

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA DI VITERBO**

**DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E
AGROCHIMICA**

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

**BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI
XIX CICLO**

**Sviluppo di metodiche molecolari per il
rilevamento rapido di *Pseudomonas* in matrici
alimentari e ambientali**

(CHIM/11)

Coordinatore: Prof. Mauro Moresi

Tutor: Prof. Maurizio Ruzzi

Dott.ssa Cecilia Calisti

INDICE

	RIASSUNTO	1
	ABSTRACT	2
1	INTRODUZIONE	3
1.1	Controllo microbiologico	4
1.2	Metodi convenzionali	7
1.2.1	Procedure quantitative	7
a	Metodo della conta su piastra	7
b	Metodo del most probable number (MPN)	9
1.2.2	Procedure qualitative	9
1.3	Metodi rapidi	10
a	Metodi immunologici	10
b	Metodi di amplificazione degli acidi nucleici	12
1.3.1	Polymerase chain reaction (PCR)	13
1.3.2	Multiplex PCR	20
1.3.3	Real-time PCR	22
1.3.3.1	EMA real-time PCR	28
1.3.4	Standardizzazione e validazione della PCR	31
1.3.5	Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)	38
1.4	Nucleic acid fingerprinting	44
1.4.1	Denaturing gel electrophoresis (DGE)	46
1.4.2	Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA)	49
1.4.3	Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)	51
1.4.4	Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)	53
1.4.5	Approcci polifasici	62
1.5	Genere <i>Pseudomonas</i>	64
	Tassonomia	65
	Caratterizzazione	70
	Ecologia	73
2	MATERIALI E METODI	74
2.1	Microrganismi utilizzati nei test di inclusività/esclusività	75
2.2	Terreni culturali	76

2.3	Condizioni di crescita	77
2.4	Vettori di clonaggio	77
2.5	Preparazione di cellule competenti e trasformazione di <i>E.coli</i>	78
2.6	Estrazione del DNA plasmidico	79
2.7	Separazione elettroforetica di molecole di DNA	79
2.8	Sequenziamento del DNA	80
2.9	Estrazione di DNA genomico mediante il “Genomic DNA Purification Kit” (Fermentas)	80
2.10	Estrazione di DNA genomico mediante il “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen)	80
2.11	Estrazione di DNA genomico mediante il kit “PrepMan Ultra” (Applied Biosystems)	80
2.12	Preparazione dei campioni per l’analisi T-RFLP	81
2.12.1	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	81
2.12.2	Programmi PCR	82
2.12.3	Primers utilizzati per l’analisi T-RFLP	83
2.12.4	Purificazione dei prodotti di amplificazione	83
2.12.5	Digestione del DNA con enzimi di restrizione per analisi T-RFLP	84
2.12.6	Elettroforesi con sequenziatore automatico	84
2.13	PCR real-time	85
2.14	Primers utilizzati	87
2.15	Determinazione del numero di cellule mediante conta diretta al microscopio	88
3	RISULTATI E DISCUSSIONE	89
3.1	Metodologie basate sulla PCR	90
3.1.1	Valutazione della specificità dei primers su DNA di colture pure	91
3.1.2	Valutazione della specificità dei primers su DNA metagenomico	92
3.1.3	Disegno di nuove coppie di primers	95
3.2	Multiplex PCR	103
3.3	Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)	106
3.3.1	Analisi T-RFLP di metagenoma da soluzioni nutrienti emendate con N-Serve	108
3.3.2	Analisi T-RFLP di metagenoma ottenuto da scarti della produzione di funghi eduli	113
3.4	Real-time PCR	119
3.5	PCR-RFLP	126

3.6	Ricerca di <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	132
3.7	Estrazione di DNA da matrici alimentari	134
4	CONCLUSIONI	138
4.1	Metodologie basate sulla PCR	139
4.2	Multiplex PCR	140
4.3	T-RFLP	141
4.4	Real-time PCR	141
4.5	PCR-RFLP ed identificazione di <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	142
4.6	Estrazione di DNA da matrici alimentari	142
5	BIBLIOGRAFIA	143
6	APPENDICE	181

Riassunto

Il genere *Pseudomonas* include batteri gram negativi aerobi, eterotrofi, che sono particolarmente versatili dal punto di vista metabolico e sono in grado di contaminare un ampio spettro di alimenti (latticini, uova, pesce, carne e vegetali) e di determinarne il deterioramento. Alcune forme, ascrivibili alle specie *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, possono essere patogeni opportunistici per piante, animali ed esseri umani e, data la loro capacità di formare biofilm, risultano spesso resistenti a trattamenti con antibiotici ad ampio spettro.

Tradizionalmente l'identificazione e caratterizzazione di *Pseudomonas* viene condotta utilizzando test fenotipici classici come crescita su terreni specifici, reazioni enzimatiche ed analisi morfologica e microscopica. Questi metodi oltre a richiede tempo talvolta non permettono di effettuare identificazioni precise in particolare per ceppi appartenenti a specie eterogenee come *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. syringae* (Grimont et al., 1996). Questo progetto di dottorato ha riguardato pertanto lo sviluppo di metodiche molecolari innovative per identificare e tracciare la presenza di microrganismi appartenenti al genere *Pseudomonas* in matrici alimentari e ambientali. Utilizzando primers specifici per il DNA ribosomiale 16S, è stato possibile discriminare, mediante PCR, batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* da altre forme microbiche. In parallelo è stato sviluppato un protocollo di multiplex PCR, basato sull'amplificazione simultanea dei geni per il 16S rRNA e per la subunità beta della RNA polimerasi (*rpoB*) che ha permesso di aumentare la specificità del test molecolare e di discriminare i *Pseudomonas* da batteri appartenenti a generi strettamente correlati da un punto di vista tassonomico (come ad esempio i *Marinomonas*). Il protocollo di PCR specifico per il DNA ribosomiale 16S in combinazione con la tecnica della T-RFLP ha permesso di effettuare identificazioni tassonomiche a livello di specie senza ricorrere a procedure di prearricchimento o all'isolamento e alla coltivazione in piastra dei ceppi ambientali. È stato anche sviluppato un protocollo di PCR real-time, avente come bersaglio il DNA ribosomiale 16S, che ha permesso di aumentare la sensibilità e la rapidità del test diagnostico che, partendo da DNA, può essere eseguito in circa 30 minuti. Infine è stato messo a punto un protocollo di RFLP-PCR, specifico per il gene che codifica la subunità B

della DNA girasi (*gyrB*), che è risultato utile per l'identificazione rapida di batteri appartenenti alla specie *P. aeruginosa*: patogeni opportunistici ben noti per la loro capacità di crescere in acqua distillata e di sopravvivere nei disinfettanti e che comunemente sono utilizzati come indicatore per valutare la qualità delle acque destinate al consumo umano.

Prove condotte su campioni di DNA ambientale di diversa provenienza (metagenoma della comunità microbica presenti in reattori biologici a cellule adese, scarti agricoli e latte contaminato) hanno permesso di dimostrare che le metodiche molecolari sviluppate nell'ambito di questo progetto di dottorato sono più accurate di quelle precedentemente descritte in letteratura.

Abstract

Main goal of this PhD project was to develop a rapid, efficient and sensitive procedures to identify and trace dissemination of pathogenic and spoilage *Pseudomonas* species in foods and environments. In this work, the molecular identification of *Pseudomonas* species was achieved using new PCR-based assays with primer sets specific for 16S ribosomal DNA, *rpoB* and *gyrB* genes. These PCR assays were found to provide highly genus-specific detection and could be successfully used to identify *Pseudomonas* in microbial consortia where these bacteria were not abundant. By coupling the PCR assay for 16S rDNA gene to a T-RFLP technique, identification of *Pseudomonas* strains at species level could be obtained without cultivation. PCR with a combination of two target sequences (multiplex PCR) appeared to be the optimum choice for discriminating between *Pseudomonas* and closely related genera. Finally, we demonstrated that direct detection and identification of *P. aeruginosa* in environmental samples can be achieved using a PCR technique based on the detection of *gyrB*. RFLP analysis of this latter gene can be also used for discriminating between *P. aeruginosa* and *P. putida*/*P. fluorescens* species.

1 INTRODUZIONE

1.1 Controllo microbiologico

Batteri, virus ed altri microrganismi sono ampiamente diffusi in natura e in presenza di nutrienti e in condizioni favorevoli di umidità e temperatura possono diffondersi facilmente e rapidamente. Molti microrganismi sono strettamente associati con piante o animali a formare relazione benefiche. Tuttavia, certi microrganismi, potenzialmente dannosi, possono provocare malattie nell'uomo e/o negli animali. I batteri sono presenti nel suolo, nelle acque marine e di estuario, nel tratto intestinale di animali o in acque contaminate da materiale fecale. Con la consapevolezza che l'ambiente può servire da serbatoio per i patogeni umani, lo sviluppo di metodologie per il rilevamento rapido e sicuro di microrganismi, è una priorità sia per la ricerca microbiologica che per quella biotecnologia. Sebbene la ricerca, l'enumerazione e l'identificazione di batteri patogeni da campioni ambientali, quali suolo e acqua, sia stata affrontata sotto diversi aspetti, recentemente molta attenzione è stata rivolta anche alla sicurezza alimentare. Per moltissimi anni la sicurezza microbiologica degli alimenti è stata gestita con gli stessi criteri, sostanzialmente di sorveglianza analitica, che venivano applicati ai rischi di tipo chimico. Ma mentre le sostanze chimiche sono distribuite nel cibo in maniera omogenea, un microrganismo è al contrario distribuito in modo stratificato, disomogeneo, e per di più mentre una tossina chimica è costante nella sua concentrazione, che non subisce modificazioni, la concentrazione di un microrganismo cambia col tempo. Quindi un approccio classico di verifica analitica non potrà mai essere efficace nel prevenire malattie alimentari. Per garantire sicurezza al consumatore è necessario prima di tutto accertarsi che le materie prime non siano contaminate con microrganismi indesiderati (portatori di malattie o alteranti), eliminare o ridurre a livelli non pericolosi per la salute i microrganismi presenti e, infine, verificare che il prodotto non venga nuovamente contaminato. In questo modo l'eventualità di danni per la salute, e collateralmente per la qualità organolettica dell'alimento, dovrebbero essere eliminati.

I microrganismi presenti negli alimenti possono essere classificati in:

- ❖ alteranti
- ❖ indicatori
- ❖ patogeni

I microrganismi alteranti determinano il deterioramento degli alimenti, che si rende visibile quando i componenti del campione subiscono delle demolizioni alterative ad opera di enzimi prodotti dai microrganismi. Lo scadimento qualitativo dei prodotti attaccati da enzimi microbici è imputabile a:

- a) modificazioni di uno o più attributi caratteristici del prodotto
- b) accumulo di metaboliti microbici che conferiscono caratteristiche insolite al prodotto invaso dalle cellule microbiche.

Il deterioramento di un alimento ad opera di microrganismi può interessare l'aspetto, l'odore, il sapore o, più spesso, l'insieme di queste caratteristiche.

Alcuni batteri, non direttamente pericolosi per la salute, e non necessariamente implicati nei processi deteriorativi, vengono chiamati "indicatori" e svolgono egregiamente il loro ruolo di "spie" della qualità microbiologica di produzione e della possibile co-presenza di pericoli per la salute umana. All'interno del gruppo dei batteri gram-negativi è consuetudine utilizzare l'intera famiglia delle Enterobacteriaceae, oppure la parte di essa conosciuta come "coliformi", per valutare l'andamento della maggior parte dei trattamenti di conservazione.

Delle numerose specie di microrganismi che possono essere presenti in un alimento solo una piccola parte è in grado di provocare malattie al consumatore: si tratta dei batteri patogeni. Questi possono essere classificati in patogeni convenzionali e patogeni condizionati o opportunistici. I primi sono in grado di causare infezione e malattia nell'ospite con normali difese immunitarie, mentre i secondi attaccano solamente individui con sistema immunitario compromesso.

Negli alimenti sono stati identificati un numero crescente di microrganismi patogeni per l'uomo (Swaminathan and Feng, 1994; McNamara, 1998; Slutsker et al., 1998). Le malattie di natura alimentare, "foodborne", continuano ad essere un comune e serio pericolo per la salute pubblica nel mondo. La maggior parte delle malattie foodborne sono associate con sintomi gastrointestinali acuti come diarrea e vomito. Qualche malattia è più seria e risulta pericolosa per la vita, particolarmente per i bambini dei paesi in via di sviluppo dove le infezioni possono divenire croniche o causare infermità. Negli ultimi anni una maggiore

attenzione riguardo alla sicurezza alimentare ha portato ad una minore incidenza di particolari malattie foodborne in alcune regioni. Per esempio, nel 2000 nel Regno Unito la salmonellosi ha registrato il livello più basso dal 1985, con una diminuzione del 54% nel numero di casi riportati. Una riduzione di casi di salmonellosi è stata anche osservata negli Stati Uniti (Olsen et al., 2001). Recentemente sono stati osservati in Inghilterra e negli Stati Uniti una diminuzione nel numero di listeriosi, tuttavia per alcuni patogeni come *Campylobacter*, il numero di malattie ad esso associate continua ad aumentare. Negli Stati Uniti è stato stimato che si verificano ogni anno 76 milioni di casi di malattie infettive trasmesse per via alimentare, con 325000 ospedalizzazioni e 5000 decessi (Mead et al., 1999). Lo spettro dei patogeni trasmessi per via alimentare è molto ampio ed include batteri enterici, aerobi e anaerobi, patogeni virali, parassiti e batteri che producono tossine nei pesci e nei frutti di mare. Per esempio, *Escherichia coli* O157:H7, uno dei più importanti patogeni alimentari (Allerberger et al., 1996; Altekruse et al., 1997; Bell et al., 1994), produce grandi quantità di un enzima che determina coliti emorragiche e causa seri pericoli per la salute. I microrganismi che determinano il maggior numero di malattie di natura alimentare sono virus Norwalk-like, seguiti da *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Giardia lamblia*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e *Toxoplasma gondii*, ma nella maggior parte dei casi (82%) l'agente infettivo è difficile da isolare (Maslanka et al., 2001; Robert, 2002). Analizzando i casi di decesso determinati da malattie infettive si può osservare che essi sono principalmente dovuti (75%) a infezioni da *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, e *Toxoplasma* (Malanska et al., 2001). Inoltre, va tenuto presente che il numero di patogeni, cosiddetti "food-borne", che vengono scoperti continua ad aumentare in modo significativo (Mead et al., 1999). Pertanto la disponibilità di tests rapidi e accreditati, per il rilevamento della presenza/assenza dei comuni patogeni, o per la determinazione del grado di contaminazione microbica (anche da forme responsabili delle alterazioni degli alimenti) è un'esigenza sempre più forte per il settore agro-alimentare.

1.2 Metodi convenzionali

I metodi tradizionali per il rilevamento di microrganismi in campioni alimentari ed ambientali possono essere divisi in due gruppi:

- quantitativi o enumerativi, nei quali viene determinato il numero di un gruppo di microrganismi presenti nel campione e il risultato viene espresso come numero di organismi presenti per unità in peso di campione
- qualitativi o presenza/assenza, nei quali viene richiesto semplicemente di rilevare se un particolare organismo è presente o assente in un dato campione.

La base dei metodi utilizzati per rilevare microrganismi in una matrice alimentare consiste nel mettere il campione da analizzare (previo opportuni trattamenti di omogeneizzazione, macinazione o concentrazione) in terreno nutritizio idoneo per i microrganismi che si intende ricercare, e valutare visivamente, dopo 24-48-72 ore, l'eventuale crescita microbica. Tali metodi sono semplici adattabili, convenienti e non dispendiosi. Tuttavia essi presentano due svantaggi, sono lenti e laboriosi; la crescita microbica, in condizioni di laboratorio, può richiedere diversi giorni.

1.2.1 Procedure quantitative

L'enumerazione dei microrganismi presenti nei campioni da analizzare viene generalmente eseguita mediante i metodi di conta su piastra o del most probable number (MPN). Il primo metodo è il più utilizzato, mentre il secondo è utilizzato, principalmente, per la ricerca di *E. coli* o dei coliformi.

a. Metodo della conta su piastra

Il metodo consiste nel piastrare aliquote del campione (o di una sospensione in fase acquosa) su piastre Petri contenenti terreno nutritizio agarizzato. Organismi individuali o piccoli gruppi di organismi occuperanno un discreto spazio sull'agar e durante il periodo di incubazione cresceranno a formare colonie discrete che possono poi essere contate. A tale scopo, possono essere utilizzati vari tipi di terreni agarizzati, a seconda dei microrganismi che si vogliono ricercare. L'uso di terreno nutritizio non selettivo, con incubazione a 30°C in condizioni aerobiche, risulterà in una conta totale delle forme vitali e coltivabili, o conta dei mesofili

aerobi. Cambiando, per esempio, la temperatura di incubazione è possibile ricreare in laboratorio le condizioni idonee per il rilevamento e la coltivazione di forme microbiche differenti (per esempio psicrofili e termofili). Se si vuole enumerare un particolare microrganismo la composizione del terreno verrà scelta in modo da permettere solo, o principalmente, la crescita del microrganismo di interesse. Questo può essere raggiunto mediante tre diverse procedure:

- elettiva
- selettiva
- differenziale

Le procedure elettive prevedono l'inclusione nel terreno di reagenti (quali zuccheri, aminoacidi, o altri fattori di crescita), o l'uso di condizioni di crescita particolari che incoraggiano lo sviluppo del microrganismo di interesse, ma non inibiscono la crescita delle altre forme microbiche.

Le procedure selettive prevedono l'inclusione di reagenti o l'uso di condizioni di crescita particolari che inibiscono lo sviluppo di microrganismi diversi da quelli bersaglio. In molti casi gli agenti selettivi possono avere effetti negativi anche sulla crescita dei microrganismi di interesse, tuttavia tali effetti saranno minori rispetto a quelli osservati su altri organismi. Esempi di procedure selettive prevedono l'inclusione di antibiotici nel terreno o l'uso di condizioni di crescita anaerobiche.

Le procedure differenziali permettono di distinguere un microrganismo da un altro mediante le reazioni che le colonie producono nel terreno. Un esempio potrebbe essere l'inclusione nel terreno di un indicatore di pH per differenziare organismi che producono acidi.

In molti casi i terreni contengono componenti elettivi, selettivi e differenziali in modo da facilitare l'identificazione e l'enumerazione del microrganismo di interesse.

b. Metodo MPN

La seconda procedura di enumerazione, il most probable number, permette la stima, su base statistica, del numero di organismi vitali e coltivabili presenti in un campione. La stima è ottenuta preparando diluizioni decimali del campione da analizzare e trasferendo i sub-campioni di ogni diluizione in tre tubi contenenti terreno nutritizio. Dopo l'inoculo i tubi vengono incubati alla temperatura appropriata per 24-48 ore, quindi valutando la torbidità del mezzo di coltura, si identificano i tubi nei quali c'è stata crescita microbica. Determinando il punto di estinzione (della crescita microbica) e utilizzando tabelle di calcolo specifiche si può calcolare il livello di contaminazione di un determinato campione. Tale procedura risulta più laboriosa e richiede più materiale rispetto alla conta su piastra, inoltre i limiti di confidenza sono ampi anche se per ogni diluizione vengono effettuati più replicati. Pertanto tale procedura tende ad essere meno accurata della conta su piastra, ma ha il vantaggio di una maggiore sensibilità.

1.2.2 Procedure qualitative

Le procedure qualitative vengono utilizzate quando si vuole escludere la presenza di un determinato microrganismo nel campione. Generalmente tali metodi sono utilizzati per la ricerca di patogeni come *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp. Un campione accuratamente pesato (generalmente 25 g) viene omogeneizzato in un brodo di arricchimento primario ed incubato a temperatura appropriata per un periodo di tempo opportuno. In alcuni casi, una aliquota della coltura così ottenuta viene trasferita in un brodo di arricchimento secondario e messa nuovamente ad incubare in condizioni di crescita ottimali per il microrganismo che si intende ricercare. L'arricchimento finale viene poi strisciato su piastre di terreno selettivo agarizzato per ottenere colonie singole del microrganismo di interesse. Il ricorso a procedure di arricchimento lunghe e laboriose è motivato dal fatto che i microrganismi patogeni sono spesso presenti in basse concentrazioni nelle matrici alimentari e ambientali e potrebbero essere, quindi, difficilmente individuati utilizzando procedure di conta diretta. L'isolamento di colonie d'aspetto tipico su terreni selettivi deve essere considerato un segnale presuntivo della possibile presenza del batterio ricercato. A scopo di conferma su colture pure degli isolati microbici dovranno essere

eseguiti ulteriori test biochimici e sierologici che permettono di discriminare il microrganismo di interesse da forme microbiche strettamente correlate.

I metodi tradizionali che si basano sulla coltivazione dei microrganismi richiedono da diversi giorni a settimane per fornire un risultato attendibile. Inoltre, le proprietà fenotipiche sulle quali si basa l'identificazione dei batteri possono, talvolta, non essere espresse o essere espresse in modo ambiguo, il che rende difficile l'interpretazione dei risultati e la conseguente classificazione degli isolati microbici. Inoltre per effettuare tali analisi è richiesto personale addestrato, altamente qualificato. Un altro svantaggio dei metodi tradizionali è la loro incapacità di rilevare la presenza di cellule vitali, ma non coltivabili, uno stato fisiologico che è molto diffuso in natura in presenza di stress ambientali, come ampiamente documentato per *Campylobacter* spp (Rollins and Colwell, 1986; Tholozan et al., 1999). Lo stato vitale, ma non coltivabile è infatti una strategia di sopravvivenza utilizzata dai microrganismi non sporigeni per fronteggiare condizioni ambientali non ottimali. Questi microrganismi, pur avendo perso apparentemente la capacità di formare colonie su terreni di coltura, mantengono la propria vitalità e nel caso dei patogeni la capacità di infettare l'organismo ospite appena escono dallo stato di quiescenza.

1.3 Metodi rapidi

Negli ultimi anni c'è stata una ricerca considerevole di metodi rapidi, automatizzabili, per il rilevamento di contaminazioni microbiche. Il termine metodi rapidi comprende numerose tecnologie comprese quelle basate sulla microscopia, sulla determinazione della quantità di adenosina trifosfato (ATP), sul monitoraggio dell'attività metabolica mediante misure elettriche, sulla presenza di marcatori molecolari (antigeni o acidi nucleici) di natura microbica.

a. Metodi immunologici

I metodi immunologici sono basati sulla reazione di legame specifico che avviene tra un anticorpo e l'antigene al quale è diretto. Il legame di un antigene è altamente specifico, pertanto i metodi immunologici possono essere utilizzati per rilevare un microrganismo specifico o tossine prodotte da microrganismo. Per visualizzare o misurare l'interazione antigene-anticorpo a quest'ultimo è

solitamente legata una molecola fluorescente, luminescente, un radioisotopo o un enzima che fungono da marcatore. In un saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) il termine enzyme-linked indica che il sistema di rilevamento è mediato da un enzima. In molti sistemi, l'enzima catalizza la conversione di un substrato in un prodotto colorato e l'endpoint del saggio può essere facilmente rilevato visivamente o mediante una misurazione spettrofotometrica o fluorimetrica. I tipici complessi enzima-substrato usati nell'ELISA includono fosfatasi alcalina (enzima) e *para*-nitrofenil fosfato (substrato) e prevedono il rilevamento di un prodotto di colore giallo.

I sistemi immunoenzimatici commercialmente disponibili permettono sia di catturare che di rilevare cellule microbiche o tossine presenti nei campioni da analizzare. I kit sono forniti con due tipi di anticorpi: anticorpo di cattura e anticorpo coniugato. L'anticorpo di cattura è solitamente legato alla superficie di un supporto solido come per esempio un pozzetto di una piastra di microtitolazione. Il campione arricchito viene aggiunto al pozzetto in modo da permettere la cattura degli antigeni microbici eventualmente presenti. Il pozzetto viene poi lavato per rimuovere le molecole (o le cellule) che non vengono riconosciute dall'anticorpo prima di procedere all'aggiunta dell'anticorpo coniugato specifico per il marcatore molecolare di interesse. Gli anticorpi non legati vengono rimossi mediante lavaggio ed infine si aggiunge il substrato delle reazioni enzimatiche e si procede al rilevamento del prodotto colorato. Un saggio ELISA di questo tipo permette in 2-3 ore, contro i 3-5 giorni richiesti da una metodica tradizionale, di effettuare una rilevazione della presenza presunta del microrganismo di interesse. I campioni risultati positivi devono poi essere confermati mediante test biochimici e sierologici. Esistono in commercio diversi kit ELISA per il rilevamento di *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 in matrici alimentari. Numerose valutazioni di metodi immunologici disponibili in commercio hanno indicato che i risultati generalmente sono ben correlati con quelli ottenuti con metodi microbiologici tradizionali. In particolare i saggi immunoenzimatici offrono l'opportunità di ridurre il tempo delle analisi di 1-2 giorni; l'automazione o la miniaturizzazione di questi kit inoltre ha ridotto la quantità di personale richiesto per il test ed ha semplificato considerevolmente le procedure manuali.

Il maggior problema che si ha con questi saggi è la bassa sensibilità. Il numero minimo di organismi richiesti per fornire un risultato positivo in un saggio immunoenzimatico è di 10^5 cellule/ml. Pertanto, per una valutazione corretta della presenza/assenza di un singolo microrganismo in 25 g di campione è sempre necessaria una procedura di prearricchimento del campione stesso con conseguente allungamento dei tempi di analisi (di 24-48 ore).

b. Tecniche di amplificazione degli acidi nucleici

Alcune nuove tecnologie, come l'amplificazione degli acidi nucleici hanno migliorato significativamente la specificità e la sensibilità dei test diagnostici, riducendo in modo significativo il tempo necessario per il rilevamento di patogeni microbici.

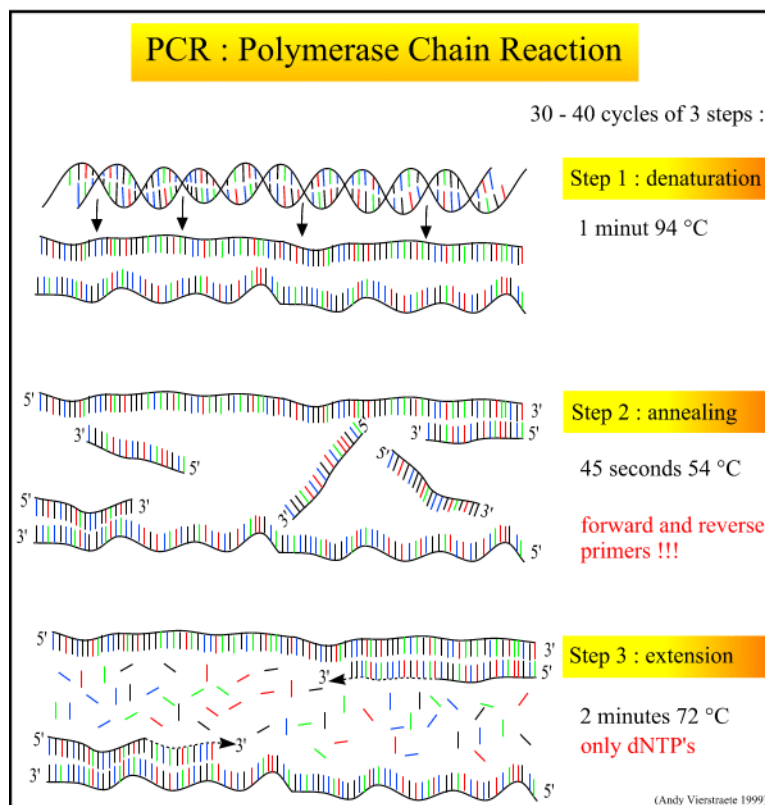
Per il rilevamento di microrganismi in matrici alimentari e ambientali sono disponibili due principali metodiche:

- ✓ la polimerase chain reaction (PCR) e sue varianti, incluse la reverse transcriptase (RT) PCR, la multiplex PCR e la real-time PCR
- ✓ la nucleic acid sequence based amplification (NASBA)

1.3.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Brevemente, il metodo della PCR usa una DNA polimerasi termostabile (per esempio l'enzima *Taq*) per sintetizzare copie multiple di un DNA bersaglio. Il processo può essere diviso in tre passaggi che costituiscono un ciclo della reazione; la reazione di sintesi può essere condotta ripetendo il ciclo per molte volte. Nel primo dei tre passaggi, condotto a temperature superiori a 90°C, si ha la denaturazione del DNA, nel secondo avviene l'appaiamento (annealing) dei primers con il filamento complementare del DNA bersaglio, generalmente a temperature comprese tra 50-60°C ed infine si ha l'estensione ottimale del primer a 68-72°C (Figura 1).

Figura 1. Rappresentazione schematica della reazione a catena della polimerasi.



La PCR offre molti vantaggi rispetto ai metodi basati sulle colture ed altri metodi standard per il rilevamento di patogeni. I principali vantaggi sono specificità, sensibilità, rapidità, accuratezza e capacità di rilevare piccole quantità di un acido nucleico bersaglio in un campione complesso. Poiché la PCR amplifica l'acido nucleico di un organismo, questo permette nel caso di patogeni batterici di superare il problema di rilevare cellule vitali ma non coltivabili. L'uso della PCR per rilevare la presenza di virus presenti nell'acqua ha diversi vantaggi rispetto ad altre tecniche convenzionali. Essa, infatti, può migliorare i limiti di rilevamento ed il numero di virus rilevabili, riducendo sia i tempi di analisi che i costi. La PCR è già stata utilizzata per rilevare virus enterici in campioni ambientali. Sono stati pubblicati diversi metodi che prevedono l'uso della PCR per il rilevamento di contaminazione virale dei frutti di mare. Atmanr et al. (1995) hanno utilizzato la PCR per rilevare la presenza del Norwalk virus ed il virus dell'epatite A nei molluschi. Chung et al. (1996) hanno rilevato l'enterovirus e il virus dell'epatite A direttamente dai molluschi e in coltura cellulare usando la PCR. Attraverso l'uso della PCR questi autori hanno dimostrato un incremento del 50% nell'efficienza di rilevamento rispetto all'uso della sola coltura cellulare. Per quanto riguarda i batteri patogeni molti possono essere isolati e mantenuti su terreno solido. Nonostante ciò ci sono numerosi problemi associati con la loro rilevazione e quantificazione in campioni d'acqua. I problemi associati con la coltura diretta delle specie batteriche includono difficoltà nell'identificazione dei patogeni batterici, il tempo, necessario per effettuare le analisi di identificazione e tipizzazione degli isolati ed i costi di queste analisi, l'effetto dei terreni selettivi e/o dei metodi di isolamento selettivo sull'attendibilità del risultato finale. La PCR è stata saggiata per il rilevamento rapido di patogeni batterici in un certo numero di studi. È stata utilizzata sia per l'identificazione rapida di specie batteriche patogene isolate dall'ambiente, sia per il rilevamento diretto dei patogeni. Esempi ascrivibili al primo caso includono specie di *Bifidobacterium* (Kaufmann et al., 1997), *Listeria*, *Staphylococcus* e *Salmonella* (Jensen et al., 1993; Cohen et al., 1996). Letocart et al. (1997) hanno dimostrato che la PCR potrebbe ridurre significativamente il tempo richiesto per identificare e distinguere tra isolati di *Leptospira* (agente eziologico della leptospirosi, malattia infettiva acuta). Tradizionalmente le specie di *Leptospira* sono identificate usando anticorpi specifici per ciascuna specie; la differenziazione tra specie patogene e non

patogene risulta essere, quindi, dispendiosa e tediosa. Gli autori sostengono che il metodo della PCR può essere usato da laboratori non specializzati e produrre risultati attendibili in soli due giorni. In riferimento al rilevamento diretto dei patogeni è presente un'ampia letteratura relativa al rilevamento diretto di *Salmonella* (Way et al., 1993; Lin and Tsen, 1996), *Legionella* (Hay et al., 1995; Palmer et al., 1995), *E. coli* enterotossigenico (Tamanai-Shacoori et al., 1996) e *Campylobacter* (Jackson et al., 1996). È stato osservato che è possibile migliorare il limite di rilevamento facendo precedere alla PCR uno step di arricchimento (Ng et al., 1997; Fach and Popoff, 1997). Alexandrino et al. (2004) hanno utilizzato la PCR per il rilevamento di *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Yersinia enterocolitica* da campioni di reflui urbani. Il limite di rilevamento da questi campioni era di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quello ottenuto con colture pure, ma era comparabile con quello rilevato da Moreno et al. (2003) per *Campylobacter* in campioni di acque di fiume. Inoltre, *Arcobacter* che spesso non viene rilevato con metodi tradizionali è stato osservato essere il microrganismo prevalente in campioni di acque reflue, utilizzando la PCR in combinazione con la FISH (Moreno et al., 2003). Clarke et al. (2003) hanno sviluppato un saggio di PCR basato sull'amplificazione del gene *groES* per il rilevamento di *Pseudomonas* spp. in pazienti affetti da fibrosi cistica. Un altro protocollo di PCR per l'identificazione di *P. aeruginosa* genotipo D è stato sviluppato da Lødenng et al. (2006). Il saggio basato sull'amplificazione della regione ribosomiale spaziatrice 23S-5S rDNA rappresenta uno strumento molto utile per l'identificazione rapida e la prevenzione di infezioni ad opera di questo microrganismo. Fontana et al. (2006) mediante amplificazione della regione 16S-23S rDNA hanno rilevato *Lactobacillus sakei* e *L. curvatus* in campioni di carne di manzo confezionata sotto vuoto. Recentemente un saggio di PCR basato sull'amplificazione del gene *sdiA*, che codifica un recettore del segnale coinvolto nel quorum-sensing, è stato sviluppato per il rilevamento di *Salmonella* spp (Alatsi et al., 2006). La PCR viene utilizzata non solo per il rilevamento e l'identificazione di patogeni, ma anche per la ricerca di microrganismi in grado di produrre composti di interesse. Per esempio la PCR è stata utilizzata da Ciesielski et al. (2006) per rilevare la presenza di batteri che producono polioidrossialcanoati (PHA) in fanghi attivi alimentati con metanolo.

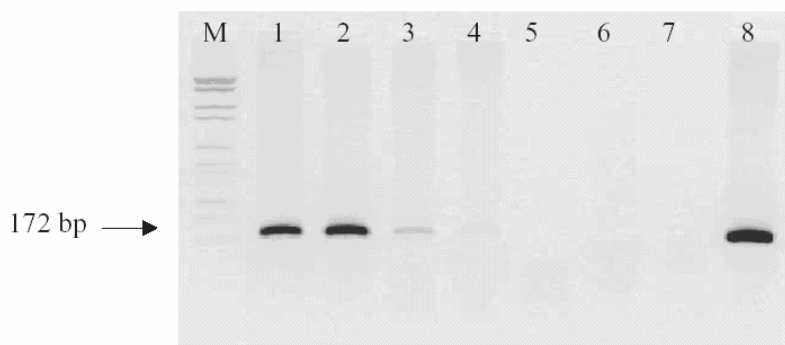
L'uso della PCR per il rilevamento dei microrganismi offre molti vantaggi, tuttavia ci sono alcune problematiche legate all'utilizzo di questa tecnica. Innanzitutto si possono avere risultati falsi positivi a causa della contaminazione (biomolecolare) a partire da materiale utilizzato come controllo positivo o da aerosol provenienti da campioni contenenti DNA del bersaglio. Un altro svantaggio della PCR sono i laboriosi step post-PCR richiesti per rilevare l'amplicone (Guatelli et al., 1989). Questi metodi di rilevamento includono elettroforesi su gel d'agarosio (Kidd et al., 2000), Southern blot (Holland et al., 1991) e sistemi ELISA-like (van der Vliet et al., 1993). Recentemente Wu et al. (2004) hanno sviluppato un nuovo saggio di agglutinazione di microsfere per il rilevamento rapido ed economico dei prodotti di PCR. Usando primers *forward* e *reverse* biotinilati, la presenza dei frammenti di DNA amplificati attraverso la PCR possono essere rilevati mediante agglutinazione di microsfere marcate con streptavidina. L'agglutinazione può essere identificata visivamente in 2 minuti senza alcun strumento o reagente addizionale. Con questa tecnica, usando primers biotinilati specifici per il gene *lisA* sono state rilevate con successo cellule di *Listeria monocytogenes lisA*⁺ tra cellule di *S. typhimurium*, *S. aureus*, *C. jejuni* e *E. coli* O157:H7. La semplicità di questo protocollo riduce sensibilmente il tempo ed il costo degli esperimenti di PCR diagnostici.

Un altro problema è che l'enzima polimerasi, che è centrale nella reazione di PCR, è altamente suscettibile a numerosi contaminanti presenti negli alimenti, nelle acque ed in campioni ambientali (per esempio, composti umici, alta concentrazione di cationi bivalenti e sali). Quando la PCR è stata utilizzata per rilevare microrganismi da un campione di acqua, in particolare da acque di scolo, sono stati compiuti considerevoli sforzi per rimuovere i composti inibenti prima di poter effettuare il saggio (Straub et al., 1995b). Numerosi metodi possono essere utilizzati per rimuovere i composti inibenti, incluso l'uso di polivinil polipirrolidina, colonne sephadex, resine a scambio ionico ed ultracentrifugazione su gradiente di cloruro di cesio (Lantz et al., 1997; Shieh et al., 1997; Wilson 1997). Molti di questi metodi sono complessi o richiedono macchinari sofisticati e costosi rendendoli non adatti all'impiego nelle routine del laboratorio di analisi. Sono stati sviluppati altri metodi che dovrebbero rimuovere molti dei fattori che inibiscono la reazione di PCR. La cattura con anticorpo (cattura immunomagnetica) o la cattura dell'acido nucleico sono risultati molto utili per la

separazione di microrganismi o dei loro acidi nucleici da campioni contenenti composti inibenti la PCR.

La cattura degli acidi nucleici coinvolge l'impiego di palline microscopiche paramagnetiche leganti oligonucleotidi sonda o una catena di poli-timidine (poly-T). Il principio del metodo è quello che una volta lisate le cellule, l'acido nucleico in soluzione ibridizza con l'oligonucleotide sonda o la poly-T. Un magnete posto sul lato esterno del tubo contenente questa soluzione di ibridizzazione attrae le palline magnetiche. La soluzione acquosa e il resto del materiale sono rimossi e gli acidi nucleici catturati sono poi risospesi in una soluzione appropriata. Questo metodo permette la rimozione di composti dall'associazione con l'acido nucleico bersaglio. Gilgen et al. (1995) hanno utilizzato un metodo simile, una membrana carica positivamente, per catturare molecole di RNA virale (enterovirus) da campioni d'acqua. Palline paramagnetiche associate ad un oligonucleotide sonda per mRNA sono state usate da Stinear et al. (1996) per rilevare oocisti vitali di *Cryptosporidium parvum* disseminate in acque ambientali concentrate e da Kaucner and Stinear (1998) come parte di una multiplex PCR per rilevare cisti vitali di *Guardia* e oocisti di *Cryptosporidium* in campioni di acqua. Amigliani et al. (2004) hanno sviluppato due metodi di cattura degli acidi nucleici per il rilevamento diretto del patogeno alimentare *Listeria monocytogenes* nel latte. Questi due metodi comprendono l'isolamento del DNA batterico direttamente dal latte utilizzando nanoparticelle paramagnetiche e una successiva PCR con primers selettivi per il gene listeriolisina O (*hlyA*). Sono stati utilizzati due differenti supporti magnetici: silice-magnetite (Taylor et al., 2000) e DEAE-agarose (Bruce et al., 1996). I risultati ottenuti con i due supporti magnetici sono stati confrontati con quelli ottenuti con altri metodi usati correntemente: estrazione convenzionale con fenolo-cloroformio e colonne commerciali. I sistemi basati sui supporti magnetici hanno mostrato una sensibilità 10 volte più alta (Figura 2). È stato dimostrato che il limite di rilevamento (Tabella 1) di entrambi i metodi (10 CFU ml^{-1}) è sufficiente per il rilevamento diretto del DNA di *L. monocytogenes* dal latte evitando i passaggi delle colture di arricchimento, riducendo il tempo necessario per ottenere il risultato a 7 ore da un minimo di 5 giorni richiesti per le procedure standard.

