS. Questo non stupisce in quanto, consultando i dati relativi ai genomi nelle banche dati, si può osservare come, nel caso di alcune specie di *Nostoc* i geni ribosomali non siano organizzati in operoni simili a quelli degli altri batteri. Dall'osservazione dei profili ottenuti, si può inoltre notare come, se ci si basasse solo sulle informazioni fornite dalla tecnica RISA, i ceppi F1den e F3den, R1den e S1den o F2aaa e RLgi, risulterebbero tra loro uguali. In realtà grazie alle informazioni ottenute dalla sequenza del 16S rDNA è stato evidenziato che *Paracoccus solventivorans* (F1den) e *Bacillus pichinotyi* (F3den), sono ben differenti tra loro, come lo sono *Aquamicrobium defluvii* (R1den) e *Paracoccus denitrificans* (S1den), pur appartenendo entrambi alla stessa

classe degli α -proteobatteri, e *Agrobacterium sp.* (F2aaa) e *Rhizobium sp.* J3-A127 (Rlgi) pur appartenendo alla stessa famiglia (Rhizobiaceae).

Questo non deve essere considerato un errore della tecnica, ma un suo limite. Infatti, non contano solo le dimensioni delle sequenze amplificate ma, se si considera un profilo elettroforetico classico, è determinante anche l'intensità della banda, che dovrebbe essere indicativa di quante copie di sequenze di quelle dimensioni sono state amplificate come ITS. Inoltre, una differenza di lunghezza di pochi nucleotidi non è visibile su un gel. Per questo l'elettroforesi capillare è considerata un metodo più affidabile in quanto permette di visualizzare con maggiore chiarezza e precisione sequenze di diversa lunghezza (anche di pochi nucleotidi), rilevandole come picchi, più o meno alti e ampi, in proporzione alla loro abbondanza che è messa in evidenza dall'intensità della fluorescenza .

La tecnica ARISA (RISA Automatizzata) visualizza in modo inequivocabile le differenze a livello di specie e persino di ceppi. Infatti, nonostante la maggior parte dei batteri contenga più di un operone *rrn*, e i diversi operoni *rrn* di uno stesso batterio siano identici o quasi, l'evoluzione delle ITS è diversa: si osserva un maggiore livello di eterogeneità intra-specie e, molto spesso, anche fra ceppi diversi della stessa specie. Si pone, a questo punto, il problema se possono essere considerati OTU (unità tassonomiche) tutti i picchi che si osservano con l'analisi ARISA visto che ogni batterio può essere rappresentato anche da più bande. Considerando che, per molte specie batteriche che possono presentare più bande, ci sono specie il cui DNA non è amplificabile e quindi non mostra bande, mediamente i due aspetti opposti si bilanciano. Per questo motivo, si è stabilito che i picchi possono essere considerati OTU [Nesme & Normand, 2004].

Per un'analisi più precisa ed affidabile gli stessi ampliconi analizzati su gel sono stati quindi sottoposti a elettroforesi capillare tramite la tecnica ARISA, in condizioni denaturanti, analizzando le sequenze comprese tra i 200 e i 1200 bp in presenza dello standard interno 2500 ROX. I dati ottenuti sono stati confrontati, ove disponibile la sequenza genomica depositata in banca dati della stessa specie, con i profili ottenuti tramite PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) eseguita utilizzando gli stessi *primer*. Per poter effettuare il confronto, sono stati considerati solo i picchi con una fluorescenza relativa maggiore all'1% della fluorescenza totale del campione. E' stata scelta una soglia più elevata rispetto a quella scelta normalmente in quanto si tratta di ceppi isolati e identificati. La fluorescenza relativa per ogni picco è stata calcolata dividendo la

fluorescenza del picco stesso per la fluorescenza totale del campione, misurata sia come area che come altezza dei picchi presenti, in modo che, in entrambi i casi, fosse soddisfatta la condizione richiesta. Le sequenze ottenute da ciascun microrganismo tramite PCR in silico sono state quindi paragonate a quelle ottenute realmente tenendo come riferimento *S. enterica*. In questo caso, infatti, tramite PCR in silico si ottengono 7 bande ITS: 2 di 440 bp, 2 di 480 bp e 3 di 600 bp. Dall'analisi reale escono in realtà 6 picchi: 2 di circa 440 bp, 2 di circa 480 bp e apparentemente 2 di circa 595 bp (600) invece di 3. In realtà, osservando la fluorescenza di ciascun picco evidenziato, espressa come area, uno di questi ha un valore di circa 60000 unità di fluorescenza e l'altro di circa 120000. Si potrebbe quindi supporre che nell'area di 120000 unità di fluorescenza in realtà sono presenti 2 e non un'unica sequenza. Ciò significa che in realtà questi due picchi in realtà rappresentano 3 frammenti di circa 600 bp. Inoltre una banda di di 595 bp può essere considerata uguale a quella di 600 bp perché è stato stabilito da più autori che sono accettate differenze di $3 \text{ bp} \pm 1 \text{ bp}$ per frammenti di dimensioni entro le 700 bp [Brown *et al*, 2005; Kovacs *et al*, 2010]. I dati ottenuti sono raccolti in **Tabella 12.18**.

Nonostante della maggior parte dei batteri identificati non sia possibile effettuare l'amplificazione in silico per mancanza della sequenza genomica, alcune considerazioni possono essere fatte.

In generale c'è una buona corrispondenza all'interno della specie analizzata, ma come è evidenziato per *Pseudomonas putida*, dei 5 ceppi di cui si conosce la sequenza genomica ed è possibile l'analisi in silico, solo uno si avvicina al profilo del ceppo identificato (*P. putida* KT2440).

Se si esegue un'amplificazione in silico per cianobatteri del genere *Nostoc* si osserva che, delle due sequenze genomiche presenti in banca dati, una presenta due frammenti da 600 e 370 bp mentre per *Nostoc punctiforme* PCC 73102 non vi è alcuna amplificazione in silico, mettendo in evidenza la possibilità che alcune specie di cianobatteri possano avere una diversa organizzazione dei geni ribosomali e non avere ITS.

Per quanto concerne l'isolamento e l'identificazione di batteri ammonio ossidanti e nitrito ossidanti (nitrificanti), dopo ripetute fasi di arricchimento, è stato possibile avere in coltura pura solo un batterio che si era arricchito con gli specifici terreni come ammonio-ossidante. Tale ceppo, è stato tuttavia identificato, tramite analisi molecolare, come *Paenibacillus* sp.(Accession Number: JN936297.1 in *GenBank*) che è più

probabilmente riconducibile alla nitrato riduzione in condizioni di anaerobiosi piuttosto che ad un metabolismo chemiolitoautotrofo come la riduzione dell'ammonio.

Tabella 12.18 Dati relativi alle ITS dei ceppi identificati, ottenuti tramite PCR <i>in silico</i> e tramite PCR <i>in vitro</i>.		
Isolato batterico identificato	ITS(bp) da PCR <i>in silico</i>	ITS(bp) da ARISA
F1 den <i>Paracoccus solventivorans</i>	-	575, 605, 680
F3 den <i>Bacillus pichinoty</i>	-	575, 605, 680
F5 den <i>Citrobacter freundii</i>	-	320, 405, 470, 620
F6 den <i>Uncultured Bacillaceae bacterium</i>	-	315, 370, 470, 600
R1 den <i>Aquamicrobium defluvii</i>	-	830
R3 den <i>Enterococcus faecium</i>	-	370, 430, 530
S1 den <i>Paracoccus denitrificans</i>	798 (2)	785 (2)
S3 den <i>Enterococcus avium</i>	-	280, 330, 440
R nfb <i>Pseudomonas putida</i>	Da 370 a 2700: 5 profili diversi in base al ceppo analizzato	380, 590, 650
M nfb <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	691 (3)	570 (1), 680 (2)
F2 aaa <i>Agrobacterium sp. BKBLPu7</i>	1226 (2)	1130 (3)
M1 aaa <i>Uncultured Klebsiella sp.</i>	-	405, 470, 620
R lgi <i>Rhizobium sp. J3-A127</i>	1134 (3)	1130 (3)
S1 lgi <i>Azomonas agilis</i>	-	500, 520, 575
F5 ciano <i>Nostoc sp. TO1S01</i>	Assenti o 600, 370	Assenti
<i>Salmonella enterica</i>	440 (2), 480 (2), 600 (3)	440 (2), 480 (2), 595 (3)

L'interesse nei confronti dei batteri nitrificanti è legato alla necessità di conoscere se, come, e in quale percentuale, la comunità batterica contribuisce realmente all'elevato tasso di nitrificazione potenziale, misurato principalmente nei sedimenti vegetati rispetto ai sedimenti non vegetati. Tale parametro risulta meno elevato, nelle zone vegetate, in estate rispetto alla stagione primaverile, probabilmente a causa della

temperatura maggiore che stimola la crescita batterica e l'aumento della domanda sedimentaria di ossigeno in conseguenza all'aumento di sostanza organica labile, che, soggetta a mineralizzazione, porta a un aumento del rilascio di ammonio nelle acque interstiziali, che non è controllato dalla presenza della pianta. Ci sarebbe, quindi, notevole interesse a sviluppare metodi di analisi delle popolazioni di batteri nitrificanti.

12.2.2 Ricerca bibliografica di primer specifici per batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto

L'analisi preliminare svolta ha inoltre incluso la ricerca di geni specifici coinvolti in reazioni chiave del metabolismo dell'azoto, e dei primer più adatti per PCR multiplex, sulla base delle informazioni ad oggi disponibili in letteratura. Tale ricerca è riassunta nella **Tabella 12.19**.

Identificare il gene chiave di ciascuna delle principali vie batteriche per il metabolismo dei composti dell'azoto, individuare le sequenze di primer adatti a lavorare nelle medesime condizioni e in modo specifico per la maggioranza dei batteri coinvolti nel ciclo dell'azoto, permette di impostare una Real Time PCR *multiplex* e monitorare contemporaneamente le diverse popolazioni microbiche e indirettamente gli scambi di azoto tra queste e l'ambiente in un determinato sito d'indagine.

Con questa ricerca sono stati individuati primer che permettono di amplificare in modo specifico i geni:

- *nosZ* per la denitrificazione (codifica per l'enzima *ossido nitroso reduttasi* in grado di ridurre N_2O a N_2);
- *nrfA* per la DNRA dove il nitrito è ridotto ad ammonio dall'enzima codificato da tale gene;
- *amoA* per gli ammonio ossidanti (l'ossidazione dell'ammonio, tramite *ammonio monoossigenasi*, è il passo iniziale della nitrificazione);
- *nxrA* per i nitrito ossidanti (la *nitrito ossido reduttasi* è l'enzima chiave responsabile per l'ossidazione del nitrito a nitrato in tali batteri);
- *hzo* gene che codifica per l'*idrazina ossido reduttasi* enzima chiave del processo *anammox*);
- *nifH* per tutti gli azotofissatori (es: *Klebsiella* sp, *Azomonas* sp, *Rhizobium* sp); *nifD* per i cianobatteri azotofissatori (es: *Nostoc* sp).