Figura 2. Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione del DNA di *L. monocytogenes* ottenuto utilizzando differenti protocolli da un campione di 10 ml di latte contaminato artificialmente con 10 cfu ml⁻¹.



Canali: M, Marker VI (Roche); PCR condotta su campioni di DNA estratti con (1) DEAE-Agarose; (2) silice-magnetite; (3) fenolo-cloroformio seguita da purificazione con silice-magnetite; (4) fenolo-cloroformio; (5) kit DNeasy Tissue (Qiagen); (6) controllo (latte non contaminato); (7) controllo negativo di PCR (senza DNA); e (8) controllo positivo di PCR (DNA di *L. monocytogenes*). Fonte Amigiani et al., 2004.

Tabella 1. Limiti di rilevamento di vari metodi di estrazione impiegati per il rilevamento di *L. monocytogenes* nel latte.

Metodo di estrazione	<i>L. monocytogenes</i> (cfu ml ⁻¹) nel latte					
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
Fenolo-cloroformio	+	+	+	+	+	-
Fenolo-cloroformio + silice magnetite	+	+	+	+	+	-
Silice-magnetite	+	+	+	+	+	-
Dneasy tissue kit (Qiagen)	+	+	+	+	-	-
DEAE-Agarose	+	+	+	+	+	± ^a

^a La contaminazione è stata rilevata in due dei 20 campioni esaminati.

Nella cattura immunomagnetica, alle palline paramagnetiche è legato, anziché un oligonucleotide sonda, un anticorpo specifico per un microrganismo bersaglio. L'anticorpo si lega agli antigeni specifici presenti sulla superficie dell'organismo bersaglio. Come per il metodo della cattura degli acidi nucleici, un magnete viene poi utilizzato per rimuovere l'organismo catturato dalla soluzione. Le cellule sono successivamente risospese in un tampone appropriato e si procede all'estrazione e purificazione degli acidi nucleici. Un vantaggio di questa procedura è dato dalla possibilità di separare il microrganismo dalle sostanze che possono inibire la reazione di PCR. La cattura immunomagnetica, inoltre, può essere usata per concentrare l'organismo bersaglio da volumi di campione relativamente grandi, in alternativa alle procedure di concentrazione su membrana filtrante. Recentemente, Lynch et al. (2004) hanno confrontato un metodo di separazione immunomagnetica automatizzato (AIMS) con il metodo convenzionale basato sulle colture al fine di valutare il potenziale uso dell'IMS come metodo alternativo per il rilevamento rapido e sensibile delle specie di *Salmonella* in campioni prelevati da allevamenti avicoli. Da questo confronto è emerso che il metodo AIMS è più rapido e sensibile, riducendo la quantità di terreno selettivo usato per l'isolamento e l'identificazione e abbassando tempi e costi delle analisi rispetto al metodo classico di arricchimento in coltura (Lynch et al., 2004). Un altro protocollo di PCR combinato con la separazione immunomagnetica è stato sviluppato per il rilevamento di *Escherichia coli* negli alimenti (Drysdale et al., 2004) e di *Legionella pneumophila* in campioni di acqua (Yáñez et al., 2005). Stratmann et al. (2006) hanno sviluppato un nuovo sistema di cattura magnetica mediata da un peptide e basata sull'interazione recettore-ligando per il rilevamento, mediante PCR, di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in campioni di latte. La sensibilità del metodo è risultata essere di 5×10^2 CFU/ml per campioni contaminati artificialmente. Il metodo può essere utilizzato nelle routine di laboratorio e può essere adattato all'automazione. Inoltre, al contrario dei metodi basati sugli anticorpi, la cattura mediata da peptide non è inibita dagli anticorpi circolanti presenti nel latte e pertanto potrebbe rappresentare uno strumento utile per programmi di controllo della paratubercolosi su larga scala.

1.3.2 Multiplex PCR

Una evoluzione della PCR è rappresentata dalla multiplex PCR dove più coppie di primers vengono utilizzate per amplificare simultaneamente differenti sequenze nella stessa reazione. Il vantaggio di questo metodo è il considerevole risparmio di sforzi e tempo quando si analizzano differenti regioni bersaglio. Tuttavia questa metodica può essere restrittiva dal momento che tutte le coppie di primers devono funzionare nelle stesse condizioni di amplificazione, con il rischio che si possa avere formazione di primer-dimer tra vari primer con conseguente diminuzione della sensibilità del test e/o l'amplificazione preferenziale di alcuni bersagli rispetto ad altri (Markoulatos et al., 2002). Malgrado queste problematiche la multiplex PCR può rappresentare un metodo di screening rapido e conveniente per il rilevamento di virus, batteri e/o altri microrganismi in campioni clinici, ambientali e alimentari. La multiplex PCR può essere utilizzata per il rilevamento di un solo microrganismo o di microrganismi differenti presenti nello stesso campione. Esempi del primo tipo comprendono l'identificazione di *Pseudomonas aeruginosa* in campioni clinici (De Vos et al., 1997) e di *Vibrio cholerae* biotipo O1 in campioni ambientali (Shangkuan et al., 1995). Recentemente un saggio di multiplex PCR basato sull'amplificazione di due geni distinti è stato sviluppato da Ruttler et al. (2006) per l'identificazione rapida di *Escherichia coli* enteroaggregativo (EAEC). Un saggio basato sull'amplificazione simultanea di tre geni è stato sviluppato da Ali et al. (2006) per il rilevamento di *Salmonella typhi*, e da Martinez et al. (2006) per l'identificazione di *Campylobacter jejuni*. L'amplificazione simultanea di quattro geni, infine, è stata utilizzata da Scholz et al. (2006) per il rilevamento di *Chromobacterium violaceum*. Come detto in precedenza, la multiplex PCR può essere anche utilizzata per il rilevamento simultaneo di patogeni differenti (LaGier et al., 2004). Kong et al. (2002), per esempio, hanno sviluppato un saggio di multiplex PCR per il rilevamento di patogeni batterici presenti nell'acqua come *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Yersinia enterocolitica*. Il saggio, che richiede meno di 12 ore mostra un limite di rilevamento di 10^0 - 10^2 CFU. Aridgides et al. (2004) hanno messo a punto un saggio di multiplex che permette di rilevare simultaneamente un batterio (*V. cholerae*), un virus (*Calicivirus*) ed un protista (*Aureococcus anophagefferens*). Recentemente,

Neubauer e Hess (2006) utilizzando la multiplex PCR sono stati in grado di rilevare in campioni di carne di pollo tre patogeni food-borne, *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter*, mentre Atabay et al. (2006) sono stati in grado di rilevare e differenziare tra le varie specie di *Arcobacter*. Kositanont et al. (2007) hanno sviluppato una multiplex PCR per diagnosticare la leptospirosi e differenziare tra ceppi di *Leptospira* patogena e non. Settani et al. (2005) hanno sviluppato un protocollo a due step di multiplex PCR che consente di rilevare e differenziare 16 differenti specie di *Lactobacillus*. La multiplex PCR può essere utilizzata anche per il rilevamento dei due più importanti patogeni food-borne umani: *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (Mukhopadhyay and Mukhopadhyay, 2006). Kim et al. (2006) hanno sviluppato un protocollo di multiplex PCR per il rilevamento di *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* in chicchi di grano. Un protocollo di multiplex PCR basato sul gene *gyrB* è stato messo a punto da Maeda et al. (2006) per il rilevamento e l'identificazione di tre patogeni del riso *Burkholderia plantarii*, *B. glumae* e *B. gladioli*. Tale metodica molecolare è stata anche utilizzata per identificare contaminazioni da microcistine (Saker et al., 2006). Il saggio, in questo caso, prevede l'amplificazione di tre bersagli molecolari: un frammento del gene 16S rRNA specifico del genere *Microcystis*, il più comune cianobatterio che produce microcistina; il gene *McyA*, associato alla biosintesi di microcistina ed infine una porzione dell'operone picocianina comune a tutti i cianobatteri.

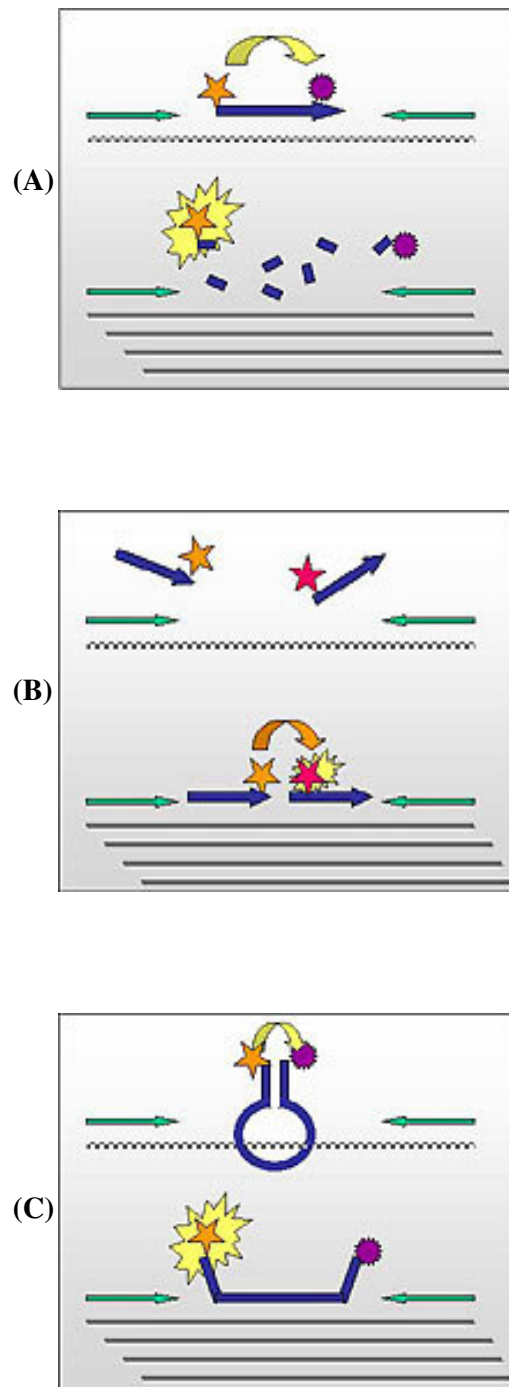
1.3.3 Real-time PCR

Un miglioramento della metodica di PCR si è avuto con l'introduzione della real-time PCR: una PCR dove il rilevamento dell'amplicone avviene durante il processo di amplificazione. Sono stati utilizzati quattro principi differenti per il rilevamento in tempo reale. Tutte e quattro le tecnologie sono basate sulla misura della fluorescenza che viene prodotta durante l'amplificazione del bersaglio (Tabella 2). La quantità di fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR (amplicone), il che permette il monitoraggio della reazione. Il principio più semplice ed economico è basato sul legame al DNA a doppio filamento di un composto intercalante (per esempio il SYBR Green I). Questa tecnologia può essere facilmente applicata con alcune variazioni a saggi di PCR di routine (Egygor et al., 2002) e non necessita di alcun oligonucleotide addizionale marcato con un fluorocromo (Aarts et al., 2001; Kaiser et al., 2001). La metodologia non permette di distinguere la formazione di prodotti di amplificazione specifici da prodotti aspecifici. Pertanto, questo saggio richiede un'accurata ottimizzazione delle condizioni di PCR e una chiara identificazione dei prodotti di amplificazione specifici per esempio usando l'analisi della curva di melting. Gli altri tre principi sono basati sull'introduzione di un oligonucleotide addizionale marcato con un fluorocromo (Figura 3). Sufficienti quantità di fluorescenza sono rilasciate solo dopo idrolisi della sonda (hydrolysis probes) (Heid et al., 1996; Gibson et al., 1996) o durante l'ibridazione dell'amplicone con uno (molecular beacon) (Tyagi and Kramer, 1996) o due (hybridization probes) (Wittwer et al., 1997) oligonucleotidi. L'introduzione di una sonda addizionale aumenta la specificità del saggio e permette lo sviluppo di reazioni di tipo multiplex.

Tabella 2. Viene riportata una breve descrizione dei quattro principi utilizzati per il rilevamento in tempo reale del prodotto di amplificazione.

Metodo	Descrizione
Colorante legante il DNA (per esempio SYBR-green)	Quando il colorante è legato al DNA e viene esposto a luce di una determinata lunghezza d'onda emette fluorescenza.
Hydrolysis probes (Taqman)	La sonda è marcata con un fluorocromo ad un'estremità e con un colorante quencher dall'altra. Il segnale di fluorescenza viene emesso in seguito all'idrolisi della sonda, ad opera dell'attività 5'esonucleasica della Taq polimerasi.
Hybridization probes	Sono richieste due sonde adiacenti. La sonda a monte è marcata all'estremità 3' con un fluorocromo, che agisce come donatore di energia. La sonda a valle è marcata all'estremità 5' con un colorante che agisce come accettore. La fluorescenza viene emessa solo quando le due sonde si legano al DNA.
Molecular beacons	La sonda è marcata con un fluorocromo ad un'estremità e con un colorante quencher dall'altra. In seguito ad ibridazione al DNA si ha la separazione del fluorocromo dal quencher con emissione di fluorescenza.

Figura 3. Rappresentazione schematica dei metodi di rilevamento utilizzati nella real-time PCR.



A, Sonde a idrolisi; B, Sonde di ibridazione; C, "Molecular beacon".

La PCR real-time presenta diversi vantaggi rispetto alla PCR convenzionale. Infatti i saggi in tempo reale sono caratterizzati da uno spettro di sensibilità più ampio (di 7-8 unità logaritmiche) rispetto a saggi di PCR quantitativi standard, inoltre hanno una più alta sensibilità (< 5 copie) e una più alta precisione (deviazione standard <2%) (Bustin, 2000; Klein et al., 2001). Un altro vantaggio di questo metodo è che non sono richiesti step post-PCR (elettroforesi su gel, ibridazione del DNA), il che riduce il rischio di cross-contaminazione. Infine la PCR real-time fornisce risultati con una velocità maggiore. Questo è soprattutto dovuto al tempo ridotto dei singoli cicli, alla rimozione di procedure separate per il rilevamento post-PCR e all'uso di attrezzature di rilevamento della fluorescenza molto sensibili, che permettono un rilevamento più facile dell'amplicone (Wittwer et al., 1990; 1997). Una dimensione ridotta dell'amplicone può anche giocare un ruolo nella velocità di reazione; tuttavia è stato dimostrato che la taglia ridotta del prodotto di amplificazione non è strettamente correlata con il miglioramento dell'efficienza della reazione di PCR (Nitsche et al., 2000; Lunge et al., 2002). La PCR real-time è molto utilizzata in campo alimentare per il rilevamento di patogeni. Sono stati sviluppati diversi protocolli basati sulla tecnologia del SYBR Green I per il rilevamento del prodotto di amplificazione. De Medici et al. (2003) hanno sviluppato un protocollo di PCR real-time per rilevare *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis nella carne di pollo. Nam et al. (2005), sempre utilizzando il SYBR Green I per il rilevamento dell'amplicone, sono riusciti a rilevare *Salmonella* spp. Il saggio è risultato essere specifico, riproducibile, semplice ed ha permesso di rilevare un numero di cellule di *Salmonella* inferiore alle 10 CFU/ml in campioni contaminati con un alto livello di flora autoctona. L'estrazione del DNA e la PCR sono state precedute da un arricchimento di circa 18 ore in un terreno di prearricchimento non selettivo. Sempre utilizzando un protocollo di PCR real-time basato sul SYBR Green I, Oliveira et al. (2005) sono riusciti a rilevare *Campylobacter jejuni* in campioni di carne contaminati artificialmente con 10 CFU per 10 grammi, con un arricchimento di 24 ore. È stato anche sviluppato un saggio di PCR real-time per la quantificazione molecolare di batteri lattici in 6 differenti tipi di latte fermentato (Furet et al., 2004). Utilizzando la tecnologia Taqman per il rilevamento dell'amplicone, Oravcová et al. (2005) hanno sviluppato un saggio di PCR basato sul gene di virulenza *actA* per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*, mentre Rodríguez-Lazáro et al. (2005)

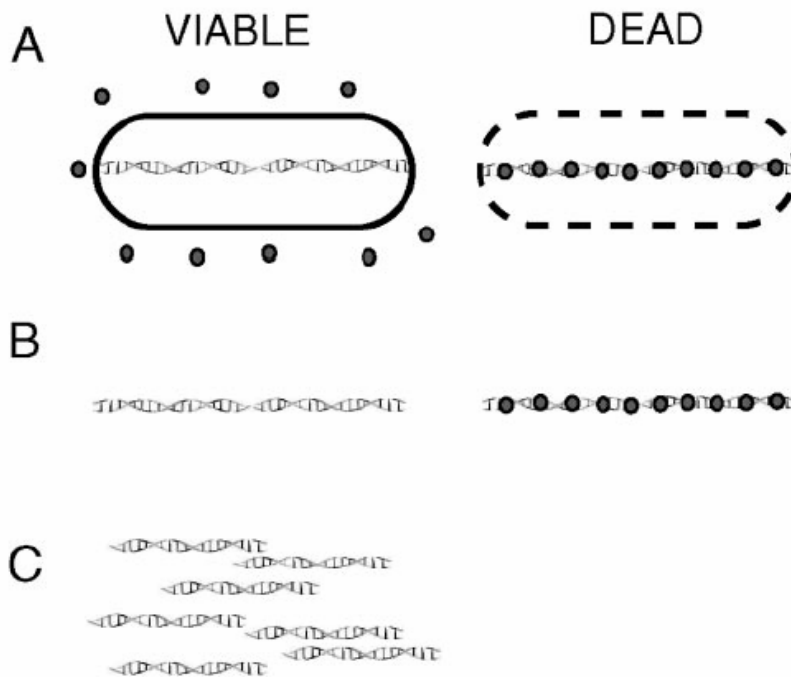
sono stati in grado di rilevare 10^2 cellule di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 20 ml di latte contaminato artificialmente. Connor et al. (2005) hanno messo a punto un protocollo per il rilevamento rapido e specifico di batteri termofili, soprattutto *Alicyclobacillus* spp., coinvolti nello “spoilage” dei succhi di frutta. Questo saggio che può essere completato in meno di 5 ore potrebbe risultare molto importante per l’industria alimentare e, in particolar modo per le industrie che producono bevande, per lo screening dei componenti di partenza e per il controllo di qualità del prodotto finito. Un saggio di PCR real-time, in combinazione con un sistema di cattura immunomagnetica, è stato sviluppato da Yáñez et al. (2005) per la determinazione di *Legionella pneumophila* in campioni di acqua. Un saggio di PCR real-time basato sull’impiego di sonde Taqman-Minor Groove Binder (MGB) è stato applicato da Rousselon et al. (2004) per il rilevamento di batteri fecali in campioni ambientali. Utilizzando la tecnologia Hybridization probes, Ellingson et al. (2004) hanno sviluppato un saggio di PCR per il rilevamento di *Salmonella* in carne di manzo che in meno di 12 ore fornisce risultati sia qualitativi che quantitativi. Un saggio di real-time PCR basato sulla tecnologia del molecular beacon (MB) è stata invece sviluppata da Liming et al. (2004) per il rilevamento di *Salmonella* nella frutta e nei vegetali. Questo saggio, che ha permesso di rilevare 4 CFU/25g di prodotto dopo 16 ore di arricchimento, permette un rilevamento rapido di un gran numero di campioni sia alimentari che ambientali. Sono stati sviluppati anche diversi saggi di PCR multiplex real-time. Hsu et al. (2005), per incrementare la specificità del rilevamento di *Escherichia coli* O157:H7, hanno utilizzato due geni *rfb* (che è responsabile della biosintesi dell’antigene O) e *stx₂* (che è responsabile per la biosintesi della tossina 2 Shiga-like) in una PCR multiplex real-time. Un saggio basato sull’amplificazione simultanea di 4 geni, è stato sviluppato da Woron et al. (2006) per il rilevamento e la caratterizzazione di *Yersinia pestis* in campioni ambientali. La sensibilità del saggio è risultata essere di meno di 85 CFU per reazione per ogni tipo di campione analizzato. Questo rappresenta il primo saggio in tempo reale basato su 4 geni per *Y. pestis* nel quale il rilevamento e l’accertamento della virulenza, da campioni clinici o ambientali, avvengono in una sola reazione. Un saggio basato su una duplex real-time PCR è stato messo a punto da Rodriguez-Lázaro et al. (2004) per il rilevamento quantitativo simultaneo di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*. I bersagli della singola

reazione sono il 23S rDNA ed i geni *hly* di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, rispettivamente. La PCR multiplex combinata con la PCR real-time può soddisfare i criteri per il rilevamento di patogeni virali come *Norwalk*, *Astroviruses* e *Enteroviruses* (Beuret, 2004). Il saggio è risultato essere 10 volte più sensibile rispetto ad una PCR classica inoltre l'analisi della curva di melting ha richiesto meno tempo rispetto all'elettroforesi su gel d'agarosio o all'ibridizzazione con sonde specifiche. Una duplex Taqman RT-PCR è stata sviluppata da Jothikumar et al. (2005) per il rilevamento rapido e specifico di Norovirus (NoV) nei frutti di mare. Questo saggio che richiede meno di 90 minuti potrebbe essere utile per il monitoraggio di routine oltre che dei molluschi anche di campioni clinici. Un altro saggio di PCR multiplex real-time per il rilevamento dei norovirus genogruppi I e II è stato sviluppato da Hoehne e Schreier (2006). Recentemente è stato sviluppato un saggio di PCR multiplex real-time per il rilevamento di *Vibrio cholerae* (Gubala, 2006). Questo saggio, che prevede l'amplificazione simultanea di quattro geni caratteristici dei ceppi potenzialmente tossigenici (*rtxA*, *epsM*, *mshA* e *tcpA*), è basato sulla tecnologia del SYBR Green I per il rilevamento dei prodotti di amplificazione. Il limite di rilevamento del saggio è risultato essere di 10^3 CFU utilizzando cellule di colture pure e di 10^4 CFU da campioni ambientali di acqua. In questo modo l'identificazione di *Vibrio cholerae* risulta essere notevolmente più rapida rispetto ai sistemi tradizionali di rilevamento. Gubala e Proll (2006) utilizzando per il rilevamento degli ampliconi la tecnologia molecular beacon sono riusciti a migliorare ulteriormente il limite di rilevamento di *Vibrio cholerae* da 10^3 a 10 CFU per reazione (diluizioni più basse non sono state analizzate). Un saggio di PCR multiplex real-time è stato sviluppato da Berg et al. (2006) per il rilevamento di *Xanthomonas campestris*.

1.3.3.1 EMA real-time PCR

Come abbiamo visto la PCR real-time viene ampiamente utilizzata per il rilevamento e la quantificazione di patogeni in campioni alimentari, ambientali e clinici. Tuttavia uno dei maggiori ostacoli all'introduzione di questa metodica come strumento diagnostico di routine è l'incapacità di distinguere tra DNA di cellule vitali e non (Klein and Juneja, 1997; McKillip et al., 1999; Norton and Batt., 1999). Il DNA è una molecola relativamente stabile nell'ambiente e può persistere in forma intatta, in cellule non più vitali, per periodi di tempo molto lunghi (Master et al., 1994). Questo è particolarmente rilevante quando la ricerca di patogeni viene effettuata a seguito di trattamenti con disinfettanti o antibiotici. Questo problema è stato risolto combinando la differenziazione tra cellule vitali e non, che può essere ottenuta con il colorante etidio momoazide (EMA), con la PCR real-time: EMA-PCR. L'EMA penetra solo all'interno delle cellule non vitali con membrana o parete cellulare compromessa, e mediante fotoattivazione si lega covalentemente al DNA. Questo DNA non può essere più amplificato, pertanto mediante PCR sarà rilevato solamente il DNA delle cellule vitali (Figura 4). In questo modo è possibile riuscire a differenziare tra cellule vitali e non.

Figura 4. Rappresentazione schematica dell'EMA-PCR.



(A) L'EMA è aggiunto al campione contenente cellule vitali e non. Esso penetra solo all'interno delle cellule non vitali e si lega al DNA. L'esposizione alla luce per 1 minuto determina il legame covalente e l'inattivazione di EMA libero. L'EMA non penetra all'interno di cellule vitali. (B) Dopo purificazione ci sono due popolazioni di DNA, quello proveniente da cellule vitali, non colorato, e quello proveniente da cellule non vitali legate all'EMA. (C) Il DNA estratto da cellule vitali viene amplificato mediante PCR, mentre il DNA legato all'EMA non può essere amplificato.

Il segnale di riduzione EMA (EMASR) rappresenta la frazione di DNA che può essere amplificata mediante PCR in campioni trattati con l'EMA e può essere calcolato con la seguente formula:

$$\text{EMASR} = (1+E_U)^{C_{T^{\text{untr}}}} / (1+E_T)^{C_{T^{\text{treat}}}} \text{ (Nogva et al., 2003)}$$

dove $C_{T^{\text{treat}}}$ è il ciclo soglia C_T per i campioni trattati con EMA e $C_{T^{\text{untr}}}$ è il C_T per il corrispondente campione non trattato. E_U e E_T rappresentano l'efficienza di amplificazione dei campioni non trattati e trattati rispettivamente.

Rudi et al. (2005) hanno applicato tale metodologia per il rilevamento del patogeno food-borne *Campylobacter jejuni*. Le condizioni analizzate hanno incluso il rilevamento in campioni naturali, la sopravvivenza negli alimenti, ed il rilevamento dopo disinfezione o/e trattamento con antibiotici. In tutte le condizioni esaminate gli autori sono riusciti ad ottenere una quantificazione accurata del patogeno. In campo alimentare l'EMA-PCR è stata utilizzata da Rudi et al. (2005) per rilevare la presenza di *Listeria monocytogenes* nel formaggio e da Lee e Levin (2006) per il rilevamento e la quantificazione della flora batterica presente nei filetti di merluzzo.

1.3.4 Standardizzazione e validazione della PCR

Nonostante i numerosi vantaggi, la PCR in molti casi non è stata inserita come metodo standard nelle routine dei laboratori diagnostici. La mancanza di protocolli standard, così come la qualità dei reagenti e degli strumenti, influenzano la diffusione efficiente della PCR dai laboratori di ricerca a quelli diagnostici.

Nel 1999, la Commissione Europea ha approvato un progetto di ricerca, denominato FOOD-PCR (<http://www.PCR.dk>), con lo scopo di validare e standardizzare l'uso della PCR diagnostica per il rilevamento di patogeni negli alimenti. La standardizzazione, in questo caso, ha avuto come scopo lo sviluppo di un protocollo di PCR, "gold standard", che, opportunamente applicato, producesse risultati certificabili. In modo graduale si è proceduto alla standardizzazione di tutti gli aspetti della metodologia al fine di avere un insieme di linee guida chiare e complete per qualunque utilizzatore, anche quello meno esperto. Lo sviluppo di una metodologia standardizzata per il rilevamento dei patogeni basata sulla PCR può essere effettuato attraverso i seguenti passaggi:

1. Valutazione dei metodi di PCR disponibili per il rilevamento del microrganismo bersaglio e costruzione di un database.
2. Valutazione delle tecniche di preparazione del campione, in riferimento alla matrice che si prevede di analizzare.
3. Valutazione comparativa delle prestazioni dei metodi di PCR individuati al punto 1.
4. Validazione del metodo che nei diversi laboratori è risultato migliore nel confronto contro test convenzionali standard, per determinare la sua riproducibilità. A questo punto è raccomandabile, la produzione di linee guida semplici e l'organizzazione di seminari per la preparazione del personale addetto all'analisi.
5. Preparazione di standard in accordo ai protocolli accettati dalle organizzazioni internazionali come il Comitato Europeo per la Standardizzazione (CEN), l'Associazione di Chimici Americana (AOAC) o l'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO).

Un protocollo di PCR per essere considerato standardizzato deve rispondere a diversi criteri (vedi Tabella 3).

Tabella 3. Criteri per un saggio di PCR standardizzato.

Criteri	Commenti
Accuratezza analitica e diagnostica	Bassi risultati falsi positivi o negativi
Basso limite di rilevamento	Meno di una cellula per 25 g
Elevata robustezza	Riproducibilità inter-laboratorio
Controlli di amplificazione	Reagenti e controlli positivi, controllo di amplificazione interno
Basso rischio di cross-contaminazione	Aree separate di lavoro, trattamento con UNG
Alta velocità	Analisi on-line
Accettazione	Validazione e standardizzazione, set di primers non brevettati
Basso costo	Costo per le analisi
Semplicità	Automazione
Flessibilità della matrice del campione	Assenza di interferenze con la PCR
Analisi quantitativa	Microrganismi responsabili del “food spoilage”

Accuratezza analitica e diagnostica

I metodi basati sulla PCR dovrebbero avere un grado elevato di accuratezza analitica e diagnostica. L'accuratezza include la selettività, definita come misura del grado di risposta a partire da colture pure di microrganismi bersaglio e non, e il limite di rilevamento. Di conseguenza, un metodo selettivo basato sulla PCR comprende inclusività (rilevamento del patogeno bersaglio tra un ampio numero di ceppi microbici) ed esclusività (mancanza di risposta in presenza di un numero ampio di microrganismi che sono strettamente correlati al microrganismo bersaglio). L'accuratezza diagnostica tiene conto dei microrganismi bersaglio e non in presenza di una matrice biologica e comprende i termini di specificità e di sensibilità.

La specificità diagnostica è una misura di quanto il metodo è influenzato da componenti non bersaglio presenti nella matrice biologica, ossia del rischio di ottenere “falsi-positivi”.

La sensibilità è una misura del grado di rilevamento del patogeno bersaglio nella matrice biologica, o del rischio di ottenere dei “falsi negativi”. Un alto grado di accuratezza diagnostica è destinata pertanto, a rilevare, il microrganismo bersaglio in modo molto preciso in presenza di una matrice biologica senza interferenze da parte di componenti bersaglio.

Pertanto, l'accuratezza diagnostica è utilizzata per valutare il grado di accordo tra i risultati del metodo basato sulla PCR ed un metodo tradizionale di riferimento comunemente accettato.

Limite di rilevamento

I metodi basati sulla PCR dovrebbero avere un basso (buono) limite di rilevamento. Gli standards internazionali basati sui metodi di rilevamento tradizionali fissano il limite di rilevamento ad una cellula per 25g di campione. Il limite di rilevamento teorico di una cellula microbica per reazione di PCR può essere generalmente tradotto nella pratica in 10^3 - 10^4 cellule per ml di campione prearricchito, purchè nella reazione di PCR venga utilizzato un volume piccolo di matrice iniziale. Pertanto, un saggio di PCR, generalmente preceduto da uno step di arricchimento per la moltiplicazione delle cellule batteriche, dovrebbe permettere di rilevare almeno 10-100 copie di DNA batterico bersaglio per reazione. Inoltre, il limite di rilevamento deve essere determinato in relazione al

calcolo della probabilità di rilevamento (Knutsson et al., 2002). Pertanto, deve essere stabilita la frequenza relativa attesa di una risposta positiva a varie concentrazioni di acidi nucleici o cellule bersaglio.

Robustezza

Il metodo di PCR dovrebbe essere tollerante nei confronti di diversi parametri fisici e chimici. I parametri più critici sono generalmente la qualità del DNA stampo (integrità fisica del DNA cromosomale, l'assenza o presenza di inibitori della PCR), differenze nella purezza dei reagenti, accuratezza della temperatura durante le varie fasi dell'amplificazione, adeguatezza della durata del tempo di ogni ciclo di PCR, e velocità nelle variazioni di temperatura ("ramping rates") durante l'amplificazione. Inoltre uno studio recente ha dimostrato chiaramente l'importanza delle prestazioni dei termociclatori sull'attendibilità a fine diagnostico di una reazione di PCR (Saunders et al., 2001).

Se il metodo di PCR è molto robusto, si ha in genere una elevata probabilità che la sua riproducibilità inter-laboratorio possa essere alta. Tuttavia, per ottenere buone prestazioni, è fondamentale effettuare controlli periodici e rigorosi su tutti gli strumenti utilizzati (termociclatori, pipette, ecc.). Inoltre, tutti i reagenti (per esempio, microtubi, nucleotidi, enzima polimerasi, acqua) devono essere di grado appropriato per biologia molecolare.

Controlli di amplificazione

La robustezza della PCR può essere monitorata effettuando una serie di reazioni di controllo (vedi Tabella 4). È opportuno predisporre una coppia di controlli (positivo e negativo) sia per la fase di estrazione del DNA che per i reagenti impiegati nella reazione. La presenza di inibitori della PCR dovrebbe essere monitorata mediante l'uso di un appropriato controllo di amplificazione interno in ogni reazione.

Tabella 4. Test di controllo necessari per valutare la prestazione della PCR.

Tipo di controllo	Descrizione
Controllo di amplificazione interno (IAC)	DNA chimerico aggiunto alla miscela di reazione ed amplificabile con la stessa coppia di primers utilizzata per il DNA bersaglio, ma che fornisce un amplicone con taglia facilmente distinguibile da quella del DNA target.
Controllo positivo di estrazione del DNA	Un campione negativo contaminato con una quantità di patogeno sufficiente. Serve a valutare l'efficacia del processo di estrazione, effetti di inibizione.
Controllo negativo di estrazione del DNA	Un campione negativo contaminato con una quantità sufficiente di un ceppo non bersaglio, ma strettamente correlato. Serve a monitorare le contaminazioni che possono avvenire in fase di estrazione.
Controllo (negativo) dei reagenti	Miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve a monitorare eventuali contaminazioni.
Controllo negativo delle aree di lavoro	Un tubo contenente la miscela di reazione, lasciato aperto nella stanza dove viene allestita la PCR per rilevare la presenza nell'ambiente di possibile DNA contaminante (deve essere fatto ad intervalli regolari come parte del programma di accertamento della qualità).
Concentrazioni standard	Da tre a quattro campioni contenenti diluizioni seriali decimali del campione con un numero conosciuto di copie del DNA bersaglio in un intervallo di concentrazioni superiore al limite minimo di rilevamento del saggio (necessario in test quantitativi di PCR).

Contaminazione

Un saggio di PCR deve essere effettuato riducendo al minimo i rischi di contaminazione. Tale rischio, può essere minimizzato utilizzando aree di lavoro separate per le diverse fasi dell'analisi (pre-PCR, PCR e post-PCR), utilizzando puntali con filtro. Si possono anche prevenire contaminazioni incorporando nelle reazioni di PCR uracil-*N*-glicosilasi (UNG), questo impedisce che il DNA degli ampliconi possa servire da stampo per ulteriori amplificazioni (Kitchin and Bootmann, 1993). Anche la PCR real-time, dove l'amplificazione viene monitorata continuamente nei microtubi, può ridurre il rischio di contaminazione (Foy and ParKes, 2001).

Flessibilità rispetto alle varie matrici dei campioni

Un punto critico nella PCR diagnostica ed, in particolare, nel limite di rilevamento del metodo è rappresentato dalla preparazione del campione e dall'applicabilità del metodo di estrazione a varie matrici. Pertanto, metodi di PCR standardizzati dovrebbero includere metodi per: (i) concentrare i microrganismi bersaglio, (ii) superare gli effetti di possibili contaminanti che potrebbero inibire la PCR e (iii) ridurre gli effetti dell'eterogeneità dei campioni biologici sulla PCR.

Accettazione da parte degli utenti finali

Per una rapida ed ampia diffusione delle metodiche diagnostiche basate sulla PCR, oltre alla validazione delle metodiche, è importante che il metodo ed i reagenti (per esempio, primers, DNA di controllo) necessari non siano sottoposti a vincoli d'uso e che il metodo sia presentato in modo chiaro e sia accompagnato da protocolli facilmente accessibili.

Altri requisiti

Altri criteri per un'ampia applicabilità della PCR standardizzata sono semplicità del metodo diagnostico, elevata velocità nel fornire risultati, bassi costi di gestione e la possibilità di automazione.

Validazione: una buona dimostrazione della prestazione

La validazione gioca un ruolo importante nella standardizzazione, dimostrando che il nuovo metodo può generare risultati che sono comparabili, se non migliori, a quelli ottenuti mediante metodi di riferimento. Inoltre la validazione ha lo scopo di confermare la specificità e riproducibilità del metodo presso laboratori differenti.

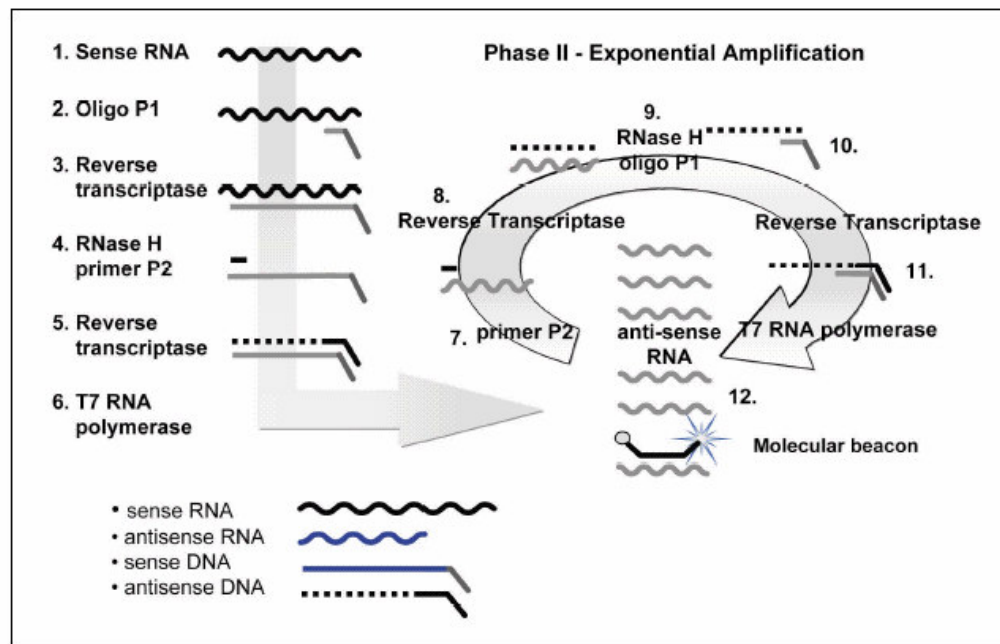
La validazione del metodo consiste in due passaggi:

1. uno studio dove il metodo basato sulla PCR è confrontato con quello corrente di riferimento utilizzando campioni contaminati artificialmente e naturalmente, e
2. uno studio interlaboratorio, chiamato “ring-trial”, nel quale la prestazione del metodo viene determinata utilizzando gli stessi materiali nei diversi laboratori, sotto il controllo di un laboratorio supervisore.

1.3.5 Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)

Un'altra metodologia molecolare che viene utilizzata per il rilevamento di microrganismi patogeni è la NASBA: una metodica sviluppata specificatamente per il rilevamento di molecole di RNA. La metodica, descritta per la prima volta da Guatelli et al. (1990) impiega tre enzimi (una trascrittasi inversa, l'RNasi H e la T7 RNA polimerasi) per produrre copie ad RNA di una molecola di RNA bersaglio. Nella reazione di retrotrascrizione, utilizzando primers opportunamente modificati, viene introdotta nella sequenza bersaglio il sito di riconoscimento per la RNA polimerasi del fago T7. Il DNA copia che viene così prodotto può funzionare come un mini "gene" ed essere trascritto "in vitro" ad opera della T7 RNA polimerasi. In questo modo si possono sintetizzare migliaia di copie dell'RNA bersaglio (Figura 5). La reazione è condotta ad una sola temperatura, normalmente di 41°C, in presenza sia di dNTPs che di NTPs. A 41°C il DNA genomico del microrganismo bersaglio rimane a doppio filamento e non costituisce un substrato per la reazione di amplificazione. Questo elimina la necessità di trattamenti con DNasi, che sono assolutamente necessari quando il rilevamento dell'RNA viene fatto con l'RT-PCR (Klein and Kuneja, 1997; Szabo and Mackey, 1999). Inoltre, il test NASBA, utilizzando molecole di RNA come bersaglio, permette un rilevamento specifico delle cellule vitali. Il prodotto della reazione NASBA è, come detto, RNA a singolo filamento.

Figura 5. Amplificazione basata sulla sequenza degli acidi nucleici (NASBA).



Fase I. Amplificazione del template.

1. RNA senso a singolo filamento.
2. L'oligonucleotide P1 contenente al 5' la sequenza di riconoscimento del promotore T7, si lega all'RNA bersaglio.
3. L'RT sintetizza un filamento di DNA copia del template a RNA.
4. L'RNasi H degrada l'RNA del duplex ed il primer P2 si lega al filamento di DNA antisenso.
5. L'RT copia il DNA antisenso per formare una molecola di DNA a doppio filamento.
6. La T7 RNA polimerasi riconosce il promotore T7 ed inizia la trascrizione, producendo centinaia di copie di RNA antisenso.

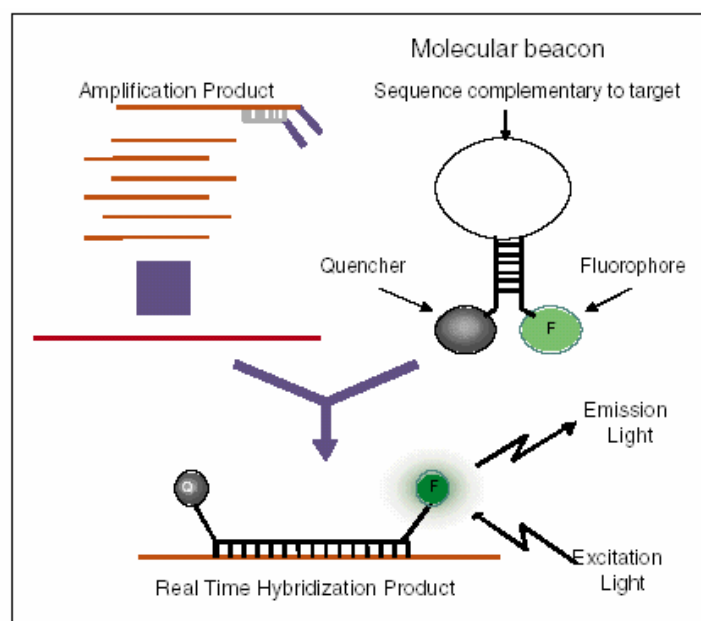
Fase II. Amplificazione esponenziale.

7. Il primer P2 si lega alla sequenza complementare sui filamenti di RNA antisenso.
8. L'RT sintetizza un filamento di DNA copia del template RNA.
9. L'RNasi H rimuove l'RNA dal duplex.
10. Il primer P2 si lega al filamento di DNA antisenso.
11. L'RT sintetizza DNA a doppio filamento contenente la sequenza del promotore T7.
12. Avvengono cicli aggiuntivi di trascrizione, con la formazione di 10^8 - 10^{10} copie di RNA antisenso che costituiscono i template sia per ulteriori cicli di amplificazione, sia per il rilevamento utilizzando molecular beacons introdotti nella reazione di amplificazione.

Generalmente la reazione NASBA richiede trattamenti del campione simili a quelli previsti per la PCR: estrazione degli acidi nucleici dell'organismo bersaglio dalle matrici alimentari o ambientali e trattamento di rimozione di eventuali inibitori delle reazioni enzimatiche.

Nel caso della NASBA la reazione è più complessa di quella della PCR in quanto sono richiesti tre enzimi e gli effetti di potenziali inibitori non sono ancora stati studiati in dettaglio, come per la PCR (Rossen et al., 1992), e non sono stati identificati facilitatori (Al Soud and Rådström, 2000) sostanze che possono contrastare gli effetti negativi degli inibitori. L'utilizzo di colture di arricchimento direttamente nella reazione NASBA, come viene fatto in alcuni saggi basati sulla PCR (Knutsson et al., 2001), non è possibile perché la temperatura di reazione non è abbastanza alta per ottenere la lisi delle cellule bersaglio ed il rilascio degli acidi nucleici. Inoltre gli enzimi che vengono impiegati nella reazione NASBA non sono termostabili e non potrebbero sostenere uno step iniziale ad alta temperatura per consentire la lisi; infine un tale step può determinare la denaturazione del DNA genomico. Il prodotto della NASBA può essere rilevato mediante elettroforesi su gel (Uyttendaele et al., 1995) saggio su gel associato ad enzimi (ELGA) (Uyttendaele et al., 1995) o mediante elettrochemiluminescenza (ECL) (van Gemen et al., 1994). Questo ultimo sistema di rilevamento è più rapido e meno laborioso rispetto ai metodi tradizionali quali ELISA e ibridazione del DNA. Alternativamente i prodotti NASBA possono essere rilevati in tempo reale usando "beacons" molecolari (Tyagi and Kramer., 1996) che vengono inclusi nella reazione (Leone et al., 1998). I beacons molecolari sono sequenze di acidi nucleici a singolo filamento, con una struttura stem-and-loop marcata con un colorante fluorescente ed un quencher alle estremità 5' e 3' rispettivamente (Tyagi and Kramer., 1996). La regione loop è una sequenza complementare alla sequenza bersaglio presente nell'acido nucleico che deve essere rilevato, e lo stem è formato mediante annealing delle sequenze complementari presenti sulle estremità della sonda. Quando questa è chiusa, la sonda non produce fluorescenza perché l'energia è trasferita al quencher e rilasciata come calore (Stryer., 1978). Tuttavia, durante la reazione NASBA, la sonda ibridizza con l'RNA bersaglio, separando il colorante reporter ed il quencher, il che fornisce un'emissione fluorescente, misurabile in tempo reale, che è direttamente proporzionale alla concentrazione della sequenza bersaglio (Leone et al., 1998) (Figura 6).

Figura 6. Rappresentazione schematica del rilevamento in tempo reale utilizzando molecular beacons.



L'uso di diverse sonde marcate con fluorofori differenti permette il rilevamento di più stampi (molecole di RNA) in una singola reazione (Tyagi et al., 1998). Questo approccio fornisce la possibilità di rilevamento del segnale in tempo reale. La reazione è condotta in un tubo chiuso; il che riduce il rischio di cross contaminazioni e permette di ottenere prestazioni più elevate ed è compatibile con l'automazione del processo come avviene per la PCR real-time. L'applicazione della NASBA per il rilevamento di patogeni batterici trasmessi per via alimentare è relativamente nuovo. Il metodo NASBA è stato riportato per il rilevamento di virus Norwalk-like (Greene et al., 2003), del virus dell'epatite A (Jean et al., 2002), di *S. enterica* (Simpkins et al., 2000), *L. monocytogenes* (Blais et al., 1997) e *C. jejuni* (Uyttendaele et al., 1997). Normalmente è richiesto l'uso di uno step di arricchimento che precede la NASBA anche per evitare risultati falsi positivi dovuti a RNA residuo presente in cellule non vitali. Un saggio NASBA real-time (RTi-NASBA) è stato già condotto per il rilevamento di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nell'acqua e nel latte (Rodríguez-Lázaro et al., 2004). In tale saggio è stato anche incluso un controllo di amplificazione interno (IAC). Uno IAC è una sequenza di acido nucleico non target presente nella reazione, che è coamplificata simultaneamente con la sequenza bersaglio (Hoorfar et al., 2004). Ciò può rilevare ogni reazione che non è avvenuta a causa del malfunzionamento dello strumento, di errori da parte dell'operatore o per la presenza di sostanze inibitrici nella matrice di campione originale (Ballagi-Pordány and Belák., 1996; Al-Soud and Radstrom., 2001). È stato anche visto che il metodo NASBA è applicabile al rilevamento di *Salmonella* da uno spettro ampio di alimenti compresi latticini, prodotti da forno, spezie, frutti di mare e carne (D'Souza and Jaykus, 2003). In questo studio sono stati anche valutati per la prima volta i possibili effetti di inibizione della matrice. È stato visto che alcune matrici alimentari inibiscono la reazione NASBA; questo inconveniente può essere superato mediante diluizioni del campione (di circa 10 volte). Jean et al. (2004) hanno sviluppato una multiplex NASBA per il rilevamento simultaneo del virus dell'epatite A e dei norovirus genogruppi I e II in cibi pronti all'uso. Un altro saggio NASBA per il rilevamento di norovirus in campioni fecali e nei frutti di mare è stato sviluppato da Kou et al. (2006). Tale saggio utilizza per il rilevamento dell'amplicone il Northern blotting. Recentemente un saggio NASBA real-time è stato sviluppato da Rutjes et al. (2006) per il rilevamento di norovirus.

Il rilevamento mediante questa metodica è stato confrontato con quello di una metodica convenzionale di RT-PCR su campioni di grande volume di acqua di fiume ed è stato osservato che i fattori che inibiscono l'RT-PCR hanno scarso o nessun effetto sulla reazione NASBA. Questo di conseguenza ha determinato una sensibilità più alta della NASBA rispetto all'RT-PCR. Combinando inoltre un metodo efficiente di estrazione dell'RNA con la NASBA real-time la sensibilità di rilevamento del norovirus in campioni di acqua è aumentata di almeno 100 volte. Abd El Galil et al. (2005) hanno sviluppato un saggio NASBA in combinazione con molecular beacon per il rilevamento e la quantificazione del virus dell'epatite A. Il saggio NASBA real-time, quando è combinato con una procedura di separazione immunomagnetica, riesce a rilevare poco meno di 10 PFU da campioni di acqua di lago. Il tempo di rilevamento con questa metodologia (~100 min.) è molto inferiore rispetto a quello necessario per un saggio Taqman RT-PCR (~180 min.) (Costa-Mattioli et al., 2002) o per una RT-PCR combinata con molecular beacon (Abd El Galil et al., 2004). Un saggio NASBA real-time viene anche utilizzato per il rilevamento di enterovirus in campioni clinici (Landry et al., 2005). Sempre per applicazioni in campo medico è stato sviluppato recentemente un saggio NASBA real-time per il rilevamento di *Chlamydomphila pneumoniae* il più comune agente eziologico di infezione del tratto respiratorio (Loens et al., 2006) e per il rilevamento di *Legionella* (Loens et al., 2006). Un saggio NASBA multiplex real-time è stato anche sviluppato per il rilevamento del coronavirus associato con la SARS (Keightley et al., 2005).

1.4 Nucleic acid fingerprinting

L'amplificazione mediante PCR di sequenze bersaglio specifiche presenti negli acidi nucleici estratti da campioni ambientali, rappresenta il primo passaggio di numerose tecniche molecolari sviluppate recentemente che hanno permesso di aumentare la conoscenza sulla diversità microbica e sulla interazione tra i microrganismi presenti in ambienti complessi. Tecniche come l'analisi di restrizione del DNA ribosomiale amplificato (ARDRA, anche conosciuto come 16S-RFLP), l'analisi delle regioni spaziatrici ribosomiali (RISA), del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizioni terminali (T-RFLP), l'elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE), sono state utilizzate in molte aree della ricerca microbiologica per aumentare la nostra capacità di descrivere e monitorare popolazioni miste e di distinguere nella stessa specie ceppi virulenti da ceppi non-virulenti. L'analisi del 16S rRNA ha consentito ai microbiologi di descrivere la diversità di individui nelle popolazioni e di identificare nuovi microrganismi (Amman et al., 1998).

Le tecniche di analisi di comunità basate sugli acidi nucleici sono state sviluppate per descrivere le comunità microbiche senza ricorrere alla coltivazione dei microrganismi. In teoria, il materiale genetico isolato da campioni ambientali contiene frammenti di DNA provenienti da tutti i membri della comunità, indipendentemente dalle esigenze nutrizionali e di crescita delle singole forme microbiche. Le regioni variabili del genoma possono essere amplificate utilizzando primers aventi come bersaglio le regioni fiancheggiatrici conservate ed i prodotti di amplificazione così ottenuti possono essere digeriti con enzimi di restrizione ed analizzati mediante elettroforesi. I profili generati sono chiamati DNA fingerprints. Da questo semplice principio si sono evolute differenti tecniche che includono ARDRA, RISA, DGE, T-RFLP, ognuna con propri vantaggi e svantaggi (Tabella 5). I dati risultanti da queste analisi sono spesso considerati analoghi a quelli ottenuti con approcci classici e pertanto possono essere utilizzati per determinare indici ecologici come l'indice di diversità di Shannon-Weaver e l'indice di similarità di Sorenson (Kent and Triplett, 2002).

Tabella 5. Tecniche molecolari di fingerprinting.

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi	Esempi di applicazioni
Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	Coltura-indipendente Adatto per l'analisi di un numero ampio di microrganismi Utilizzo dell'eterogeneità di sequenza del gene 16S rRNA	Estrazione di DNA e interferenze inerenti la PCR Non quantitativa La specificità può essere un problema a causa delle sequenze bersaglio brevi	Successione di popolazioni batteriche (Simpson et al., 2000).
Ribosomal RNA intergenic spacer analysis (RISA)	Coltura-indipendente Adatto per l'analisi di un numero ampio di microrganismi Significativa eterogeneità nella lunghezza e sequenza tra i batteri	Estrazione di DNA e interferenze inerenti la PCR. Non quantitativa. Eterogeneità significativa in lunghezza e sequenza tra i batteri	Analisi della diversità batterica e della struttura della comunità nelle acque reflue delle cartiere (Yu and Mohn, 2001). Analisi della comunità batterica da differenti sistemi di trattamento delle acque reflue delle cartiere (Baker et al., 2003).
Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)	Coltura-indipendente Adatto per l'analisi di un ampio numero di microrganismi.	Estrazione di DNA e interferenze inerenti la PCR Non quantitativa.	Diversità microbica di fanghi attivi (Pellegrin et al., 1999).
Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)	Coltura-indipendente Adatto per l'analisi di un numero ampio di microrganismi Rapida e semiquantitativa	Estrazione di DNA e interferenze inerenti la PCR	Composizione della comunità microbica (Gilbride and Fulthorpe, 2004). Composizione della comunità batterica in impianti di trattamento di acque reflue (Hiraishi et al., 2000).

1.4.1 Denaturing gel electrophoresis (DGE)

Con la tecnica che utilizza l'elettroforesi su gel in condizioni denaturanti (DGGE) o (TGGE), possono essere separati frammenti di DNA a doppio filamento, (inferiori alle 500 bp), di stessa lunghezza, ma diversa sequenza. La separazione dei frammenti di DNA dipende dal loro contenuto in G+C e dalla distribuzione delle basi. Il fingerprinting si ottiene per effetto del diverso comportamento di denaturazione delle molecole in un gradiente lineare di denaturazione ottenuto mediante agenti chimici (urea e formamide) o fisici (temperatura). La concentrazione di agenti denaturanti necessaria per l'apertura della doppia elica varia in molecole caratterizzate da sequenze diverse. Infatti, è inversamente proporzionale all'energia di legame tra i due filamenti e quindi al contenuto in G+C, e alla posizione delle G e delle C lungo la sequenza. Per ottenere una risoluzione ottimale le molecole non devono essere completamente denaturate. L'aggiunta ad uno dei primers di una sequenza (da 30 a 40 bp circa) ricca in G+C, denominata GC-clamp, (con elevata energia di legame), ha il compito di impedire che la denaturazione dell'amplicone sia completa e che la regione analizzata si trovi nel dominio di melting più basso (Myers et al., 1985; Sheffield et al., 1989). Poiché le condizioni richieste per la denaturazione delle molecole di DNA sono strettamente correlate alla loro sequenza, e dato che la denaturazione influisce sulla velocità di migrazione elettroforetica degli ampliconi, molecole con sequenza diversa migreranno diversamente su gel nei quali è presente un gradiente lineare denaturante. In effetti, nelle condizioni impiegate nella DGGE, è possibile evidenziare differenze minime di lunghezza tra ampliconi, che altrimenti non sarebbero visibili. Inoltre, è possibile discriminare frammenti di DNA di uguale lunghezza, ma nei quali sono presenti sostituzioni di singoli nucleotidi. La DGGE può essere condotta su gel con gradiente denaturante perpendicolare o parallelo. Nel primo caso, il gradiente denaturante è perpendicolare alla direzione dell'elettroforesi e l'ambito del gradiente è generalmente ampio da: 0-100% o 20-100%; in questo tipo di gel può essere caricato un solo campione. Nella DGGE in parallelo, il gradiente denaturante è parallelo al campo elettrico e l'ampiezza del gradiente è ristretta, permettendo così una migliore separazione (Myers et al., 1987); i gels paralleli sono quelli più comunemente utilizzati. Le bande nei fingerprints DGGE possono essere rilevate mediante colorazione con bromuro

d'etidio o con il Silver staining (Felske et al., 1996), una procedura più sensibile che, però, non è compatibile con esperimenti di ibridazione DNA-DNA. Una alternativa per la visualizzazione dei gels DGGE è l'impiego del SYBR Green I (Muyzer et al., 1997). La colorazione con SYBR Green I non fornisce colorazione di fondo, il che permette il rilevamento di frammenti di DNA anche a concentrazioni molto basse.

L'identificazione delle specie, utilizzando la PCR-DGGE, avviene attraverso il confronto dei prodotti di amplificazione ottenuti con quelli generati da specie note di riferimento. Tuttavia, per un'identificazione certa, gli ampliconi devono essere prelevati da gel, riamplicati e sequenziati e la loro sequenza deve essere confrontata con quelle note depositate nelle banche dati. Le informazioni di sequenza ottenute a partire da frammenti di DNA relativamente corti (<500 bp) possono essere talvolta limitate per effettuare un'identificazione filogenetica certa. Inoltre, molecole di DNA a singolo filamento che si possono formare durante l'amplificazione dei geni per l' rRNA 16S possono determinare una sovrastima dell'eterogeneità di sequenza (Zhang et al., 2005). La PCR-DGGE è stata utilizzata, per la prima volta, in studi di ecologia microbica da Muyzer et al. (1993). Oggi, vi è un'ampia letteratura sull'impiego di questa metodologia in campo microbiologico. La PCR-DGGE è generalmente impiegata sia per determinare la struttura di comunità microbiche in campioni ambientali, senza dover ricorrere a tecniche di coltivazione su piastra, sia per determinare le dinamiche della comunità in risposta a variazioni ambientali. Le applicazioni più recenti di questa tecnica sono state rivolte a studiare la struttura e l'evoluzione di comunità microbiche nel suolo (Norris et al., 2002; Avrahami et al., 2003; Nicol et al., 2003); in acque di mare (Bano and Hollibaugh, 2002), fiume (Sekiguchi et al., 2002), e lago (Crump et al., 2003); nel tratto gastrointestinale (Zoetendal et al., 2002); in bioreattori per il trattamento di acque di scarico (Gray et al., 2002; Stamper et al., 2003; Zhang et al., 2005); e in campioni clinici (Burton et al., 2003; Donskey et al., 2003; Mc Bain et al., 2003). La PCR-DGGE è anche utilizzata per l'identificazione e la tipizzazione di forme microbiche (Nielsen et al., 2000; Theelen et al., 2001; Gurtler et al., 2002) e in ambito di microbiologia degli alimenti. Randazzo et al. (2002) hanno esaminato la successione microbica durante la produzione artigianale di formaggio siciliano, mentre Ercolini et al. (2003a) mediante PCR-DGGE e sequenziamento delle regioni V3 e V4-V5 del

16S rDNA hanno studiato la struttura della comunità batterica presente nel formaggio Stilton. Settani et al. (2006) hanno utilizzato una combinazione di multiplex PCR e DGGE per monitorare le specie di *Lactobacillus* associate con lievito naturale. Cocolin et al. (2005) hanno sviluppato un protocollo di PCR-DGGE basato sul gene *rpoB* per il rilevamento e l'identificazione di *Yersinia* spp. negli alimenti, fornendo risultati in tempi molto più rapidi (24-36 ore) rispetto ai metodi tradizionali (7-28 giorni).

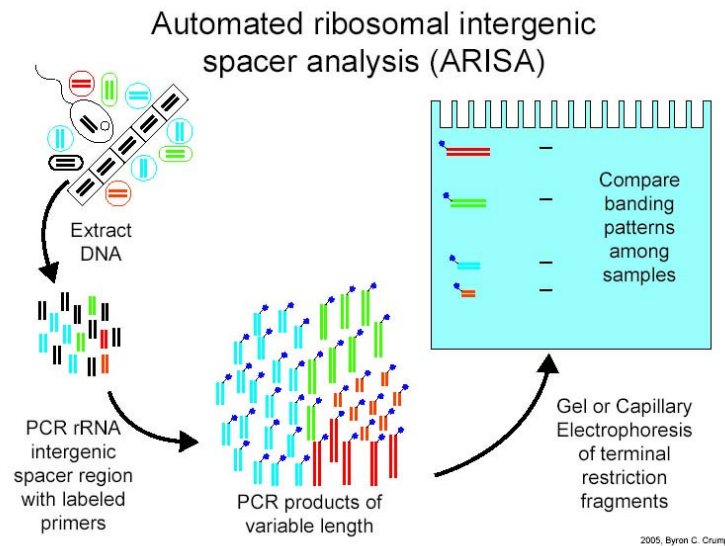
1.4.2 Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA)

Un'altra tecnica di DNA fingerprinting è rappresentata dall'analisi della regione intergenica compresa tra i geni 16S e 23S rRNA. La lunghezza di questa regione spaziatrice (ITS) varia tra i diversi microrganismi e la RISA sfrutta questa eterogeneità di lunghezza per l'identificazione dei taxa presenti nel campione in esame. Come in altri approcci di fingerprinting, questa tecnica è suscettibile agli artefatti metodologici che possono avvenire durante la PCR. La RISA è stata applicata con successo per rilevare cambiamenti dovuti a perturbazioni della comunità batterica (Fisher and Trippler, 1999). Yu e Mohn (2001) hanno utilizzato tale metodica molecolare insieme con il sequenziamento del 16S rRNA, per investigare la diversità batterica e la struttura di una comunità. Lo studio ha mostrato che le differenze temporali nella comunità erano maggiori di quelle spaziali e che i filotipi dominanti appartenevano ai generi *Methylobacillus* e *Azospirillum*.

Come evoluzione logica della RISA nasce l'ARISA (Automated ribosomal intergenic spacer analysis). Questa tecnica, sviluppata da Fisher e Triplett, è basata sull'utilizzo per l'amplificazione di un primer fluorescente. I prodotti di PCR sono analizzati mediante un sistema di elettroforesi capillare automatizzata che produce un elettroferogramma, i cui picchi corrispondono ai frammenti di DNA marcati terminalmente (Figura 7). Diversi studi hanno dimostrato la robustezza della ARISA nel produrre profili equivalenti nel numero di picchi e nell'intensità di fluorescenza, a partire da amplificazioni multiple dello stesso campione o da repliche del campione stesso (Fisher and Triplett, 1999; Yannarel and Triplett, 2005). Fisher e Triplett (1999) hanno osservato che variando il numero dei cicli di amplificazione (tra 15 e 30) tutti i profili ARISA ottenuti erano simili, ad eccezione di alcuni picchi aventi taglia molecolare vicina al limite di rilevamento, suggerendo che possibili artefatti dovuti alla PCR non influenzano in maniera significativa i profili ottenuti. La sensibilità della tecnica è veramente elevata e la riproducibilità è garantita dall'automazione dello strumento. L'ARISA è stata utilizzata per analizzare la struttura genetica di diverse comunità batteriche e/o fungine da campioni di acqua dolce (Fisher and Triplett, 1999), di acqua di mare (Brown et al., 2005), bacterioplancton (Fisher et al., 2000; Graham et al., 2001) e suoli differenti (Ranjard et al., 2001). L'automatismo strumentale della

ARISA e la semplicità di lettura dei dati ottenuti rendono questa tecnica adatta per analizzare e confrontare un grande numero di campioni in modo attendibile e riproducibile.

Figura 7. Rappresentazione schematica della ARISA.



1. Estrazione del DNA genomico; 2. Amplificazione della regione intergenica compresa tra i geni 16S e 23S rRNA con primers universali marcati. 3 La miscela di ampliconi è costituita da frammenti di lunghezza variabile. 4. I frammenti sono separati mediante elettroforesi capillare con l'impiego di un sequenziatore automatico.

1.4.3 Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

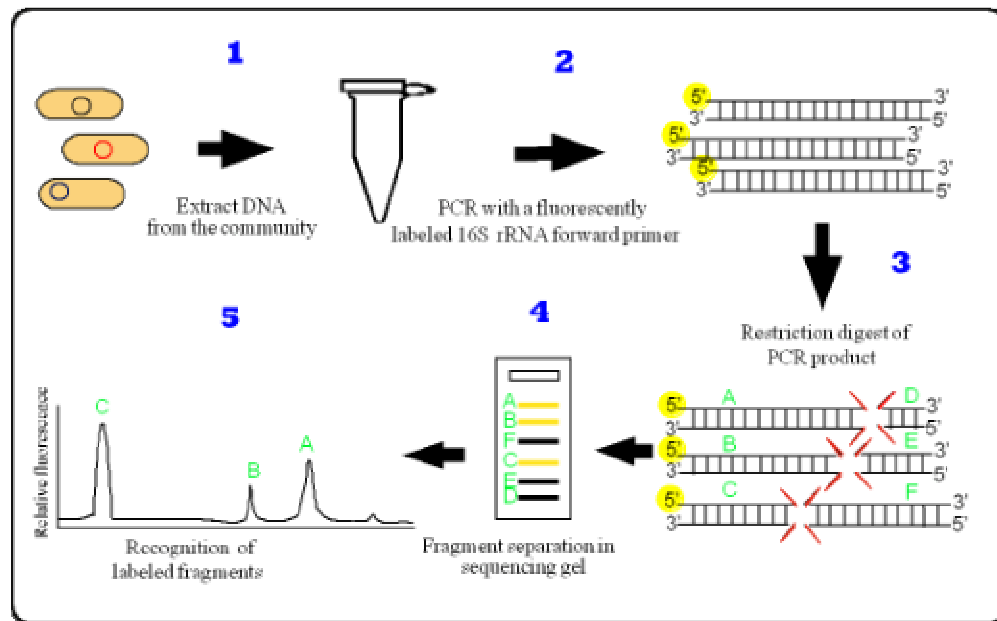
Questa tecnica coinvolge l'amplificazione del gene che codifica per l'rRNA ribosomiale 16S seguita dalla digestione enzimatica dell'amplicone e dall'elettroforesi su gel. L'utilizzo di primers appropriati nella reazione di PCR permette di ottenere sia fingerprints dell'intera comunità microbica (con primers universali) che di sottogruppi specifici (con primers specie-specifici). Per individuare gli RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) si utilizzano enzimi di restrizione che riconoscono siti di taglio specifici di 4-6 bp; i prodotti di amplificazione vengono digeriti con uno o più enzimi generando una famiglia di frammenti che vengono separati in base alla taglia molecolare mediante elettroforesi su gel. Le differenze nella lunghezza del frammento dovute a sostituzioni, addizioni, delezioni o riarrangiamenti possono determinare alterazioni della sequenza genica che possono produrre nuovi siti di restrizione o eliminarne alcuni già esistenti. Questo fenomeno, dovuto appunto al polimorfismo delle molecole di DNA bersaglio, si traduce nel profilo di restrizione caratteristico di una comunità microbica, profilo che si presenta come una particolare combinazione di bande (di intensità e di taglia differenti) all'interno del gel elettroforetico. Inoltre, meno sono correlate le specie degli individui in esame, più la loro sequenza di DNA sarà divergente, e maggiore sarà la complessità del profilo RFLP. La presenza o assenza di frammenti di restrizione può essere utilizzata per identificare sia specie che popolazioni. Questa metodica presenta un problema quando i frammenti di restrizione della comunità vengono risolti su gel di poliacrilammide, a causa del numero elevato di frammenti di restrizione che alcuni microrganismi presentano. Teoricamente una tecnica che genera profili di restrizione di una comunità dovrebbe essere in grado di risolvere i frammenti di DNA (gli ampliconi) generando un solo frammento di restrizione per ogni organismo (Kolbert e Persing, 1999). Nel 1994, Avaniss-Aghjani et al. hanno accoppiato la tecnologia del sequenziamento automatico all'amplificazione del marcatore molecolare rRNA 16S sviluppando un protocollo rapido per l'identificazione a largo spettro di specie batteriche. L'ampio database di sequenze di rRNA 16S disponibili rende questo bersaglio un candidato ideale per l'identificazione molecolare di campioni ambientali. Nel caso specifico, si può parlare quindi di un'analisi comparativa dei geni codificanti l'rRNA 16S di una

comunità, ossia di una procedura di Ribotipizzazione (Marsh, 1999). Recentemente è stato sviluppato da Gonzalez et al. (2006) un saggio di PCR-RFLP dei geni 16S rRNA e 23S rRNA che consente di discriminare tra *Helicobacter*, *Campylobacter* e *Arcobacter*, tre generi strettamente correlati. Chen et al. (2006) hanno utilizzato la PCR-RFLP per caratterizzare i batteri termo-acidofili formanti spore isolati da ambienti di produzione del succo di mela.

1.4.4 Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

Come evoluzione logica dell'analisi RFLP, nasce la tecnica denominata T-RFLP, che applicata all'analisi di comunità microbiche è in grado di rilevare differenze anche minime tra ceppi, consentendo la comprensione della struttura e la funzione della comunità microbica in esame. Come indica il suo nome, l'analisi T-RFLP misura la grandezza del polimorfismo dei frammenti terminali di restrizione di un marker genetico amplificato mediante PCR. L'analisi T-RFLP è basata sulla digestione con endonucleasi di restrizione di prodotti di PCR marcati all'estremità con una molecola fluorescente. Uno o entrambi i primers possono essere marcati con fluorocromi differenti. I prodotti di digestione vengono mescolati con uno standard di taglie molecolari marcato con un differente colorante fluorescente, ed i frammenti vengono poi separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide o con sistemi basati sull'elettroforesi capillare con rilevamento automatico dei frammenti marcati di DNA mediante laser (Figura 8).

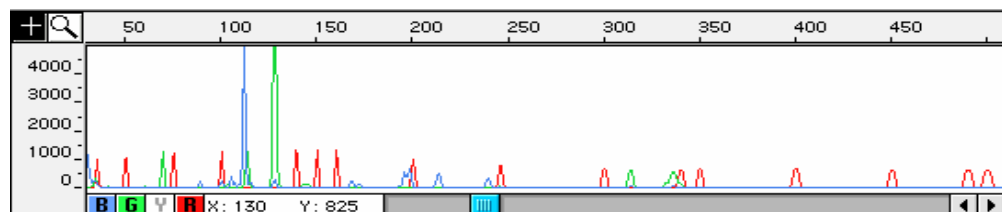
Figura 8. Descrizione schematica della procedura di T-RFLP applicata all'analisi molecolare di una comunità microbica.



1. Estrazione del DNA genomico; 2. Amplificazione dei geni per il 16S rRNA con primers universali. Il primer forward è marcato al 5' per la successiva analisi del frammento terminale (T-RF); 3. La miscela degli ampliconi è digerita con un enzima di restrizione che genera frammenti di diversa taglia (A-F); 4. I frammenti sono separati mediante elettroforesi capillare con l'impiego di un sequenziatore automatico, con quantificazione diretta della fluorescenza dei singoli T-RF.

Il risultato di tale analisi è un elettroferogramma costituito da una serie di picchi che differiscono per mobilità (taglia molecolare), altezza e area (Figura 9) e che rappresentano le diverse forme microbiche presenti nella comunità in esame.

Figura 9. Esempio di elettroferogramma ottenuto mediante analisi T-RFLP.



Nella Figura 9 si possono notare tre set di picchi: il primo di colore rosso, rappresenta il marker standard interno, mentre gli altri due indicano i frammenti di restrizione terminali (T-RFs) dei prodotti di digestione (in blu quelli corrispondenti all'estremità 5' del prodotto di amplificazione e in verde quelli corrispondenti all'estremità 3'). L'altezza di ogni picco dovrebbe fornire una misura della proporzione relativa di ogni componente della popolazione, tuttavia a causa dell'annealing preferenziale del primer su alcuni stampi di DNA rispetto ad altri (Suzuki and Giovannoni, 1996), il valore assoluto di questa misura deve essere trattato con cautela. Inoltre microrganismi differenti possono avere per un determinato enzima un T-RF della stessa dimensione e quindi non essere distinguibili in base ad un singolo profilo di restrizione. Questo è particolarmente vero per i T-RF generati dall'estremità 3' terminale del gene 16S rRNA. Una discriminazione maggiore viene fornita dalla regione 5' in conseguenza dell'eterogeneità di sequenza all'estremità 5' del gene, nelle regioni V1, V2 e V3 (Suzuki et al., 1998).

Il programma di analisi fornisce oltre all'elettroferogramma una tabella, che include, la taglia in paia di basi di ogni picco (calcolata facendo riferimento allo standard interno) e l'altezza del picco relativa alla quantità di fluorescenza rilevata.

Quando si analizza un particolare profilo, viene fissata una soglia minima di fluorescenza per escludere il rumore di fondo.

L'analisi T-RFLP è soggetta a tutte le interferenze caratteristiche degli approcci di amplificazione; è stato osservato che, anche in una semplice comunità artificiale, una interferenza nell'amplificazione di particolari sequenze, causata dall'annealing preferenziale di alcune coppie di primer, o da un incremento nell'incidenza di prodotti di PCR chimerici in relazione all'aumento del numero di cicli di PCR, può ridurre la qualità delle predizioni quantitative (Osborn et al., 2000). Altre potenziali complicazioni sono associate con la PCR a largo spettro; DNA batterico contaminante all'interno dei reagenti di amplificazione della PCR, Taq polimerasi o anche tubi di PCR possono portare a risultati falsi positivi a causa dell'amplificazione di molecole di DNA non correlate con le sequenze bersaglio. In più amplificazioni da stampi batterici misti possono dar luogo alla formazione di artefatti molecolari che non rappresentano forme microbiche esistenti in natura. Inoltre c'è la possibilità di ottenere risultati falsi negativi

dovuti alla presenza di sostanze inibitrici presenti nella soluzione di reazione (Kolbert and Persing, 1999). Pertanto è necessario ridurre al minimo e definire chiaramente la quantità di variabili sperimentali e/o le tendenze inerenti ai metodi basati sulla PCR. Occorre inoltre stabilire quali altri fattori risultano importanti per aumentare l'accuratezza dell'analisi quando si utilizza come stampo DNA proveniente da campioni naturali: riproducibilità dell'esperimento, effetti di diluizione, scelta appropriata di primers, polimerasi e temperatura di annealing (Osborn et al., 2000). Usando un sistema di elettroforesi capillare (come ad esempio il sistema ABI PRISM 310) con un meccanismo automatico di caricamento del campione (caricamento elettro-cinetico), il grado di variabilità tra corse replicate dello stesso campione risulta molto minore che in sistemi manuali a gel di poliacrilammide. La differenza maggiore che si osserva in analisi replicate dello stesso campione utilizzando un sistema di caricamento manuale a gel, è una diminuzione generale dell'ampiezza di tutti i picchi, con la scomparsa, in alcuni casi, dei picchi minori. Questo è dovuto al fatto che errori di caricamento possono determinare variazioni nella quantità totale del campione che si intende analizzare. L'analisi T-RFLP prevede inoltre la presenza in ogni campione di uno standard interno anch'esso fluorescente, che permette di quantificare variazioni in termini di taglia di basi dei T-RFs e variazioni nelle proporzioni relative di ciascun T-RF in un profilo di comunità. Questo tipo di tecnologia fa sì che si possano ottenere profili con un alto grado di riproducibilità. I principali parametri sperimentali da controllare in un'analisi T-RFLP sono:

Quantità di DNA stampo

Il primo parametro da tenere in considerazione è la quantità di DNA stampo. È stato osservato da Farrelly et al. (1995) che in una comunità artificiale il rapporto dei geni rRNA amplificati riflette il rapporto di DNA stampo presente nella miscela di partenza, nonostante evidenze contrarie della tendenza risultante da fattori come l'annealing preferenziale dei primers (Suzuki and Giovannoni, 1996) o differenze nelle cinetiche di re-annealing quando la concentrazione dei prodotti di PCR supera determinati livelli (Suzuki et al., 1998). Diluendo la concentrazione iniziale di templatò si osserva una riduzione nel numero e nell'altezza dei picchi presenti in un determinato profilo, mentre le taglie rimangono invariate. Di

conseguenza, l'altezza di ciascun picco riflette l'abbondanza relativa di un determinato ribotipo nella miscela di reazione.

Numero di cicli di PCR

La riduzione del numero dei cicli di PCR, come atteso, porta ad una riduzione nel numero e nell'altezza dei T-RFs presenti in un determinato profilo. Ogni T-RF presente in un profilo generato con un numero di cicli di PCR minore è presente anche nei profili che sono stati generati da un numero di cicli maggiore. Questo è dovuto al fatto che l'incremento del numero di picchi in corrispondenza ad un incremento nel numero di cicli di PCR, determina la comparsa di T-RFs associati a popolazioni minoritarie che non possono essere rilevate con un numero basso di cicli di amplificazione. Sebbene l'incrementando del numero di cicli permette di ottenere profili più complessi, in queste condizioni i profili saranno maggiormente soggetti a interferenze connesse alla PCR.

Taq polimerasi

Un'altra possibile fonte di variazione per l'analisi T-RFLP può essere l'enzima utilizzato per la reazione di amplificazione. Tuttavia, come osservato da Osborn et al. (2000), l'utilizzo di Taq polimerasi differenti non sembra avere alcuna influenza sui membri predominanti della popolazione.

Temperatura di annealing

Riguardo alla temperatura di annealing da utilizzare per la PCR è stato osservato che più è alta tale temperatura maggiore è il numero dei T-RF (Osborn et al., 2000). Questo risultato sembra non essere in accordo con la teoria secondo la quale temperature di annealing più stringenti forniscono profili con un minor numero di T-RF. Una possibile spiegazione a questa apparente anomalia potrebbe essere che in una reazione di PCR ad una temperatura di annealing più bassa si ha un maggior numero di sequenze amplificate, ma come conseguenza queste ultime vengono prodotte in concentrazione più bassa e quindi non sono rilevate in una analisi T-RFLP.

Presenza di prodotti parziali di digestione

Un altro possibile problema è la presenza di prodotti di PCR parzialmente digeriti. Questo può determinare un incremento nel numero dei T-RFs e condurre ad una sovrastima della diversità della comunità in esame. La tendenza di alcune endonucleasi di restrizione nel preferire alcuni siti di taglio piuttosto che altri può essere limitata aumentando la concentrazione dell'enzima stesso. La presenza di frammenti terminali parzialmente digeriti, in alcuni casi non provoca un aumento nel numero dei picchi in un profilo T-RFLP, ma piuttosto determina uno spostamento della taglia dei frammenti più piccoli, accoppiata ad un aumento del numero di frammenti con taglia maggiore. Un metodo per determinare quali frammenti derivano da digestioni parziali è quello di realizzare un esperimento in parallelo nel quale la concentrazione di enzima sia limitante; in questo caso i T-RFs saranno potenzialmente costituiti da prodotti parzialmente digeriti. Confrontando i due profili così ottenuti sarà possibile stabilire quali picchi corrispondono a potenziali “falsi positivi”. Il problema di risultati falsi positivi non è naturalmente limitato alla sola analisi T-RFLP.