Tabella 12.19			
Sequenze di <i>primer</i> specifici coinvolti nel ciclo biogeochimico dell'azoto ad oggi riportati in letteratura.			
Target	GENE	PRIMER FORWARD / REVERSE	Note
DENITRIFICAZIONE (respirazione à N₂)	<i>nirS</i> [Braker <i>et al</i> , 1998]	nirS1F: CCT AY(C/T)T GGC CGC CR(A/G)C ART	Univ 763 - 780
		nirS6R: CGT TGA ACT TR(A/G)C CGG T	Univ 1653 - 1638
	<i>nirK</i> [Braker <i>et al</i> , 1998]	nirK1F: GGM(A/C) ATG GTK(G/T) CCS TGG CA	Univ 526 - 542
		nirK5R: GCC TCG ATC AGR TTR TGG	Univ 1040 - 1023
	<i>norB</i> [Casciotti & Ward, 2005]	norB1f: CGN GAR TTY CTS GAR CAR CC	Univ 400-419
		norB8r: CRT ADG CVC CRW AGA AVG C	Univ 1051-1069
<i>nosZ</i> [Henry <i>et al</i> , 2006]	nosZ2F: CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT	Univ 1617 - 1640	
	nosZ2R: CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA	Univ 1884 - 1864	
DNRA (NH₄⁺)	<i>nrfA</i> [Mohan <i>et al</i> , 2004]	nrfA F1f: GCN TGY TGG WSN TGY AA	~ 520 bp
		nrfA 7R1: TWN GGC ATR TGR CAR TC	
ANAMMOX	<i>hzo</i> [Schmid <i>et al</i> , 2008]	hzoC11F1: TGY AAG ACY TGY CAY TGG	ANAM ~ 470 bp
		hzoC11R2: ACT CCA GAT RTG CTG ACC	ANAM ~ 470 bp
NITRIFICANTI	<i>amoA</i> [Rotthauwe <i>et al</i> , 1997]	amoA-1F: GGG GTT TCT ACT GGT GGT	Bacteria ~ 491 bp
		amoA-2R: CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	
	<i>nrxA</i> [Wertz <i>et al</i> , 2008; Vanparys <i>et al</i> , 2006]	F1370 F1 nrxA: CAG ACC GAC GTG TGC GAA AG F2843 R2 nrxA: TCC ACA AGG AAC GGA AGG TC	<i>Nitrobacter</i> operone nor=nrx
AZOTOFISSATORI	<i>nifH</i> [Widmer <i>et al</i> , 1999]	nifH forA: GCI WTI TAY GGN AAR GGN GG	Nested PCR (2 For + 1 Rev)
		nifH forB: GGI TGT GAY CCN AAV GCN GA	
		nifH rev: GCR TAI ABN GCC ATC ATY TC	
CIANOBATTERI AZOTOFISSATORI	<i>nifD</i> [Roeselers <i>et al</i> , 2007]	nifD522-F: TCC GKG GKG TDT CTC AGT C	~ 310 bp
		nifD861-R: CGR CWG ATR TAG TTC AT	

12.2.3 Informazioni ottenute sulla comunità batterica

L'analisi dell'intera comunità microbica (profilo di comunità) nei sedimenti campionati in presenza e in assenza di *Vallisneria spiralis* è stata svolta applicando la tecnica ARISA su campioni ottenuti dallo schema illustrato nel **Capitolo 11** e che può essere riassunto come segue:

- 3 aree vegetate da *V. spiralis*; 3 aree adiacenti non vegetate presso il sito di Massimbona sul fiume Mincio;

- per ciascuna area sono state raccolte 3 carote intatte di sedimento, in totale 9 campioni per la zona vegetata e 9 per la zona non vegetata;
- da ogni campione sono state fatte due estrazioni del DNA genomico ambientale;
- questo lavoro è stato ripetuto in due momenti chiave della crescita di *V. spiralis*, in primavera e in tarda estate.

L'analisi ARISA, come precedentemente spiegato, è stata messa a punto partendo dalle informazioni raccolte in letteratura [Fisher & Triplett, 1999; Cardinale *et al*, 2004], reimpostando il programma di PCR e utilizzando una temperatura di *annealing* di 58 °C, valutando la migliore concentrazione dei *primer* che è risultata essere 100 nM, ricercando il migliore compromesso tra la giusta diluizione del DNA genomico estratto direttamente da suolo (1:100) per avere una buona resa di amplificazione senza perdita di informazione e allo stesso tempo l'assenza dei possibili inibitori della reazione di amplificazione come gli acidi umici e infine testando la migliore quantità di amplificato caricabile per avere l'immagine completa delle sequenze presenti e rilevabili tramite fluorescenza (5µl di amplificato in rapporto 1 a 4 con il *size standard* ROX 2500 utilizzato).

Elettroferogrammi complessi (profili) con picchi (bande) di dimensioni comprese tra 100 bp e 1200 bp sono stati ottenuti per estrapolazione tramite GeneMapper dallo standard ROX Gene Scan 2500 size.

L'alta sensibilità del sequenziatore automatico ha permesso al software GeneMapper di rilevare un alto numero di picchi per ogni profilo ARISA. Sono stati ottenuti 12 elettroferogrammi che possono essere riassunti nell'immagine mostrata in **Figura 12.10**. Sono stati confrontati due tipi di sedimenti (in presenza e in assenza della macrofita radicata, rispettivamente V e NV) in due momenti importanti nello sviluppo della pianta acquatica sommersa (maggio: fase esponenziale della crescita, M; settembre: fase della massima produzione di biomassa vegetale nell'anno corrente, S) tra loro nelle seguenti combinazioni: MV, MNV, SV, SNV.

Sono stati anche analizzati i dati ottenuti dai triplicati di campionamento di ognuna delle situazioni sopra riportate, per osservare se la comunità microbica presentasse diversità all'interno dei campioni provenienti dalla stessa zona. Questo è stato possibile grazie al calcolo degli indici di similarità e diversità.

Il sistema di analisi di ogni elettroferogramma è stato impostato dopo avere raccolto informazioni da diversi lavori presenti in letteratura [Fisher & Triplett, 1999; Ranjard *et*

al, 2001; Hewson & Fuhrman, 2004; Kovacs *et al*, 2010] e tenendo conto dello schema di campionamento e replicati attuato.

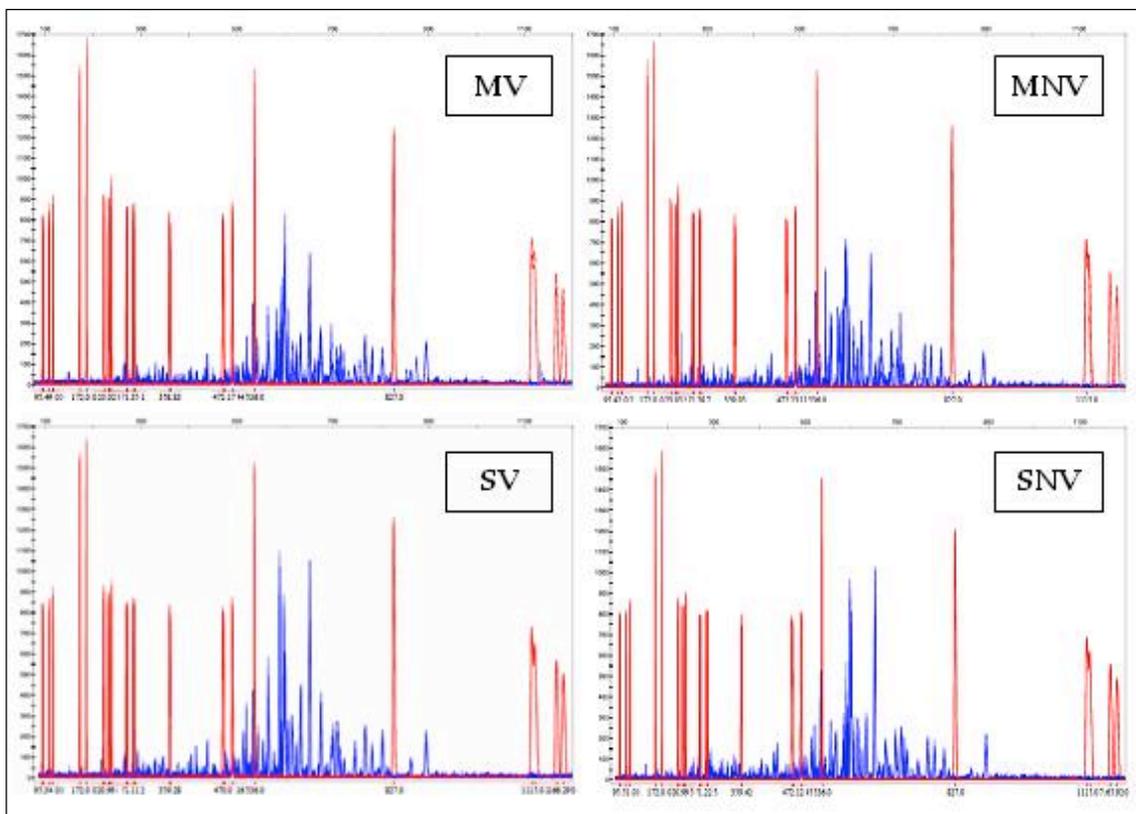


Figura 12.10
Profili ARISA del sedimento analizzato in situazioni diverse nel tempo e nello spazio. MV (maggio, vegetato); MNV (maggio, non vegetato); SV (settembre, vegetato); SNV (settembre, non vegetato). In ordinata è mostrata la fluorescenza, espressa come altezza del picco, in ascissa la lunghezza delle ITS (bp). In rosso sono riportati i picchi del *size standard*, in blu quelli delle ITS amplificate. Ogni elettroferogramma rappresenta la sovrapposizione dell'analisi di 3 siti (es: MV = MV1, MV2, MV3) effettivamente analizzati per ogni situazione.

Allo scopo di escludere dall'analisi gli artefatti si è deciso, anche sulla base di quanto riportato in letteratura, di escludere ogni picco che, in termini di fluorescenza, rappresentasse meno dello 0.1% della fluorescenza totale dei picchi [Hewson & Fuhrman, 2004; Brown *et al*, 2005; Popa *et al*, 2009].

I picchi più grandi di 1000 bp e inferiori a 82 bp (somma tra le dimensioni dei *primer* e la lunghezza delle sequenze non appartenenti alle regioni ITS, ma ai geni per gli rRNA 16S e 23S) non sono stati considerati [Popa *et al*, 2009]. Con i frammenti è stata eseguita una operazione di raggruppamento (*binning*) secondo le indicazioni riportate in letteratura [Brown *et al*, 2005; Kovacs *et al*, 2010]:

- 3 bp \pm 1 bp per frammenti fino ai 700 bp;
- 5 bp per frammenti tra i 700 e i 1000 bp.

Tutti i picchi presenti un'unica volta sul totale dei 12 campioni (MV1, MV2, MV3, MNV1, MNV2, MNV3, SV1, SV2, SV3, SNV1, SNV2, SNV3) sono stati esclusi. Infine,

poiché per ogni sito MV, MNV, SV, SNV sono stati effettuati 3 campioni in 3 zone rappresentative e comparabili tra maggio e settembre (in quanto identiche), sono stati considerati validi i picchi presenti almeno 2 volte su 3 per ciascuno dei siti, tenendo come ipotesi reale che in base alla presenza assenza della macrofita radicata e in base alle diverse stagioni di sviluppo della pianta, questi potessero rappresentare delle repliche della stessa situazione analizzata. La presenza quindi di un unico picco su tre è stata considerata come artefatto della corsa elettroforetica automatizzata.

Stabilite tali condizioni 91 picchi, nei 12 profili, sono stati considerati come reali e confrontati, analizzando la loro presenza-assenza e la loro abbondanza relativa (p_i) calcolata sia utilizzando le aree che le altezze dei picchi.

E' stata costruita manualmente una matrice in sistema binario (1=presenza del picco; 0= assenza del picco) dei 91 frammenti (di dimensioni comprese tra i 151 e 895 bp) sia considerando i 12 campioni che le 4 situazioni confrontate (tali dati sono stati ottenuti tramite il programma Excel, considerando i campioni "1, 2 e 3" per ogni situazione come repliche e facendo una media dei dati ottenuti).

Sui dati contenuti nella matrice di 12 righe e 91 colonne è stata effettuata un'analisi statistica multivariata dei dati dominanti tramite PCA utilizzando il programma NTSYS 2.0 [Rohl, 1998]. La matrice è interpretata come le unità sperimentali (righe) e le variabili (colonne). In questo caso sono presenti più variabili rispetto alle osservazioni. Tipicamente le variabili sono correlate tra loro ma le unità sono indipendenti.

La PCA è stata effettuata utilizzando il coefficiente di Jaccard, il *file* in output è un grafico in 3D che mostra le distanze dei campioni analizzati (**Figura 12.11**).

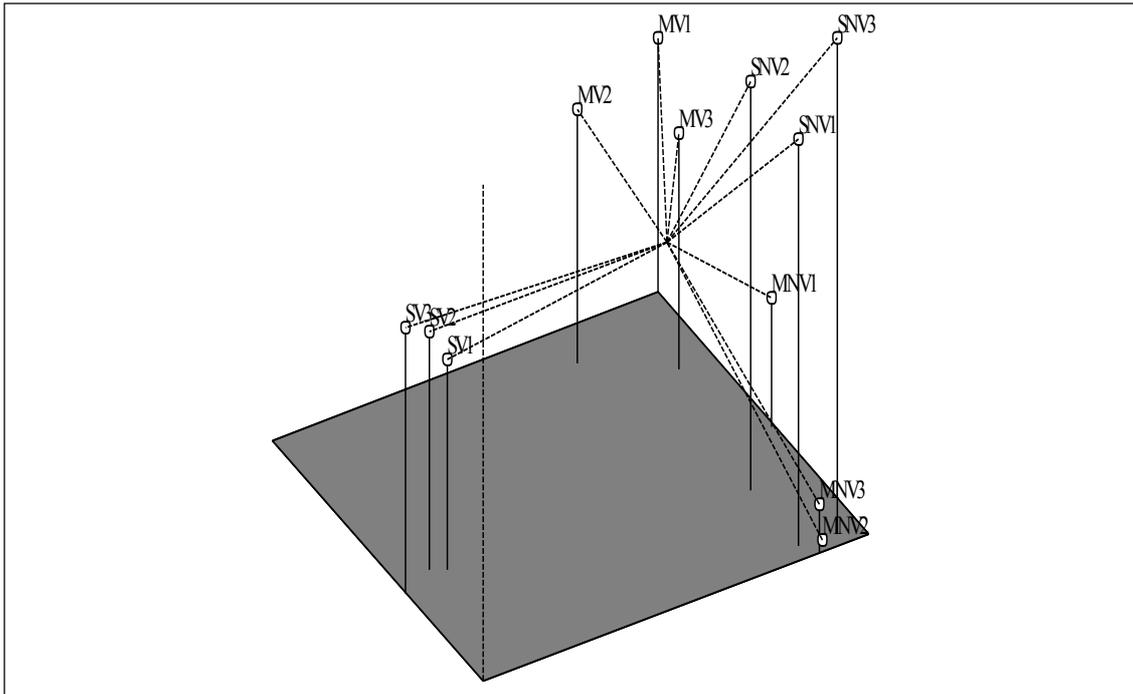


Figura 12.11
Grafico che rappresenta il risultato dell'analisi PCA per i 12 campioni analizzati.

Il programma ha permesso di ottenere anche un dendrogramma basandosi sul metodo di *clustering* delle distanze UPGMA mostrato in **Figura 12.12**. Secondo tale rappresentazione, tutti i sedimenti vegetati, nel momento della maggiore produzione in termini di biomassa da parte della macrofita *V.spiralis* (SV1, SV2, SV3), mostrano una popolazione microbica nettamente diversa rispetto alle altre situazioni analizzate. Di seguito si può notare come la comunità microbica si diversifichi tra i campioni dell'area vegetata di maggio (MV1, MV2, MV3) e tutti i campioni derivati dall'area non vegetata (tranne MNV1) indipendentemente dalla stagione del campionamento (SNV1, SNV2, SNV3, MNV2, MNV3). MNV1 stranamente mostra una composizione microbica più simile alla zona vegetata della stessa stagione (MV1, MV2, MV3).

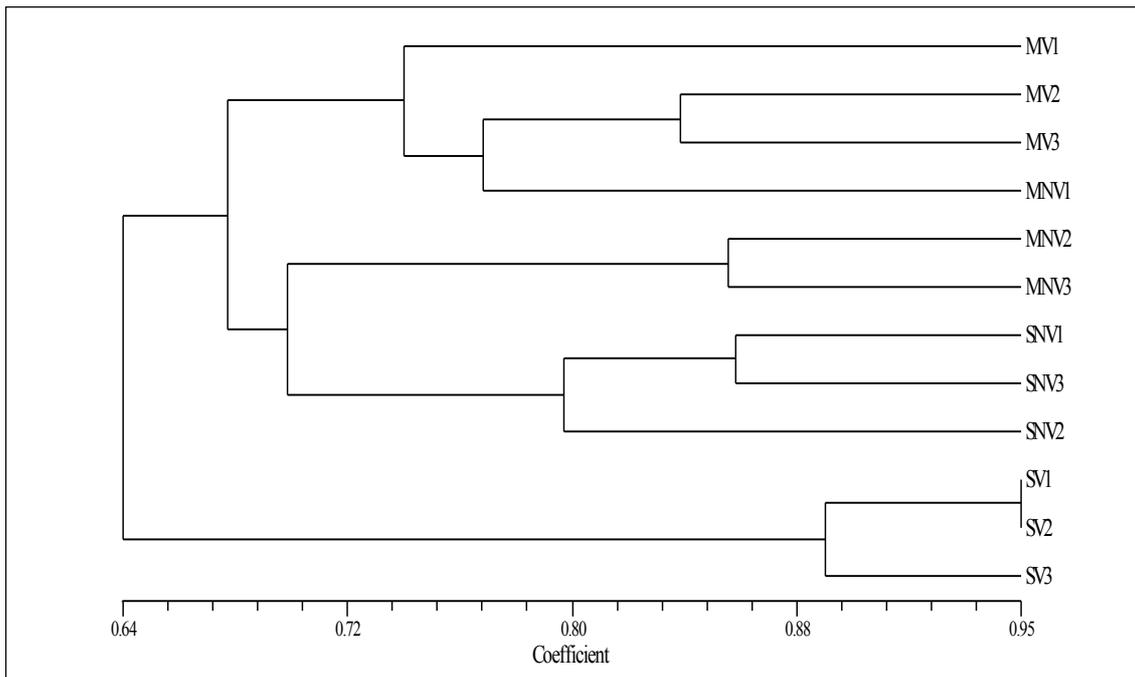


Figura 12.12
Dendrogramma, determinato con il metodo UPGMA, che descrive le relazioni di similarità tra i 12 campioni analizzati.

Se invece la stessa matrice di dati di partenza è analizzata con il sistema di *clustering* Neighbor-joining (NJ), si ottiene la rappresentazione riportata in **Figura 12.13**.

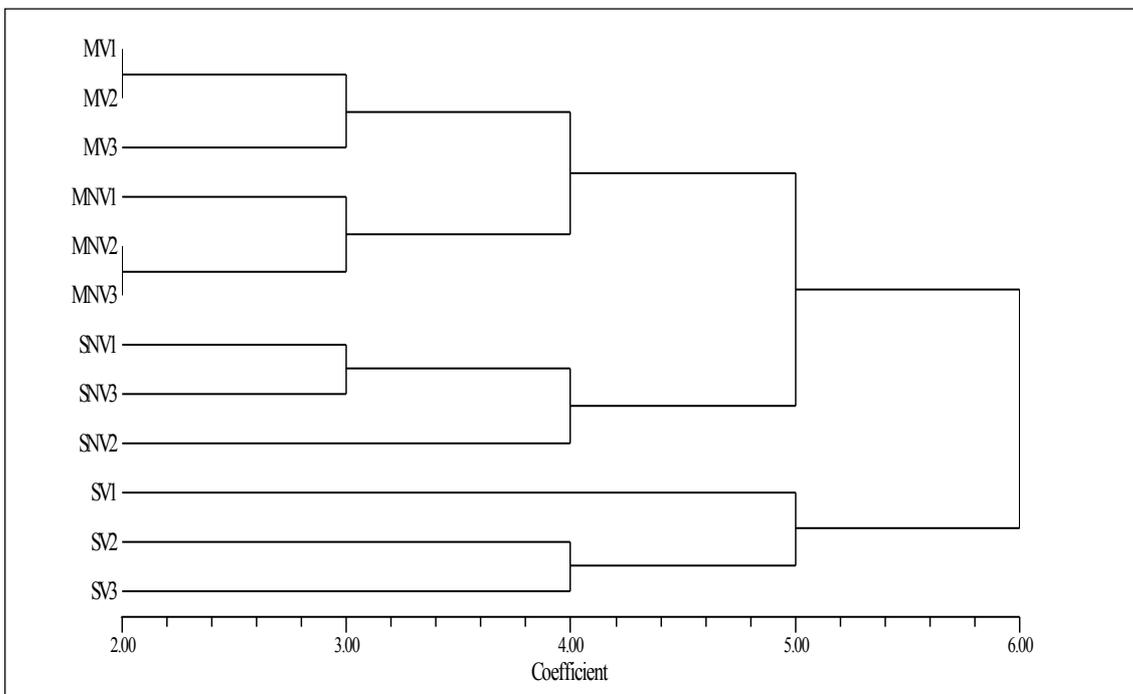


Figura 12.13
Dendrogramma, determinato con il metodo NJ, che descrive le relazioni di similarità tra i 12 campioni analizzati.