La tecnica T-RFLP è rapida e sensibile e può essere utilizzata per l'identificazione di ceppi batterici, per l'analisi comparativa di comunità e per ottenere una stima della diversità di un gruppo filogenetico all'interno di una comunità. Grazie alla grande capacità di produzione e al supporto dei database di sequenza, tale tecnica si dimostrerà sempre più preziosa nell'analisi comparativa di comunità. Inoltre livelli crescenti nella dissezione di comunità possono essere ottenuti con l'uso sistematico nel protocollo T-RFLP di primer filogeneticamente specifici. I dati T-RFLP, se utilizzati insieme a quelli sulla diversità e distribuzione di marker fisiologici fondamentali, o a quelli chimico-fisici che descrivono un particolare ecosistema, possono fornire un livello di comprensione profonda della struttura e della funzione di una comunità microbica (Marsh, 1999). Il dettaglio delle informazioni fornite (per esempio la taglia in bp dei T-RF) permette il confronto tra i profili di restrizione ottenuti da metagenoma o da DNA di singoli isolati, e le informazioni presenti nei database di predizione di T-RFs “in silico” aprendo la possibilità di assegnazioni filogenetiche immediate a partire dall'analisi del T-RFLP (Osborn et al., 2000). Risulta evidente che l'utilità di questa tecnica è

apprezzabile su campioni complessi solo se modellata su un database di sequenze. I profili così ottenuti riflettono la diversità genetica della comunità e ciascun T-RFs può essere utilizzato come “data point” per effettuare confronti di comunità mediante analisi statistiche.

Vi è una vasta letteratura sull'utilizzo del T-RFLP per lo studio di comunità batteriche. Horz et al. (2004) mediante analisi T-RFLP hanno esaminato la risposta, di batteri che ossidano l'ammonio (AOB), ad incrementi contemporanei di: anidride carbonica atmosferica, precipitazione, temperatura e decomposizione dell'azoto. In questo lavoro è stato osservato che la comunità microbica può subire delle alterazioni significative per effetto di cambi globali con implicazioni rilevanti sulla funzione dell'ecosistema. Per esempio l'aumento della decomposizione dell'azoto determina alterazioni della struttura della comunità batterica, con una dominanza nella popolazione di batteri strettamente correlati a *Nitrospira*. Questa variazione è molto pronunciata in assenza di un aumento della temperatura e delle precipitazioni atmosferiche. L'abbondanza totale dei batteri AOB, invece, diminuisce significativamente in risposta all'aumento dell'anidride carbonica atmosferica in particolare in seguito ad un incremento nelle precipitazioni atmosferiche. Pester et al. (2004) mediante analisi T-RFLP del gene *pmoA*, hanno studiato la diversità e la struttura della comunità di batteri che ossidano il metano, presente nei sedimenti del litorale del lago di Costanza. I profili T-RFLP hanno indicato una elevata similarità tra la comunità attiva presente nello strato ossigenato e quella inattiva presente nello strato anossico a 10 cm di profondità. Inoltre non sono stati osservati grandi variazioni nella struttura della comunità presente in sedimenti prelevati nel periodo estivo ed in quello invernale. Sono state invece osservate notevoli differenze nella struttura della comunità presente nei sedimenti dello strato superficiale ed in quello più profondo. Pérez-Jiménez e Kerkhof (2005) hanno esaminato la comunità di batteri che riducono il solfato, mediante analisi T-RFLP del gene *dsrAB*, che codifica per la solfito redattasi. Edlund et al. (2006) hanno studiato la struttura della comunità microbica in sedimenti inquinati del Mar Baltico, mentre Moss et al. (2006) hanno analizzato la stabilità temporale ed i cambi dei gruppi filogenetici dominanti del dominio Bacteria in una comunità di biofilm presente negli estuari. L'alternanza della dominanza di gruppi filogenetici tra le varie stagioni è risultata associata a cambi stagionali nella temperatura, nella disponibilità di nutrienti e nella luce. La

struttura della comunità è apparsa essere stabile durante questi periodi malgrado i cambi di salinità e ossigeno disciolto. Hoshino et al. (2005) hanno dimostrato che l'analisi T-RFLP è una metodica appropriata per il monitoraggio quotidiano delle comunità microbiche coinvolte nei processi di trattamento delle acque reflue. È stato osservato, in particolare, che batteri appartenenti ai generi *Hydrogenophaga* e *Acidovorax* aumentano in numero dopo l'inizio della denitrificazione. L'analisi T-RFLP è stata utilizzata da Saikaly et al. (2005) per studiare la riproducibilità e la stabilità della struttura della comunità batterica in sistemi di fanghi attivi utilizzati per rimuovere sostanze organiche e nutrienti (azoto e fosforo) dalle acque di scarico municipali. Yoshie et al. (2006) hanno studiato la comunità batterica alofila responsabile della denitrificazione delle acque di scarico industriali utilizzando l'analisi T-RFLP. Questa metodica è stata anche utilizzata per analizzare la struttura e la disposizione spaziale della comunità microbica presente in reattori utilizzati per il biorisanamento di reflui agro-industriali ricchi in composti fenolici (Bertin et al., 2004, 2006). Fedi et al. (2005) hanno dimostrato che l'analisi T-RFLP rappresenta uno strumento molto utile per valutare i cambi nella struttura della comunità microbica presente in bioreattori sviluppati per la degradazione di policlorobifenili (PCB) ed emendati con metil- β -ciclodestrine. Hartmann e Widmer (2006) hanno dimostrato che l'analisi T-RFLP è un metodo molto sensibile per osservare le differenze nella struttura delle comunità microbiche del suolo.

L'analisi T-RFLP è stata utilizzata anche in campo alimentare per monitorare la dinamica di popolazione di una frazione metabolicamente attiva presente in colture starter utilizzate di routine nella preparazione di formaggi (Sánchez et al., 2006).

L'analisi del polimorfismo dei frammenti terminali di restrizione del gene che codifica per gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (*gap*) viene utilizzata per l'identificazione di specie di *Staphylococcus* in campioni clinici (Layer et al., 2006). Rogers et al. (2003) hanno utilizzato tale metodica molecolare per caratterizzare, senza ricorrere a procedure di coltivazione, la comunità batterica presente in campioni prelevati da pazienti adulti affetti da fibrosi cistica. La specie batterica maggiormente rappresentata in questa comunità è risultata essere *P. aeruginosa*, seguita da *Burkholderia cepacia* ed *Haemophilus influenzae*. Un saggio diagnostico basato sul T-RFLP è stato sviluppato da Christensen et al.

(2004) per ricercare *Lactobacillus* in campioni di sangue provenienti da pazienti affetti da batteriemia. L'analisi T-RFLP ha permesso la corretta identificazione di specie di *Lactobacillus* in tutti i campioni analizzati. Il saggio è stato completato in 8 ore rispetto alle 24-48 richieste dalle tecniche tradizionali basate sulla coltivazione e sulla caratterizzazione biochimica. Questo ha importanti implicazioni per la durata dell'infezione, il costo per la cura del paziente, la durata dell'ospedalizzazione, lo sviluppo della resistenza ad antibiotici di ampio spettro e la mortalità dovuta a batteriemia.

1.4.5 Approcci polifasici

In molti casi per una migliore descrizione della composizione e della diversità di comunità microbiche sono stati utilizzati approcci polifasici. Baker et al. (2003) hanno utilizzato diversi metodi di fingerprinting (16S-RFLP, RISA e Rep-PCR) per confrontare comunità batteriche presenti in differenti sistemi di trattamento di acque reflue di cartiera. Sebbene le comunità batteriche sono risultate essere abbastanza stabili nel tempo, ogni comunità presenta un differente fingerprint molecolare. Gilbride e Fulthorpe (2004) utilizzando tecniche tradizionali di coltivazione, sonde molecolari e librerie di cloni delle sequenze 16S rDNA hanno confrontato i singoli membri presenti in diversi sistemi di trattamento di acque di vegetazione delle olive. In questo modo hanno osservato scarsa sovrapposizione nella composizione della comunità coltivabile a livello di genere e hanno identificato *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Xanthobacter* spp. come alcune delle specie dominanti. Il sequenziamento parziale dei geni 16S rRNA da librerie dell'intera comunità ha permesso di identificare membri che sono risultati simili a *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Nitrospira*, *Firmicutes* e *Holophaga/Acidobacterium*. Inoltre Ballinger et al. (1998) mediante amplificazione clonaggio e sequenziamento del gene 16S rRNA, sono riusciti ad identificare alcuni *beta-proteobacteria* (incluse *Nitrospira*-like e *Nitrosomonas*) da un reattore di nitrificazione-denitrificazione per il trattamento di acque di scarico da raffineria. Gilbride et al. (2006) hanno utilizzato sia la DGGE che il T-RFLP per produrre i fingerprints molecolari da impianti di trattamento della senza delle olive. Nell'arco di 8 mesi, gli autori hanno osservato che variazioni nei fingerprints potrebbero essere correlate con le fluttuazioni nei parametri di processo. Per ricercare nelle comunità presenti nel suolo popolazioni batteriche antagoniste di patogeni delle piante, Hjort et al. (2006) hanno utilizzato due approcci molecolari. La composizione della comunità batterica dominante è stata analizzata mediante T-RFLP e DGGE dopo aver emendato il suolo con: spore di *Plasmodiophora*, chitina e sodio acetato. In seguito all'aggiunta di chitina al suolo alcune popolazioni batteriche sono incrementate drasticamente divenendo dominanti sia nella popolazione totale che nella comunità in attiva proliferazione. Alcune bande DGGE dei gel sono state sequenziate. Dai dati di sequenza è emerso che tali popolazioni erano simili a generi conosciuti di batteri in grado di degradare la

chitina come *Oerskovia*, *Kitasatospora* e *Streptomyces*. Alcune di queste sequenze sono risultate corrispondere a picchi presenti nel profilo T-RFLP. In seguito all'aggiunta di spore di *Plasmodiophora* è stato osservato un incremento nelle Pseudomonadi utilizzando nella DGGE primers *Pseudomonas*-specifici. Questi risultati dimostrano l'utilità di combinare diversi approcci molecolari per studiare la composizione di comunità microbiche complesse del suolo. Borin et al. (2006) hanno utilizzato un approccio polifasico per studiare l'ecologia microbica di un biofiltro allo scopo di valutare la successione delle specie microbiche a seguito di differenti condizioni di biofiltrazione. Utilizzando metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti, come RISA e DGGE, sono state studiate le variazioni nella struttura e nella biodiversità di una comunità microbica presente in un biofiltro utilizzato per il trattamento di aria contaminata da benzene: un composto tossico altamente volatile. Il confronto tra i profili RISA e DGGE della comunità totale e dei ceppi isolati hanno mostrato che in risposta all'incremento della concentrazione di benzene si assiste ad una successione nella popolazione durante la quale il genere *Rhodococcus* diviene la forma prevalente.

Riassumendo, utilizzando approcci di fingerprinting molecolare si può ottenere, rispetto alle tecniche tradizionali, una conoscenza più approfondita della biodiversità. Tuttavia, le caratteristiche dei campioni trattati, come ad esempio la presenza di particolati di natura inorganica e organica, può interferire con il recupero di DNA di alta qualità, limitando come detto in precedenza la sensibilità e l'accuratezza di queste metodiche.

1.5 Genere *Pseudomonas*

Il genere *Pseudomonas*, genere tipo della famiglia delle Pseudomonadaceae, è stato descritto originariamente da Migula nel 1894 ed include batteri gram-negativi aerobi, eterotrofi, con elevate capacità di adattamento, grande versatilità metabolica e capacità di colonizzare vari ambienti naturali. La famiglia delle Pseudomonadaceae comprendeva anche i generi: *Frauteria*, *Xanthomonas* e *Zoogloea* che sono stati successivamente riposizionati tassonomicamente in famiglie distinte.

I membri del genere *Pseudomonas* sono caratterizzati dalla capacità di crescere in terreno minimo utilizzando come unica fonte di carbonio ed energia una grande varietà di composti organici semplici. Risultano generalmente positivi alla reazione ossidasi ed hanno un contenuto G+C del DNA compreso tra il 58-70%.

I ceppi di *Xanthomonas* sono patogeni delle piante. Hanno maggiori richieste nutrizionali rispetto a *Pseudomonas*, producono caratteristici pigmenti cellulari di colore giallo (xantomonadine), ed hanno una risposta alla reazione ossidasi debole o negativa. Il contenuto in G+C varia tra il 63-71%. Successivamente il genere *Xanthomonas* è stato spostato nella famiglia delle Xanthomonadaceae.

Mentre i ceppi di *Pseudomonas* e *Xanthomonas* non tollerano condizioni acide, i ceppi di *Frauteria* possono crescere a valori di pH di 3,6. Il contenuto di G+C del DNA è di 62-64%. Questo genere è stato successivamente spostato nella sottoclasse Alpha Proteobacteria.

Infine il genere *Zoogloea* produce matrici gelatinose che formano flocculi ed il DNA ha un contenuto G+C del 65%. Questo genere successivamente è stato spostato nella sottoclasse Beta Proteobacteria.

Tassonomia

Il genere *Pseudomonas* ha subito ripetute revisioni tassonomiche. Le specie di *Pseudomonas* inizialmente venivano raggruppate sulla base dei risultati di test fenotipici convenzionali. Nel 1973 Palleroni et al. hanno proposto una classificazione basata su studi di ibridazione DNA-DNA e DNA-rRNA. In questo modo le specie di *Pseudomonas* sono state classificate in cinque cluster basati sull'omologia degli RNA ribosomali, chiamati "RNA similarity groups" (Figura 10). In seguito i cinque gruppi hanno rivelato essere correlati ad un'ampia varietà di *Proteobacteria* (De Vos and De Ley, 1983; De Vos et al., 1985, 1989). Nelle ultime due decadi le specie di *Pseudomonas* appartenenti ai gruppi II-V sono state trasferite ad altri generi.

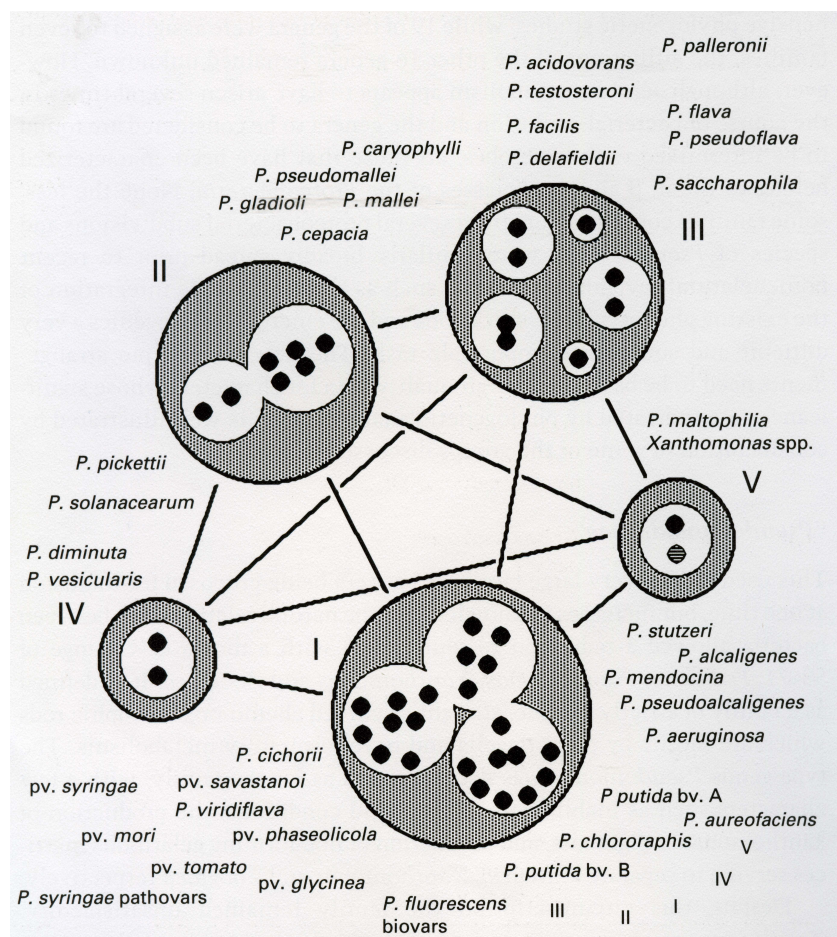


Figura 10. Classificazione delle specie appartenenti al genere *Pseudomonas* basata sugli RNA similarity groups. Fonte Palleroni (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume 1, p. 161.

➤ RNA Gruppo I

Il gruppo I rappresenta il genere *Pseudomonas sensu stricto* ed include specie fluorescenti (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. syringae* e *P. cichorii*) e non (*P. stutzeri*, *P. mendocina* e *P. alcaligenes*). All'interno di questo grande gruppo di similarità le specie sono a loro volta divise in tre sottogruppi.

Il primo comprende *P. aeruginosa*, la specie tipo del genere *Pseudomonas*, che rappresenta un patogeno opportunistico per l'uomo, e le specie denitrificanti e non fluorescenti come *P. alcaligenes* e *P. stutzeri*. Tutte le specie di questo gruppo sono in grado di crescere alla temperatura di 41°C.

Il secondo sottogruppo contiene patogeni delle piante: *P. syringae*, *P. cichorii* e *P. viridiflava*. La reazione ossidasi permette di differenziare *P. cichorii* che presenta una risposta positiva da *P. syringae* che presenta invece una risposta negativa. Le specie di *P. syringae* sono classificate in pathovars differenti.

Il terzo sottogruppo comprende organismi saprofitici come *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. chlororaphis*. *P. fluorescens* è una specie piuttosto eterogenea che può essere divisa mediante vari criteri tassonomici in cinque biovars (Palleroni, 1991), mentre *P. putida* è divisa in due biovars.

➤ rRNA gruppo II

Con l'eccezione di *P. solanacearum*, tutti i ceppi di questo gruppo crescono a 40°C, sono in grado di denitrificare e utilizzano un *ortho* diossigenasi (1,2-diossigenasi) per la rottura dell'anello aromatico del protocatecuato. Se si esclude *P. pickettii*, tutte le specie sono patogeni di piante (*P. caryophylli*, *P. gladioli* e *P. solanacearum*) o animali (*P. mallei*, *P. pseudomallei* e *P. cepacia*). Per i membri di questo gruppo è stato successivamente creato un nuovo genere *Burkholderia*, con *B. cepacia* come specie tipo (Yabuuchi et al., 1992, 1995). Questo genere appartiene alla sottoclasse Beta Proteobacteria.

➤ rRNA Gruppo III

Tutte le specie comprese in questo gruppo accumulano poli- β -idrossibutirrato come materiale di riserva, sono incapaci di utilizzare arginina o betaina come fonte di carbonio per la crescita, e con l'eccezione di *P. pseudoflava*, sono incapaci di crescere a 41°C o a denitrificare. Queste ultime due proprietà sono caratteristiche del gruppo II. Tutti i ceppi del gruppo III utilizzano una *meta* diossigenasi (2,3-diossigenasi) per la rottura dell'anello aromatico del protocatecuato. Questo gruppo può essere suddiviso in due sottogruppi: *Pseudomonas* in grado di ossidare l'idrogeno, come *P. facilis*, *P. saccharophila*, *P. flava*, *P. pseudoflava*, *P. palleroni*, e specie (*P. acidovorans*, *P. testosteroni* e *P. delafieldii*) incapaci di crescere in maniera chemiolilotrofa. Questa divisione non è tuttavia correlata con i gruppi di ibridazione DNA-rRNA. Successivamente le specie *P. flava* e *P. palleroni* del primo gruppo sono state inserite nel nuovo genere *Hydrogenophaga*, mentre *P. facilis* e *P. delafieldii* sono state trasferite nel nuovo genere *Acidovorax*, insieme con isolati clinici della nuova specie *A. temperans*, e con i patogeni delle piante del gruppo *P. avenae*. *P. acidovorans* è stata inserita nel genere *Comamonas*, che insieme con i generi *Acidovorax* e *Hydrogenophaga* forma la famiglia delle Comamonadaceae che appartiene alla sottoclasse Beta Proteobacteria.

➤ rRNA Gruppo IV

Questo gruppo comprende le specie *P. diminuta* e *P. vesicularis*, che differiscono dalle altre specie di *Pseudomonas* per la richiesta di fattori di crescita, per l'incapacità di utilizzare il nitrato come fonte di azoto e infine per una composizione di lipidi unica, dove i lipidi contenenti zuccheri rappresentano la maggioranza. Queste specie sono state trasferite al genere *Brevundimonas* (Segers et al., 1994), che appartiene alla sottoclasse Alpha Proteobacteria.

➤ rRNA Gruppo V

Questo gruppo è costituito da *P. maltophilia* che mostra un elevato livello di omologia dell'rRNA con le specie di *Xanthomonas*. Questa specie è stata trasferita dal genere *Pseudomonas* al genere *Xanthomonas* sulla base dei dati dell'rRNA e DNA, e del caratteristico profilo chemiotassonomico che include la presenza di acidi grassi idrossili ramificati durante lo sviluppo della cellula, differenze quantitative e qualitative negli zuccheri dei lipopolisaccaridi, e meccanismi di controllo del DAHP (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase) unici, ma differisce dalle altre Xanthomonadi per molti altri aspetti. Successivamente tale specie è stata definita come la specie tipo del genere *Stenotrophomonas* (Palleroni and Bradbury, 1993), che appartiene alla sottoclasse Gamma-Beta Proteobacteria.

Attualmente il genere *Pseudomonas* è costituito dalle specie del gruppo I, ed il genere appartiene alla sottoclasse Gamma Proteobacteria.

Caratterizzazione

Tradizionalmente, la caratterizzazione di ceppi di *Pseudomonas* viene condotta utilizzando test fenotipici classici come la crescita su terreni specifici, reazioni enzimatiche e analisi microscopica. Tuttavia questi approcci richiedono molto tempo e spesso sono inappropriati quando si esaminano ceppi appartenenti a specie strettamente correlate. In commercio sono disponibili due metodi di identificazione e caratterizzazione batterica ampiamente utilizzati, i sistemi API e Biolog.

Il kit API 20NE consiste di 20 test enzimatici e di assimilazione di composti di carbonio, mentre il Biolog GN system contiene 95 pozzetti con differenti fonti di carbonio. La respirazione batterica nei pozzetti Biolog GN è indicata dalla riduzione del colorante violetto di tetrazolio con conseguente formazione di una colorazione porpora. La caratterizzazione di ceppi batterici utilizzando tali test fenotipici è tuttavia controversa poiché dipende dalla capacità del microrganismo di crescere in determinate condizioni ambientali, e può essere complicata dalla presenza di plasmidi catabolici (Palleroni, 1986). Inoltre anche il più fine sistema fenotipico (per esempio, le Biotype-100 strips) non è in grado di risolvere le specie nei complessi altamente eterogenei come *P. fluorescens*, *P. putida* o *P. syringae* (Grimont et al., 1996). I metodi molecolari consentono l'identificazione di microrganismi sulla base della comparazione del DNA degli organismi da identificare con quello di microrganismi già classificati, garantendo così l'ottenimento di risultati affidabili. Ibridazione DNA-DNA, ribotipizzazione con gli enzimi di restrizione *SmaI* e *HincII* (Brosch et al., 1996) e microsequenziamento sono solo alcune delle metodiche molecolari utilizzate a scopo diagnostico. Per l'identificazione di specie di *Pseudomonas* che producono il pigmento fluorescente pioverdina è stata proposta la tipizzazione del sideroforo (Meyer et al., 2002). Il DNA ribosomiale (rDNA) è una sequenza bersaglio ideale per l'identificazione molecolare. Infatti, oltre ad essere ovviamente presente in tutti gli organismi, è soggetta ad un processo evolutivo relativamente lento che consente la presenza sia di motivi altamente conservati, che permettono la differenziazione tra loro di specie non strettamente correlate, sia di sequenze variabili, utili per il confronto tra specie più strettamente correlate. In sintesi, l'rDNA è dotato di elevato polimorfismo interspecifico (in specie diverse) e limitato polimorfismo intraspecifico (all'interno della specie). Il che significa che

individui della stessa specie si caratterizzano per una sostanziale identità di sequenza dell'rDNA, mentre individui appartenenti a specie diverse presentano un'identità tanto minore quanto maggiore è la loro distanza evolutiva e quindi la loro diversità. L'identificazione di un microrganismo mediante analisi dell' rDNA avviene normalmente in due fasi. Nel corso della prima fase si effettua la PCR, mentre nella seconda fase i prodotti di amplificazione ottenuti possono essere sottoposti a sequenziamento seguito dal confronto delle sequenze ottenute con quelle raccolte da banche dati. Tale confronto viene effettuato impiegando programmi appositi. Un esempio è BLAST, acronimo di *Basic Local Alignment Search Tool*, disponibile al sito <http://www.ebi.ac.uk/services>, che consente la ricerca di similarità tra la sequenza oggetto di studio e tutte le sequenze depositate nella banca dati. Recenti avanzamenti nelle tecniche molecolari e le informazioni disponibili nei database di sequenze hanno incoraggiato lo sviluppo di protocolli di PCR altamente specifici, specialmente per il rilevamento del gene 16S rRNA (Amann et al., 1995; Giovannoni et al., 1990; Moyer et al., 1995; Sayler et al., 1990). Il disegno di primers genere specifici dipende sia da una tassonomia ben definita sia da una collezione rappresentativa di sequenze bersaglio. Widmer et al. (1998) hanno disegnato dei primers *Pseudomonas*-specifici che amplificano selettivamente un frammento del 16S rDNA di circa 990 bp, che permette di rilevare e tracciare la presenza di *Pseudomonas* mediante PCR, clonaggio e sequenziamento. Il protocollo di PCR è stato successivamente combinato con l'analisi del profilo di frammentazione del DNA ottenuto mediante digestione multipla (MERFLP, multiple enzyme restriction fragment length polymorphism) con quattro enzimi di restrizione: *AluI*, *HinfI*, *RsaI* e *Tru9I*. Questa analisi si è dimostrata utile nel distinguere tra loro le *Pseudomonas* fluorescenti (Porteous et al., 2002). Un altro protocollo di PCR genere specifico per *Pseudomonas* è stato sviluppato da Purhoit et al. (2003), mentre Scarpellini et al (2004) hanno messo a punto un saggio di PCR specie-specifico per l'identificazione di *P. fluorescens* e per distinguere i biotipi di questa specie combinando tecniche molecolari con metodi biochimici tradizionali. La coppia di primer sviluppata è costituita da un primer *forward* specie-specifico e da un primer *reverse* famiglia-specifico. Sebbene il gene 16S rRNA rappresenti un bersaglio molecolare di primaria importanza per l'identificazione del genere *Pseudomonas*, tuttavia anche altri marcatori molecolari sono utilizzati per tale scopo. Yamamoto e Harayama (1998)

e Yamamoto et al. (2000) hanno proposto che è possibile stabilire una filogenesi più precisa del genere *Pseudomonas* analizzando alcuni geni funzionali, come *gyrB* e *rpoD*. Il gene *gyrB* codifica per la subunità B della DNA girasi, l'enzima che introduce superavvolgimenti negativi nel cromosoma batterico e svolge un ruolo cruciale nella replicazione del DNA (Watt and Hickson, 1994). Il gene *rpoD*, invece, codifica per il fattore σ^{70} uno dei fattori sigma della RNA polimerasi (Lonetto et al., 1992). Sia la DNA girasi sia il fattore σ^{70} sono essenziali per la sopravvivenza della cellula batterica ed il trasferimento orizzontale di questi geni sembra molto raro così come per i geni per l'rRNA, inoltre i geni che codificano per proteine sembrano aver subito un'evoluzione più rapida (Ochman and Wilson, 1987). Un altro marcatore molecolare utilizzato per la filogenesi e l'identificazione dei ceppi di *Pseudomonas* è il gene *rpoB* (Ait Tayeb et al., 2005), che codifica per la subunità beta dell'RNA polimerasi. De Vos et al. (1998) hanno utilizzato come bersaglio molecolare per l'identificazione di *Pseudomonas* il gene *oprI*, che codifica per la lipoproteina I della membrana esterna. Tale gene è stato dimostrato essere conservato tra i membri delle *Pseudomonas* fluorescenti (De Vos et al., 1992; Saint-Onge et al., 1992). È stato anche sviluppato un protocollo di multiplex PCR basato sull'amplificazione dei geni *oprI* e *oprL* per il rilevamento specifico rispettivamente di *Pseudomonas* fluorescenti e *P. aeruginosa*. Recentemente Bodilis et al. (2006) hanno sottolineato il potenziale ruolo del gene *oprF*, che codifica per la maggiore proteina della membrana esterna, per definire gli ecotipi nelle specie di *P. fluorescens*. Tale marcatore molecolare potrebbe essere utilizzato per migliorare la risoluzione della tassonomia del genere *Pseudomonas*.

Ecologia

Le specie di *Pseudomonas* sono note per la loro capacità di degradare composti che sono altamente refrattarie ad altri microrganismi, inclusi idrocarburi alifatici ed aromatici, acidi grassi, insetticidi ed altri inquinanti ambientali. I soli composti organici che i *Pseudomonas* non sono in grado di degradare sono teflon e composti organici ad un atomo di carbonio come metano, metanolo, formaldeide ecc. Questa proprietà li rende dei candidati ottimali per l'utilizzo nel biorisanamento. Alcune specie di *Pseudomonas* hanno azione antagonista nei confronti di patogeni vegetali (Pujol et al., 2006), producono composti che stimolano la crescita delle piante (Kloepper et al., 1980), promuovono la simbiosi nelle micorrize (Duponnois and Garbaye, 1991) e svolgono un ruolo importante nel ciclo del carbonio e dell'azoto (Palleroni, 1993; Paul and Clark, 1996). Altre specie possono essere patogeni opportunistici di piante (Gonzalez et al., 2000), funghi (Munsch et al., 2000), pesci (Park et al., 2000), animali ed esseri umani (Palleroni, 1992; Tyler et al., 1995). Alcune forme di *Pseudomonas* hanno la capacità di formare biofilm e risultano spesso resistenti o refrattarie ad antibiotici ad ampio spettro, il che rappresenta un rischio per la salute umana soprattutto in ambienti nosocomiali. Molti materiali utilizzati nella pratica medica possono essere contaminati da *Pseudomonas*; questi includono soluzioni di antisettici e disinfettanti, ma più comunemente acqua, soluzione salina, utensili e strumenti medici. Contaminazione da *Pseudomonas* è stata anche riscontrata in cosmetici, prodotti farmaceutici e in preparazioni a base di estratti vegetali. Alcune forme di *Pseudomonas*, ascrivibili principalmente alla specie *P. fluorescens*, sono in grado di contaminare un ampio spettro di alimenti come latticini, pesce (Tryfinopoulou et al., 2002; Garcia-Lopez et al., 2004), carne (Hinton et al., 2004), verdure (Tournas, 2005), e di determinarne il deterioramento. Questi organismi sono noti per la loro capacità di sopravvivere e moltiplicarsi rapidamente nei materiali grezzi e negli ambienti di produzione. Sono inoltre capaci di proliferare a 4°C e di idrolizzare la gelatina, caratteristiche che possono spiegare il loro frequente coinvolgimento nelle alterazioni di alimenti refrigerati.

2 MATERIALI E METODI

2.1 *Microrganismi utilizzati nei test di inclusività/esclusività*

Microrganismo	Numero di ceppi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>P. avellanae</i>	1
<i>P. chlororaphis</i>	1
<i>P. fluorescens</i>	4
<i>P. oleovorans</i>	1
<i>P. putida</i>	4
<i>P. savastanoi</i>	4
<i>P. syringae</i>	1
<i>P. stutzeri</i>	1
<i>Acinetobacter baylyi</i>	1
<i>A. baumannii</i>	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Brenneria quercina</i>	1
<i>Burkholderia terricola</i>	1
<i>Clostridium</i> spp	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Erwinia amylovora</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Halomonas</i> spp	1
<i>Marinomonas</i> spp	2
<i>Paracoccus denitrificans</i>	1
<i>Pseudoalteromonas</i> spp	3
<i>Rhizobium</i> spp	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1

2.2 Terreni colturali

LB (Luria-Bertani; Sambrook et al, 1989)

Composizione in grammi per litro di terreno:

Componenti	Quantità (g)
Tryptone	10
Estratto di lievito	5
NaCl	5
H₂O	q.b. ad 1l

Per la preparazione del terreno solido sono stati aggiunti 15g/l di Agar (Acumedia).

King's B medium

Composizione in grammi per litro di terreno:

Componenti	Quantità (g)
Proteose peptone no.3	20
Glicerolo	10
K₂HPO₄	1,5
MgSO₄	1,5
H₂O	q.b. ad 1l

2.3 Condizioni di crescita

I ceppi sono stati fatti crescere a 37°C (*Escherichia coli*) o a 30°C (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Rizhobium*, *Acinetobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Halomonas*) in orbital shaker (180 rpm). La crescita delle colture è stata monitorata misurando l'incremento della densità ottica a 600nm utilizzando uno spettrofotometro.

2.4 Vettori di clonaggio

Il clonaggio dei frammenti di amplificazione in *E. coli* è stato effettuato utilizzando il vettore **pGEM-Teasy** (Promega). Le caratteristiche principali di questo vettore sono:

ori, lacZ, lacO, SP6, MCS, T7, fl ori, Amp¹

¹ ori- origine di replicazione pMB1, lacZ- regione codificante l'α-peptide della β-galattosidasi, lacO- operatore lac, SP6- promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi SP6, MCS- sito multiplo di clonaggio, T7- promotore e codone di inizio della polimerasi T7, fl ori- origine di replicazione del fago fl, Amp- resistenza all'ampicillina.

2.5 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di E. coli

Le cellule del ceppo DH5 α sono state rese competenti mediante trattamento con sali di calcio (Mandel and Higa, 1970). Una beuta contenente 30 ml di terreno LB, viene inoculata con 600 μ l di una coltura di cellule cresciute per tutta la notte e viene messa ad incubare in un orbital shaker fino a che la coltura non raggiunge un O.D.₆₀₀=0.4-0.6. Le cellule vengono poi trasferite sterilmente in tubi sterili (tipo OAK-RIDGE) preraffreddati e raccolte per centrifugazione a 6000 rpm per 5 min a 4°C. Il pellet cellulare viene risospeso in un volume di una soluzione sterile, preraffreddata, di 0.1M CaCl₂-5mM Tris/HCl pH 7.5, pari a ½ del volume iniziale della brodocoltura e la sospensione di cellule viene messa ad incubare in ghiaccio per 30 min. Le cellule vengono nuovamente raccolte per centrifugazione e risospese in 500 μ l di una soluzione preraffreddata di 0.1M di CaCl₂-5mM Tris/HCl pH 7.5. Dopo aver subito questo trattamento le cellule sono pronte per esser trasformate.

Trasformazione

In provette sterili da 1,5 ml si preparano un campione contenente DNA (fino a 10 μ l) e cellule competenti (100 μ l) e un campione di controllo con sole cellule. I campioni vengono tenuti in ghiaccio per 30 min, per permettere al DNA eventualmente presente di legarsi alle cellule competenti, vengono poi trasferiti a 42°C per 45 sec, per provocare lo shock termico che promuove l'ingresso del DNA all'interno della cellula, ed infine messi nuovamente in ghiaccio per 2 min. A ciascun campione viene poi aggiunto 1 ml di brodo LB e le cellule vengono quindi messe a crescere a 37°C per 30 min. Al termine del periodo di incubazione la sospensione cellulare viene piastrata su terreno agarizzato LB contenente l'antibiotico appropriato per la selezione dei trasformanti e X-gal e IPTG per il test di α -complementazione utilizzato per individuare la presenza di plasmidi con inserto.

Digestione enzimatica: La presenza dell'inserto nel plasmide pGEM-Teasy è stata verificata mediante digestione enzimatica con l'enzima di restrizione EcoRI che taglia nelle regioni fiancheggianti il sito di clonaggio.

2.6 Estrazione del DNA plasmidico

La separazione del DNA plasmidico da quello cromosomale è stata ottenuta con la tecnica della lisi alcalina (Birboim, 1983) che si basa sulla diversa velocità di riassociazione di molecole di DNA di taglia molto differente. Dopo aver fatto crescere per tutta la notte una brodocoltura del ceppo ricombinante, le cellule sono raccolte per centrifugazione, risospese in 1/15 di volume di tampone glucosio (50mM glucosio, 10mM EDTA, 25mM Tris/HCl) e lisate in ambiente alcalino aggiungendo 2 volumi di una soluzione 0.2N NaOH, 1% SDS: in queste condizioni si ha denaturazione delle molecole di DNA. Dopo la lisi, che viene condotta in ghiaccio, al lisato cellulare vengono aggiunti 2/3 di volume di una soluzione 3M sodioacetato, 1.8M di sodio formiato per ottenere la rinaturazione del DNA. I debris cellulari ed il DNA cromosomale vengono rimossi mediante centrifugazione (20.000 x g) ed il DNA plasmidico viene recuperato mediante precipitazione con solvente (etanolo 96%, 2 volumi) a basse temperature (-20°C). Il DNA plasmidico viene risospeso in acqua distillata e quantificato per fluorescenza (dopo elettroforesi su gel di agarosio (1% w/v)-Tris acetato e colorazione con bromuro di etidio), utilizzando un campione di DNA a titolo noto (il DNA del fago lambda digerito con l'enzima di restrizione *HindIII*) come riferimento.

2.7 Separazione elettroforetica di molecole di DNA

L'identificazione e la separazione degli acidi nucleici è stata realizzata mediante elettroforesi su gel d'agarosio preparato all'1% (w/v) in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3). La corsa viene effettuata in presenza del tampone TAE a voltaggio costante pari a 80V e sfrutta il fatto che la molecola di DNA, essendo carica negativamente, migra in un campo elettrico verso il polo positivo. Al termine della corsa il gel viene colorato con bromuro d'etidio un intercalante del DNA che, quando eccitato con luce ultravioletta, riemette energia a lunghezza d'onda superiore (nello spettro del visibile). La velocità di migrazione dei frammenti di DNA risulta essere inversamente proporzionale alla dimensione, l'utilizzo di un DNA di riferimento (markers di pesi molecolari) consente di stimare la taglia apparente e risalire al peso molecolare del frammento di interesse.

2.8 Sequenziamento del DNA

La determinazione della sequenza nucleotidica dei frammenti di DNA clonati nel vettore pGEM-Teasy, è stata eseguita utilizzando l'*ABI Prism BidDye Terminator Sequencing Ready Reaction kit* (PE Biosystems). La separazione elettroforetica dei prodotti di reazione marcati e la determinazione della composizione nucleotidica è stata eseguita presso il *Servizio di Sequenziamento dell'Università della Tuscia* utilizzando un sequenziatore ABI Prism 310 Perkin Elmer. La reazione è stata condotta in un volume finale di 8µl utilizzando 500 ng di DNA plasmidico e 3,2 pmol di sequencing primer (M13f, M13r vedi Tabella 2.13).

2.9 Estrazione di DNA genomico mediante il “Genomic DNA Purification Kit”(Fermentas)

Questa procedura comporta l'estrazione con cloroformio e non richiede l'estrazione fenolica o il trattamento con proteinasi K. L'estrazione di DNA è basata sulla lisi delle cellule seguita da una precipitazione selettiva del DNA. Infine, il DNA genomico è concentrato e purificato da contaminanti salini mediante precipitazione con etanolo.

L'estrazione è eseguita seguendo le istruzioni della casa produttrice.

2.10 Estrazione di DNA genomico mediante il “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen)

Questo kit utilizza la tecnologia delle membrane di gel di silice per una purificazione del DNA cellulare totale senza estrazione organica o precipitazione con etanolo. L'estrazione è stata eseguita seguendo le istruzioni della casa produttrice.