In tal caso è netta la separazione tra la popolazione microbica della zona vegetata in fase di massima produzione di biomassa da parte della macrofita radicata (il gruppo SV rispetto agli altri). Vi è un'ulteriore separazione alla stagione in cui è effettuata l'analisi (tra tutti i campioni M e gli SNV) e infine una separazione tra le comunità del gruppo MV e MNV.

Per avere ulteriore conferma di tali dati, un altro programma disponibile online [Garcia-Vallve *et al*, 1999], basato sul metodo di *clustering* UPGMA è stato utilizzato, usando gli indici di Jaccard e Pearson. Oltre alla possibilità di ottenere i fenogrammi che, come mostrato in **Figura 12.14**, per Jaccard rispecchia quello sopra riportato mentre per Pearson è leggermente diverso, tale sistema fornisce la matrice delle distanze e delle similarità e il coefficiente di correlazione cofenetica (CCC).

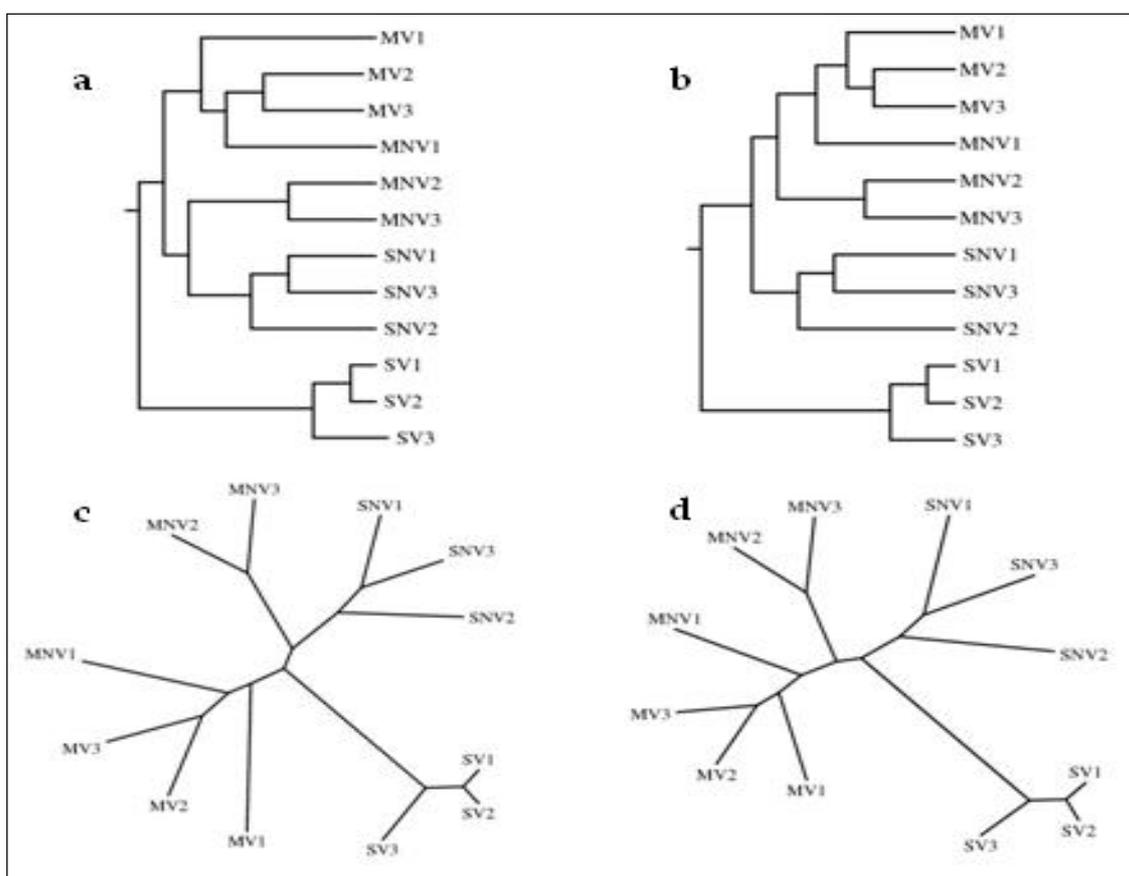


Figura 12.14
Fenogrammi *rooted* e *unrooted* derivati dall'applicazione del metodo di *clustering* UPGMA usando per il calcolo delle distanze l'indice di Jaccard (a,c) e l'indice di Pearson (b,d).

Si ricorda che il coefficiente di correlazione è una misura del grado di relazione tra due variabili, il cui valore può variare tra -1 e 1. Un valore positivo indica una proporzionalità diretta, un valore negativo indica una proporzionalità inversa tra le due variabili. La distanza del valore dallo zero indica la forza della relazione. In particolare

il coefficiente di correlazione cofenetica fra la matrice di dissimilarità originale e quella inferita in base alla classificazione è risultato essere maggiore di 0.8 con l'utilizzo di entrambi gli indici:

- 0.85 (Jaccard);
- 0.88 (Pearson);

significando un buon accordo. Tale strumento può essere utilizzato per la scelta dell'algoritmo ottimale. Nel caso in cui i valori siano inferiori a 0.8 ciò indica che il dendrogramma non è una buona rappresentazione delle relazioni fra gli oggetti analizzati. In questo caso entrambi gli indici possono essere utilizzati per rappresentare le relazioni tra i vari campioni analizzati.

Avendo osservato, come ci si aspettava, che la composizione è generalmente molto simile all'interno delle quattro situazioni d'interesse, i campioni "1, 2 e 3" sono stati raggruppati per poter confrontare direttamente MV, SV, MNV, SNV. Questo ha permesso di visualizzare i possibili effetti della stagione di sviluppo della pianta, in relazione alla presenza o assenza della macrofita radicata stessa, sulla composizione della comunità microbica esaminata.

In questo caso la matrice è costituita quindi da 91 variabili (frammenti) e 4 unità sperimentali.

La PCA è stata effettuata utilizzando il coefficiente di Jaccard, il *file* in output è un grafico in 3D che mostra le distanze dei campioni analizzati (**Figura 12.15**).

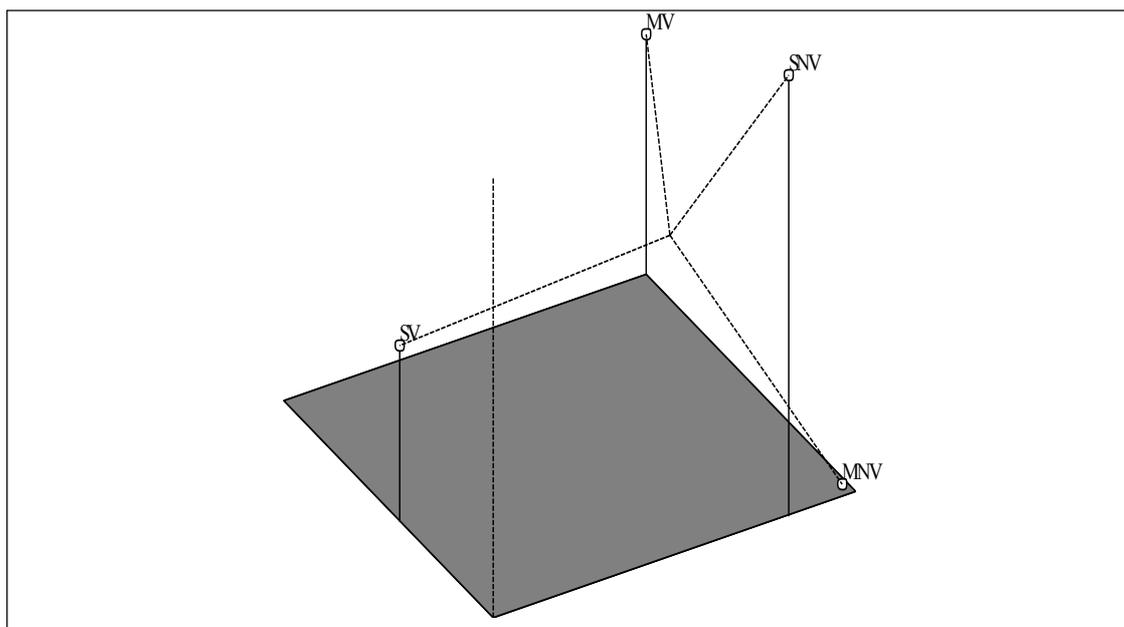


Figura 12.15
Grafico che rappresenta il risultato dell'analisi PCA per i 4 campioni analizzati.

Il programma ha permesso quindi di ottenere anche un dendrogramma, basandosi sul metodo di *clustering* delle distanze UPGMA, mostrato in **Figura 12.16**. Secondo tale rappresentazione, le zone vegetate (SV e MV), quindi in presenza di *Vallisneria spiralis* la comunità microbica subisce la maggiore diversificazione tra la stagione di crescita esponenziale (maggio) e la stagione di massima produzione in termini di biomassa (settembre), le zone non vegetate invece, non sembrano subire rilevanti modifiche stagionali. In generale sono campioni la cui composizione microbica è molto simile.

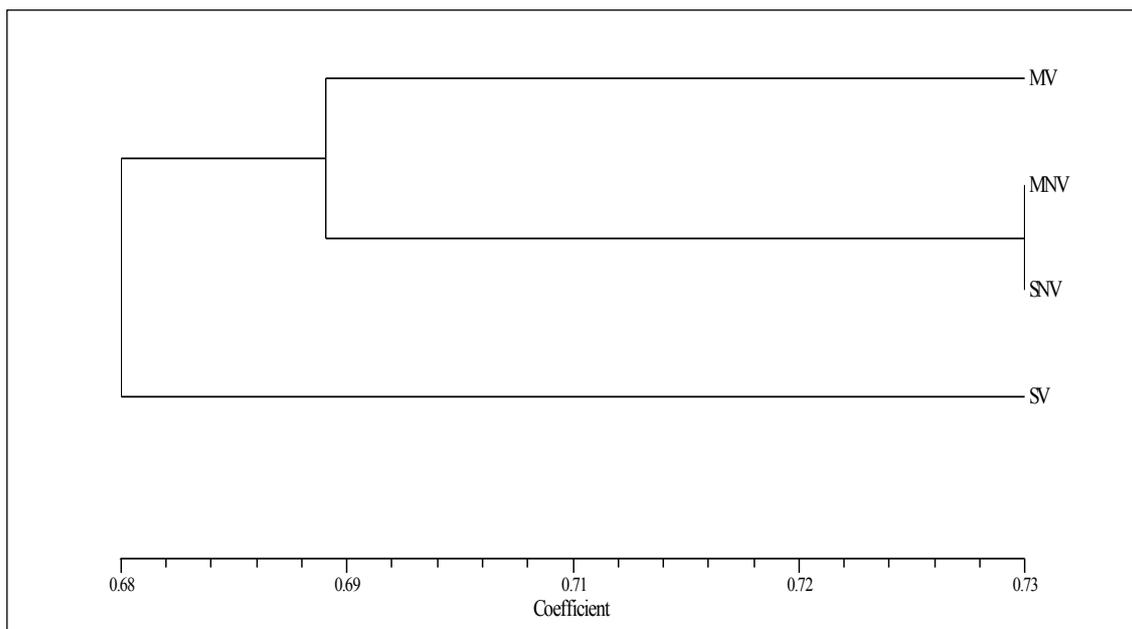


Figura 12.16
Dendrogramma, determinato con il metodo UPGMA, che descrive le relazioni di similarità tra le 4 condizioni analizzate.

Pur usando la stessa matrice di dati di partenza è analizzata con il sistema di *clustering* Neighbor-joining (NJ), la situazione non varia.

Anche in questo caso è risultato utile programma disponibile online [Garcia-Vallve *et al*, 1999], basato sul metodo di *clustering* UPGMA è stato utilizzato, usando gli indici di Jaccard e Pearson. Nel confronto in esame il coefficiente di correlazione cofenetica per entrambi gli indici utilizzati risulta essere il seguente:

- 0.93 (Jaccard);
- 0.67 (Pearson).

Poiché nel caso dell'indice di Pearson il valore è inferiore a 0.8 esso viene scartato, in quanto il dendrogramma non è una buona rappresentazione delle relazioni fra i casi analizzati.

In **Figura 12.17**, sono riportate le matrici di similarità e distanza, secondo l'indice di Jaccard, oltre ai fonogrammi, con e senza radice, ottenuti.

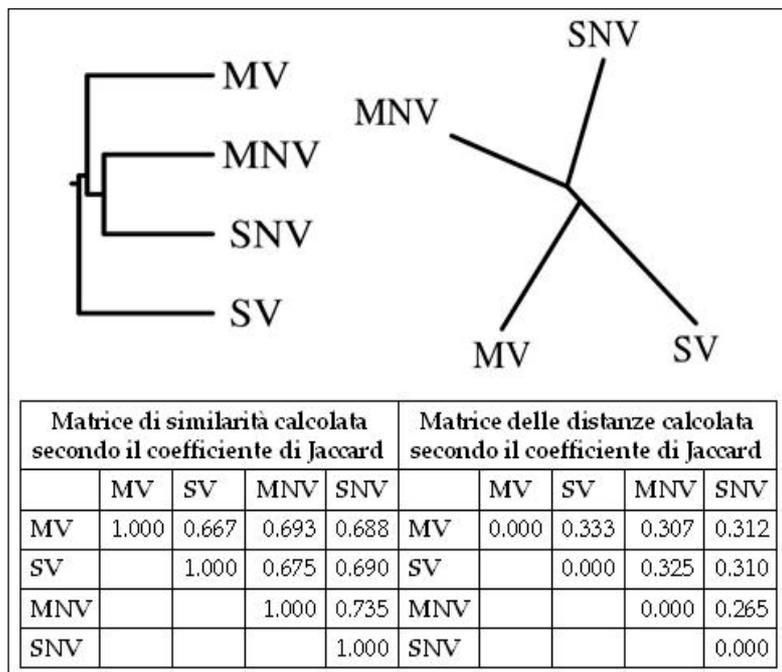


Figura 12.17
Dati ottenuti dall'analisi [Garcia-Vallve *et al*, 1999], secondo il metodo UPGMA, dei 4 siti MV, MNV, SV, SNV.

I dati riportati nelle matrici mostrano ciò che era atteso osservando il dendrogramma ottenuto tramite NTSYS; la similarità è molto alta andando da un minimo di 0.667 (tra MV e SV) a un massimo di 0.735 (tra MNV e SNV).

Considerati i 91 picchi compresi tra lunghezze di 151 e 895 bp e condivisi da almeno 2 su 3 campioni per ogni condizione analizzata (MV, SV, MNV, SNV), la ricchezza per ogni campione, espressa come numero totale di picchi all'interno dell'elettroferogramma è:

- 59 per MV;
- 66 per SV;
- 68 per MNV;
- 76 per SNV [Danovaro *et al*, 2006].

I seguenti indici ecologici (basati sulla presenza-assenza del picco o proporzionali all'abbondanza relativa di ciascun picco) sono inoltre stati calcolati e riassunti nelle **Tabelle 12.20, 12.21, 12.22**, secondo i seguenti riferimenti:

- indice ecologico di Simpson ($1-D = 1 - \sum p_i^2$) dove D l'indice di dominanza di Simpson e p_i è il rapporto tra l'intensità di fluorescenza di ciascun picco e l'intensità totale della fluorescenza di ciascun campione [Cardinale *et al*, 2004; Danovaro *et al*, 2006; Corno *et al*, 2008] (per correttezza è stato calcolato sia usando le aree che le

altezze); p_i è anche chiamato fluorescenza relativa o abbondanza relativa o importanza relativa;

- indice di Shannon – Wiener $H = -\sum p_i(\log_{10} p_i)$; p_i è la fluorescenza relativa [Hewson & Fuhrman, 2004; Danovaro *et al*, 2006; Corno *et al*, 2008];
- indice di Jaccard ($S_j = W / (a_1 + a_2 - W)$) dove W è il numero di picchi condiviso tra due popolazioni; a_1 e a_2 sono rispettivamente il numero totale delle diverse lunghezze di ITS nelle popolazioni 1 e 2; 0 indica completa differenza 1 indica identità [Hewson & Fuhrman, 2004];
- indice di Sorenson $C_s = 2j/(a+b)$ è un coefficiente di similarità dove j è il numero di frammenti comuni in entrambi i campioni, mentre a e b sono il numero totale di frammenti rispettivamente nei campioni a e b ; un valore di C_s pari a 0 indica che i due campioni sono completamente diversi, mentre pari a 1 significa che sono identici [Fisher & Triplett, 1999];
- indice di associazione di Whittaker $S_w = 1 - \sum [(b_{i1}-b_{i2})/2]$ dove $b_i = p_i$ rispettivamente per due popolazioni confrontate (1,2) [Hewson & Fuhrman, 2004].

Tabella 12.20 Indice ecologico di Simpson.	Indice ecologico di Simpson (1-D, altezze)	Indice ecologico di Simpson (1-D, aree)
MV	0.97	0.97
SV	0.97	0.96
MNV	0.97	0.97
SNV	0.97	0.97

L'indice ecologico di Simpson mostra, come previsto, una similarità evidente tra la quattro condizioni analizzate, indipendentemente dall'uso dell'altezza o dell'area per il calcolo relativo alla fluorescenza relativa.

Tabella 12.21 Indice di Shannon-Wiener.	Indice di Shannon-Wiener (H, altezze)	Indice di Shannon-Wiener (H, aree)
MV	1.68	1.62
SV	1.65	1.60
MNV	1.71	1.66
SNV	1.72	1.66

L'indice di Shannon-Wiener, mostra una maggiore similarità all'interno delle zone non vegetate rispetto alle zone vegetate e quindi le principali differenze, seppur sottili,

secondo tale indice sono dovute alla presenza o meno della pianta rispetto alla stagione di crescita. Nonostante gli indici calcolati con le aree o con le altezze mostrino valori diversi, le differenze non variano.

Tabella 12.22 Indice di Jaccard, indice di Sorenson, indice di Whittaker.	Indice di Jaccard (Sj)	Indice di Sorenson (Cs)	Indice di Whittaker (Sw, altezze)	Indice di Whittaker (Sw, aree)
MV	0.67	0.80	0.73	0.73
SV				
MNV	0.73	0.85	0.82	0.83
SNV				
MV	0.69	0.82	0.83	0.82
MNV				
SV	0.69	0.82	0.79	0.78
SNV				

Infine quest'ultima serie di indici confermano quanto detto fino ad ora: la comunità microbica non subisce forti variazioni a livello di popolazioni presenti, sono più simili tra loro le zone non vegetate (MNV, SNV) indipendentemente dalla stagione di campionamento, mentre sono più accentuate le differenze all'interno della zona vegetata, in base allo stadio di sviluppo della pianta (SV, MV). Secondo l'indice di Whittaker inoltre sembrano essere più simili tra loro la zona vegetata e la zona non vegetata del periodo di crescita primaverile (MV, MNV) rispetto alla zona vegetata e non vegetata nella fase estiva (SV, SNV).

Sicuramente, quindi, la vegetazione e la temperatura giocano un ruolo importante. Questo confronto qualitativo e senza alcuna identificazione delle popolazioni coinvolte fa pensare che la comunità microbica resti per lo più invariata a livello di composizione, mentre potrebbero variare le quantità delle popolazioni attive in un determinato momento dell'anno. Ecco perché sarebbe interessante riuscire a identificarle ma soprattutto a quantificare tali popolazioni, per monitorarne la presenza e stabilirne il ruolo che ricoprono all'interno del caso studiato.

13. Conclusioni e prospettive

La rilevazione e l'identificazione microbica, che sono alla base della microbiologia diagnostica, assieme alla quantificazione e allo studio di comunità microbiche complesse, sono sempre più di fondamentale importanza per il monitoraggio di tutti quei processi ecologici, biotecnologici e industriali dove "l'invisibile" è ciò che guida e permette l'ottenimento di uno specifico prodotto o l'evolversi di un determinato evento ambientale, alla base di reti ecologiche complesse.

Ad oggi, la rilevazione è ancora troppo legata a tecniche microbiologiche standard, accettate dalle normative e utilizzate nei laboratori secondo la certificazione di qualità a livello nazionale ed internazionale (ISO), che richiedono lunghi tempi d'analisi e una dipendenza dalla capacità di isolamento e coltivazione dei microrganismi in laboratorio, senza tener conto di tutte quelle forme patogene di cui si conosce la presenza di uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) e che costantemente non vengono considerate in tali analisi, pur essendo un possibile rischio di malattie per l'uomo e altri esseri viventi ad esso correlati.