2.11 Estrazione del DNA genomico mediante il Kit “PrepMan Ultra” (Applied Biosystems)

La metodica prevede l'impiego di una tecnologia proprietaria, coperta da brevetto, con reagenti specifici dei quali non viene fornita la composizione.

2.12 Preparazione dei campioni per l'analisi T-RFLP

La T-RFLP consente di effettuare un'analisi semiquantitativa di una o più comunità microbiche, basandosi sui diversi profili elettroforetici di frammenti di DNA ottenuti dopo digestione enzimatica di regioni genomiche amplificate per mezzo della reazione a catena della polimerasi (PCR).

La preparazione dei campioni per l'analisi T-RFLP consiste di diversi passaggi:

1. Amplificazione, mediante PCR, della regione di DNA di interesse utilizzando, come innesco, un primer (il *forward*) marcato con FAM;
2. purificazione degli ampliconi;
3. digestione degli ampliconi con un enzima di restrizione che genera frammenti terminali marcati di taglia compresa tra 50 e 450 bp;
4. separazione dei frammenti di restrizione (mediante elettroforesi su capillare) e quantificazione della mobilità elettroforetica e della fluorescenza del frammento terminale marcato.

2.12.1 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Le reazioni di PCR sono state effettuate adottando una procedura standard che prevede le seguenti condizioni:

Componente	Volume
DNA stampo	0,5-3 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
dNTP's 10 mM	1 µl
Tampone 10X	5 µl
Taq DNA polimerasi 5U/µl	0,5 µl
ddH ₂ O	Fino a 50 µl

Le reazioni di amplificazione sono state condotte con l'apparecchio GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), utilizzando alternativamente *Taq* DNA

polymerase (Biolabs), *Taq* DNA polymerase (Qiagen) e MasterTaq (Eppendorf). Con le tre tipologie di *Taq* polimerasi utilizzate sono stati sempre ottenuti risultati riproducibili e confrontabili.

2.12.2 Programmi PCR

Per l'amplificazione di sequenze per l'rRNA 16S con la coppia di primer universali per Eubatteri (63F-1389R) è stato utilizzato il seguente programma di PCR:

Denaturazione iniziale	3'	94°C	
Denaturazione	30''	94°C	25 cicli
Annealing	30''	60°C	
Estensione	1'30''	68°C	
Estensione finale	7'	68°C	

Per l'amplificazione di sequenze per l'rRNA 16S con le coppie di primer *Pseudomonas*-specifiche (P94F-P1104R e P259F-P1104R) è stato utilizzato il seguente programma:

Denaturazione iniziale	3'	94°C	
Denaturazione	30''	94°C	30 cicli
Annealing	20''	64°C	
Estensione	1'	72°C	
Estensione finale	7'	72°C	

2.12.3 *Primers utilizzati per l'analisi T-RFLP*

Per l'amplificazione delle sequenze (16S rRNA) sottoposte ad analisi T-RFLP sono stati utilizzati i seguenti primers

Primer	Sequenza (5'-3')
63F* (Forward primer marcato con FAM)	*5' -CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'
1389R (Reverse primer)	5' -ACGGGCGGTGTGTGTACAAG-3'
P94F* (Forward primer marcato con FAM)	*5' -CGGACGGGTGAGTAATGCCTAG-3'
P259F* (Forward primer marcato con FAM)	*5' -CCAAGGCGACGATCCGTAAGT-3'
P1104R (Reverse primer)	5' -CGTGCTGGTAACTAAGGACAAGG-3'

2.12.4 *Purificazione dei prodotti di amplificazione*

I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega), seguendo le informazioni fornite dalla casa produttrice. Al prodotto di PCR (50 µl) si aggiunge un isovolume di “Membrane Binding Solution”, si carica il campione su una colonnina, contenente una membrana che lega il DNA, e si lascia incubare per 1 min a temperatura ambiente. Si centrifuga 1 min a 13000 rpm; si aggiungono 700 µl di “Membrane Wash Solution” a cui è stato aggiunto etanolo e si centrifuga nuovamente. Si ripete il lavaggio aggiungendo 500 µl di “Membrane Wash Solution” e centrifugando 5 min a 13000 rpm. Per eluire il DNA si trasferisce la colonnina in un nuovo tubo da 1.5 ml, si aggiungono 35 µl di “Nucleare-Free Water”, si lascia 1 min a temperatura ambiente e quindi si centrifuga 1 min a 13000 rpm. La fase acquosa recuperata dopo centrifugazione contiene il DNA purificato del prodotto di amplificazione.

2.12.5 *Digestione del DNA con enzimi di restrizione per analisi T-RFLP*

I frammenti di DNA amplificati vengono digeriti utilizzando enzimi di restrizione scelti opportunamente; nel nostro caso, sono stati utilizzati gli enzimi *HhaI* (Roche), *MspI* (Roche) e *RsaI* (Invitrogen).

Una tipica digestione di DNA con endonucleasi di restrizione per una analisi T-RFLP è così composta:

Componente	Volume
DNA	1,5-4 µl
Tampone di restrizione 10X	2 µl
Enzima di restrizione	1 µl
Acqua distillata	Fino a 20 µl

La miscela di reazione viene incubata a 37°C per 2 ore e 30 min, dopodiché si aggiunge 0,5 µl di enzima fresco si porta il volume a 25 µl con tampone ed acqua e si lascia incubare per tutta la notte.

2.12.6 *Elettroforesi con sequenziatore automatico*

L'elettroforesi capillare è stata realizzata presso il *Servizio di Sequenziamento dell'Università della Tuscia*. Un'aliquota (1 µl) dei prodotti di PCR marcati con il fluorocromo FAM (5-carboxyfluorescein) e digeriti con endonucleasi di restrizione viene miscelata con 19,5 µl di formamide deionizzata e 0,5 µl di marker di taglie molecolari costituito da una miscela di frammenti di DNA di peso molecolare noto (ROX-LABELED GS500, Applied Biosystems). Ogni campione è stato denaturato per 5 min a 95°C ed immediatamente raffreddato in ghiaccio prima di essere sottoposto ad elettroforesi capillare realizzata su un ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) operante in modo GeneScan con il set D di filtri.

2.13 PCR real-time

La PCR real-time e l'analisi dei dati sono stati condotti su LightCycler Roche utilizzando QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Valencia, CA). Una tipica reazione di amplificazione comprende:

Componente	Volume/reazione	Concentrazione finale
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix *	10 µl	1x
Primer <i>Forward</i>	1 µl	0,2 µM
Primer <i>Reverse</i>	1 µl	0,2 µM
MgCl ₂	0,8 µl	1 mM
DNA	2 µl	variabile
H ₂ O	variabile	-
Volume totale	20 µl	-

* fornisce una concentrazione finale di 2,5 mM di MgCl₂

2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix contiene:

- SYBR Green PCR Buffer
- HotStarTaq[®] DNA Polymerase
- dNTP mix incluso dUTP
- SYBR Green 1
- Passive reference dye ROX
- 5 mM MgCl₂

Tutte le PCR hanno incluso un controllo negativo senza DNA bersaglio.

È stato utilizzato il seguente protocollo sperimentale:

Programma	Preincubazione			
Numero del segmento	Temperatura (°C)	Tempo (sec)	Slope (°C/sec)	Modalità di acquisizione
1	95	900	20	nessuna

Programma	Amplificazione (35 cicli)			
Numero del segmento	Temperatura (°C)	Tempo (sec)	Slope (°C/sec)	Modalità di acquisizione
1	95	15	20	Nessuna
2	63	20	20	Nessuna
3	72	20	20	Nessuna

Programma	Curva di melting			
Numero del segmento	Temperatura (°C)	Tempo (sec)	Slope (°C/sec)	Modalità di acquisizione
1	95	0	20	Nessuna
2	65	15	20	Nessuna
3	95	0	0,1	Continua

Programma	Raffreddamento			
Numero del segmento	Temperatura (°C)	Tempo (sec)	Slope (°C/sec)	Modalità di acquisizione
1	40	30	20	nessuna

2.14 Primers utilizzati

Primer	Sequenza (5'-3')	Referenza
311F 1263R	GGTCTGAGAGGATGATCAGT TTAGCTCCACCTCGCGGC	Widmer et al. 1998
P346F P457R	CTACGGGAGGCAGCAGTGG TCGGTAACGTCAAAACAGCAAAGT	Purohit et al. 2003
P94F P259F P649R P1104R	CGGACGGGTGAGTAATGCCTAG CCAAGGCGACGATCCGTAAGT CAGGAAATTCCACCACCCTCTACC CGTGCTGGTAAGTAAGGACAAGG	Questo studio
63F 1389R	CAGGCCTAACACATGCAAGTC ACGGGCGGTGTGTACAAG	Osborn et al. 2000
LAPS LAPS27	TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG	Ait Tayeb et al. 2005
UP1E APrU	CAGGAAACAGCTATGACCAAYGSNGGNGGNAARTTYRA TGTAACACGACGGCCAGTGCNNGGRTCYTTYTCYTGRCA	Yamamoto et al. 1996
gyrPA-398 gyrPA-620	CCTGACCATCCGTCGCCACAAC CGCAGCAGGATGCCGACGCC	Qin et al. 2003
M13R M13(-21) M13f M13r	CAGGAAACAGCTATGACC TGTAACACGACGGCCAGT TCCCAGTCACGACGTCGT GGAAACAGCTATGACCATG	Yamamoto et al. 1996

2.15 Determinazione del numero di cellule mediante conta diretta al microscopio

Il numero di cellule di *P. putida* KT2440 è stato determinato mediante conta diretta al microscopio.

A partire da una sospensione di una coltura di *Pseudomonas* sono state fatte delle diluizioni seriali decimali in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%). Una goccia di ciascuna sospensione è stata posta tra la camera di conta di Thoma ed il vetrino coprioggetto. Il numero di cellule è stato contato al microscopio ad un ingrandimento 400x. La conta è stata eseguita in triplicato. Sono stati scelti in maniera casuale 256 campi ed il numero di cellule è stato determinato secondo la seguente equazione:

$$\text{n}^\circ \text{ cellule/cm}^3 \text{ o ml} = N \times (1/4000) \times 1000 \times D$$

dove N= n° di cellule per quadratino, 1/4000 corrisponde al volume di ciascun quadratino (0,00025 mm³), D è il fattore di diluizione e 1000 il fattore per convertire mm³ in cm³.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Metodologie basate sulla PCR

Nei test diagnostici basati sulla PCR, l'identificazione dei ceppi prevede come primo passaggio l'amplificazione di sequenze specie-specifiche. Uno dei geni bersaglio ampiamente utilizzato in queste analisi è il gene per l'rRNA ribosomiale 16S presente nella subunità piccola del ribosoma. Questo gene può essere anche utilizzato per l'identificazione di batteri non coltivabili in laboratorio perché 1) è presente in tutti i batteri, 2) la sequenza nucleotidica dell'rRNA 16S è molto conservata, 3) le variazioni a livello di sequenza nucleotidica sono specie-specifiche e possono essere utilizzate a fini tassonomici, inoltre 5) sono disponibili, per l'analisi comparativa, un numero ampio di sequenze nucleotidiche corrispondenti a questo gene, presso le banche dati di DNA GenBank (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Bioinformatics Institute) e Ribosomal Database Project (<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>).

Uno degli obiettivi di questa tesi è stato quello di sviluppare un protocollo di PCR (basato sul gene 16S rRNA), che permettesse di rilevare in maniera rapida e sensibile la presenza di *Pseudomonas* in matrici alimentari ed ambientali. Negli esperimenti preliminari è stata valutata la possibilità di sviluppare questo saggio di PCR mediante l'impiego di coppie di primers *Pseudomonas*-specifici descritte in letteratura. In base ai dati di sequenza noti si evince che i primers della coppia 311F-1263R (Widmer et al., 1998) corrispondono rispettivamente alle posizioni 289-308 e 1258-1275 del gene per l'rRNA di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (type strain), omologhe alle posizioni 292-311 e 1263-1280 del gene per l'rRNA 16S di *E. coli*, mentre quelli della coppia P346F-P457R (Purohit et al., 2003) corrispondono alle posizioni 330-343 e 431-454 del gene per il 16S rRNA di *P. aeruginosa* e alle posizioni 333-346 e 434-457 di quello di *E. coli*.

3.1.1 Valutazione della specificità dei primers su DNA di colture pure

La specificità delle due coppie di primers è stata valutata inizialmente su DNA genomico proveniente da colture pure di ceppi di *Pseudomonas* e non-*Pseudomonas*. In questi esperimenti, che sono stati condotti utilizzando quantità comparabili di DNA, sono stati ottenuti prodotti di amplificazione della taglia attesa solo a partire da DNA isolato da ceppi di *Pseudomonas*, mentre con DNA estratto da ceppi appartenenti ad altri generi non sono stati ottenuti prodotti di amplificazione (Tabella 6). Questi test permettono di stimare un'inclusività ed un'esclusività delle due coppie di primers del 100% almeno su colture pure.

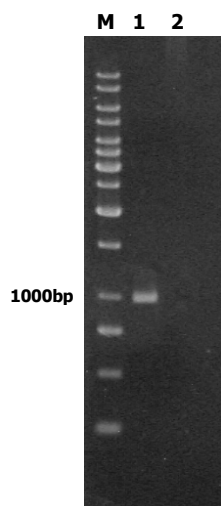
Tabella 6. Risultati delle PCR con i primers *Pseudomonas*-specifici.

Specie batteriche (n° di ceppi testati)	311F-1263R (990 bp)	P346F-P457R (150 bp)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)	+	+
<i>P. avellanae</i> (1)	+	+
<i>P. chlororaphis</i> (1)	+	+
<i>P. fluorescens</i> (4)	+	+
<i>P. putida</i> (4)	+	+
<i>P. oleovorans</i> (1)	+	+
<i>P. savastanoi</i> (4)	+	+
<i>P. syringae</i> (1)	+	+
<i>P. stutzeri</i> (1)	+	+
<i>Acinetobacter baylyi</i> (1)	–	–
<i>A. baumannii</i> (1)	–	–
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	–	–
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (1)	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	–	–
<i>Brenneria quercina</i> (1)	–	–
<i>Burkholderia terricola</i> (1)	–	–
<i>Clostridium</i> spp. (1)	–	–
<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	–	–
<i>Erwinia amylovora</i> (1)	–	–
<i>Escherichia coli</i> (1)	–	–
<i>Halomonas</i> spp. (1)	–	–
<i>Marinomonas</i> spp. (2)	–	–
<i>Paracoccus denitrificans</i> (1)	–	–
<i>Pseudoalteromonas</i> spp. (3)	–	–
<i>Rhizobium</i> spp. (1)	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	–	–
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1)	–	–

I simboli indicano la presenza (+) o assenza (-) del prodotto di amplificazione.

A titolo di esempio è mostrata nella Figura 11 la capacità della coppia di primers 311F-1263R di discriminare, a livello molecolare, ceppi di *Pseudomonas* da ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* (famiglia delle Xanthomonadaceae).

Figura 11. Test di specificità della coppia di primer 311F-1263R.



M, 1Kb DNA ladder; **1**, prodotto di amplificazione da DNA genomico di *P. putida*; **2**, prodotto di amplificazione da DNA genomico di *S. maltophilia*. L'esperimento è stato condotto utilizzando quantità comparabili di DNA genomico e una temperatura di annealing di 66°C.

3.1.2 Valutazione della specificità dei primers su DNA metagenomico

In parallelo, è stata valutata sperimentalmente la specificità delle due coppie di primers su metagenoma ambientale. L'utilizzo di metagenoma nelle prove di PCR permette di valutare la specificità dei primers in condizioni operative comparabili con quelle utilizzate nel controllo microbiologico. In particolare, queste prove permettono di valutare rapidamente l'effetto, sulla reazione di PCR, della presenza di DNA competitore proveniente da batteri appartenenti ad altri generi, comprese forme microbiche non coltivabili che sono ampiamente diffuse in natura e non sono state ancora caratterizzate in modo approfondito a livello molecolare.

Per le prove su metagenoma è stato utilizzato il DNA totale di un *consorzio* microbico utilizzato per la decontaminazione di reflui ricchi in fenoli. Studi precedenti (Bertin et al., 2006) avevano dimostrato che la popolazione microbica presente in un reattore a cellule adese utilizzate per il trattamento di acque di

vegetazione delle olive era costituita principalmente da microrganismi appartenenti ai taxa *Paracoccus* e *Bacteroides*; e tra le forme minoritarie erano presenti batteri appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Dechlorosoma*, *Acinetobacter*, TM7 e *Pseudomonas*. La presenza, di *Pseudomonas* in forma minoritaria permetteva di valutare sul metagenoma di questo consorzio microbico sia la sensibilità del saggio di PCR che la sua specificità. Con entrambe le coppie di primers è stato ottenuto un prodotto di amplificazione della taglia attesa il quale è stato utilizzato per generare librerie di cloni che fossero rappresentative delle sequenze di 16S rDNA amplificate. Da ciascuna di queste librerie, che sono state costruite utilizzando il plasmide pGEM-Tesay (Promega) come vettore di clonaggio, sono stati scelti in maniera casuale 30 cloni indipendenti che sono stati analizzati mediante digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *EcoRI*. I cloni sono stati raggruppati secondo il profilo di restrizione (RFLP), e 10 cloni indipendenti rappresentativi dei vari profili sono stati sequenziati su entrambi i filamenti. Ogni sequenza di DNA è stata controllata con il software CHIMERA-CHECK per escludere che il prodotto di PCR clonato corrispondesse ad una molecola chimerica. Il confronto delle sequenze ottenute con quelle disponibili presso il database del Ribosomal Database Project mediante il programma BLAST per la ricerca di omologie, ha permesso di evidenziare che i primers 311F-1263R amplificavano sia sequenze di 16S rDNA di *Pseudomonas* (le 2 sequenze maggiormente rappresentate hanno, rispettivamente un indice di similarità di 0,807 con *P. nitroreducens* type strain LMG1224 e di 0,964 con *P. alcaliphila* type strain AL 15-21, sia sequenze da batteri non coltivabili ascrivibili al genere incertae sedis TM7. La divisione candidata TM7 è una delle divisioni batteriche recentemente descritte, caratterizzata esclusivamente sulla base di dati di sequenza provenienti da campioni ambientali (Hugenholtz et al., 2001). L'analisi della libreria degli ampliconi ottenuti con la coppia di primers P346F-P457R ha evidenziato che tutti i DNA amplificati corrispondevano a sequenze di *Pseudomonas*, sebbene la dimensione del prodotto di amplificazione (150 bp) non permettesse di effettuare un'attribuzione tassonomica certa fino a livello di specie. La sequenza del 16S rDNA maggiormente rappresentata in questa libreria ha mostrato una similarità di 0,951 con le sequenze di 4 type strains appartenenti a ribotipi differenti: *P. indica*, *P. umsongensis* ceppo Ps 3-10, *P. mosselii* ceppo CIP 105259, *P. migulae* ceppo CIP 105470. Al fine di ottenere prodotti di

amplificazione *Pseudomonas*-specifici di taglia maggiore sono state condotte, sul metagenoma, reazioni di PCR, con combinazioni diverse dei primers specifici precedentemente descritti. Con la combinazione 311F-P457R, che produce un prodotto di amplificazione di 200 bp, sono state rilevate solo sequenze di *Pseudomonas*, ma anche in questo caso la dimensione ridotta del prodotto di amplificazione non ha permesso di arrivare ad una identificazione certa a livello di specie. La sequenza maggiormente rappresentata nella libreria mostra infatti una similarità di 0,964 con ben 6 differenti ribotipi di *Pseudomonas* (*P. monteillii* CIP 104883, *P. brenneri* CFML 97-391T, *P. indica*, *P. umsogensis* Ps 3-10, *P. mosselii* CIP 105259 e *P. migulae* CIP 105470). L'altra combinazione utilizzata P346F-1263R ha generato un prodotto di amplificazione della taglia attesa (940 bp), ma l'analisi BLAST ha rivelato che nessuna delle sequenze ottenute è omologa a quelle di microrganismi appartenenti al genere *Pseudomonas*. Le 2 tipologie di sequenze amplificate con questa coppia di primers hanno mostrato similarità significative con sequenze 16S rDNA del genere *Dechlorosoma*, che appartiene alla classe Beta Proteobacteria, e del genere *Clostridium*, appartenente al phylum *Firmicutes*. Infine sono state condotte reazioni di PCR utilizzando il primer *Pseudomonas* specifico P346F in combinazione con un primer universale per Eubatteri (1389R). I risultati di questo esperimento hanno rivelato che è possibile ottenere un prodotto di amplificazione della taglia attesa (1105 bp), ma gli ampliconi così ottenuti corrispondono a sequenze di 16S rDNA di microrganismi ascrivibili al genere *Paracoccus* che appartiene alla classe Alpha Proteobacteria. Dai risultati ottenuti utilizzando come stampo metagenoma si può concludere che: è possibile identificare in modo specifico batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* solo utilizzando il primer P457R (Tabella 7) tuttavia l'impiego di questo primer in combinazione con i primers P346F o 311F genera prodotti che non consentono di discriminare i *Pseudomonas* a livello di specie.

Tabella 7. Valutazione della selettività delle coppie di primers.

Coppie di primer Cloni (%) la cui sequenza corrisponde al 16S rDNA di <i>Pseudomonas</i>	
311F - 1263R	40
P346F - P457R	100
311F - P457R	100
P346F - 1263R	0
P346F - 1389R	0

I test sono stati condotti mediante PCR utilizzando, come stampo, DNA metagenomico rappresentativo di una comunità microbica presente in un reattore a letto impaccato utilizzato per il trattamento aerobio di reflui dell'industria olearia. Tutte le reazioni di PCR avevano generato un prodotto di amplificazione della taglia attesa.

3.1.3 Disegno di nuove coppie di primers

Sulla base di queste osservazioni, è stato deciso di disegnare nuove coppie di primers che permettessero di ottenere in modo specifico e selettivo ampliconi di *Pseudomonas* di dimensioni maggiori alle 200 bp. L'individuazione di sequenze bersaglio specifiche per batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* è stata effettuata mediante allineamento delle sequenze codificanti per il 16S rDNA di 22 ceppi di riferimento (type-strain) appartenenti alle principali specie note di *Pseudomonas* (Figura 12). L'individuazione dei primers sulla base delle sequenze conservate è stata effettuata manualmente utilizzando la sequenza del 16S rDNA di *E. coli* come outgroup. In questo modo sono state identificate due coppie di primers (P94F-P1104R e P259F-P1104R) che generano frammenti di amplificazione rispettivamente di 1081 e 846 bp. Nella Figura 13 è mostrata la sequenza del gene di *P. putida* KT2440 per il 16S rRNA e la localizzazione dei vari primers.

Figura 12. Allineamento multiplo di 22 sequenze di 16S rDNA da type-strains di *Pseudomonas* (sono mostrate solo le regioni utilizzate per il disegno dei primers).

S000000053	41	GGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGG CGGACGGCTGAGTAATGCCTAG GAAT	S000000053	596	GGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAGGCTAGAGTAT GCTAGAGGCTGCTGGAATTTCTCTG TCT
S000022067	41	..AT.A.G.-AG....CT..C..ATT.AG-.....	S000022067	593	CA.....G.....G.
S000012408	41		S000012408	596	A.....G.
S000013128	41	..T..AGA.-AAG....CTT..CT..-A.....	S000013128	593	A.....G..C.....G.
S000011992	41	..T..AGA.-AAG....CTT..CT..-A.....	S000011992	593	T.....A.T.A.....TG.....G.
S000145155	61	..T..AGA.-AAG....CTT..CT..-A.....	S000145155	614	T.....A.T.A.....G.....G.
S000000900	41	..T..AGA.-..G...CC....CT..-A.....	S000000900	593	GA.....G.....G.
S000005892	41	A..G.....C..G.....	S000005892	596	GA.....G..C.....G.
S000013965	61	..AT.A.GA.AGCT.GC.CT...--ATTG.....	S000013965	614	A.....G..C.....G.
S000003553	41	..AT.AGAA.AGCT.GC.CTTC.--ATTG.....	S000003553	593	A.....C.....G.
S000022197	41	..T..AGA.AAGCT.GC.T.TCT--T.A.....A.....	S000022197	593	A.T.A.....G.....G.
S000003544	41	-T.GCGA.....	S000003544	594	A.....G.....G.
S000015006	41	..AT.AGAA.-AG....CT.T.C.-ATTG.....	S000015006	593	GA.....G.....G.
S000013236	41	..AT.A.GA-.AG....CT.TCT.-ATTT.....C.....A.....	S000013236	593	GA.....C.....Y.....G.
S000145156	61	..T..AGA.-AAG....CTT..CT-T.A.....	S000145156	614	T.....A.T.A.....G.....G.
S000004100	41	..AT.A.G.-.AG....CT..CT.-ATTT.....	S000004100	593	GA.....C.....G.....G.
S000002765	41	..T..AGA.-AAG....CTT..CT-T.A.....	S000002765	593	T.....A.T.A.....C.....G.C
S000007012	41	GG.-TCCT.C.GGATGCC-.....	S000007012	593	ACTGA.....C.....Y.....G.
S000005136	41	..AT.ACG.-.AG....CT..CT.-ATTT.....R.....	S000005136	593	GA.....C.....C.....G.
S000012757	41	..AT.AGT.-.AG....CT..AT.-ATTG.....	S000012757	593	C.....ACTGA.....C.....A.....G.
S000136924	41	..AT.A.G.-.AG....CT.....-ATTG.....	S000136924	593	ACTGA.....C.....G.....G.
S000006645	41	..AT.T.G.-.AG....CTT.....-ATTG.....	S000006645	593	T.....C.T.A.....C.....G.
S000000053	221	TTGGTGAGGTAATGGCTCA CCAAGGCGACGATCCGTA ACTG ST CTGAGAGGATGATCAGT	S000000053	1061	AAGTCCCGTAACGAGCGCAAC CCTTGTCCTTAGTTACCAGC ACGTTAAGGTGGGCACTCT
S000022067	219	A.....	S000022067	1059	G.T.....-.....
S000012408	221		S000012408	1061	
S000013128	219		S000013128	1059	T.....
S000011992	219	G.....	S000011992	1059	G.T.....-.....
S000145155	239		S000145155	1079	A.T.....
S000000900	219		S000000900	1059	A.T.....
S000005892	221	A.....	S000005892	1061	G.T.....
S000013965	239		S000013965	1079	A...T.....
S000003553	219		S000003553	1059	T.....
S000022197	219		S000022197	1059	A.T.....
S000003544	220		S000003544	1060	A.T.....
S000015006	219		S000015006	1059	C.T.....-.....
S000013236	219		S000013236	1059	C.CGT.-.....A...
S000145156	239	G.....	S000145156	1079	A.T.....
S000004100	219		S000004100	1059	A.T.....
S000002765	219		S000002765	1059	T.....-.....
S000007012	219	G.....	S000007012	1059	T.....T.....
S000005136	219		S000005136	1059	W.T.....
S000012757	219	..A.....T.....	S000012757	1059	GA.....T.....
S000136924	219	G.....A...CT.....	S000136924	1059	R.....C.CG-
S000006645	219	..A...G.....T.....	S000006645	1059	R.....T.....

Figura 13. Posizione dei primers sulla sequenza del gene 16S rRNA di *P. putida* KT2440.

```

ATCATGGCTC AGATTGAACG CTGGCGGCAG GCCTAACACA TGCAAGTCGA GCGGATGACG
                                P94F
GGAGCTTGCT CCTTGATTCA GCGGCGGACG GGTGAGTAAT GCCTAGGAAT CTGCCCTGGTA
GTGGGGGACA ACGTTTCGAA AGGAACGCTA ATACCGCATA CGTCCTACGG GAGAAAGCAG
GGGACCTTCG GGCCTTGCGC TATCAGATGA GCCTAGGTCG GATTAGCTAG TTGGTGGGGT
P259F                                311F
AATGGCTCAC CAAGGCGACG ATCCGTAACT GGTCTGAGAG GATGATCAGT CACACTGGAA
                                346F
CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGA
AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGTCTT CGGATTGTAA AGCACTTTAA
                                457R
GTTGGGAGGA AGGGCAGTAA GTTAATACCTT TGCTGTTTTG ACGTTACCGA CAGAATAAGC
ACCGGCTAAC TCTGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACAGAGG GTGCAAGCGT TAATCGGAAT
TACTGGGCGT AAAGCGCGCG TAGGTGGTTT GTTAAGTTGG ATGTGAAAGC CCCGGGCTCA
                                P649R
ACCTGGGAAC TGCATCCAAA ACTGGCAAGC TAGAGTACGG TAGAGGGTGG TGGAAATTTCC
TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACCACCTG
GACTGATACT GACACTGAGG TCGGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
AGTCCACGCC GTAAACGATG TCAACTAGCC GTTGGAATCC TTGAGATTTT AGTGGCGCAG
CTAACGCATT AAGTTGACCG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGTTAAAACT CAAATGAATT
GACGGGGGCC CGCACAAAGC GTGGAGCATG TGGTTTAATT CGAAGCAACG CGAAGAACCT
TACCAGGCCT TGACATGCAG AGAACTTTCC AGAGATGGAT TGGTGCCTTC GGGAACTCTG
ACACAGGTGC TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA
                                P1104R
ACGAGCGCAA CCTTGTCTT TAGTTACCAG CACGTTATGG TGGGCACTCT AAGGAGACTG
CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC ATCATGGCCC TTACGGCCTG
                                1263R
GGCTACACAC GTGCTACAAT GGTCCGTACA GAGGGTTGCC AAGCCGCGAG GTGGAGCTAA
TCTCACAAAA CCGATCGTAG TCCGGATCGC AGTCTGCAAC TCGACTGCGT GAAGTCGGAA
TCGCTAGTAA TCGCGAATCA GAATGTCGCG GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC
GCCCCGCACA CCATGGGAGT GGGTTGCACC AGAAGTAGCT AGTCTAACCT TCGGGAGGAC
GGTTACCACG GTGTGATTCA TGA
```

La specificità dei singoli primers è stata valutata utilizzando il programma PROBE MATCH disponibile sul sito del RDP (Tabella 8). Da questa analisi è stato possibile dimostrare che: il primer P94F ha una corrispondenza perfetta con 3425 di 5313 sequenze di *Pseudomonas* disponibili nella banca dati e con 1472 di 165940 sequenze non appartenenti al genere *Pseudomonas*; il primer P259F ha una corrispondenza perfetta con 3425 di 5313 sequenze di *Pseudomonas* e con 260 sequenze non appartenenti al genere *Pseudomonas*; il primer P1104R ha una corrispondenza perfetta con 2012 sequenze di *Pseudomonas* e con 75 sequenze non appartenenti al genere *Pseudomonas*. Per le sequenze non appartenenti al

genere *Pseudomonas* questi valori rappresentano lo 0,9, 0,16 e 0,04% rispettivamente dell'intero database RDP.

Tabella 8. Sequenze note di 16S rDNA che mostrano una corrispondenza perfetta con i nuovi primers[§]

Primer	N° di Sequenze	
	<i>Pseudomonas</i>	non- <i>Pseudomonas</i>
P94F	3425	1472
P259F	3450	260
P1104R	2012	75

[§]I dati riportati in tabella sono stati ottenuti analizzando la "Release 9" (update 31) della banca dati di sequenze batteriche codificanti per il 16S rDNA (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) con il programma PROBE MATCH.

Utilizzando il programma Microbial Community Analysis (MiCA3), è stata anche effettuata un'analisi sulla presunta specificità e selettività di undici diverse coppie di primers ottenute combinando i nuovi primers con quelli descritti in letteratura. I risultati, mostrati in Tabella 9, indicano che i nuovi primers sono selettivi ed hanno una buona specificità; la coppia P259F-P1104R, in particolare, riconosce circa l'80% delle sequenze note di *P. putida* e di *P. aeruginosa*.

Tabella 9. Inclusività ed Esclusività dei primers *Pseudomonas*-specifici[§] basata sui dati di sequenza

Coppia di primers	N° di sequenze amplificabili	
	<i>Pseudomonas</i>	non- <i>Pseudomonas</i> & <i>uncultured bacteria</i>
311F - 1263R (952 bp)	1069	209
311F - P457R (200 bp)	114	198
311F - 1104R (793 bp)	1113	239
P346F - P457R (150 bp)	106	195
P346F - 1263R (917 bp)	1085	720
P346F - 1389R (1043 bp)	1082	1465
P94F - P649R (555 bp)	857	241
P94F - P1104R (1010 bp)	988	192
P94F - P1263R (1169 bp)	959	360
P259F - P649R (390 bp)	999	275
P259F - P1104R (845 bp)	1118	248

[§]I dati riportati in tabella sono stati ottenuti analizzando la “Release 9” (update 31) della banca dati di sequenze batteriche codificanti per il 16S rDNA (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) con il programma MiCA3 sviluppato presso l’Università dell’Idaho (<http://mica.ibest.uidaho.edu/primer.php>). I dati riportati nella seconda colonna forniscono una misura dell’*inclusività* della coppia di primers (N° di campioni identificati correttamente), mentre nella terza colonna si ha il numero dei possibili falsi positivi (*esclusività*).

Le coppie di primers P94F-P1104R e P259F-P1104R sono state utilizzate per amplificare il 16S rDNA del ceppo *P. putida* KT2440 ed hanno permesso di generare frammenti della taglia attesa (Figura 14), confermando quanto dedotto dall’analisi di sequenza.

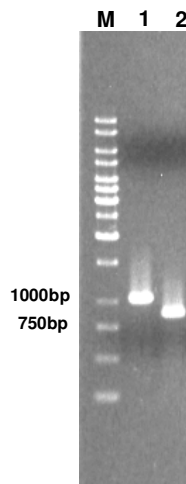


Figura 14. Profilo elettroforetico dei prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando le coppie di primers P94F-P1104R (linea 1) e P259F-P1104R (linea 2) ed il DNA genomico di *P. putida* KT2440 come stampo. M, 1Kb DNA ladder.

La selettività dei primers è stata riconfermata in esperimenti condotti utilizzando, come stampo, DNA metagenomico. In parallelo è stata anche valutata la selettività della coppia ottenuta combinando i primers P94F e P457R. I tre prodotti di amplificazione ottenuti, dopo purificazione sono stati utilizzati per generare librerie di cloni che sono state analizzate con gli stessi approcci descritti in precedenza. L'analisi BLAST condotta sulle sequenze clonate ha permesso di evidenziare che i primers P94F-P1104R amplificano esclusivamente sequenze di *Pseudomonas*; la sequenza più rappresentata mostra un indice di similarità di 0,968 con quella del type strain *P. nitroreducens* IAM 1439. La coppia P259F-P1104R amplifica, oltre a sequenze di *Pseudomonas* (0,952 *P. citronellolis* type strain DSM 50332T e 0,948 *P. nitroreducens* type strain IAM 1439), anche sequenze di microrganismi appartenenti alla famiglia delle Xhantomonadaceae. Tuttavia è stato osservato che i prodotti di amplificazione ottenuti dal DNA delle due famiglie microbiche possono essere facilmente distinti mediante una analisi RFLP. Nelle sequenze da *Xhantomonas* è presente un sito di taglio riconosciuto dall'enzima di restrizione *EcoRI* che assente in quelle da *Pseudomonas*, mentre in entrambe è presente un sito di restrizione *HhaI* che, essendo localizzato in posizioni differenti, genera profili distinti (111 bp in *Xhantomonas* e 307 bp in

Pseudomonas dal primer P259F). La combinazione P94F-P457R ha generato un prodotto di amplificazione della taglia attesa (370 bp) e l'analisi BLAST ha evidenziato che tutte le sequenze amplificate appartengono a *Pseudomonas* (le due sequenze maggiormente rappresentate presentano un indice di similarità di 0,946 con *P. aeruginosa* type strain LMG 1242T, e di 0,925 con *P. nitroreducens* type strain IAM 1439).

La Tabella 10 riassume i risultati della selettività di tutte le coppie di primers che sono state saggiare su metagenoma. Come si può vedere quattro delle coppie di primers utilizzate (P346F-P457R, 311F-P457R, P94F-P457R e P94F-P1104R) permettono di amplificare esclusivamente sequenze di *Pseudomonas*, tuttavia dall'analisi condotta utilizzando il programma Microbial Community Analysis è emerso che le coppie nelle quali è presente il primer P457R presentano un'inclusività piuttosto bassa (Tabella 9). Un'analisi più approfondita condotta utilizzando il programma PROBE MATCH ha mostrato che il primer P457R riconosce solamente il 6% delle sequenze di *Pseudomonas* riportate nel database RDP release 9.31 (16 settembre 2006). Questo naturalmente rappresenta un limite nell'ambito del controllo microbiologico perché la mancata amplificazione utilizzando le coppie di primers P346F-P457R, 311F-P457R e P94F-P457R, non consentirebbe di escludere la presenza di *Pseudomonas* in assenza di un prodotto di amplificazione. Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che la nuova coppia di primer disegnata, P94F-P1104R, permette l'identificazione di *Pseudomonas* in maniera più specifica rispetto ai primers descritti in letteratura. Utilizzando questa coppia di primer è stato sviluppato protocollo di PCR che può essere utilizzato per identificare e tracciare la contaminazione da *Pseudomonas* in alimenti, acqua e campioni industriali ed ambientali.

I dati ottenuti su metagenoma, inoltre, indicano che, senza ricorrere ad alcun passaggio di prearricchimento in terreno nutriente, il saggio di PCR permette di identificare la presenza di *Pseudomonas* in consorzi microbici nei quali questo microrganismo è poco rappresentato.

Tabella 10. Valutazione della selettività delle coppie di primers.

Coppie di primer Cloni (%) la cui sequenza corrisponde al 16S rDNA di <i>Pseudomonas</i>	
311F - 1263R	40
P346F - P457R	100
311F - P457R	100
P346F - 1263R	0
P346F - 1389R	0
P94F – P457R	100
P94F - P1104R	100
P259F - P1104R	60

I test sono stati condotti mediante PCR utilizzando, come stampo, DNA metagenomico rappresentativo di una comunità microbica presente in un reattore a letto impaccato utilizzato per il trattamento aerobio di reflui dell'industria olearia. Tutte le reazioni di PCR avevano generato un prodotto di amplificazione della taglia attesa.

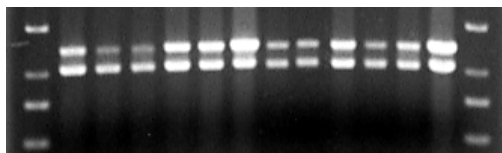
3.2 *Multiplex PCR*

La specificità del saggio di PCR sviluppato potrebbe essere migliorata utilizzando per l'identificazione due marcatori molecolari differenti. De Vos et al. (1997) hanno sviluppato un saggio di multiplex PCR per l'identificazione di *P. aeruginosa* in campioni clinici, basato sull'amplificazione simultanea dei geni *oprI* e *oprL* codificanti per due lipoproteine. Questo saggio, che è stato anche utilizzato da Kimata et al. (2004) per l'identificazione di ceppi di *P. aeruginosa* isolati da ambienti marini dalla baia di Tokyo, non consente tuttavia l'identificazione di altre specie di *Pseudomonas*. Pertanto si è deciso di sviluppare un protocollo di multiplex PCR basato sull'amplificazione simultanea del gene ribosomiale 16S rRNA e del gene funzionale *rpoB*, codificante per la subunità beta della RNA polimerasi. *rpoB* è un gene "housekeeping" altamente conservato presente in singola copia in tutti i batteri grazie al ruolo essenziale che svolge nel metabolismo cellulare (Qi et al., 2001). Il sequenziamento del gene *rpoB* viene utilizzato per l'identificazione di specie di *Corynebacterium* (Khamis et al., 2004), *Paenibacillus* (da Mota et al., 2004; 2005) e *Acinetobacter* (La Scola et al., 2006) e l'identificazione rapida e la differenziazione di isolati di *Brucella* (Marianelli et al., 2006). In campo clinico il clonaggio ed il sequenziamento del gene *rpoB* viene utilizzato per il rilevamento e l'identificazione di *Mycobacterium tuberculosis* in campioni provenienti da pazienti sospettati di essere affetti da tubercolosi osteoarticolare (Yun et al., 2005). Il gene *rpoB* viene anche utilizzato per l'identificazione fino a livello di specie di LAB cocchi nelle bevande fermentate (Renouf et al., 2006) e per l'identificazione di *Yersinia* spp. negli alimenti (Cocolin and Comi, 2005). Le sequenze del gene *rpoB* sono state anche utilizzate per delineare la filogenesi della famiglia delle Pasteurellaceae (Korczak et al., 2004). Ait Tayeb et al. (2005) hanno sviluppato primers (LAPS e LAPS27) specifici per il gene *rpoB* di *Pseudomonas*. Tali primers, permettono di ottenere un prodotto di amplificazione di ca. 1247 bp, che copre la sequenza *rpoB* di *P. aeruginosa* (GenBank accession no. AE004842) dalla posizione 1531 a 2760. Gli autori sostengono che l'identificazione di ceppi di *Pseudomonas* mediante sequenziamento del gene *rpoB* è piuttosto semplice e rappresenta il primo metodo di identificazione utilizzato presso il Center for Molecular Identification of Bacteria all'Istituto Pasteur.