Nel campo dell'identificazione e del monitoraggio di comunità microbiche complesse, alla base di eventi ecologici o processi industriali, molto è ancora affidato alla chimica e alla determinazione di quei composti che si conoscono essere negativi o positivi per il controllo di alcuni processi. Sarebbe più utile comprendere cosa sta avvenendo durante il processo e monitorarlo in base a chi lo conduce e non su ciò che esso produce.

Tracciando un bilancio del lavoro svolto in questa tesi e seguendo l'attenzione che vi è dedicata in questi ultimi anni dal mondo scientifico, le tecniche molecolari basate sull'analisi del DNA sono la via complementare e, o alternativa, adatta a tale scopo.

Nella prima fase del lavoro sono stati sviluppati e analizzati due metodi per quantificare *S. enterica* e *C. jejuni*, mediante qPCR in colture pure ed in campioni di pollo. Il primo metodo, messo a punto da Agrimonti *et al* [Agrimonti *et al*, *manoscritto in preparazione*], si basa sul Sybr®Green e in questo lavoro è stato testato in un laboratorio diverso da quello originale e su due macchine per Real Time PCR diverse da quella su cui il metodo era stato messo a punto originariamente. Il metodo per la quantificazione di *Salmonella* in campioni di pollo contaminati artificialmente con questo organismo, si è rivelato trasferibile da una macchina all'altra, anche se ad operare erano sperimentatori diversi. Per *Campylobacter*, invece, il metodo deve essere ulteriormente migliorato, in quanto solo uno dei campioni analizzati dava risultati riproducibili sulle due macchine utilizzate. Tuttavia, il metodo si è rivelato adeguato per

rilevare, in modo qualitativo, la presenza di *Campylobacter* su campioni di pollo prelevati presso un'importante azienda del settore avicolo.

Il metodo basato sul Sybr®Green è veloce e relativamente economico, non è però in grado di quantificare simultaneamente due tipi di DNA diverso nella stessa reazione. Per questo motivo è stato sviluppato il metodo basato su sonde TaqMan® per quantificare *Salmonella* e *Campylobacter* nel pollo. I risultati delle analisi, condotte su colture pure dei due microrganismi e su campioni di pollo contaminati con essi, hanno mostrato una buona concordanza tra la qPCR in singolo ed in doppio e i convenzionali metodi microbiologici, per la maggior parte dei campioni analizzati.

Una certa discrepanza è stata tuttavia osservata, per le colture pure con meno di 100 CFU/ml, in cui la qPCR sovrastima il numero di cellule batteriche rispetto alla conta su piastra. Questo è stato osservato anche con il Sybr®Green [Agrimonti et al, *manoscritto in preparazione*]. I motivi di ciò possono essere dovuti al fatto che la qPCR è in grado di rilevare anche la presenza di DNA di cellule morte, chiaramente non rilevabili su piastra, inoltre sia *C. jejuni* che *S. enterica* hanno mostrato di appartenere ai batteri in grado di sviluppare forme vitali ma non coltivabili (VBNC) [Oliver, 2010].

Un aspetto importante è il limite di rilevabilità delle tecniche descritte: sia il Sybr®Green che il metodo TaqMan® presentano un LOD pari a 10 copie di genoma batterico per reazione. Questo significa che il LOD relativo al campione è più alto e dipende dal fattore di diluizione, ovvero la quantità di DNA impiegata nella reazione rispetto alla quantità totale estratta dal campione. Se ad esempio, nella reazione si impiegano 5 µl di DNA su un volume di eluizione pari a 100 µl, i CFU del campione si otterranno moltiplicando per 20 i CFU quantificati nella reazione. In questo caso non potranno essere rilevati meno di 200 CFU nel campione.

Questo è in accordo con quanto riportato in letteratura: nessuno dei valori mostrati è inferiore a 10³ CFU per campione sia per *S. enterica* che per *C. jejuni* [Settanni & Corsetti, 2007; Braun & Methner, 2011; Techathuvanan & D'Souza, 2011; Elizaquível & Aznar, 2008; Leblanc-Maridor et al, 2011; Melero et al, 2011; Omiccioli et al, 2009].

La possibilità di studiare le popolazioni microbiche alla base di determinati processi in modo specifico e di monitorarle a livello qualitativo è invece mostrata dal lavoro svolto nella seconda fase di questa tesi.

Il riconoscimento dei microrganismi con tecniche basate sulla coltivazione richiedono tempi lunghi e forniscono informazioni limitate, seppur molto utili. La metagenomica, cioè lo studio del DNA genomico estratto direttamente dal campione ambientale,

applicata con tecniche di analisi di profilo come l'ARISA ha dimostrato fornire informazioni sulle diversità dei gruppi microbici presenti in determinate condizioni. Questo sistema automatizzato, affiancato allo studio mirato di rilevazione e quantificazione tramite Real Time PCR, sembra essere la giusta combinazione per ottenere un metodo polifasico più rapido, affidabile e sicuramente meno costoso e dispendioso in termini di conoscenze informatiche per analisi dei dati, delle nuove tecnologie di sequenziamento massivo ad oggi in via di applicazione.

Sono stati identificati alcuni dei microrganismi coinvolti nel ciclo dell'azoto, presenti nei sedimenti vegetati da *V. spiralis*. E' stato compreso che la presenza della macrofita radicata influisce, seppur in modo limitato, sulla diversità microbica, soprattutto in base allo stadio di sviluppo della pianta. Sono stati infine selezionati i geni alla base delle reazioni chiave del metabolismo dell'azoto che potrebbero essere coinvolte nell'utilizzo di tale elemento da parte dei microrganismi all'interno dei sedimenti raccolti in un sistema fluviale eutrofico, in relazione alla presenza di una macrofita sommersa, ecologicamente interessante. Tutte queste informazioni saranno utili per mettere a punto un sistema di rilevazione e quantificazione dei batteri correlati all'elemento azoto, basato sulla qPCR. Questo permetterebbe, non solo di comprendere maggiormente il ruolo della comunità microbica nel sistema studiato, ma anche di monitorare i cambiamenti che avvengono all'interno delle singole popolazioni (batteri denitrificanti, batteri nitrificanti, batteri azotofissatori, ecc), considerato che dai dati emersi probabilmente sono rappresentate tutte le possibili vie di utilizzo dell'azoto, ma variano quantitativamente in base ai parametri stagionali del sistema stesso.

Nonostante non esista una singola tecnica molecolare basata sul DNA in grado di rispondere a tutti i quesiti relativi al mondo microbico, tale tesi ha dimostrato che molti metodi sono disponibili, che la messa a punto è sicuramente la parte più complessa da attuare ma, una volta effettuata, l'esperienza acquisita permette il trasferimento delle metodica a diverse matrici, e fornisce sempre più applicazioni, sia in campo alimentare che in sistemi ambientali complessi, in ambiti non solo di ricerca ma anche industriali, riducendo, oltre ai tempi di analisi, anche i costi annessi.

14. Letteratura

Albuquerque P., Mendes M.V., Santos C.L., Moradas-Ferreira P., Tavares F. (2009). DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Science of Total Environment*, **407**: 3641-3651.

Alef K., Nannipieri P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Stratford Books, United Kingdom, pp 608.

Amann R., Schleifer K.H. (2005). Nucleic acid probes and their application in environmental microbiology. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume Two. Springer, New York, pp. 67-82.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**: 143-169.

Arora P., Sindhu A., Dilbaghi N., Chaudhury A. (2011). Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. Review. *Biosensors and Bioelectronics*, **28**: 1-12.

Aureli P., Orefice L. (2006). Alimentazione sicura in ambito domestico: obiettivi e raccomandazioni per la prevenzione e sorveglianza delle tossinfezioni alimentari. Rapporti ISTISAN 06/27. Istituto Superiore della Sanità, Roma, pp 1-38.

Baldwin B.R., Nakatsu C.H., Nies L. (2003). Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3350–3358.

Bambauer A., Rainey F.A., Stackebrandt E., Winter J. (1998). Characterization of *Aquamicrobium defluvii* gen. nov. sp. nov., a thiophene-2-carboxylate-metabolizing bacterium from activated sludge. *Archives of Microbiology*, **169**: 293-302.

Barer M.R., Harwood C.R. (1999). Bacterial viability and culturability. *Advances in Microbial Physiology*, **41**: 93-137.

Barko J.W., Gunnison G., Carpenter S.R. (1991). Sediment interactions with submersed macrophyte growth and community dynamics. *Aquatic Botany*, **41**: 41-65.

- Barko J.W., Smart R.M. (1986). Sediment-related mechanisms of growth limitation in submersed macrophytes. *Ecology*, **67**: 1328-1340.
- Bartosik D., Szymanik M., Baj J. (2003). Identification and distribution of insertion sequences of *Paracoccus solventivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 7002-7008.
- Bedford B.L., Bouldin D.R., Beliveau B.D. (1991). Net oxygen and carbon-dioxide balances in solutions bathing roots of wetland plants. *Journal of Ecology*, **79**: 943-959.
- Bernot M.J., Dodds W.K. (2005). Nitrogen retention, removal, and saturation in lotic ecosystems. *Ecosystems*, **8**: 442-453.
- Birch L., Dawson C.E., Cornett J.H., Keer J.T. (2001). A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Letters in Applied Microbiology*, **33**: 296-301.
- Borneman J., Triplett E. W. (1997). Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2647-2653.
- Botteldoorn N., Van Coillie E., Rasschaert G., Debruyne L., Heyndrickx M., Herman L., Messens W. (2008). Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, **105**: 1909-1919.
- Boucher D., Laffaire J.B., Jaziri F., David C., Biderre-Petit C., Duquenne P., Peyretailade E., Peyret P. (2011). Bacterial community composition of biological degreasing systems and health risk assessment for workers. *Microbial Ecology*, **62**: 868-881.
- Braker G., Fesefeldt A., K.P. (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to Detect Denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 3769-3775.

- Braun S.D., Methner U. (2011). Comparison of DNA isolation methods and detection of *Salmonella* spp. from animal faeces and dust using *invA* real-time PCR. *Berliner und Munchener Tierarztichel Wochenschrift*, **124**: 177-185.
- Brown M.V., Schwalbach M.S., Hewson I, Fuhrman A. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environmental Microbiology*, **7**: 1466-1479.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Plaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer T. (2009). The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. *Clinical Chemistry*, **55**: 611-622.
- Caffrey J.M., Kemp W.M. (1992). Influence of the submersed plant, *Potamogeton perfoliatus* L., on nitrogen cycling in estuarine sediments. *Limnology and Oceanography*, **37**: 1483-1495.
- Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P., Borin S., Puglia A.M., Rizzi A., Zanardini E., Sorlini C., Corselli C., Daffonchio D. (2004). Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *American Society of Microbiology*, **70**: 6147-6156.
- Carpenter S.R., Elser J.J., Olson K.M. (1983). Effects of roots of *Myriophyllum verticillatum* L. on sediment redox conditions. *Aquatic Botany*, **17**: 243-249.
- Casciotti K.L., Ward B.B. (2005). Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **52**: 197-205.
- Cedergreen N., Madsen T.V. (2003). Nitrate reductase activity in roots and shoots of aquatic macrophytes. *Aquatic Botany*, **76**: 203-212.
- Charles N., Williams S.K., Rodrick G.E. (2006). Effects of packaging systems on the natural microflora and acceptability of chicken breast meat. *Poultry Science*, **85**: 1798-1801.

Chen H.Y., Li X.K., Cui B.A., Wei Z.Y., Li X.S., Wang Y.B., Zhao L., Wang Z.Y. (2009). A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. *Journal of Virological Methods*, **156**: 84-88.

Cheng X., Li S. (2006). An analysis on the evolvement processes of lake eutrophication and their characteristics on the typical lakes in the middle and lower reaches Yangtze River. *Chinese Science Bulletin*, **51**: 1603-1613.

Clarke S.J. (2002). Vegetation growth in rivers: influences upon sediment and nutrient dynamics. *Progress in Physical Geography* **26**: 159-172.

Codex Alimentarius Commission (2009). Consideration of the methods for the detection and identification of foods derived from biotechnology. General approach and criteria for the methods. CX/MAS 05/26/9, pp 1-25.

Collins M.D., Jones D., Farrow J.A.E., Kilpper-Bälz R., Schleifer K.H. (1984). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **34**: 220-223.

Colmer T.D. (2003). Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment*, **26**: 17-36.

Corno G., Caravati E., Callieri C., Bertoni R. (2008). Effects of predation pressure on bacterial abundance, diversity, and size-structure distribution in an oligotrophic system. *Journal of Limnology*, **67**: 107-119.

Corry J.E.L., Jarvis B., Passmore S., Hedeges A. (2007). A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food microbiology*, **24**: 230-253.

Corsetti A., Settanni L. (2007). The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review. *Journal of Microbiological Methods*, **69**: 1-22.

Danovaro R., Luna G.M., Dell'Anno A., Pietrangeli B. (2006). Comparison of two fingerprinting techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 5982-5989.

Dave D., Abdel E.G. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* **6**: 486-510.

Demeke T., Jenkins R. G. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **396**: 1977-1990.

Denis M., Refrégier-Petton J., Laisney M.J., Ermel G., Salvat G. (2001). *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 255-267.

Dodds W.K. (2006). Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnology Oceanography*, **51**: 671-680.

Donovan P.K., Euzéby J.P., Goodhew C.F., Wood A.P. (2006). Redefining *Paracoccus denitrificans* and *Paracoccus pantotrophus* and the case for a reassessment of the strains held by international culture collections. *Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**: 2495-2500.

Dover J.E., Hwang G.M., Mullen E.H., Prorok B.C., Suh S.J. (2009). Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents. *Journal of Microbiological Methods*, **78**: 10-19.

Doyle M.P., Erickson M.C. (2006). Reducing the Carriage of Foodborne Pathogens in Livestock and Poultry. *Poultry Science*, **85**: 960-973.

EFSA (2006). Opinion of the scientific panel on biological hazards and of scientific panel on animal health and welfare on “Review of the Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004”. *The EFSA Journal*, **403**: 1-62.

EFSA (2010a). Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *The EFSA Journal*, **8**: 1487-1525.

EFSA (2010b). Scientific Opinion on the link between *Salmonella* criteria at different stages of the poultry production chain. *The EFSA Journal*, **8**(3): 1545-1610.

EFSA (2010c). Analyses of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. *The EFSA Journal*, **8**: 1503-1602.

Elizaquível P., Aznar R. (2008). A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiology*, **25**: 705-713.

Enyola K.I., Olayemi A. B. (2008). Linear alkylbenzene sulfonate tolerance in bacteria isolated from sediment of tropical water bodies polluted with detergents. *Revista de Biologia Tropical*, **56**: 1595-1601.

Fisher M.M., Triplett E.W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 4630-4636.

Fries M.R., Hopkins G.D., McCarty P.L., Forney L.J., Tiedje J.M. (1997). Microbial succession during a field evaluation of phenol and toluene as the primary substrates for trichloroethene cometabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 1515–1522.

Fry B.N., Korolik V., ten Brinke J.A., Pennings M.T.T., Zalm R., Teunis B.J.J., Coloe P.J., van der Zeijst B.A.M. (1998). The lipopolysaccharide biosynthesis locus of *Campylobacter jejuni* 81116. *Microbiology*, **144**: 2049-2061.

Fukushima H., Tsunomori Y., Seki R. (2003). Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 5134-5146.

Galan J.E., Ginocchio C., Costeas P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology*, **174**: 4338–4349.

Garcia J. L., Cayol J. L., Verhe F., Fardeau M.L., Ollivier B. (2002). Characterization of six new species of denitrifying *Bacillus* from tropical rice soils. *Unpublished*.

García R., Bælum J., Fredslund L., Santorum P., Jacobsen C.S. (2010). Influence of temperature and predation on survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of *invA* in soil and manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 5025-5031.

Garcia-Vallve S., Palau J., Romeu A. (1999). Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, **9**:1125-1134.

Gich F.B., Amer E., Figueras J.B., Abella C.A., Balaguer M.D., Poch M. (2000). Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *International Microbiology*, **3**: 103–106.

González-Escalona N., Hammack T.S., Russell M., Jacobson A.P., De Jesús A.J., Brown E.W., Lampel K.A. (2009). Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-based quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR targeting *invA* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 3714-3720.

Graziani C., Galetta P., Busani L., Dionisi A.M., Filetici E., Ricci A., Caprioli A., Luzzi I. (2005). Le infezioni da Salmonella: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. Rapporti ISTISAN 05/27. Istituto Superiore della Sanità, Roma, pp 1-49.

Hale S.E., Meynet P., Davenport R.J., Jones D.M., Werner D. (2010). Changes in polycyclic aromatic hydrocarbon availability in River Tyne sediment following bioremediation treatments or activated carbon amendment. *Water Research*, **44**: 4529-4536.

Handelsman J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**: 669-685.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**:986-994.

Heilman M., Carlton R.G. (2001). Methane oxidation associated with submerged vascular macrophytes and its impact on plant diffusive methane flux. *Biogeochemistry*, **52**: 207-224.

Hemminga M.A. (1998). The root/rhizome system of seagrasses: an asset and a burden. *Journal of Sea Research*, **39**: 183-196.

Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 5181-5189.

Hernandez M.E., Mitsch W. J. (2007). Denitrification in created riverine wetlands: influence of hydrology and season. *Ecological Engineering*, **30**: 78-88.

Herrmann M., Saunders M., Schramm A. (2009). Effect of lake trophic status and rooted macrophytes on community composition and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 3127-3136.

Hewson I., Fuhrman A.J. (2004). Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3425-3433.

Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., Fach P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 1863-1868.

Jarquín R., Hanning I., Ahn S., Ricke S.C. (2009). Development of rapid detection and genetic characterization of *Salmonella* in poultry breeder feeds. *Sensors*, **9**: 5308-5323.

Justé A., Thomma B.P.H.J., Lievens B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, **25**: 745-761.

Keer J.T., Birch L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods*, **53**: 175-183.

Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**: 169-187.

Kent A.D., Triplett E.W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, **56**: 211-236.

Kim L.H., Lee S.S. (2011). Isolation and characterization of ethylbenzene degrading *Pseudomonas putida* E41. *The Journal of Microbiology*, **49**: 575-584.

Knaebel DB, Crawford RL. (1995). Extraction and purification of microbial DNA from petroleum-contaminated soils and detection of low numbers of toluene, octane and pesticide degraders by multiplex polymerase chain reaction and Southern analysis. *Molecular Ecology*, **4**: 579-591.

Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia oxidizing marine archaeon. *Nature*, **437**: 543-546.

Kovacs A., Yacoby K. Gophna U. (2010). A systematic assessment of Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. *Research in Microbiology*, **161**: 192-197.

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombon L., Stahlberg A., Zoric N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. Review. *Molecular aspects of Medicine*, **27**: 95-125.

Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. John Wiley and Sons: Chichester, pp 177-203.

Leblanc-Maridor M., Beaudeau F., Seegers H., Denis M., Belloc C. (2011). Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. *BioMed Central Microbiology*, **11**: 113-128.

Leitgib L., Kálmán J., Gruiz K. (2007). Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, **66**: 428-434.

Les D.H., Jacobs S.W.L., Tippery N.P., Chen L., Moody M.L., Wilstermann-Hildebrand M. (2008). Systematics of *Vallisneria* (Hydrocharitaceae). *Systematic Botany*, **33**: 49–65.

Lin X., Kennedy D., Peacock A., McKinley J., Resch C.T., Fredrickson J., Konopka A. (2011). Distribution of microbial biomass and the potential for anaerobic respiration in Hanford Site 300 Area subsurface sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, ahead of print.

Lipski A., Reichert K., Reuter B., Spröer C., Altendorf K. (1998). Identification of bacterial isolates from biofilters as *Paracoccus alkenifer* sp. nov. and *Paracoccus solventivorans* with emended description of *Paracoccus solventivorans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**: 529-536.

Liu J., Gratz J., Maro A., Kumburu H., Kibiki G., Taniuchi M., Howlader A.M., Sobuz S.U., Haque R., Talukder K.A., Qureshi S., Zaidi A., Haverstick D.M., Houpt E.R. (2011). Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-Luminex assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**: 98-103.

Maciorowski K.G., Pillai S.D., Jones F.T., Ricke S.C. (2005). Polymerase Chain Reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. *Critical Review in Microbiology*, **31**: 45-53.

Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. Review Article. *Environmental International*, **34**: 265-276.

Melero B., Cocolin L., Rantsiou K., Jaime I., Rovira J. (2011). Comparison between conventional and qPCR methods for enumerating *Campylobacter jejuni* in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, **28**: 1353-1358.

Mohan S.B., Schmid M., Jetten M., Cole J. (2004). Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in

the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**: 433-443.

Muehe E.M., Gerhardt S., Schink B., Kappler A. (2009). Ecophysiology and the energetic benefit of mixotrophic Fe(II) oxidation by various strains of nitrate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **70**: 335-343.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Siaki R., Horn G. and Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**: 263-273.

Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, **148**: 257-266.

Nesme X., Normand P. (2004). Easy individual strain and community typing by rDNA ITS1 analysis. *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands. **3.09**: 671-688.

Nocker A., Burr M., Camper A.K. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, **54**: 276-289.

Novinscak A., Surette C., Filion M. (2007). Quantification of *Salmonella* spp. in composted biosolids using a TaqMan qPCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, **70**: 119-126.

Novinscak A., Surette C., Filion M. (2007). Quantification of *Salmonella* spp. in composted biosolids using a TaqMan qPCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, **70**: 119-126.