Si è pertanto deciso di utilizzare tale coppia di primers in combinazione con quella più specifica e selettiva per il 16S rDNA, la coppia P94F-P1104R, per la messa a punto di un saggio di multiplex PCR. Sono state condotte, inizialmente, una serie di prove di PCR utilizzando come stampo il DNA genomico di *P. putida* KT2440, per individuare la corretta temperatura di annealing da utilizzare per l'amplificazione dei due geni che necessariamente non corrisponde a quella utilizzata nelle reazioni separate. Successivamente, sono state effettuate prove per stabilire il corretto rapporto tra le due coppie di primers da utilizzare, al fine di ottenere quantità comparabili dei due prodotti di amplificazione. Da queste prove è emerso che le coppie di primers nella miscela di reazione devono essere presenti in rapporto 1:1 e che la temperatura di annealing deve essere fissata a 64°C. Infine è stato sviluppato un protocollo di amplificazione che è stato poi utilizzato per valutare la specificità del saggio (vedi appendice). La specificità è stata valutata mediante test di inclusività ed esclusività che sono stati condotti con DNA provenienti da ceppi delle colture pure utilizzate per i precedenti test. I risultati attesi da queste prove erano due ampliconi di taglia corretta nelle amplificazioni a partire da DNA di *Pseudomonas* (inclusività), nessun prodotto di amplificazione, un solo prodotto di amplificazione o due prodotti ma di taglia non corretta nelle amplificazioni a partire da DNA di non-*Pseudomonas* (esclusività). Per i test di inclusività è stato utilizzato DNA di ceppi di *Pseudomonas* appartenenti a sette differenti specie. Come mostrato nella Figura 15 e nella Figura 16 (linea 2) si osservano due bande di amplificazione della taglia attesa ca 1100 bp (16S rRNA) e ca 1250 bp (*rpoB*) in tutti i test condotti utilizzando DNA da ceppi di *Pseudomonas*, il che indica un inclusività del 100%. Valore analogo è stato ottenuto nei test di esclusività, infatti come si può vedere dalla Figura 16 (a partire dalla linea 3) nella maggior parte dei casi non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione. L'utilizzo della multiplex PCR è risultato particolarmente utile per differenziare microrganismi appartenenti a gruppi tassonomici strettamente correlati a *Pseudomonas*. Come mostrato in Figura 16 (linea 3) anche utilizzando come stampo DNA da *Marinomonas* (nel caso specifico è stato utilizzato il DNA di un ceppo di *Marinomonas* di nuovo isolamento che cresce vigorosamente su *Pseudomonas* Isolation Agar) non si ottiene amplificazione di tutti i bersagli. I risultati ottenuti dai test di inclusività ed esclusività mostrano quindi che la

multiplex PCR risulta essere più specifica nell'identificazione di *Pseudomonas* rispetto al saggio basato sull'amplificazione del solo gene ribosomiale.

Figura 15. Multiplex PCR: test di inclusività



Linea 1 e 14, 1Kb DNA ladder; **linee 2-4**, *P. putida*; **linee 5-7**, *P. fluorescens*; **linea 8-9**, *P. aeruginosa*; **linea 10**, *P. avellanae*; **linea 11**, *P. syringae*; **linee 12-13**, *P. savastanoi*.

Figura 16. Multiplex PCR: test di esclusività



Linee 1 e 14, 1Kb DNA ladder; **lane 2**, *P. stutzeri*; **linea 3**, *Marinomonas*; **linea 4**, *Halomonas*; **linea 5**, *Pseudoalteromonas*; **linea 6**, *Acinetobacter baumannii*; **linea 7**, *Acinetobacter baylyi*; **linea 8**, *Agrobacterium tumefaciens*; **linea 9**, *Bulkholderia terricola*; **linea 10**, *Escherichia coli*; **linea 11**, *Erwinia amylovora*; **linea 12**, *Stenotrophomonas maltophilia*; **linea 13**, *Bacillus subtilis*.

3.3 *Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)*

Un altro approccio molecolare che potrebbe essere utilizzato con successo per il rilevamento e l'identificazione fino a livello di specie di *Pseudomonas* consiste nel combinare la PCR con l'analisi del profilo di frammentazione che si ottiene dopo digestione del DNA con uno più enzimi di restrizione. Questo tipo di analisi può essere condotta utilizzando metodiche differenti (RFLP o T-RFLP). Nella T-RFLP l'analisi del profilo di frammentazione è molto semplificata in quanto ci si limita ad analizzare uno o entrambi i frammenti di restrizione terminali (T-RF). Allo scopo di sviluppare una metodica di T-RFLP per l'identificazione rapida di *Pseudomonas*, come primo passaggio si è proceduto all'individuazione di siti di restrizione presenti nel 16S rDNA la cui presenza/assenza e localizzazione fosse informativa da un punto di vista tassonomico. Anche in questo caso sono state condotte analisi di sequenza e prove di validazione del modello sperimentale direttamente su metagenoma ambientale. Le analisi di sequenza sono state effettuate con la banca dati del 16S rDNA utilizzando il programma MiCa3, mentre le analisi T-RFLP sono state condotte su DNA ambientale estratto da due comunità microbiche nelle quali i *Pseudomonas* erano forme predominanti. Sono stati esaminati tre prodotti di PCR (63F-1389R; P94F-P1104R; P259F-P1104R) in combinazione con tre enzimi di restrizione (*HhaI*, *MspI* e *RsaI*). I dati riportati in Tabella 11 mostrano che l'uso combinato di primers *Pseudomonas*-specifici e la determinazione della taglia molecolare dei frammenti terminali 5' permette 1) l'identificazione rapida di ceppi di *Pseudomonas* fluorescenti (digestione *HhaI* e *MspI* dell'amplicone P259F-P1104R), 2) la differenziazione tra ceppi di *P. aeruginosa* e ceppi di *P. putida*/*P. fluorescens* (digestione *HhaI* e *MspI* degli ampliconi 63F-1389R e P94F-P1104R), 3) la differenziazione tra ceppi di *P. putida* e ceppi di *P. fluorescens* (digestione *RsaI* degli ampliconi P94F-P1104R e P259F-P1104R). L'identificazione delle forme microbiche può essere effettuata direttamente su metagenoma senza ricorrere all'isolamento e alla coltivazione in piastra dei microrganismi. Ove necessario, i dati ottenuti dai profili di T-RFLP possono essere integrati dall'analisi di sequenza dei prodotti di amplificazione.

Tabella 11. Dimensione (bp) del frammento terminale generato per digestione enzimatica del 16S rDNA di *Pseudomonas* fluorescenti

Prodotti di amplificazione & Enzimi di restrizione	63F*-1389R			P94F*-P1104R			P259F*-P1104R		
	<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I
<i>P. aeruginosa</i>	120	108	609	63	51	552	307	233	387
<i>P. fluorescens</i>	172	455	843	115	398	552	307	233	621
<i>P. putida</i>	172	455	609	115	398	786	307	233	387

Le suddette informazioni sono state utilizzate per studiare il metagenoma ottenuto a partire da scarti (paglia esausta) della produzione di funghi eduli e da soluzioni nutrienti emendate con N-Serve che sono utilizzate nell'allevamento di piante in coltura idroponica. Le due matrici esaminate contenevano quantità significative di composti aromatici e rappresentavano quindi un habitat ideale per lo sviluppo di *Pseudomonas*.

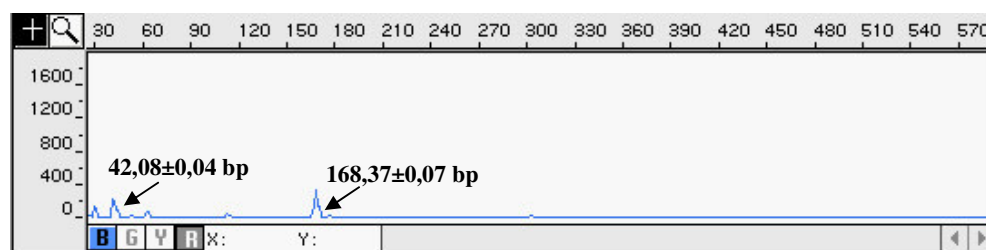
3.3.1 Analisi T-RFLP di metagenoma da soluzioni nutrienti di colture idroponiche emendate con N-Serve

Nel caso di soluzioni emendate con N-Serve l'analisi T-RFLP è stata eseguita inizialmente utilizzando per l'amplificazione primers universali per Eubatteri (63F marcato con FAM e 1389R). Questa analisi consentiva di avere indicazioni sulla possibile presenza di *Pseudomonas*, e allo stesso tempo, di monitorare la popolazione totale. Il DNA amplificato, ottenuto a partire da metagenoma, è stato controllato mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1%, ed il prodotto di amplificazione è stato purificato con il kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-up" (Promega, Italia), in accordo con le istruzioni della casa produttrice, per rimuovere nucleotidi non incorporati e primer marcati residui. Il profilo T-RFLP è stato generato usando l'enzima di restrizione *HhaI*. Una aliquota del digerito è stata miscelata con 0,5 µl di marker di taglie molecolari ROX-LABELLED GS500 (Applied Biosystems). Il campione è stato analizzato mediante elettroforesi capillare con rilevamento tramite fluorescenza laser indotta utilizzando un ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) operante in modo GeneScan con il set D di filtri.

Per l'analisi qualitativa e quantitativa dell'elettroferogramma è stato utilizzato il software GENESCAN 3.10 fissando il valore di cut-off per l'altezza dei picchi a 100 unità di fluorescenza. Per la determinazione della taglia molecolare, in bp, dei frammenti terminali di restrizione (T-RFs) è stato utilizzato l'algoritmo Local Southern.

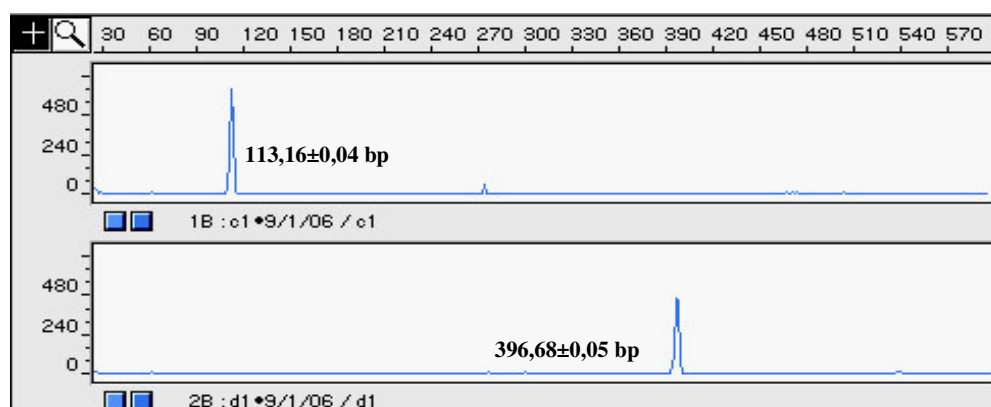
I risultati mostrati in Figura 17 indicano che la digestione con l'enzima *HhaI* dell'amplicone fluorescente genera due picchi marcati terminalmente rispettivamente di $42,08 \pm 0,04$ bp e $168,37 \pm 0,07$ bp, il che corrisponde ad una popolazione microbica non molto eterogenea. La presenza di un picco di 168 bp potrebbe essere indicativo della presenza nella popolazione di ceppi di *Pseudomonas*; tuttavia ampliconi ottenuti da sequenze di microrganismi appartenenti al genere *Alteromonas* potrebbero anch'essi generare un frammento terminale di restrizione della stessa taglia.

Figura 17. Analisi T-RFLP dell'amplicone (16S rDNA) ottenuto con primers universali a partire da metagenoma estratto da soluzioni nutritive, utilizzate per l'allevamento di piante in coltura idroponica ed emendate con N-Serve. L'amplificazione è stata condotta utilizzando la coppia di primers universali 63F(marcato con FAM)-1389R; il DNA è stato digerito con l'enzima di restrizione *HhaI*. La dimensione dei frammenti è indicata in alto, mentre l'altezza dei picchi è espressa in unità di fluorescenza.



Possibili conferme sperimentali della presenza di *Pseudomonas* nella popolazione in esame potrebbero essere ottenute in due modi: 1) mediante costruzione di una libreria genomica di 16S rDNA ed analisi di sequenza di un certo numero di cloni o 2) combinando l'analisi T-RFLP con l'utilizzo di primers *Pseudomonas*-specifici come quelli sviluppati nell'ambito della presente ricerca. Quest'ultima metodica sarebbe più rapida e meno dispendiosa e, quindi, più idonea per un'applicazione di tipo diagnostico o di controllo microbiologico. Per verificare la specificità di questo approccio l'amplificazione da metagenoma è stata effettuata utilizzando la coppia di primers P94F (marcato con FAM)-P114R, e l'amplicone è stato digerito separatamente con gli enzimi di restrizione *HhaI* e *MspI*, generando due distinti profili T-RFLP. Nel campione in esame la digestione con l'enzima *HhaI* (Figura 18, pannello superiore) genera un picco di fluorescenza di 113,16±0,04 bp, mentre quella con l'enzima *MspI* (Figura 18, pannello inferiore) un picco di fluorescenza di 396,68±0,05 bp. Questi risultati confermano la presenza di *Pseudomonas* nel campione esaminato e forniscono informazioni utili per l'identificazione dei ceppi a livello di specie (vedi in seguito).

Figura18. Analisi T-RFLP dell'amplicone ottenuto con primers *Pseudomonas*-specifici. L'amplificazione è stata condotta su metagenoma estratto da soluzioni nutritive, utilizzate per l'allevamento di piante in coltura idroponica ed emendate con N-Serve; la coppia di primers utilizzata è la P94F(marcato con FAM)-P1104R. Il DNA del prodotto di amplificazione è stato digerito con gli enzimi di restrizione *HhaI* (pannello superiore) e *MspI* (pannello inferiore).

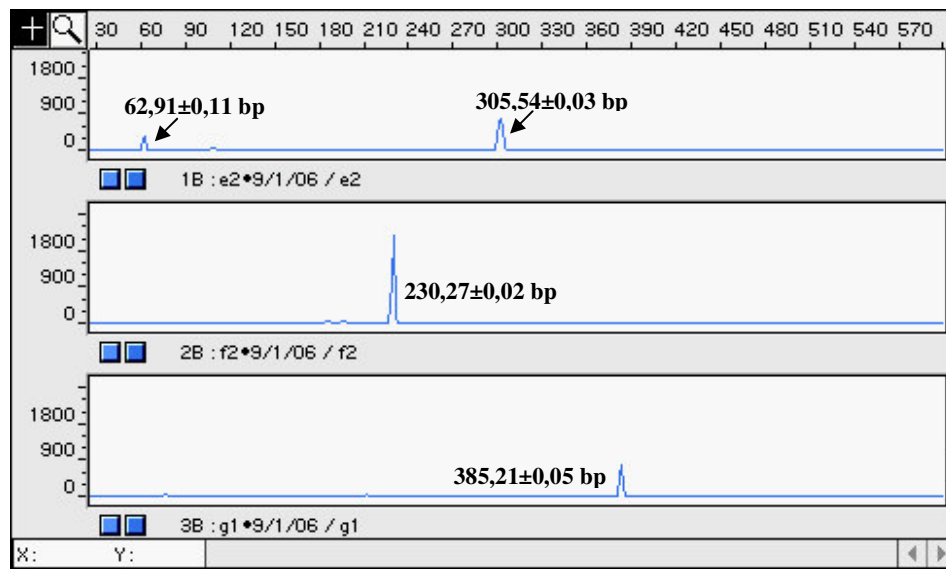


Per una ulteriore conferma dei dati ottenuti è stata condotta un'analisi T-RFLP su ampliconi ottenuti utilizzando la coppia di primers *Pseudomonas*-specifici P259F (marcato con FAM)-P1104R. In questo caso il prodotto di amplificazione è stato digerito con tre enzimi di restrizione, *HhaI*, *MspI* e *RsaI*, generando tre distinti profili di T-RFLP. La digestione *MspI* dell'amplicone fluorescente ha generato un T-RF di $230,27 \pm 0,02$ bp come atteso nel caso in cui siano presenti nella popolazione *Pseudomonas* fluorescenti (Figura 19, pannello centrale). Il profilo generato dopo digestione *HhaI* dell'amplicone (Figura 19, pannello superiore) presenta invece due T-RF rispettivamente di $62,91 \pm 0,11$ bp e $305,54 \pm 0,03$ bp. Il picco di fluorescenza maggioritario di $305,54 \pm 0,03$ bp corrisponde a quello atteso per *Pseudomonas* fluorescenti. Il T-RF di $62,91 \pm 0,11$ bp potrebbe corrispondere ad un ceppo di *Pseudomonas* che non appartiene alla classe delle *Pseudomonas* fluorescenti.

Infine il profilo di restrizione ottenuto in seguito a digestione dell'amplicone con l'enzima *RsaI*, mostra un unico T-RF di $385,21 \pm 0,05$ bp (Figura 19, pannello inferiore). Combinando questi risultati con quelli ottenuti in precedenza è

possibile concludere che la popolazione di *Pseudomonas* è costituita principalmente da ceppi di *P. putida*. Questa conclusione è stata confermata mediante isolamento su piastra e caratterizzazione fenotipica e molecolare dei *Pseudomonas* fluorescenti presenti nella soluzione nutriente. Tra i *Pseudomonas* la forma microbica prevalente è un ceppo la cui sequenza di 16S rDNA mostra un grado di similarità del 98% con quelle del type-strain *P. putida* DSM291T e di *P. putida* KT2440.

Figura 19. Analisi T-RFLP dell'amplicone ottenuto con primers *Pseudomonas*-specifici. L'amplificazione è stata condotta su metagenoma estratto da soluzioni nutritive, utilizzate per l'allevamento di piante in coltura idroponica ed emendate con N-Serve; la coppia di primers utilizzata è P259F(marcato con FAM)-P1104R. Il DNA è stato digerito con gli enzimi di restrizione *HhaI* (pannello superiore), *MspI* (pannello centrale) e *RsaI* (pannello inferiore).



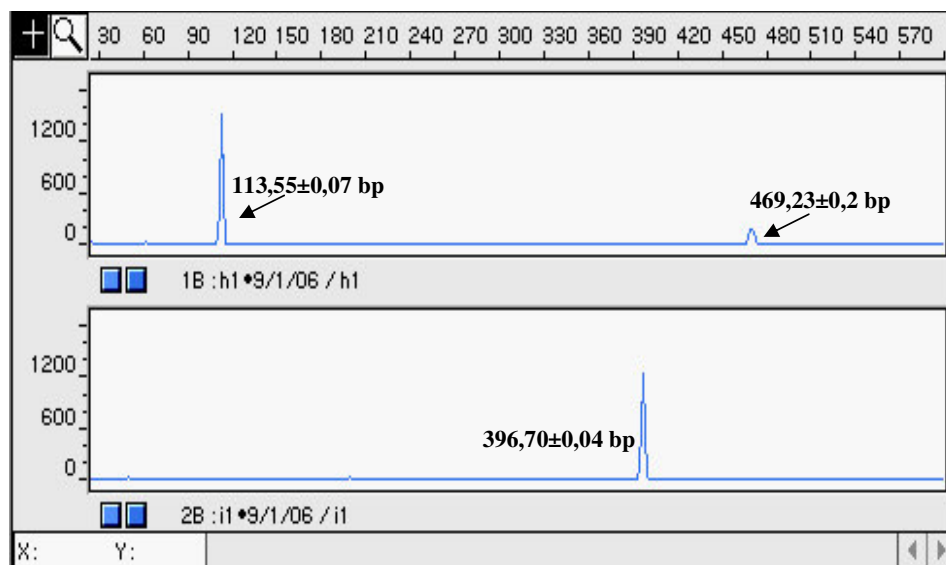
3.3.2 Analisi T-RFLP di metagenoma da scarti di produzione di funghi eduli

Il metagenoma ottenuto a partire da scarti (paglia esausta) di produzione dell'allevamento di funghi eduli è stato studiato mediante analisi T-RFLP condotta utilizzando solamente le coppie di primers *Pseudomonas*-specifiche.

Il prodotto di amplificazione ottenuto utilizzando la coppia P94F (marcato con FAM)-P1104R, dopo purificazione, è stato digerito separatamente con gli enzimi di restrizione *HhaI* e *MspI*. La digestione con l'enzima *HhaI* (Figura 20 pannello superiore) ha generato due picchi di fluorescenza. Il picco maggioritario di 113,55±0,07 bp mostra la presenza in questa popolazione microbica di ceppi appartenenti al gruppo *P. putida*/*P. fluorescens*. Per quanto riguarda l'altro picco di fluorescenza, quello di 469,23±0,20 bp, un'analisi in silico condotta sulla sequenza del gene 16S rRNA di *P. putida* KT2440 ha mostrato che questo picco potrebbe essere associato alla presenza di un secondo sito di restrizione localizzato a valle del sito primario. Questo RF addizionale, noto in letteratura con il nome di pseudo-T-RF, molto probabilmente è dovuto ad una digestione parziale degli ampliconi nei quali il sito di restrizione terminale non è stato tagliato. La formazione di questi pseudo-T-RF è stata spiegata da Egert e Friedrich (2003). Questi autori hanno dimostrato che durante l'amplificazione dei geni 16S rRNA alcuni degli ampliconi formati risultano essere parzialmente a singolo filamento. Poiché i siti di restrizione terminali a singolo filamento non possono essere tagliati dalle endonucleasi di restrizione, è possibile che nell'analisi vengano rilevati siti di restrizione pseudo-terminali localizzati a valle del sito di restrizione primario atteso. Gli autori hanno anche ipotizzato che gli ampliconi dei geni 16S rRNA possono formare delle strutture secondarie palindromiche locali, che permettono agli enzimi di restrizione di tagliare DNA "a singolo filamento". Questa ipotesi potrebbe render conto del fatto che l'analisi T-RFLP dalla stessa PCR produce pseudo-T-RFs con alcuni enzimi di restrizione (*HhaI*) ma non con altri (*MspI*). In questo contesto un sito di restrizione secondario è rilevabile solo se il sito di restrizione primario non è parte di una struttura canonica.

La digestione *MspI* dell'amplicone fluorescente ha prodotto un solo T-RF di 396,70±0,04 bp (Figura 20, pannello inferiore) confermando la presenza in questa popolazione di ceppi di *P. putida*/*P. fluorescens*.

Figura 20. Analisi T-RFLP dell'amplicone ottenuto con primers *Pseudomonas*-specifici. L'amplificazione è stata condotta su metagenoma estratto da compost esausto utilizzato per l'allevamento di funghi eduli. La coppia di primers utilizzata è P94F(marcato con FAM)-P1104R. Il DNA è stato digerito con gli enzimi di restrizione *HhaI* (pannello superiore) e *MspI* (pannello inferiore).



Anche su questo metagenoma sono stati generati tre profili aggiuntivi mediante digestione dell'amplicone P259F (marcato con FAM)-P1104R con gli enzimi di restrizione *HhaI*, *MspI* e *RsaI*. La digestione con l'enzima *HhaI* (Figura 21, pannello superiore) dell'amplicone fluorescente ha generato due picchi rispettivamente di $62,89 \pm 0,20$ bp e $305,50 \pm 0,04$ bp. Per questo profilo possono essere fatte le stesse considerazioni sui pseudo-TRF riportate in precedenza.

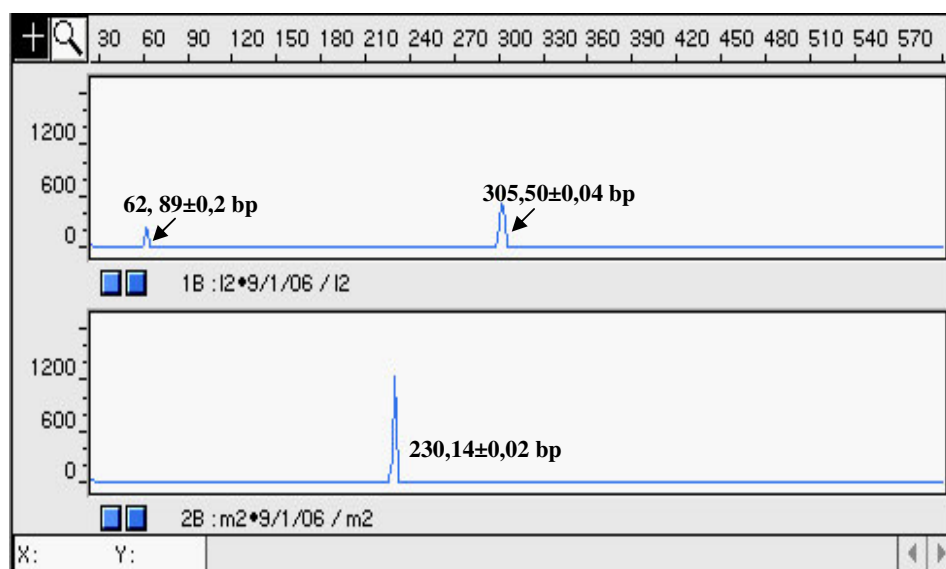
La digestione con l'enzima *MspI* dell'amplicone ha prodotto un solo T-RF di $230,14 \pm 0,02$ bp (Figura 21, pannello inferiore) confermando che nella popolazione sono presenti *Pseudomonas* fluorescenti.

Infine, l'assenza di un T-RF di 387 bp nel profilo di restrizione ottenuto dopo digestione con l'enzima *RsaI* ci ha permesso di escludere la presenza in questa popolazione di ceppi di *P. putida*. Nell'elettroferogramma si osserva un picco di dimensione superiore alle 500 bp (la cui taglia non può essere determinata con il

marker ROX-GS500) compatibile con il frammento terminale atteso per *P. fluorescens* $622\pm 1\text{bp}$.

Combinando i risultati ottenuti analizzando i profili T-RFLP è possibile concludere che in questa popolazione microbica sono presenti *Pseudomonas* fluorescenti appartenenti alla specie *P. fluorescens*.

Figura 21. Analisi T-RFLP dell'amplicone ottenuto con primers *Pseudomonas*-specifici. L'amplificazione è stata condotta su metagenoma estratto da compost esausto utilizzato per l'allevamento di funghi eduli. La coppia di primers utilizzata è P259F(marcato con FAM)-P1104R. Il DNA è stato digerito con gli enzimi di restrizione *HhaI* (pannello superiore) e *MspI* (pannello inferiore).



I risultati dei profili T-RFLP sono stati integrati con l'analisi di sequenza dei prodotti di amplificazione. In particolare il prodotto di amplificazione dell'rDNA 16S ottenuto utilizzando la coppia di primer P259F-P1104R, dopo purificazione è stato clonato nel vettore pGEM-Teasy per costruire una libreria di cloni. Dopo analisi RFLP condotta con l'enzima di restrizione *EcoRI*, sono stati scelti due cloni rappresentativi dell'intera popolazione che sono stati utilizzati per l'analisi di sequenza. Le sequenze nucleotidiche degli inserti presenti in questi due cloni sono state comparate con quelle disponibili nella banca dati del Ribosomal Database Project. I risultati ottenuti mostrano che entrambe le sequenze presentano un grado di similarità molto elevato (superiore a 0,9) con quelle del 16S rDNA di ceppi di *P. fluorescens*. In particolare la sequenza del clone S6 (Figura 22) presenta un grado identità del 96,1% con il 16S rDNA di *P. fluorescens*, biotipo G, ceppo ATCC 17518, mentre quella del clone S12 (Figura 23) presenta un grado di identità del 96,1% con il 16S rDNA di *P. fluorescens*, biotipo A, ceppo ATCC17555.

I dati di sequenza confermano i risultati ottenuti dall'analisi T-RFLP, e cioè la presenza nella popolazione di ceppi di *P. fluorescens*.

Figura 22. Sequenza del gene che codifica per l'rRNA 16S del clone S6; in grassetto è riportato il sito di restrizione *RsaI* presente alla posizione 621.

```
>clone S6 16S rDNA 259-1104
CCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG
AAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACC GGCTAA
CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTCAAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATAC
TGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCAT
TAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCC
TTGACATCCAATGAACCTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTG
CTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCA
ACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACG
```

Figura 23. Sequenza del gene che codifica per l'rRNA 16S del clone S6; in grassetto è riportato il sito di restrizione *RsaI* presente alla posizione 621.

```
>clone S12 16S rDNA 259-1104
CCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGTCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG
AAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACC GGCTAA
CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACTGATAC
TGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCAT
TAAGTTGACCGCCCGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCC
TTGACATCCAATGAACCTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTG
CTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCA
ACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACG
```

In tutti i profili T-RFLP generati è stata notata una lieve discrepanza tra la taglia del frammento terminale 5' apparente (ottenuto dall'elettroforesi) e quello atteso (dalla digestione in silico di sequenze note). Questi risultati, che sono in accordo con quanto riportato in letteratura sono imputabili alla separazione elettroforetica delle molecole di DNA; in genere si ritiene che la differenza tra che valore atteso e valore sperimentale possa essere compresa tra 0 e 4 bp (Liu et al., 1997; Clement et al., 1998; Bernhard et al., 2000a; Gonzalez et al., 2000; Kaplan et al., 2001).

In conclusione in questo lavoro è stato dimostrato che l'utilizzo di un protocollo di PCR con coppie di primers *Pseudomonas*-specifici, in combinazione con la tecnica T-RFLP, permette facilmente di identificare le *Pseudomonas* fluorescenti e può rappresentare una valida alternativa alla multiplex PCR. La metodica è semplice ed affidabile e, applicata a campioni ambientali, permette di identificare la presenza di *Pseudomonas* fino a livello di specie senza ricorrere a tecniche di coltivazione in piastra

Questo è il primo esempio di applicazione della T-RFLP per la differenziazione a livello di specie di *Pseudomonas* fluorescenti (*P. aeruginosa*/*P. putida*/*P. fluorescens*).

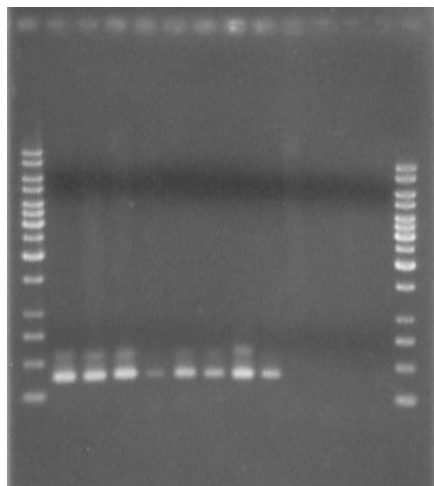
3.4 Real-time PCR

Recentemente sono stati descritti in letteratura saggi per il rilevamento di *Pseudomonas* in real-time PCR. In particolare, Lloyd-Jones et al. (2005) hanno sviluppato un protocollo di PCR combinato con la tecnologia Taqman per il rilevamento di un amplicone, corrispondente ad una porzione del gene per il 16S rRNA. Questo saggio è stato utilizzato per quantificare la popolazione di *Pseudomonas* in differenti campioni di suolo della Nuova Zelanda. Gli autori, utilizzando questa metodica in parallelo a test di coltivazione in piastra, hanno dimostrato che le Pseudomonadi fluorescenti coltivabili rappresentano una piccola porzione (<1%) della popolazione totale di *Pseudomonas*, che rappresenta meno dell'1% della popolazione batterica totale presente nei campioni esaminati. Pujol et al. (2006) hanno messo a punto un protocollo di real-time PCR basato sull'impiego di primers ceppo specifici per monitorare la colonizzazione dei fiori e delle foglie di melo da parte di *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, un agente di controllo biologico della malattia del luppolo, causata da *Erwinia amylovora*. Diversi protocolli di real-time PCR sono stati infatti sviluppati per il rilevamento di *P. aeruginosa*, un patogeno opportunistico per l'uomo, in campioni clinici (Qin et al., 2003) ed in campioni di acque reflue municipali (Schwartz et al., 2006).

Pertanto, con l'obiettivo di migliorare la specificità e la sensibilità dell'identificazione di *Pseudomonas* è stata valutata la possibilità di sviluppare un protocollo di real-time PCR utilizzando alcuni dei primers disegnati in questo lavoro. Per il rilevamento dei prodotti di amplificazione si è scelto di utilizzare il SYBR Green I dye, che si lega al DNA a doppio filamento. In assenza di sonde, la specificità della reazione è determinata dalla temperatura di melting dell'amplicone ottenuto. Come marcatore molecolare abbiamo scelto il gene per il 16S rRNA che è presente in più copie nel genoma dei *Pseudomonas* (3 copie in *P. aeruginosa* e 7 copie in *P. putida*) il che potrebbe aumentare la sensibilità di rilevamento di questi microrganismi. Per lo sviluppo di protocolli di PCR real-time i primers devono produrre ampliconi di dimensioni non superiori alle 600 bp, se si vuole ottenere una quantificazione accurata. Purtroppo le coppie di primers che rispondevano a questo requisito (P346F-P457R, 311F-P457R, P94F-P457R) avevano tutte un inclusività piuttosto bassa (vedi Tabella 9), in quanto il primer P457R riconosce solo il 6% delle sequenze di *Pseudomonas* riportate nel database

RDP release 9.31 (16 settembre 2006). Si è quindi proceduto al disegno di un nuovo *reverse* primer (P649R) che potesse essere utilizzato in combinazione con quelli P94F e P259F. La specificità e la sensibilità delle nuove coppie di primers è stata valutata sia su DNA genomico di colture pure che su metagenoma microbico. Sulla base dei risultati ottenuti è stato scelto per lo sviluppo del protocollo di amplificazione la coppia di primer P94F-P649R. La Figura 24 mostra la specificità della coppia di primers P94F-P649R su DNA di colture pure.

Figura 24. Specificità della coppia di primers P94F-P649R.

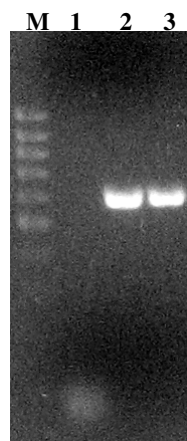


Linea 1 e 14, 1Kb DNA Ladder; **linea 2,** *P. putida* KT2440; **linea 3,** *P. putida* T2; **linea 4,** *P. putida* RB; **linea 5,** *P. fluorescens* PDM; **linea 6,** *P. aeruginosa*; **linea 7,** *P. avellanae*; **linea 8,** *P. syringae*; **linea 9,** *Pseudomonas* sp. M1; **linea 10,** *S. maltophilia* P12; **linea 11,** *E. amylovora*; **linea 12,** *A. baylyi* ADP1, **linea 13,** *E. coli*.

Per la messa a punto del protocollo di real-time PCR è stato utilizzato come stampo DNA genomico di *P. putida* ceppo KT2440. Dal momento che durante l'amplificazione oltre all'amplicone atteso, potrebbero formarsi prodotti non specifici, per esempio primer-dimers, che legano il SYBR Green I dye, la quantificazione è stata affiancata da un'analisi della curva di melting dei prodotti ottenuti. L'analisi della curva di melting permette di distinguere i segnali del bersaglio da quelli di coprodotti della PCR, mediante riferimento ai valori di T_m . Nel nostro caso il valore T_m dei primer-dimers è di circa 77,8 °C, che è facilmente distinguibile dal T_m del bersaglio che è di circa 84,7 °C. L'assenza di prodotti aspecifici è stata valutata mediante separazione elettroforetica dei prodotti di

amplificazione su gel di agarosio all'1% e visualizzazione con luce UV dopo colorazione con bromuro d'etidio. I risultati di questa analisi (Figura 25) indicano che non sono presenti bande dovute a prodotti aspecifici di amplificazione.

Figura 25. Profilo elettroforetico del prodotto di amplificazione ottenuto a partire da DNA genomico di *P. putida* KT2440 utilizzando la coppia di primers P94F-P649R in reazioni di real-time PCR.



M, 500 bp DNA ladder; **linea 1**, controllo negativo di PCR; prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando come stampo 40 ng (**linea 2**) e 4 ng (**linea 3**) di DNA di *P. putida* KT2440

Per generare uno standard esterno da utilizzare per la quantificazione dei campioni è stata amplificata, per PCR, una porzione del gene 16S rRNA di *P. putida* KT2440 utilizzando i primers universali per Eubatteri (63F-1389R). Il prodotto di amplificazione ottenuto è stato purificato, quantificato spettrofotometricamente ed utilizzato, successivamente, per preparare diluizioni decimali dello standard corrispondenti a 10^7 - 10^2 copie/ μ l. Aliquote delle suddette diluizioni sono state utilizzate come stampo in reazioni di real-time PCR con la coppia di primers *Pseudomonas*-specifici P94F-P649R al fine di costruire una curva standard esterna da utilizzare per la quantificazione. La Figura 26 mostra i tipici profili di amplificazione ottenuti con ciascun template.

La capacità della real-time PCR di determinare accuratamente il numero di sequenze bersaglio presenti nel campione dipende dalla linearità e dall'efficienza

di amplificazione. La linearità è definita come la capacità della metodica di generare risultati proporzionali alla quantità di analita presente nel campione ed è rappresentata dal coefficiente di regressione.

L'efficienza è definita come la capacità della PCR di duplicare le molecole di ampliconi in ogni ciclo ed è calcolata dallo slope della curva di regressione lineare (s) mediante l'equazione

$$E = 10^{-1/s} - 1 \text{ (Klein et al., 1999).}$$

Ad una efficienza ottimale ($E=1$) corrisponde uno slope di -3.322 (Knutsson et al., 2002).

Nel nostro caso, riportando in grafico i valori dei C_t ottenuti in funzione del logaritmo del numero di copie del gene 16S rRNA è stata ottenuta una retta con un coefficiente di correlazione (r) di -1 (che corrisponde ad un $R^2=1$). L'amplificazione si mantiene lineare in un range di 5 unità logaritmiche e l'efficienza della reazione è di 0.74. La Figura 27 mostra la curva standard ottenuta.

Figura 26. PCR real-time di diluizioni seriali decimali del gene 16S rRNA di *Pseudomonas*.

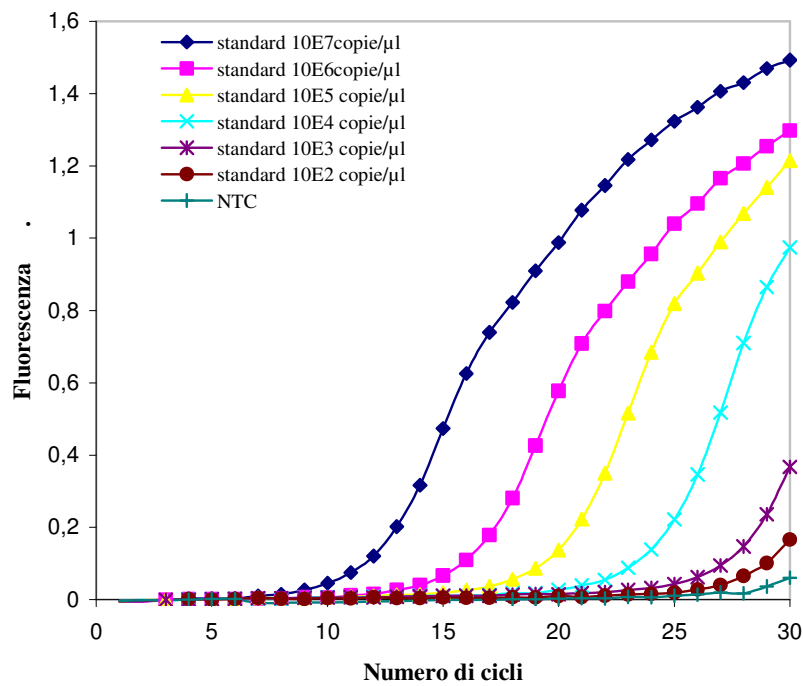
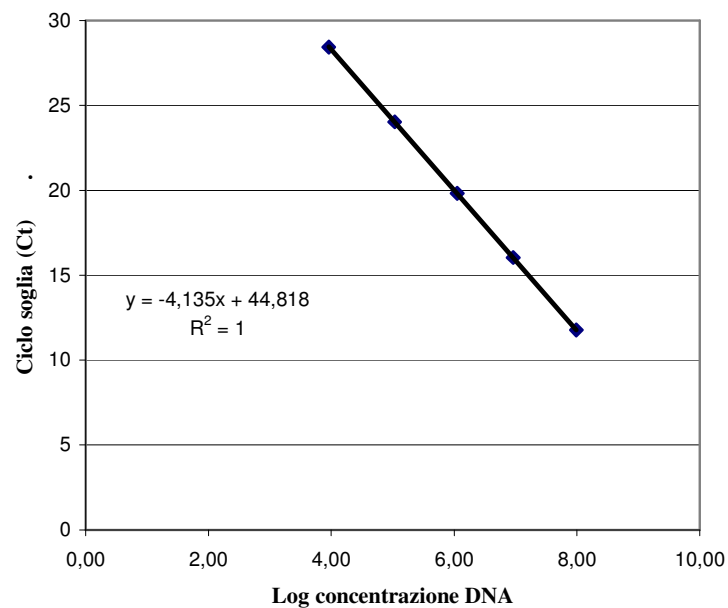


Figura 27. Curva standard che mostra la relazione lineare tra il C_T ed il log della concentrazione di DNA.



Successivamente è stata costruita una curva standard riferita al numero di cellule presenti nel campione. A tale scopo da una coltura di *P. putida* KT2440 sono state fatte diluizioni seriali decimali ed il numero di cellule presenti nelle diluizioni è stato determinato mediante un metodo di conta tradizionale quale la conta diretta al microscopio (vedi materiali e metodi). Da ciascuna diluizione (ca. 5×10^6 - 5×10^2 cellule/ml) è stato poi estratto il DNA genomico che è stato utilizzato come stampo nelle reazioni di amplificazione (Figura 28). Questo metodo evita di estrapolare il numero di cellule dalla quantità di DNA fornendo un risultato diagnostico più immediato, che tiene anche conto dell'efficienza della procedura di estrazione del DNA.

La curva standard basata su diluizioni decimali del numero di cellule ha mostrato una relazione lineare tra il logaritmo del numero di cellule ed i cicli soglia (Figura 29). Lo slope della curva è $-2,9459$ che corrisponde ad una efficienza di amplificazione di $E = 1,18$ ed il coefficiente di correlazione (r) è risultato essere di $-0,9958$ ($R^2 = 0,9917$). La linearità delle due curve standard ottenute e l'osservazione che la PCR opera con un'efficienza costante conferma che il saggio è adatto per misure quantitative (Heid et al., 1996). Il limite di rilevamento del saggio di PCR è risultato essere di ca. 5×10^2 cellule/ml (ca. 2 cellule per PCR). Questo risultato è in accordo con quelli riportati in letteratura. Chen et al. (1997) infatti, hanno mostrato un limite di rilevamento inferiore a 2 CFU/PCR da una coltura pura di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Sails et al. (2003) sono stati in grado di rilevare ca. 12 genomi/PCR su campioni di *Campylobacter jejuni*. Il saggio di real-time PCR sviluppato è risultato essere un metodo sensibile e specifico che consente di ridurre il tempo per il rilevamento e l'identificazione di *Pseudomonas*. I risultati ottenuti mostrano che tale metodica potrebbe essere usata per test di routine relativamente rapidi per il controllo microbiologico di campioni alimentari e ambientali.

Figura 28. PCR real-time di diluizioni seriali decimali di una coltura di *Pseudomonas*.

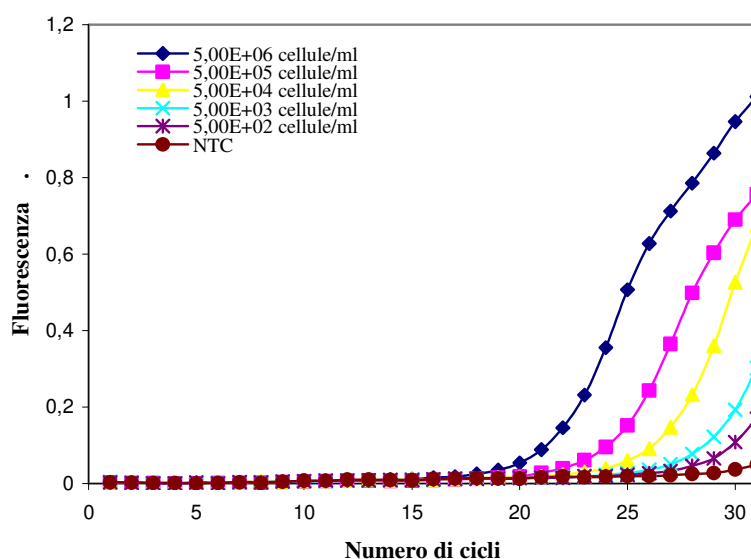
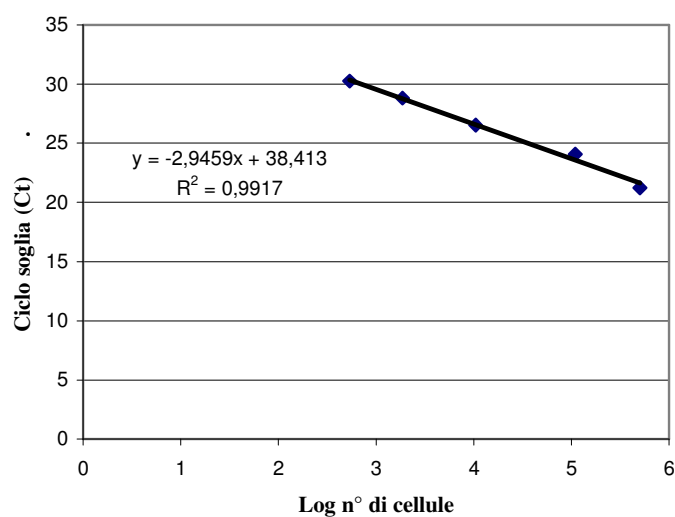


Figura 29. Curva standard che mostra la relazione lineare tra il C_T ed il log del numero di cellule di *Pseudomonas*.



3.5 PCR-RFLP

Per l'identificazione rapida di *Pseudomonas* è stata anche valutata la possibilità di utilizzare un marker molecolare differente dal gene per il 16S rRNA.

Affinché un determinato gene possa essere utilizzato per analisi tassonomica devono essere soddisfatti i seguenti presupposti:

- il gene non deve essere trasmesso orizzontalmente
- la velocità di evoluzione molecolare deve essere maggiore di quella del 16S rRNA
- deve essere distribuito universalmente tra le specie batteriche che si intende caratterizzare.

Il gene *gyrB* sembra presentare tutte queste caratteristiche. La probabilità di trasmissione orizzontale è trascurabile, è distribuito universalmente tra le specie batteriche (McMacken et al., 1987) e la sua velocità di evoluzione è più alta non solo dei geni ribosomiali ma anche di altri geni codificanti proteine (Yamamoto and Harayama, 1996). Quest'ultima caratteristica lo rende particolarmente utile sia per l'identificazione che la discriminazione di ceppi ambientali. Il gene *gyrB* codifica per la subunità B della DNA girasi (una topoisomerasi di tipo II), un enzima essenziale per la replicazione del cromosoma, che controlla lo stato topologico del DNA (Watt and Hickson, 1994).

Yamamoto et al. (2000) hanno disegnato primer universali che permettono di amplificare con successo il gene *gyrB* da un ampio spettro di specie batteriche. Il primer UP1E è stato disegnato sulle regioni conservate presenti nelle sequenze aminoacidiche delle proteine GyrB di *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus subtilis*; mentre APrU, è stato disegnato sulle sequenze conservate di GyrB di 15 ceppi appartenenti al genere *Acinetobacter* (Yamamoto and Harayama, 1996). All'estremità 5' dei due primers sono state aggiunte le sequenze dei primer universali M13 reverse (UP1E) e M(-21) (APrU) in modo da rendere possibile il sequenziamento diretto del prodotto di amplificazione.

Come primo passaggio è stata valutata la possibilità di utilizzare questa coppia di primers per amplificare sequenze del gene *gyrB* da ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas*, successivamente è stata considerata la possibilità di utilizzare la tecnica dell'RFLP per analizzare i prodotti di amplificazione così ottenuti. Analizzando le sequenze *gyrB* di *Pseudomonas* riportate nei database ICB

(<http://seasquirt.mbio.co.jp/icb/index.php>) e GenBank. è emerso che l'88% delle sequenze (388/438) presentano un sito di restrizione *PvuII* a 250 nt rispetto al primer *reverse*. Tra le 50 sequenze che non possiedono il sito di restrizione *PvuII* spiccano due specie (Tabella 12): *P. aeruginosa* che presenta un sostituzione nucleotidica (T al posto di C) e *P. agarici* che presenta ben due sostituzioni (due T al posto di due C). Come si può vedere dalla Figura 30 in entrambi i casi le sostituzioni sono sulla terza posizione del codone e pertanto non determinano variazioni nella sequenza aminoacidica.

Tabella 12. Presenza (+)/Assenza (-) del sito di restrizione *PvuII* nelle sequenze del gene *gyrB* di *Pseudomonas*.

Specie di <i>Pseudomonas</i> (Numero di sequenze)		Sito di restrizione <i>PvuII</i>	Variazione rispetto a <i>PvuII</i>
<i>P. aeruginosa</i>	(6/7)	—	CAGTTG
<i>P. agarici</i>	(3)	—	TAGTTG
<i>P. alcaligenes</i>	(1)	+	
<i>P. amygdali</i>	(3)	+	
<i>P. anguilliseptica</i>	(1)	+	
<i>P. asplenii</i>	(2)	+	
<i>P. azotoformans</i>	(1)	+	
<i>P. balearica</i>	(2)	+	
<i>P. brassicacearum</i>	(1)	+	
<i>P. caricapapayae</i>	(3)	+	
<i>P. chloritidis</i>	(1)	+	
<i>P. chlororaphis</i>	(6)	+	
<i>P. cichorii</i>	(5)	+	
<i>P. citronellolis</i>	(1)	+	
<i>P. corrugata</i>	(3)	+	
<i>P. entomophila</i>	(1)	+	
<i>P. ficuserectae</i>	(1)	+	
<i>P. fluorescens</i>	biotype A (3/4)	+	
	biotype B (2)	+	
	biotype C (3)	+	
	biotype G (1)	+	
	biotype unknown (21/25)	+	
<i>P. frederiksbergensis</i>	(1)	+	
<i>P. fulva</i>	(2)	+	
<i>P. kilonensis</i>	(1)	+	
<i>P. marginalis</i>	pv. <i>alfalfae</i> (2)	+	
	pv. <i>marginalis</i> (6)	+	
	pv. <i>pastinaceae</i> (4)	+	
	pv. unknown (1)	+	
<i>P. marginata</i>	(1)	+	
<i>P. mediterranea</i>	(1)	+	
<i>P. mendocina</i>	(1)	+	
<i>P. mucidolens</i>	(1)	+	
<i>P. oleovorans</i>	(1)	+	
<i>P. plecoglossicida</i>	(10)	+	

Specie di <i>Pseudomonas</i> (Numero di sequenze)	Sito di restrizione <i>PvuII</i>	Variazione rispetto a <i>PvuII</i>
<i>P. pseudoalcaligenes</i> (3)	+	
<i>P. putida</i>		
biovar A (6)	+	
biovar B (2)	+	
biovar unknown (28/30)	+	
<i>P. qianpuensis</i> (1)	+	
<i>P.</i>		
<i>savastanoi</i>		
pv. <i>glycinea</i> (4)	+	
pv. <i>phaseolicola</i> (3)	+	
pv. <i>savastanoi</i> (2)	+	
pv. unknown (4)	+	
<i>Pseudomonas</i> sp. (35/44)	+	
<i>P. straminea</i> (1)	+	
<i>P. stutzeri</i> (26/27)	+	
<i>P. synxanta</i> (1)	+	
<i>P. syringae</i>		
pv. <i>antirrhini</i> (1)	–	CAGTTG
pv. <i>coriandricola</i> (1)	+	
pv. <i>coronafaciens</i> (1)	–	TAGCTG
pv. <i>glycinea</i> (10)	+	
pv. <i>lachrymans</i> (5/7)	+	
pv. <i>maculicola</i> (5/8)	+	
pv. <i>mori</i> (3)	+	
pv. <i>morsprunorum</i> (3)	+	
pv. <i>oryzae</i> (1)	–	TAGCTG
pv. <i>phaseolicola</i> (13)	+	
pv. <i>pisi</i> (7)	+	
pv. <i>syringae</i> (14/16)	+	
pv. <i>tabaci</i> (3)	+	
pv. <i>tomato</i> (2/3)	+	
pv. unknown (31/38)	+	
<i>P. taetrolens</i> (1)	+	
<i>P. tolaasii</i> (3)	+	
<i>P. tremae</i> (1)	+	
<i>P. viridiflava</i> (74/80)	+	

Figura 30. Sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione *PvuII* nella sequenza del gene *gyrB* di *Pseudomonas* (1) e sequenze corrispondenti in *P. aeruginosa* (2), *P. agarici* (3), *P. syringae* (2,4 e 5).

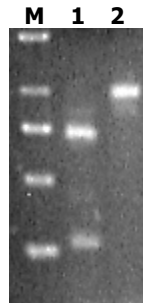
	F	S	W	D
1	TT	CAGCTG	GG	AC
2		T		
3	..	T	..	T.....
4	..	T		
5		AG		

5 S → K

Pertanto la mancata digestione dell'amplicone ottenuto a partire da DNA cromosomale di un ceppo isolato che presumibilmente appartiene al genere *Pseudomonas* potrebbe suggerire l'attribuzione del ceppo alla specie *P. aeruginosa* o *P. agarici*. Le due specie possono essere distinte con un test fisiologico di crescita alla temperatura di 42°C, temperatura permissiva per *P. aeruginosa* ma non per *P. agarici* e direttamente sulla base della sequenza nucleotidica dell'amplicone. La validità del protocollo di PCR-RFLP è stata verificata su DNA genomico di *P. putida* e di *P. aeruginosa*. Per l'amplificazione del gene *gyrB* sono state apportate delle modifiche al protocollo descritto da Yamamoto e Harayama (1996) (vedi appendice) e con entrambi i DNA è stato ottenuto un prodotto di amplificazione della taglia attesa. Dopo purificazione il DNA degli ampliconi è stato digerito con l'enzima di restrizione *PvuII* e la presenza del sito di restrizione è stata verificata mediante elettroforesi su gel d'agarosio e colorazione con bromuro d'etidio. La Figura 31 mostra i risultati ottenuti dall'analisi di restrizione; la digestione con *PvuII* dell'amplicone ottenuto da *P. putida* genera due frammenti di ca. 250 bp e 750 bp, mentre nel caso di *P. aeruginosa* si osserva un'unica banda corrispondente all'amplicone non digerito. L'analisi di sequenza dell'amplicone ottenuto da *P. aeruginosa* ha confermato

l'assenza del sito di restrizione *PvuII*. I risultati ottenuti confermano quanto ipotizzato sulla base delle informazioni ottenute dall'analisi in silico.

Figura 31. Profilo RFLP ottenuto dopo digestione *PvuII* del gene *gyrB*.



M, 1Kb DNA ladder; 1, *P. putida* KT2440; 2, *P. aeruginosa*.

In conclusione l'analisi PCR-RFLP può essere utilizzata per l'identificazione di *Pseudomonas* ma, se non viene combinata con l'impiego di sonde molecolari, è applicabile alla caratterizzazione solo di ceppi isolati. La metodica potrebbe essere ulteriormente affinata per sviluppare un protocollo di real-time PCR che preveda l'impiego di sonde di ibridazione specifiche per la regione che contiene il sito di taglio dell'enzima di restrizione *PvuII*

3.6 Ricerca di *Pseudomonas aeruginosa*

Abbiamo valutato la possibilità di utilizzare per l'identificazione di *Pseudomonas aeruginosa* un protocollo di PCR, basato sull'amplificazione del gene *gyrB*, utilizzando i primers specifici (*gyrPA398-gyrPA620*) descritti in letteratura (Qin et al., 2003). Tali primers sono stati disegnati considerando le regioni conservate presenti in 88 sequenze *gyrB* di *P. aeruginosa*.

Inizialmente la specificità dei primers è stata verificata su DNA estratto da colture pure di ceppi di *Pseudomonas*. Sono stati ottenuti prodotti di amplificazione della taglia attesa con DNA isolato da ceppi appartenenti alla specie *P. aeruginosa*, mentre sono stati ottenuti prodotti di amplificazione aspecifici con DNA estratto da ceppi appartenenti ad altre specie. Successivamente sono state condotte prove utilizzando, come stampo per l'amplificazione, DNA ambientale estratto dalla comunità microbica presente nella soluzione nutriente emendata con N-Serve precedentemente descritta. È stato ottenuto un prodotto di amplificazione della taglia attesa che è stato purificato e clonato nel vettore pGEM-Teasy (Promega, Italia). Dalla libreria così costruita sono stati scelti in maniera casuale 4 cloni che sono stati sequenziati su entrambi i filamenti. Le sequenze ottenute sono state confrontate mediante il programma BLAST per la ricerca di omologie con quelle disponibili nella banca di sequenze nucleotidiche Genbank. Tutti e 4 i cloni mostrano un'identità del 100% con sequenze *gyrB* di diversi ceppi di *P. aeruginosa*. Questi risultati ci hanno permesso di dimostrare la presenza di *P. aeruginosa* in questa popolazione. La ricerca di *Pseudomonas* all'interno della stessa popolazione mediante amplificazione del gene 16S rRNA con primers *Pseudomonas*-specifici combinata con l'analisi T-RFLP non aveva evidenziato la presenza di ceppi di *P. aeruginosa*. Questo risultato molto probabilmente è dovuto al fatto che *P. aeruginosa* rappresenta una forma minoritaria della popolazione presente nel campione esaminato. Quando si utilizzano per l'amplificazione primers per il 16S rRNA c'è competizione tra le sequenze di tutti i ceppi di *Pseudomonas* presenti, il che permette di amplificare preferenzialmente le sequenze maggiormente rappresentate e di non rilevare alcune sequenze minoritarie. Quando si utilizzano primers specie-specifici aventi come bersaglio un gene a singola copia, per esempio *gyrB*, non si ha competizione tra i DNA

delle varie specie, e quindi anche sequenze poco rappresentate possono essere rilevate, per esempio *P. aeruginosa* nel nostro caso specifico.

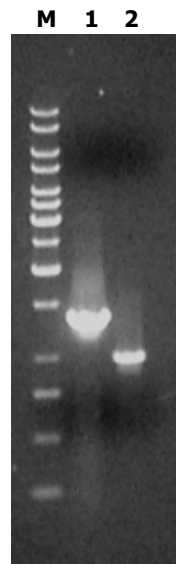
La coppia di primers gyrPA398-gyrPA620 ha inoltre il vantaggio di fornire un prodotto di amplificazione di dimensioni tali (222 bp) da poter essere analizzato in protocolli di real-time PCR utilizzabili per il rilevamento rapido e la quantificazione di *P. aeruginosa* in campioni ambientali e alimentari. Possiamo pertanto concludere che se si vuole rilevare la presenza di *P. aeruginosa* in campioni dove il microrganismo potrebbe non essere molto abbondante o se si vuole escludere con maggior certezza contaminazioni da questo microrganismo è preferibile utilizzare primers aventi come bersaglio il gene *gyrB* piuttosto che il 16S rDNA.

3.7 Estrazione di DNA da matrici alimentari

Contemporaneamente sono stati condotti esperimenti preliminari di PCR su DNA estratto da una matrice alimentare liquida contaminata artificialmente con *P. putida* KT2440, un ceppo ben caratterizzato sia a livello fisiologico che molecolare. Come matrice alimentare è stato scelto il latte in quanto i *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. putrefaciens*, meno frequentemente *P. aeruginosa*) (Gilmour and Rowe, 1990) sono le forme microbiche maggiormente coinvolte nello spoilage del latte pastorizzato processato a 4°C (Sørhaug and Stepaniak, 1997; Mc Phee and Griffiths, 2002; Munsch-Alatossava and Alatossava, 2006). Oltre a moltiplicarsi rapidamente nel latte refrigerato *Pseudomonas* produce enzimi extracellulari altamente stabili al calore come lipasi, proteasi e fosfolipasi. Alcuni di questi enzimi resistono alla pastorizzazione e ai trattamenti UHT. Le lipasi, idrolizzano i trigliceridi con conseguente formazione del sapore rancido del latte. Alcune importanti lipasi sono le lecitinasi che degradano le membrane dei globuli di grasso del latte aumentando la suscettibilità dei grassi all'azione delle lipasi. Le proteasi sono invece associate con la digestione della caseina che determina un sapore sgradevole del latte.

Sono stati eseguiti esperimenti di contaminazione controllata utilizzando latte intero pastorizzato inoculato con cellule di *P. putida* KT2440 sotto diverse condizioni sperimentali. Dai campioni di latte è stato estratto il DNA totale che è stato utilizzato come stampo in reazioni di amplificazione utilizzando sia primers *Pseudomonas*-specifici (P94F-P1104R) che primers universali per Eubatteri (63F-1389R). In entrambi i casi è stato ottenuto un prodotto di amplificazione della taglia attesa anche se con limiti di rilevamento differenti (Figura 32). Questo risultato può essere imputato sia ad una diversa sensibilità delle due coppie di primers sia al fatto che con primers universali può essere rilevato il DNA di tutti i microrganismi presenti nel campione.

Figura 32. Profilo elettroforetico dei prodotti di PCR ottenuti da DNA batterico estratto da campioni di latte.



Le amplificazioni sono state condotte utilizzando primers universali per Eubatteri (**linea 1**) e primers *Pseudomonas*-specifici (**linea 2**). M, 1Kb DNA Ladder.

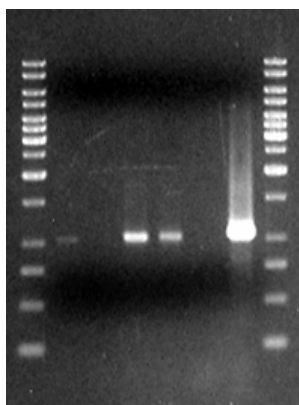
Per massimizzare la sensibilità di rilevamento per PCR della contaminazione da *Pseudomonas* si è, innanzitutto, reso necessario ottimizzare il protocollo di estrazione del DNA. Generalmente il latte è una matrice difficile dalla quale estrarre DNA in quanto è costituita da una quantità significativa di sostanze che possono inibire la reazione di amplificazione (Wilson,1997). Questi componenti devono essere necessariamente rimossi durante la procedura di isolamento per minimizzare la loro influenza sulla successiva reazione di amplificazione. A tale scopo sono stati testati tre differenti kits commerciali (Tabella 13): un kit Prepman Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA) per l'estrazione del DNA di batteri gram-positivi e gram-negativi da matrici alimentari e due kit DNeasy Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA) e Genomic DNA Purification kit (Fermentas, Lithuania) per l'estrazione di DNA da colture batteriche, colture cellulari, sangue e vari tessuti.

Tabella 13. Kits commerciali utilizzati per l'estrazione di DNA da latte.

Kit	Metodo	Facilità di utilizzo
Prepman Ultra	Soluzioni della casa	Molto semplice, minima manipolazione del campione
DNeasy Tissue kit	Membrane di gel di silice	Considerevole consumo di tempo
DNA Purification kit	Estrazione con cloroformio e precipitazione con etanolo.	Semplice, non richiede l'utilizzo di fenolo.

I templati di DNA genomico totale sono stati preparati da campioni di latte (10 ml) contaminati deliberatamente con 7×10^5 cellule/ml di *P. putida* KT2440. Il numero di cellule di *Pseudomonas* è stato determinato mediante conta diretta al microscopio. Tutti i campioni sono stati processati nella stessa maniera raccogliendo le cellule per centrifugazione e lisando le cellule come proposto nei differenti protocolli. I metodi di estrazione sono stati comparati sulla base dell'amplificabilità del DNA estratto. A scopo di controllo, campioni di latte non inoculato sono stati sottoposti a tutte le procedure di estrazione del DNA e a PCR. Su tutti i campioni non inoculati non è stata osservata formazione di prodotti di amplificazione. Utilizzando come stampo DNA estratto dai campioni contaminati, i prodotti di amplificazione più abbondanti sono stati ottenuti con il DNeasy Tissue kit, nessun prodotto di amplificazione è stato ottenuto con il DNA Purification kit (Figura 33). Concludendo, il kit della Qiagen, sebbene preveda una procedura di estrazione più laboriosa, permette di isolare DNA a partire da latte in quantità superiore e con un grado di purezza più idoneo per l'impiego in reazioni di PCR.

Figura 33. Profilo elettroforetico dei prodotti di amplificazione ottenuti con la coppia di primers P94F-P1104R utilizzando DNA estratto con kit PrepMan Ultra (linea 2, 30 rnx; linea 5, 35 rnx), Genomic DNA Purification Kit (linea 3, 30 rnx; linea 6, 35 rnx), DNeasy Tissue Kit (linea 4, 30 rnx; linea 7, 35 rnx), marker molecolari (linee 1 e 8).



4 CONCLUSIONI

4.1 Metodologie basate sulla PCR

È stato sviluppato un protocollo di PCR per l'identificazione rapida di microrganismi appartenenti al genere *Pseudomonas*. Per lo sviluppo di questo protocollo, che ha come bersaglio molecolare il gene per il 16S rRNA, sono state saggiate diverse coppie di primers:

- + primers *Pseudomonas*-specifici descritti in letteratura (311F-1263R, P346F-P457R)
- + combinazioni differenti di primers *Pseudomonas*-specifici e primers universali per eubatteri (311F-P457R, P346F-1263R, P346F-1389R)
- + nuovi primers disegnati (P94F-P1104R, P259F-P1104R) appositamente per questo scopo

Le prove sperimentali sono state condotte utilizzando come stampo sia DNA di colture pure che metagenoma ambientale.

I risultati ottenuti con metagenoma hanno mostrato che la coppia di primer 311F-1263R permette di amplificare sequenze di 16S rDNA sia di microrganismi appartenenti al genere *Pseudomonas* che di batteri non coltivabili ascrivibili alla divisione TM-7.

Le coppie di primer P346F-P457R e 311F-P457R permettono di amplificare solo sequenze di *Pseudomonas*, tuttavia l'inclusività di queste coppie di primer, valutata utilizzando il programma Mica3 si è dimostrata piuttosto bassa, inoltre i prodotti di amplificazione ottenuti non consentono un'attribuzione tassonomica certa fino a livello di specie, perché di dimensioni piuttosto ridotte (150 e 200 bp rispettivamente).

La coppia di primer P346F-1263R ha permesso di amplificare solo sequenze 16S rDNA di microrganismi ascrivibili ai generi *Dechlorosoma* e *Clostridium*.

Utilizzando la coppia di primer P346F-1389R sono stati ottenuti ampliconi che non corrispondono a sequenze di 16S rDNA di ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas*, ma a microrganismi ascrivibili al genere *Paracoccus*.

La coppia di primers P259F-P1104R amplifica oltre a sequenze di *Pseudomonas*, anche sequenze appartenenti alla famiglia delle Xanthomonadaceae, tuttavia mediante RFLP è possibile discriminare tra le due tipologie di sequenze.

Infine la coppia di primer P94F-P1104R ha permesso di amplificare sequenze solo da batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, inoltre ha mostrato una buona

inclusività e la taglia del prodotto di amplificazione è sufficientemente grande da consentire un'attribuzione tassonomica fino a livello di specie.

Possiamo pertanto concludere che la nuova coppia di primer disegnata (P94F-P1104R) consente l'identificazione di *Pseudomonas* in maniera più specifica rispetto a quelle precedentemente descritte in letteratura.

Il protocollo di PCR sviluppato può essere utilizzato per identificare e tracciare contaminazioni da *Pseudomonas* in alimenti, acqua e campioni industriali ed ambientali.

Inoltre senza ricorrere a passaggi di prearricchimento in terreno nutriente, il saggio di PCR permette di identificare la presenza di *Pseudomonas* in consorzi microbici nei quali questo microrganismo non è abbondante.

I nuovi primers possono essere utilizzati nello sviluppo di kit diagnostici.

4.2 Multiplex PCR

È stato sviluppato un protocollo di multiplex PCR dove l'identificazione di *Pseudomonas* è basata sull'amplificazione simultanea dei geni per:

- ✚ per il 16S rRNA

- ✚ la subunità beta della RNA polimerasi (*rpoB*)

La specificità del protocollo di multiplex PCR è stata valutata mediante test di inclusività ed esclusività condotti utilizzando come stampo DNA di ceppi di laboratorio.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che questo protocollo permette di aumentare la specificità del test di PCR e di discriminare i *Pseudomonas* da batteri appartenenti a generi strettamente correlati da un punto di vista tassonomico come ad esempio *Marinomonas*.

4.3 T-RFLP

Prove condotte su metagenoma ambientale di diversa provenienza (soluzioni nutrienti emendate con N-Serve e paglia esausta) hanno permesso di dimostrare che l'utilizzo del protocollo di PCR specifico per il DNA ribosomiale 16S di *Pseudomonas* in combinazione con la tecnica della T-RFLP permette:

- ✚ l'identificazione rapida di ceppi di *Pseudomonas* fluorescenti (digestione *HhaI* e *MspI* dell'amplicone P259F-P1104R)
- ✚ la differenziazione tra ceppi di *P. aeruginosa* e ceppi di *P. putida*/*P. fluorescens* (digestione *HhaI* e *MspI* degli ampliconi 63F-1389R e P94F-P1104R)
- ✚ la differenziazione tra ceppi di *P. putida* e ceppi di *P. fluorescens* (digestione *RsaI* degli ampliconi P94F-P1104R e P259F-P1104R).

Con questa metodica molecolare l'identificazione a livello di specie viene effettuata senza ricorrere a procedure di prearricchimento o all'isolamento e coltivazione in piastra dei ceppi presenti nelle matrici da esaminare.

4.4 Real-time PCR

Il DNA ribosomiale 16S è stato scelto come bersaglio molecolare per lo sviluppo di un protocollo di PCR real-time. Sono state disegnate due nuove coppie di primer (P94F-P649R, P259F-P649R) con le quali sono state effettuate prove di amplificazione sia su DNA di colture pure che su metagenoma ambientale per valutare specificità e sensibilità del test. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la coppia di primer P94F-P649R è la più idonea per condurre esperimenti di PCR real-time.

La linearità delle curve standard ottenute e l'osservazione che la PCR opera con un'efficienza costante ha permesso di concludere che il saggio proposto può essere utilizzato per effettuare misure quantitative dei livelli di contaminazione ambientale da *Pseudomonas*.

Il limite di rilevamento del saggio di PCR real-time è risultato essere di ca. 5×10^2 cellule/ml (ca. 2 cellule per PCR). Infine l'impiego della metodica ha permesso di aumentare la sensibilità e la rapidità del test diagnostico.

4.5 PCR-RFLP e identificazione di *P. aeruginosa*

Utilizzando come bersaglio molecolare il gene che codifica per la subunità B della DNA girasi (*gyrB*) è stato sviluppato un protocollo di PCR-RFLP che consente l'identificazione rapida di isolati di *Pseudomonas*.

È stata inoltre individuata all'interno della sequenza amplificata una regione, in corrispondenza del sito di restrizione *PvuII*, che può essere utilizzata per disegnare sonde molecolari specifiche da impiegare nello sviluppo di protocolli di PCR real-time. L'utilizzo delle sonde permetterebbe di utilizzare questa sequenza bersaglio per l'identificazione diretta di *Pseudomonas* da campioni di DNA ambientale e da ceppi isolati.

È stata inoltre valutata, su metagenoma ambientale, la specificità di una coppia di primers, disegnata sulla base delle sequenze del gene *gyrB* di *P. aeruginosa* (Qin et al. 2003).

I dati presentati indicano che l'impiego di questi primers può essere utile per identificare la presenza del suddetto patogeno in campioni ambientali fortemente contaminati da *Pseudomonas* fluorescenti appartenenti ad altre specie.

4.6 Estrazione di DNA da matrici alimentari

Per massimizzare la sensibilità dei test di PCR nel rilevamento di *Pseudomonas*, è stato inoltre ottimizzato un protocollo di estrazione di DNA a partire da latte contaminato. I risultati presentati indicano che la sensibilità del saggio di PCR è influenzata in modo significativo dalla procedura di estrazione del DNA che viene utilizzata; i risultati migliori si ottengono utilizzando il kit commerciale DNeasy Tissue kit della Qiagen.

5 BIBLIOGRAFIA

Aarts H.J., Joosten R.G., Henkens M.H., Stegeman H., and Van Hoek A.H. (2001). Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. J. Microbiol. Methods. **47**:209-217.

Abd El Galil K.H., El Sokkary M.A., Kheira S.M., Salazar A.M., Yates M.V., Chen W. and Mulchandani A. (2005). Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of Hepatitis A virus. Appl. Environ. Microbiol. **71**:7113-7116.

Abd El Galil K.H., El Sokkary M.A., Kheira S.M., Salazar A.M., Yates M.V., Chen W. and Mulchandani A. (2004). A combined IMS-molecular beacon RT-PCR assay for detection of hepatitis A from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. **70**:4371-43-74.

Ait Tayed L.A., Ageron E., Grimont F. and Grimont P.A.D. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. Res. Microbiol. **156**:763-773.

Alatsi K., Oikonomou I., Lambiri M., Mandilara G., Vatopoulos A. and Kyriacou A. (2006). PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. FEMS Microbiol. Lett. **259**:201-207.

Alexandrino M., Grohmann E. and Szewzyk U. (2004). Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yesinia enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples. Water Res. **38**:1340-1346.

Ali K., Zeynab A., Zhara S., Akbar K. and Saeid M. (2006). Development of an ultra rapid and simple multiplex polymerase chain reaction technique for detection of *Salmonella tiphy*. Saudi Med. J. **27**:1134-1138.

Allerberger F., Rossboth D., Dierich M.P., Aleksic S., Schmidt H. and Karch H. (1996). Prevalence and clinical manifestations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Austrian children. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **15**:545-550.

Al Soud W.A. and Rådström P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J. Clin. Microbiol. **39**:485-493.

Al Soud W.A. and Rådström P. (2000). Effect of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J. Clin. Microbiol. **38**:4463-4470.

Altekruse S.F., Cohen M.I. and Swerdlow D.L. (1997). Emerging foodborne diseases. Emerg. Infect. Dis. **3**:285-293.

Amann R., Lemmer H. and Wagner M. (1998). Monitoring the community structure of wastewater treatment: a comparison of old and new techniques. FEMS Microbiol. Ecol. **25**:205-215.

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

Amigliani G., Brandi G., Omiccioli E., Casiere A., Bruce I.J. and Magnani M. (2004). Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. Food Microbiol. **21**:597-603.

Amman R., Lemmer H. and Wagner M. (1998). Monitoring the community structure of wastewater treatment: a comparison of old and new techniques. FEMS Microbiol. Ecol. **25**:205-215.

Aridgides L.J., Doblin M.A., Berke T., Dobbs F.C., Matson D.O. and Drake L.A. (2004). Multiplex PCR allows simultaneous detection of pathogens in ships' ballast water. Mar. Pollut. Bull. **48**:1096-1101.

Atabay H.I., Wainø M. and Madsen M. (2006). Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *Int. J. Food Microbiol.* **19**:139-145.

Atmanr R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Le Guyader F., Woodley C.M., Metcalf T.G. and Estes M.K. (1995). Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3014-3018.

Avaniss-Aghajani E., Jones K., Chapman D. and Brunk C. (1994). A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques* **17**:144-149.

Avrahami S., Liesack W. and Conrad R. (2003). Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ. Microbiol.* **5**:691-705.

Baker J.O., Fulthorpe R.R. and Gilbride K.A. (2003). An assessment of variability of pulp mill wastewater treatment system bacterial communities using molecular methods. *Water Qual. Res. J. Can.* **38**:227-242.

Ballagi-Pordány A. and Belák S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes.* **10**:159-164.

Ballinger S.J., Head I.M., Curtis T.P. and Godley A.R. (1998). Molecular microbial ecology of nitrification in an activated sludge process treating refinery wastewater. *Water Sci. Technol.* **37** (4-5):105-108.

Bano N. and Hollibaugh J.T. (2002). Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:505-518.

Bell B.P., Goldoft M., Griffin P.M., Davis M.A., Gordon D.C., Tarr P.I., Bartleson C.A., Lewis J.H., Barrett T.J. and Wells J.G. (1994). A multistade outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. J. Am. Med. Assoc. **272**:1349-1353.

Berg T., Tesoriero L. and Hailstones D.L. (2006). A multiplex real-time PCR for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. Lett. Appl. Microbiol. **42**:624-630.

Bernhard A.E. and Field K.G. (2000a). A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in Bacteroides-Prevotella genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4571-4574.

Bertin L., Colao M.C., Ruzzi M., Marchetti L. and Fava F. (2006). Performances and microbial features of an aerobic packed-bed biofilm reactor developed to post-treat effluents of an olive mill wastewater-anaerobic digester. Microb. Cell. Fact. **5**(16)

Bertin L., Colao M.C., Ruzzi M. and Fava F. (2004). Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. FEMS Microbiol. Ecol. **48**:413-423.

Beuret C. (2004). Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. J. Virol. Methods. **115**:1-8.

Birnboim H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Meth. Enzymol. **100**:243-247.

Blais, B.W., Turner, G., Sookanan, R., and Malek, L.T. (1997). A nucleic acid sequence-based amplification system for detection of *Listeria monocytogenes* *hlyA* sequences. Appl. Environ. Microbiol. **63**:310-313.

Bodilis J., Hedde M., Orange N. and Barray S. (2006). *oprF* polymorphism as a marker of ecological niche in *Pseudomonas*. Environ. Microbiol. **8**:1544-1551.

Borin S., Marzorati M., Brusetti L., Zilli M., Cherif H., Hassen A., Converti A., Sorlini C. and Daffonchio D. (2006). Microbial succession in a compost-packed biofilter treating benzene-contaminated air. Biodegradation **17**:181-191.