O'Regan E., McCabe E., Burgess C., McGuinness S., Barry T., Duffy G., Whyte P., Fanning S. (2008). Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BioMed Central Microbiology*, **8**: 156-166.

Oliver J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**: 415-425.

Olsen J.E. (2000). DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Research International*, **33**: 257-266.

Omiccioli E., Amagliani G., Brandi G., Magnani M. (2009). A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiology*, **26**: 615-622.

Palyada K., Threadgill D., Stintzi A. (2004). Iron Acquisition and Regulation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, **186**: 4714-4729.

Papaefthimiou D., Hrouzek P., Mugnai M.A., Lukesova A., Turicchia S., Rasmussen U., Ventura S. (2008). Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. *Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**: 553-564.

Pasquali F., De Cesare A., Manfreda G. and Franchini A. (2011). Campylobacter control strategies in European poultry production. Reviews. *Worlds Poultry Science Journal*, **67**: 5-18.

Pinardi M., Bartoli M., Longhi D., Marzocchi U., Laini A., Ribaud C., Viaroli L. (2009). Benthic metabolism and denitrification in river reach: a comparison between vegetated and bare sediments. *Journal of Limnology*, **68**: 133-145.

Popa Ra., Popa Ro., Mashall M.J., Nguyen H., Tebo B.M., Brauer S. (2009). Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, **78**: 111-118.

Popoff M.Y., Le Minor L.E. (2005). Genus XXXIII. Salmonella. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Two. The Proteobacteria. Part B The gammaproteobacteria. Springer, New York, pp. 764-799.

Racchetti E. (2009). Carichi azotati generati, bilanci di massa ed export netto e regolazione del processo di rimozione del nitrato: una prospettiva a livello di bacino idrografico. XXII ciclo di Dottorato di Ricerca in Ecologia. Parma, pp 38-40.

Racchetti E., Bartoli M., Ribaud C., Longhi D., Naldi M., Iacumin P. (2010). Short term changes in pore water chemistry in river sediments during the early colonization by *Vallisneria spiralis*. *Hydrobiologia*, **652**: 127-137.

Rahn K., De Grandis S.A., Clarke R.C., McEwen S.A., Galan J.E, Ginocchio C., Curtiss R. and Gyles C.L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cell Probe*, **6**: 271-279.

Ranjard I., Poly F., Lata J.C., Mougél C., Thioulouse J., Nazaret S. (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 4479-4487.

Reeb V., Kolel A., McDermott T.R., Bhattacharya D. (2011). Good to the bone: microbial community thrives within bone cavities of a bison carcass at Yellowstone National Park. *Environmental Microbiology*, **13**: 2403-2415.

Regolamento (CE) N. 1441/2007 (2007). *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*. L322, 05.12.2007, pp 12-29.

Regolamento (CE) N. 2073/2005 (2005). *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*. L338, 22.12.2005, pp 1-26.

Rhodes G., Saunders J.R., Pickup R.W. (2000). Detection and distribution of insertion sequence 1 (IS1)-containing bacteria in the freshwater environment. *FEMS Microbiology Ecology*, **34**: 81-90.

Risgaard-Petersen N., Dalsgaard T., Rysgaard S., Christensen P.B., Borum J., McGlathery K., Nielsen L.P. (1998). Nitrogen balance of a temperate eelgrass *Zostera marina* bed. *Marine Ecology Progress Series*, **174**: 281-291.

Roeselers G., Stal L.J., van Loosdrecht M.C.M., Muyzer G. (2007). Development of a PCR for the detection and identification of cyanobacterial *nifD* genes. *Journal of Microbiological Methods*, **70**: 550-556.

Rohlf F.J. (1998). NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide. Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, New York 11733, pp 1-37.

Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4704-4712.

Sanangelantoni A.M. (2008). Il ruolo dei microrganismi in natura: i cicli degli elementi. Azoto. Microbiologia ambientale ed elementi di ecologia microbica. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 84-95.

Sand-Jensen K., Borum J. (1991). Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwater and estuaries. *Aquatic Botany*, **41**: 137-175.

Sand-Jensen K., Borum J., Binzer T. (2005). Oxygen stress and reduced growth of *Lobelia dortmanna* in sandy lake sediments subject to organic enrichment. *Freshwater Biology*, **50**: 1034-1048.

Schleifer K.H., Kilpper-Bälz R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **34**: 31-34.

Schmid M.C., Hooper A.B., Klotz M.G., Woebken D., Lam P., Kuypers M.M.M., Pommerening-Roeser A., op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M. (2008). Environmental detection of octahaem cytochrome *c* hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, **10**: 3140-3149.

Schramm W. (1999). Factors influencing seaweed responses to eutrophication: some results from EU-project EUMAC. *Journal of Applied Phycology*, **11**: 69-78.

Sigler W. V., Zeyer J. (2002). Microbial diversity and activity along the forefields of two receding glaciers. *Microbial Ecology*, **43**: 397-407.

Siller H., Rainey F.A., Stackebrandt E., Winter J. (1996). Isolation and characterization of a new Gram-negative, acetone-degrading, nitrate-reducing bacterium from soil, *Paracoccus solventivorans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**: 1125-1130.

Skerman V.B.D., Mc Gowan V., Sneath P.H.A. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **30**: 225-420.

Skovgaard N. (2007). New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, **120**: 217-224.

Smith C.J., Osborn M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. Minireview. *FEMS Microbial Ecology*, **67**: 6-20.

Spear J.B., Fuhrer J., Kirby B.D. (1988). *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: case report and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**: 598-599.

Stuart E.J., Shade A.L., McMahon K.D., Kent A.D. (2007). Comparison of primers sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of aquatic bacterial communities: an ecological perspective. *American Society of Microbiology*, **73**: 659-662.

Suzuki M.T., Taylor L.T., DeLong E.F. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assay. *Applied Environmental Microbiology*, **66**: 4605-4614.

Szymanski C.M., Yao R., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P. (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, **32**: 1022-1030.

Takai K., Horikoshi K. (2000). Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and Environmental microbiology*, **66**: 5066-5072.

- Techathuvanan C., D'Souza D.H. (2011). Optimization of rapid *Salmonella enterica* detection in liquid whole eggs by SYBR green I-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogen and Disease*, **8**: 527-534.
- Thevenon F., Regier N., Benagli C., Tonolla M., Adatte T., Wildi W., Poté J. (2011). Characterization of fecal indicator bacteria in sediments cores from the largest freshwater lake of Western Europe (Lake Geneva, Switzerland). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, ahead of print.
- Touchette B.W., Burkholder J.M. (2000). Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **250**: 133-167.
- Trevisani M., Albonetti S., Taffetani L., De Santis E., Giuffrida A., Flamigni L. (2002). Carne – Limiti di carica microbica ed accettabilità delle carni avicole fresche. *Industria alimentare*, **41**: 422-428.
- Validation List No. 66 (1998). Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**: 631-632.
- Vanparys B., Bodelier P., De Vos P. (2006). Validation of the correct start codon of *norX/nxrX* and universality of the *norAXB/nxrAXB* gene cluster in *Nitrobacter* species. *Current Microbiology*, **53**: 255-257.
- Vartapetian B.B., Jackson M.B. (1997). Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany*, **79**: 3-20.
- Veraart A.J., de Bruijne W.J.J., de Klein J.J.M., Peeters E.T.H.M., Scheffer M. (2011). Effect of aquatic vegetation type on denitrification. *Biogeochemistry*, **104**: 267-274.
- Wallis T.S., Galyov E.E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molecular Microbiology*, **36**: 997-1005.
- Wertz S., Poly F., Le Roux X., Degrange V. (2008). Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxA* sequences in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **63**: 261-271.

Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**: 6578-6583.

Widmer F., Shaffer B.T., Porteous L.A., Seidler R.J. (1999). Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir forest site in the Oregon Cascade Mountain range. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 374-380.

Woods D.F., Reen F.J., Gilroy D., Buckley J., Frye J.G., Boyd E.F. (2008). Rapid multiplex PCR and Real-Time TaqMan PCR assays for detection of *Salmonella enterica* and the highly virulent serovars Choleraesuis and Paratyphi C. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 4018-4022.

Xia X., Zhou Z., Zhou C., Jiang G., Liu T. (2011). Effects of suspended sediment on the biodegradation and mineralization of phenanthrene in river water. *Journal of Environmental Quality*, **40**: 118-125.

Yabuuchi E., Kawamura Y., Kosako Y., Ezaki T. (1998). Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Rüger and Tan) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, **42**: 429-438.

Yuan S.Y., Li H.T., Huang H.W., Chang B.V. (2010). Biodegradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment and the microbial community changes. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **45**: 360-365.

Zhang X., Sun L., Ma X., Sui X.H., Jiang R. (2011). *Rhizobium pseudoryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**: 2425-2429.

Zinder S.H., Salyers A.A. (2005). Microbial ecology – new directions, new importance. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume Two. Springer, New York, pp. 101-109.

Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum J. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, **32**: 103e.

Ringraziamenti e riconoscimenti

Ringrazio il Prof. Nelson Marmioli e il Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università degli Studi di Parma per l'ospitalità nello svolgimento del dottorato di ricerca, in modo particolare la Prof.ssa Anna Maria Sanangelantoni con la quale ho strettamente collaborato per questi tre anni di lavoro, per tutte le esperienze di condivisione della Scienza che mi ha permesso di vivere e incontrare.

Ringrazio la Dott.ssa Caterina Agrimonti per l'attenzione e l'ascolto prestatomi durante tutto il percorso assieme. Ringrazio la Prof.ssa Elena Maestri che mi ha coordinato durante il lavoro relativo al Progetto Integrato del VI Programma Quadro della Commissione Europea *CHILL – ON “Sviluppo e integrazione di nuove tecnologie per migliorare la sicurezza, la trasparenza, la qualità e quindi la tracciabilità lungo la filiera del prodotto refrigerato e congelato. Casi analizzati: pesce e pollo”*.

Ringrazio la Dott.ssa Patrizia Pesente della ditta AIA SpA in Verona, la Dott.ssa Giulia Amagliani del Dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università di Urbino.

Ringrazio il Dott. Marco Bartoli, la Dott.ssa Elisa Soana, la Dott.ssa Erica Racchetti e il Dott. Rossano Bolpagni del Gruppo di Ecologia del Prof. Pierluigi Viaroli, in modo particolare la Dott.ssa Soana per il grande aiuto prestatomi nella stesura della tesi.

Ringrazio la Dott.ssa Elisa Sgarbi, della Dott.ssa Benedetta Bottari e della Dott.ssa Marcela Santarelli del Gruppo di Microbiologia del Prof. Erasmo Neviani e Prof.ssa Monica Gatti, per l'ospitalità e l'aiuto nella messa a punto di una tecnica.

Ringrazio ogni Collaboratore della Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali che mi è stato vicino nei momenti di sconforto e di allegria.