Brosch R., Lefevre M., Grimont F. and Grimont P.A.D. (1996). Taxonomic diversity of pseudomonads revealed by computer-interpretation of ribotyping data. Syst. Appl. Microbiol. **19**:541-555.

Brown M.V., Schwalbach M.S., Hewson I. and Fuhrman J.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. Environ. Microbiol. **7**:466-1479.

Bruce I.J., Davies M.J., Howard K., Smethurst D.E., and Todd M. (1996). Magnetizable solid-phase supports for purification of nucleic acids. J. Pharm. Pharmacol. **48**:147-149.

Burton J.P., Cadieux P.A. and Reid G. (2003). Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. Appl. Environ. Microbiol. **69**:97-101.

Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. **25**:169-193.

Chen S., Tang Q., Zhang X., Zhao G., Hu X., Liao X., Chen F., Wu J. and Xiang H. (2006). Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. Food Microbiol. **23**:439-445.

Chen S., Yee A., Griffiths M., Larkin C., Yamashiro C.T., Behari R., Paszko-Kolva C., Rahn K. and De Grandis A. (1997). The evaluation of fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int. J. Food. Microbiol.* **35**:239-250.

Christensen J., Reynolds C.E., Shukla S. and Reed K.D. (2004). Rapid molecular diagnosis of *Lactobacillus* bacteremia by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Clin. Med. Res.* **2**:37-45.

Chung H., Jaykus L.-A. and Sobsey M.D. (1996). Detection of human enteric viruses in oysters by *in vivo* and *in vitro* amplification of nucleic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3772-3778.

Ciesielski S., Cydzik-Kwiatkowska A., Pokoj T. and Klimiuk E. (2006). Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *J. Appl. Microbiol.* **101**:190-199.

Clarke L., Moore J.E., Millar B.C., Garske L., Xu J., Heuzenroeder M.W., Crowe M. and Elborn J.S. (2003). Development of a diagnostic PCR assay that targets a heat-shock protein gene (*groES*) for detection of *Pseudomonas* spp. in cystic fibrosis patients. *J. Med. Microbiol.* **52**:759-763.

Clement B.G., Kehl L.E., DeBord K.L. and Kitts C.L. (1998). Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods.* **31**:135-142.

Cocolin L. and Comi G. (2005). Use a culture-independent molecular method to study the ecology of *Yersinia* spp. in food. *Int. J. Food Microbiol.* **105**:71-82.

Cohen H., Mechanda S.M. and Lin W. (1996). PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for the detection of *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4303-4308.

Connor C.J., Luo H., McSpadden Gardener B.B. and Wang H.H. (2005). Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products. *Int. J. Food Microbiol.* **99**:229-235.

Costa-Mattioli M., Monpoeho S., Nicand E., Aleman M.H., Billaudel S. and Ferré V. (2002). Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral. Hepat.* **9**:101-106.

Crump B.C., Kling G.W., Bahar M. and Hobbie J.E. (2003). Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2253-2268.

da Mota F.F., Gomes E.A., Paiva E. and Seldin L. (2005). Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**:317-328.

da Mota F.F., Gomes E.A., Paiva E., Rosado A.S. and Seldin L. (2004). Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**:34-40.

De Medici C., Croci L., Delibato E., Pasquale S., Filetici E. and Toti L. (2003). Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3456-3461.

De Vos D., Bouton C., Sarniguet A., De Vos P., Vauterin M. and Cornelis P. (1998). Sequence diversity of the *oprI* gene, coding for major outer membrane lipoprotein I, among rRNA group I pseudomonads. *J. Bacteriol.* **180**:6551-6556.

De Vos D., Lim A., Pirnay J.P., Struelens M., Vandenvelde C., Duinslaeger L., Vanderkelen A. and Cornelis P. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. J. Clin. Microbiol. **35**:1295-1299.

De Vos D., Lim Jr. A., De Vos P., Sarniguet A., Kesters K. And Cornelis P. (1992). Detection of the outer membrane lipoprotein I and its gene in fluorescent and non fluorescent pseudomonads: implications for taxonomy and diagnosis. J. Gen. Microbiol. **139**:2215-2223.

De Vos P., Van Landschoot A., Segers P., Tytgat R., Gillis M., Bauwens M., Rosseau R., Goor M., Pot B., Kersters K., Lizzaraga P. and De Ley J. (1989). Genotypic relationship and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid: ribosomal ribonucleic acid hybridizations. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**:35-49.

De Vos P., Goor M., Gillis M. and De Ley J. (1985). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. Int. J. Syst. Bacteriol. **35**:169-184.

De Vos P. and De Ley J. (1983). Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. Int. J. Syst. Bacteriol. **33**:487-509.

Donskey C.J., Hujer A.M., Das S.M., Pultz N.J., Bonomo R.A. and Rice L.B. (2003). Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. J. Microbiol. Methods. **54**:249-256.

Drysdale M., MacRae M., Strachan N.J.C., Reid T.M.S. and Odgen I.D. (2004). The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation. J. Appl. Microbiol. **97**:220-224.

D'Souza D.H. and Jaykus L.-A. (2003). Nucleic acid sequence based amplification for the rapid and sensitive detection of *Salmonella enterica* from foods. J. Appl. Microbiol. **95**:1343-1350.

Duponnois R. and Garbaye J. (1991). Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditons. Ann. Sci. For. **48**:239-251.

Edlund A., Soule T., Sjöling S. and Jansson J.K. (2006). Microbial community structure in polluted Baltic Sea sediments. Environ. Microbiol. **8**:223-232.

Egert M. and Friedrich W. (2003). Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 2555-2562.

Egygor A., Carli K.T. and Unal C.B. (2002). Implementation of real-time PCR to tetratonate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. Lett. Appl. Microbiol. **34**:37-41.

Ellingson J.L.E., Anderson J.L., Carlson S.A. and Sahrma V.K. (2004). Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. Mol. Cell. Probes. **18**:51-57.

Ercolini D., Hill P.J. and Dodd C.E.R. (2003a). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. Appl. Environ. Microbiol. **69**:3540-3548.

Fach P. and Popoff M.R. (1997). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples a duplex PCR and slide latex agglutination test. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4232-4236.

Farrelly V., Rainey F.A. and Stackebrandt E. (1995). Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl. Environ. Microbiol. **61**:2798-2801.

Fedi S., Tremaroli V., Scala D., Pérez-Jiménez J.R., Fava F., Young L. and Zannoni D. (2005). T-RFLP analysis of bacterial communities in cyclodextrin-amended bioreactors developed for biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Res. Microbiol.* **156**:201-210.

Felske A., Engelen B., Nubel U. and Backhaus H. (1996). Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4162-4167.

Fisher M.M., Klug J.L., Lauster G., Newton M. and Triplett E.W. (2000). Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton. *Microb. Ecol.* **40**:125-138.

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

Fontana C., Cocconcelli PS. and Vignolo G. (2006). Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-packaged beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5618-5622.

Foy C.A. and Parkes H.C. (2001). Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **47**:990-1000.

Furet J.-P., Quénee P. and Tailliez P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **97**:197-207.

Garcia-Lopez I., Otero A., Garcia-Lopez M.L. and Santos J.A. (2004). Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. *J. Appl. Microbiol.* **96**:878-886.

Gibson U.E.M., Heid C.A. and Williams P.M. (1996). A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**:995-1001.

Gilbride K.A., Cesnik A., Gawat J., Frigon D. and Fulthorpe R.R. (2006). Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community. *Water Res.* **40**:775-778.

Gilbride K.A. and Fulthorpe R.R. (2004). A survey of the composition and diversity of bacterial populations in Kraft Pulp Mill Wastewater Secondary Treatment Systems. *Can. J. Microbiol.* **50**:633-644.

Gilgen M., Wegmüller B., Burkhalter P., Bühler H.-P., Müller U., Lüthy J. and Candrian U. (1995). Reverse transcription PCR to detect enteroviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1226-1231.

Gilmour A. and Rowe M.T. (1990). Micro-organism associated with milk. In: Robinson, R.K. (Eds), *The Microbiology of milk*, vol. 1, Dairy Microbiology, second ed. Elsevier Applied Science, London, 37-75.

Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L. and Field K.G. (1990). Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature* **344**:60-63.

Gonzalez A., Moreno Y., Gonzalez R., Hernandez J. and Ferrus M.A. (2006). Development of a simple and rapid method based on polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter* and *Arcobacter* species. *Curr. Microbiol.* **53**:416-421.

Gonzalez A.J., Landeras E. and Mendoza M.C. (2000). Pathovars of *Pseudomonas syringae* causing bacterial brown spot and halo blight in *Phaseolus vulgaris* L. are distinguishable by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:850-854.

Gonzalez J.M., Simó R., Massana R., Covert J.S., Casamayor E.O., Pedrós-Alió C. and Moran M.A. (2000). Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4237-4246.

Graham L.E., Graham J.M., Lauster G., Kent A.D., Yannarell A.C. and Armstrong D.E. (2001). Community dynamics of phytoplankton, protoplankton and bacterioplankton in selected Wisconsin lakes. J. Phycol. **37**:20.

Gray N.D., Miskin L.P., Kornilova O., Curtis T.P. and Head L. M. (2002). Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. Environ. Microbiol. **4**:158-168.

Greene, S.R., Moe, C.L., Jaykus, L.A., Cronin, M., Grosso, L. and van Aarle, P. (2003). Evaluation of the NucliSens Basic Kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens. J. Virol. Methods. **108**:123-131.

Grimont P.A.D., Vancanneyt M., Lefevre M., Vandemeulebroecke K., Vauterin L., Brosch R., Kersters K. and Grimont F. (1996). Ability of Biolog and Biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the pseudomonads. Syst. Appl. Microbiol. **19**:510-527.

Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., Barriger K.J., Richman D.D. and Gingeras T.R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modelled after retroviral replication. Proc. Nat. Ac. Sci. USA. **87**:1874-1878.

Guatelli J.C., Gingeras T.R. and Richman D.D. (1989). Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. Clin. Microbiol. Rev. **2**:217-226.

Gubala A.J. (2006). Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. J. Microbiol. Methods. **65**:278-293.

Gubala A.J. and Proll D.F. (2006). Molecular-beacon multiplex real-time PCR for detection of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. **72**:6424-6428.

Gurtler V., Garrie H.D. and Mayall B.C. (2002). Denaturing gradient gel electrophoretic multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates. Electrophoresis **23**:3310-3320.

Hartmann M. and Widmer F. (2006). Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. Appl. Environ. Microbiol. **72**:7804-7812.

Hay J., Seal D.V., Billcliffe B. and Freer J.H.. (1995). Non-culturable *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii*: detection of the bacterium using DNA amplification and hybridization. J. Appl. Bacteriol. **78**:61-65.

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

Hinton A. Jr. Cason J.A. and Ingram K.D. (2004). Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. Int. J. Food Microbiol. **91**:155-165.

Hiraishi A., Iwasaki M. and Shinshi H. (2000). Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge. J. Biosci. Bioeng. **90**:148-256.

Hjort K., Lembke A., Speksnijder A., Smalla K. and Jansson J.K. (2006). Community structure of actively growing bacterial populations in plant pathogen suppressive soil. Microb. Ecol. In stampa

Hoehne M. and Schreier E. (2006). Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. BMC Infect Dis. **6**:69.

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. And Gelfand D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3'exonuclease activity of *Termus aquaticus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**:7276-7280.

Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M. and Fach P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification control for diagnostic PCR assays. J. Clin. Microbiol. 42:1863-1868.

Horz H.-P., Barbrook A., Field C.B. and Bohannan B.J.M. (2004). Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. PNAS. **101**:15136-15141.

Hoshino T., Terahara T., Tsuneda S., Hirata A. and Inamori Y. (2005). Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. J. Appl. Microbiol. **99**:1165-1175.

Hsu C.F., Tsai T.Y. and Pan T.M. (2005). Use of the duplex TaqMan PCR system for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157. J. Clin. Microbiol. **43**:2668-2673.

Hugenholtz P., Tyson G.W., Webb R.I., Wagner A.M. and Blackall L.L. (2001). Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the dominia *Bacteria* with no known pure-culture representatives. Appl. Environ. Microbiol. **67**:411-419.

Jackson C.J., Fox A.J. and Jones D.M. (1996). A novel polymerase chain reaction assay for the detection and speciation of thermophilic *Campylobacter* spp. J. Appl. Bacteriol. **81**:467-473.

Jean J., D'Souza D.H. and Jaykus L.A. (2004). Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods. Appl. Environ. Microbiol. **70**:6603-6610.

Jean, J., Blais, B., Darveau, A. and Fliss, I. (2002). Simultaneous detection and identification of hepatitis A virus and rotavirus by multiplex nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and microtiter plate hybridization system. *J. Virol. Meth.* **105**:123-132.

Jensen M.A., Webster J.A. and Straus N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:945-952.

Jothikumar N., Lowther J., Henshilwood K., Lees D.N., Hill V.R. and Vinjé J. (2005). Rapid and sensitive detection of Noroviruses by using Taqman-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally conataminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1870-1875.

Kaiser K., Rabodonirina M. and Picot S. (2001). Real-time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii hominis*. *J. Microbiol. Methods.* **45**:113-118.

Khamis A., Raoult D. and La Scola B. (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3925-3931.

Kaplan C.W., Astaire J.C., Sanders M.E., Reddy B.S. and Kitts C.L. (2001). 16S rDNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in rat feces during ingestion of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1935-1939.

Kaucner C. and Stinear T. (1998). Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fibreglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1743-1749.

Kaufmann P., Pfefferkon A., Teuber M. and Meile L. (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. Appl. Environ Microbiol. **63**:1268-1273.

Keightley M.C., Sillekens P., Schippers W., Rinaldo C. George K.S. (2005). Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. J. Med. Virol. **77**:602-608.

Kent A.D. and Triplett E.W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. Annu. Rev. Microbiol. **56**:211-236.

Khamis A., Raoult D. and La Scola B. (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. J. Clin. Microbiol. **42**:3925-3931.

Kidd I.M., Clark D.A. and Emery V.C. (2000). A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpes-virus 7 load. J. Microbiol Meth. **87**:177-181.

Kim J., Demeke T., Clear R.M. and Patrick S.K. (2006). Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in artificially inoculated wheat grain. Int. J. Food Microbiol. **111**:21-5.

Kimata N., Nishino T., Suzuki S. and Kogure K. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microb. Ecol. **47**:41-47.

Kitchin P.A. and Bootmann J.S. (1993). Quality control of the polymerase chain reaction. Med. Virol. **3**:107-114.

Klein D., Leutenegger C.M., Bahula C., Gold P., Hofmann-Lehamann R., Salmons B., Lutz H. and Gunzburg W.H. (2001). Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **26**:8-20.

Klein P.G. and Juneja V.K. (1997). Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4441-4448.

Kloepper J.W., Schroth M.N. and Miller T.D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting Rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology.* **70**:1078-1082.

Knutsson R., Blitx Y., Grage H., Borch E. and Rådström P. (2002). Evaluation of selective enrichment PCR procedures for *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.* **73**:35-46.

Knutsson R., Löfström C., Grage H., Hoorfar J. and Rådström P. (2002). Modeling of 5' nuclease PCR for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:50-62.

Knutsson R., Fontanesi M., Grage H. and Rådström P. (2001). Development of a PCR-compatible enrichment medium for *Yersinia enterocolitica*: amplification precision and dynamic detection during cultivation. *Int. J. Food Microbiol.* **73**:35-46.

Kolbert C.P. and Persing D.H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:399-305.

Kong R.Y.C., Lee S.K.Y., Law T.W.F., Law S.H.W. and Wu R.S.S. (2002). Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res.* **36**:2802-2812.

Korczak B., Christensen H., Emler S., Frey J. and Kuhnert P. (2004). Phylogeny of the family Pasteurellaceae based on *rpoB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1393-1399.

Kositant U., Rugsasuk S., Leelaporn A., Phulsuksombati D., Tantitanavat S. and Naigowit P. (2007). Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57**:117-22.

Kou X., Wu Q., Zhang J. and Fan H. (2006). Rapid detection of noroviruses in fecal samples and shellfish by nucleic acid sequence-based amplification. *J. Microbiol.* **44**:403-408.

LaGier M.J., Joseph L.A., Passaretti T.V., Musser K.A., Cirino N.M. (2004). A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell. Probes.* **18**:275-282.

Landry M.L., Garner R. and Ferguson D. (2005). Real-time nucleic acid sequence-based amplification using molecular beacons for detection of Enterovirus RNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3136-3139.

Lantz P.-G., Matsson M., Wadström T. and Rådström P. (1997). Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Microbiol. Methods.* **28**:159-167.

La Scola B., Gundi V.A.K.B., Khamis A. and Raoult D. (2006). Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **44**:827-832.

Layer F., Ghebremedhin B., Moder K.A., Koning W. and Koning B. (2006). Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2824-2830.

Lee J.L. and Levin R.E. (2006). Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods.* **67**:437-445.

Leone G., van Schijndel H., van Gemen B., Kramer F.R. and Schoen C.D. (1998). Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res.* **26**:2150-2155.

Letocart M., Baranton G. and Perolat P. (1997). Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**:248-253.

Liming S.H. and Bhagwat A.A. (2004). Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* **95**:177-187.

Lin C.K. and Tsen H.Y. (1996). Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the detection of *Salmonella* in foods. *J. Appl. Microbiol.* **80**:659-666.

Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H. and Forney L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4516-4522.

Lloyd-Jones G., Laurie A.D. and Tizzard A.C. (2005). Quantification of the *Pseudomonas* population in New Zealand soils by fluorogenic PCR assay and culturing techniques. *J. Microbiol. Methods.* **60**:217-224.

Lødeng A.G., Ahlén C., Lysvand H., Mandal L.H. and Iversen O.J. (2006). Development and evaluation of a new PCR assay for detection of *Pseudomonas aeruginosa* D genotype. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:761-768.

Loens K., Beck T., Goossens H., Ursi D., Overdijk M., Sillekens P. and Ieven M. (2006). Development of conventional and real-time nucleic acid sequence-based amplification assays for detection of *Chlamydophila pneumoniae* in respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. **44**:1241-1244.

Loens K., Beck T., Goossens H., Ursi D., Overdijk M., Sillekens P. and Ieven M. (2006). Development of conventional and real-time NASBA for the detection of *Legionella* species in respiratory specimens. J. Microbiol. Methods. **67**:408-415.

Lonetto M., Gribskov M. and Gross C.A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. J. Bacteriol. **174**:3843-3849.

Lunge V.R., Miller B.J., Livak K.J. and Batt C.A. (2002). Factors affecting the performance of 5' nuclease PCR assays for *Listeria monocytogenes* detection. J. Microbiol. Methods. **51**:361-368.

Lynch M.J.B., Leon-Velarde C.G., McEwen S. and Odumeru J.A. (2004). Evaluation of an automated immunomagnetic separation method for the rapid detection of *Salmonella* species in poultry environmental samples. J. Microbiol. Methods. **58**:285-288.

Maeda Y., Shinohara H., Kiba A., Ohnishi K., Furuya N., Kawamura Y., Ezaki T., Vandamme P. and Tsushima S., Hikichi Y. (2006). Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia grumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**:1031-1038.

Mandel M. and Higa A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. **53**: 159.

Markoulatos P., Siafakas N. and Moncany M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J. Clin. Lab. Anal. **16**:47-51.

Marianelli C., Ciuchini F., Tarantino M., Pasquali P. and Adone R. (2006). Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. *Microbes Infect.* **8**:860-865.

Marsh, T. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous population of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 323-327.

Martinez I., Mateo E., Churrua E., Girbau C., Alonso R. and Fernandez-Astorga A. (2006). Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**:45-8.

Maslanka S.E., Zirnstein G., Sobel J. and Swaminathan B. (2001). Foodborne pathogen and toxin diagnostics: current methods and needs assessment from surveillance, outbreak response, and bioterrorism preparedness perspectives. *Firepower in the Lab: Automation in the Fight Against Infectious Diseases and Bioterrorism.* Joseph Henry Press: Washington, DC, 143-164.

Master C.I., Shallcross J.A. and Mackey B.M. (1994). Effects of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* **77**:73-79.

Mc Bain A.J., Bartolo R.G., Catrenich C.E., Charbonneau D., Ledder R.G. and Gilbert P. (2003). Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *J. Appl. Microbiol.* **94**:655-664.

Mc Phee J.D. and Griffiths M.W. (2002). Psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas* spp. In: Roginsky H., Fuquay J.W. and Fox P.F. (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* vol. 4. Academic Press, New York, pp. 2340-2351.

McKillip J.L., Jaykus L.A. and Drake M. (1999). Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *J. Food Prot.* **62**:839-844.

McMacken R., Silver L. and Georgopoulos C. (1987) DNA replication, p.578-580. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M.Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

McNamara A.M. (1998). Foodborne pathogens. J. Urban Health Bull. N.Y. Acad. Med. **75**:503-505.

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M. and Tauxe R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. **5**:607-625.

Meyer J.M., Geoffroy V.A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W. and Palleroni N.J. (2002). Siderophore typing, powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. **68**:2745-2753.

Moreno Y., Botella S., Alonso J.L. Ferrus M.A., Hernandez M. and Hernandez J. (2003). Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **69**:1181-1186.

Moss J.A., Nocker A., Lepo J.E. and Snyder R.A. (2006). Stability and change in estuarine biofilm bacteria community diversity. Appl. Environ. Microbiol. **72**:5679-5688.

Moyer C.L., Dobbs F.C. and Karl D.M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1555-1562.

Mukhopadhyay A. and Mukhopadhyay K.U. (2006). Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. J. Microbiol. Methods. **68**:193-200.

Munsch-Alatossava P. and Alatossava T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk-associated psychotrophic bacteria. Microbiol. Res. **161**:334-346.

Munsch P., Geoffroy V.A., Alatossava T. and Meyer J.-M. (2000). Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and “*Pseudomonas reactans*” isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4834-4841.

Muyzer G., Brinkoff T., Nubel U., Santegoeds C., Schafer H. and Waver C. (1997). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans A.D.L., Van Elsas J.D., Bruijn F.J. (Eds.), 1997. Molecular Microbial Ecology Manual. vol. 3.4.4. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp.1-27.

Muyzer G., De Waal E.C and Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electroforesis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59**:695-700.

Myers R.M., Maniatis T. and Lerman L.S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol. **155**:501-507.

Myers R.M., Fischer S.G., Lerman L.S. and Maniatis T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. **13**:3131-3145.

Nam H-M., Srinivasan V., Gillespie B.E., Murinda S. and Oliver S. (2005). Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. Int. J. Food Microbiol. **102**:161-171.

Neubauer C. and Hess M. (2006). Detection and identification of food-borne pathogens of the genera *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* by multiplex PCR in poultry and poultry products. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. **53**:376-381.

Ng L.-K., Bin Kingombe C.I., Yan W., Taylor D.E., Hiratsuka K., Malik N. and Garcia M.M. (1997). Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4558-4563.

Nicol G.W., Glover L.A. and Prosser J.I. (2003). The impact grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. Environ. Microbiol. **5**:152-162.

Nielsen E. N., Emgberg J., Fussing V., Petersen L., Brogren C.H. and On S.L. (2000). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. J. Clin. Microbiol. **38**:3800-3810.

Nitsche A., Steuer N., Schmidt C.A., Landt O., Ellerbrok H., Pauli G. and Siegert W. (2000). Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. J. Clin. Microbiol. **38**:2734-2737.

Nogva H.K., Dromtorp S.M. Nissen H. and Rudi K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5' nuclease. PCR BioTechniques. **810**:812-813.

Norris T.B., Wraith J.M., Castenholtz R.W. and McDermott T.R. (2000). Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. Appl. Environ. Microbiol. **68**:6300-6309.

Norton D.M. and Batt C.A. (1999). Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2122-2127.

Ochman H. and Wilson A.C. (1987). Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* **26**:74-86.

Oliveira T. C.R.M., Barbut S. and Griffiths M.W. (2005). Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **104**:105-111.

Olsen S.J., Bishop R., Brenner F. W., Roels T.H., Bean N., Tauxe R.V. and Slutsker L. (2001). The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *J. Infect. Dis.* **183**:753-761.

Oravcová K., Kacálková E., Krascenicsová K., Pangallo D., Brežná B., Siekel P. and Kuchta T. (2005). Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**:15-18.

Osborn A.M., Moore E.R.B., Timmis K.N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**: 39-50.

Palleroni N.J. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **64**:231-251.

Palleroni N.J. and Bradbury J.F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swing et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:606-609.

Palleroni N.J. (1992). Human- and animal-pathogenic pseudomonads. In: Balows, A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (Eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York, NY. 3086-3103.

Palleroni N.J. 1991 Present situation of the taxonomy of aerobic *Pseudomonas*. In: *Pseudomonas* Molecular Biology and Biotechnology (Galli E., Silver S. and Witholt B., Eds.), pp.105-115. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Palleroni N.J. (1986). Taxonomy of the pseudomonads, p. 3-25. In J.R. Sokatch (ed.), The bacteria (the biology of pseudomonads). Academic Press Inc., Orlando, Fla.

Palmer C.J., Bonilla G.F., Roll B., Paszko-Kolva C., Sangermano L.R. and Fujioka R.S. (1995). Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* PCR kit and direct antibody staining. Appl. Environ. Microbiol. **61**:407-412.

Park S.C., Shimamura I., Fukunaga M., Mori K.-I. and Nakai T. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. Appl. Environ. Microbiol. **66**:1416-1422.

Paul E.A. and Clark F.E. (1996). Soil microbiology and biochemistry, 2nd Eds. Academic Press, USA. 74-86.

Pellegrin V., Juretschko S., Wagner M. and Cottenceau G. (1999). Morphological and biochemical properties of a *Sphaerotilus* sp. isolated from paper mill slimes. Appl. Environ. Microbiol. **65**:156-162.

Peréz-Jiménez J.R. and Kerkhof L.J. (2005). Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). Appl. Environ. Microbiol. **71**:1004-1011.

Pester M., Friedrich M.W., Schink B. and Brune A. (2004). *pmoA*-based analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3138-3142.

Porteous L.A., Widmer F. and Seidler R.J. (2002). Multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis for high resolution distinction of *Pseudomonas* (sensu stricto) 16S rRNA genes. J. Microbiol. Methods. **51**:337-348.

Pujol M., Badosa E., Manceau C. and Montesinos E. (2006). Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and real-time PCR methods. Appl. Environ. Microbiol. **72**:2421-2427.

Purohit H.J., Raje, D.V. and Kapley, A. (2003). Identification of signature and primers specific to genus *Pseudomonas* using mismatched patterns of 16S rDNA sequences. BMC Bioinformatics **4**:19.

Qi Y., Patra G., Liang X., Williams L.E., Rose S., Redkar R.J. and DelVecchio V.G. (2001). Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. Appl. Environ. Microbiol. **67**:3720-3727.

Qin X., Emerson J., Stapp J., Abe P. and Burns J.L. (2003). Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. **41**:4312-4317.

Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. and Vaughan E.E. (2002). Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. **68**:1882-1892.

Ranjard L., Poly F., Lata J.-C., Mougél C., Thioulouse J. and Nazaret S. (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. Appl. Environ. Microbiol. **67**:4479-4487.

Renouf V., Claisse O. and Lonvaud-Funel A. (2006). *rpoB* gene: a target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real-time PCR. J. Microbiol. Methods. **67**:162-170.

Robert V.T. (2002). Emerging foodborne pathogens. Int. J. Food Microbiol. **78**:31-41.

Rodríguez-Lazáro D., D'Agostino M., Herrewegh A., Pla M., Cook N. and Ikononopoulos J. (2005). Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. Int. J. Food Microbiol. **101**:93-104.

Rodríguez-Lázaro D., Lloyd J., Herrewegh A., Ikononopoulos J., D'agostino M., Pla M. and Cook N. (2004). A molecular beacon-based real-time NASBA assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in water and milk. FEMS Microbiol. Lett. **273**:119-126.

Rogers G.B., Hart C.A., Mason J.R., Hughes M., Walshaw M.J. and Bruce K.D. (2003). Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients:16S ribosomal DNA (rDNA) length eterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment legth polymorphism profiling. J. Clin. Microbiol. **41**:3548-3558.

Rollins D.M. and Colwell R.R. (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. **52**:531-538

Rossen L., Nøskov P., Holmstrøm K. and Rasmussen O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solution. Int. J. Food Microbiol. **17**:37-45.

Rousselon N., Delgenès J.-P. and Godon J.-J. (2004). A new real-time PCR (Taqman® PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. J. Microbiol. Methods. **59**:15-22.

Rudi K., Moen B., Drømtorp S.M. and Holck A. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1018-1024.

Rudi K., Naterstad K., Drømtorp S.M. and Holo H. (2005). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**:301-306.

Rutjes S.A., van de Berg H.H.J.L., Lodder W.J. and de Roda Husman A.M. (2006). Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5349-5358.

Ruttler M.E., Yanzon C.S., Cuitino M.J., Renna N.F., Pizarro M.A. and Ortiz A.M. (2006). Evaluation of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biocell.* **30**:301-308.

Saker M.L., Welker M. and Vasconcelos V.M. (2006). Multiplex PCR for detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**:1136-1142.

Saikaly P.E., Stroot P.G. and Oerther D.B. (2005). Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5814-5822.

Sails A.D., Fox A.J., Bolton F.J., Wareing D.R.A. and Greenway L.A. (2003). A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1383-1390.

Saint-Onge A., Romeyer F., Lebel P., Masson L. and Brousseau R. (1992). Specificity of the *Pseudomonas* PAO-1 lipoprotein I gene as a probe and PCR target region within the *Pseudomonadaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:733-741.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (second ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.

Sánchez J.I., Rossetti L., Martínez B., Rodríguez A. and Giraffa G. (2006). Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. J. Microbiol. Methods. **65**:268-277.

Saunders G.C., Dukes J., Parkes H.C. and Cornett J.H. (2001). Inter-laboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. Clin. Chem. **47**:47-55.

Sayler G.S., Hooper S.W., Layton A.C. and King J.M.H. (1990). Catabolic plasmids of environmental and ecological significance. Microb. Ecol. **19**:1-20.

Scarpellini M., Franzetti L. and Galli A. (2004). Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. FEMS Microbiol. Lett. **236**:257-260.

Scholz H.C., Witte A., Tomaso H., Al Dahouk S. and Neubauer H. (2006). Detection of *Chromobacterium violaceum* by multiplex PCR targeting *prgI*, *spaO*, *invG*, and *sipB* genes. Syst. Appl. Microbiol. **29**:45-48.

Schwatz T., Volkmann H., Kirchen S., Kohnen W., Schön-Hölz K., Jansen B. and Obst U. (2006). Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. FEMS Microbiol. Ecol. **57**:158-167.

Segers P., Vancanneyt M., Pot B., Torck U., Hoste B., Dewettinck D., Falsen E., Kersters K. and De Vos P. (1994). Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:499-510.

Sekiguchi H., Watanabe M., Nakahara T., Xu B. and Uchiyama H. (2002). Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Appl. Environ. Microbiol. **68**:5142-5150.

Settanni L., Valmorri S., van Sinderen D., Suzzi G., Paparella A. and Corsetti A. (2006). Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. **72**:3793-3796.

Settanni L., van Sinderen D., Rossi J. and Corsetti A. (2005). Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough *Lactobacillus* species by multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. **71**:3049-3059.

Shangkuan Y.H., Show Y.S. and Wang T.M. (1995). Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. J. Appl. Bacteriol. **79**:264-273.

Sheffield V.C., Beck J.S., Stone E.M. and Myers R.M. (1989). Attachment of a 40 bp G+C rich esquence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**:232-236.

Shieh Y.-S.C., Baric R.S. and Sobsey M.D. (1997). Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4401-4407.

Simpkins, S.A., Chan, A.B., Hays, J., Popping, B. and Cook, N. (2000). An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*. Lett. Appl. Microbiol. **30**:75-79.

Simpson J.M., McCracken V.J., Gaskins H.R. and Mackie R.I. (2000). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4705-4714.

Slutsker L., Altekruze S.F. and Swerdlow D.L. (1998). Foodborne diseases: emerging pathogen and trends. Infect. Dis. Clin. N. Am. **12**:199-203.

Sørhaug T. and Stepaniak L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. Trends Food Sci. Technol. **8**:35-40.

Stamper D.M., Walch M. and Jacobs R.N. (2003). Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA gene fragments. Appl. Environ. Microbiol. **69**:852-860.

Stinear T., Matusan A., Hines K. and Sandery M. (1996). Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3385-3390.

Stratmann J., Dohmann K., Heinzmann J. and Gerlach G.-F. (2006). Peptide aMptD-mediate capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk milk samples. Appl. Environ. Microbiol. **72**:5150-5158.

Straub T.M., Pepper C.P. and Gerba C.P. (1995b). Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amende soil. Water Sci. Technol. **31**:311-316.

Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. Annu. Rev. Biochem. **47**:819-846.

Suzuki M.T. and Giovannoni S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62:625-630.

Suzuki M.T., Rappé M.S. and Giovannoni S.J. (1998). Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol. 64:4522-4529.

Szabo E.A. and Mackey B.M. (1999). Detection of *Salmonella enteritidis* by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). Int. J. Food Microbiol. 5:113-122.

Swaminathan B. and Feng P. (1994). Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 48:401-426.

Tamanai-Shacoori Z., Jolivet-Gougeon A. and Cormier M. (1996). Comparison of direct PCR and PCR amplification after DNA extraction for the detection of viable enterotoxigenic *Escherichia coli* in laboratory microcosms. J. Microbiol. Methods. 26:21-26.

Taylor J.L., Hurst C.D., Davies M.J., Sachsinger N., Bruce I.J. (2000). Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA. J. Chromatogr. A. 890:159-166.

Theelen B., Silvestri M., Gueho E., van Belkum A. and Boekhout T. (2001). Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphisms (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). FEMS Yeast Res. 1:79-86.

Thozolan J.L., Cappellet J.M., Tissier J.P., Delattre G. and Federighi M. (1999). Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Appl. Environ. Microbiol. 65:110-1116.

Tournas V.H. (2005). Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Crit. Rev. Microbiol.* **31**:33-44.

Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas G.J. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:65-72.

Tyagi S., Bratu D.P. and Kramer F.R. (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* **16**:49-53.

Tyagi S. and Kramer F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**:303-308.

Tyler S.D., Strathdee C.A., Rozee K.R. and Johnson W.M. (1995). Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**:448-453.

Uyttendaele M., Bastiaansen A. and Debevere J. (1997). Evaluation of the NASBA nucleic acid amplification system for assessment of the viability of *Campylobacter jejuni*. *Int. J. Food Microbiol.* **37**:13-20.

Uyttendaele M., Schukink R., van Gemen B. and Debevere J. (1995). Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a modified FDA method. *Int. J. Food Microbiol.* **27**:77-89.

van der Vliet GM., Hermans C.J. and Klatser P.R. (1993). Simple colorimetric microtiter plate hybridization assay for detection of amplified *Mycobacterium leprae* DNA. *J. Clin. Microbiol.* **31**:665-670.

van Gemen B., van Beuningen R., Nabbe A., van Strijp D., Jurriaans, S., Lens P. and Kievits T. (1994). A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. *J. Virol. Methods.* **49**:157-167.

Watt P.M. and Hickson I.D. (1994). Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J.* **303**: 681-695.

Way J.S., Josephson K.L., Pillai S.D., Abbaszadegan M., Gerba C.P. and Pepper I.L. (1993). Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1473-1479.

Widmer F., Seidler R.J., Gillevet P.M., Watrud L.S. and Di Giovanni G.D. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas (sensu stricto)* in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2545-2553.

Wilson I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3741-3751.

Wittwer C.T., Ririe K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A. and Balis U.J. (1997). The LightCycler™ : a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**:176-181.

Wittwer C.T., Fillmore G.C. and Garling D.J. (1990). Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal. Biochem.* **186**:328-331.

Woron A.M., Nazarian E.J., Egan C., McDonough K.A., Cirino N.M., Limberger R.J. and Musser K.A. (2006). Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of *Yersinia pestis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**:261-268.

Wu S.J., Chan A. and Kado C.K. (2004). Detection of PCR amplicons from bacterial pathogens using microsphere agglutination. *J. Microbiol. Methods.* **56**:395-400.

Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H. and Nishiuchi Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to the *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **39**:897-904.

Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T. and Arakawa M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **36**:1251-1275.

Yamamoto S., Kasai H., Arnold D.L., Jackson R.W., Vivian A. and Harayama S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of the *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146**:2385-2394.

Yamamoto S. and Harayama S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD*, and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:813-819.

Yamamoto S. and Harayama S. (1996). Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:506-511.

Yáñez M.A., Carrasco-Serrano C., Barberá V.M. and Catalán V. (2005). Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of *dotA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3433-3441.

Yannarel A.C. and Triplett E.W. (2005). Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:227-239.

Yoshie S., Makino H., Hirosawa H., Shirotani K., Tsuneda S and Hirata A. (2006). Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**:182-189.

Yu Z. and Mohn W.W. (2001). Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1565-1574.

Yun Y.J., Lee K.H., Haihua L., Ryu Y.J., Kim B.J., Lee Y.H., Baek G.H., Kim H.J., Chung M.S., Lee M.C., Lee S.H., Choi I.H., Cho T.J., Chang B.S. and Kook Y.H. (2005). Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in joint biopsy specimens by *rpoB* PCR cloning and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **43**:174-178.

Zhang X., Yan X., Gao P., Wang L., Zhou Z. and Zhao L. (2005). Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J. Microbiol. Methods.* **60**:1-11.

Zoetendal E.G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D. and de Vos W.M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3401-3407.

6 APPENDICE

Programmi PCR per l'amplificazione del 16S rDNA

Per l'amplificazione di sequenze dell'rDNA 16S sono stati utilizzati i seguenti programmi di PCR:

❖ Coppia di primer **311F-1263R**

Denaturazione iniziale	3'	94°C	30 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	30''	62°C	
Estensione	1'	68°C	
Estensione finale	7'	68°C	

❖ Coppia di primer **P346F-P457R**

Denaturazione iniziale	5'	95°C	35 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	15''	62°C	
Estensione	30''	72°C	
Estensione finale	7'	72°C	

❖ Coppie di primer **P346F-1263R e 311F-P457R**

Denaturazione iniziale	5'	95°C	35 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	30''	62°C	
Estensione	1'	72°C	
Estensione finale	7'	72°C	

❖ Coppia di primer **P346F-1389R**

Denaturazione iniziale	3'	94°C	45 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	30''	60°C	
Estensione	1'	68°C	
Estensione finale	7'	68°C	

❖ Coppia di primer **P94F-P457R**

Denaturazione iniziale	3'	94°C	35 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	30''	63°C	
Estensione	30''	68°C	
Estensione finale	7'	68°C	

❖ Coppie di primer **P94F-P1104R** e **P259F-P1104R**

Denaturazione iniziale	3'	94°C	35 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	30''	63°C	
Estensione	1'	68°C	
Estensione finale	7'	68°C	

Programma multiplex PCR

In una multiplex PCR vengono amplificati contemporaneamente bersagli molecolari differenti. Nel nostro caso il gene 16S rRNA (primers **P94F-P1104R**) ed il gene *rpoB* (primers **LAPS-LAPS27**). Per l'amplificazione è stato utilizzato il seguente programma:

Denaturazione iniziale	3'	94°C	25 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	30''	64°C	
Estensione	1'	72°C	
Estensione finale	7'	72°C	

Programmi PCR per l'amplificazione del gene *gyrB*

Per l'amplificazione di sequenze del gene *gyrB* sono stati utilizzati i seguenti programmi di PCR:

❖ Coppia di primer **UP1E-APrU**

Denaturazione iniziale	3'	94°C	35 cicli
Denaturazione	1'	94°C	
Annealing	30''	58°C	
Estensione	2'	72°C	
Estensione finale	7'	72°C	

❖ Coppia di primer **gyrPA398-gyrPA620**

Denaturazione iniziale	3'	94°C	35 cicli
Denaturazione	30''	94°C	
Annealing	30''	63°C	
Estensione	1'	68°C	
Estensione finale	7'	68°C	