

C5. METODI MOLECOLARI NELLA IDENTIFICAZIONE DI CIANOBATTERI TOSSICI

Susanna Vichi (a)*, Domenico D'Alelio (b)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Laboratorio di Ecologia ed Evoluzione del Plankton, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli

*susanna.vichi@iss.it

C5.1. Introduzione

La maggior parte dei piani di monitoraggio è basata sulla determinazione della densità cellulare attraverso l'osservazione delle cellule al microscopio, ma questa procedura non permette di discriminare fra individui in grado di produrre cianotossine da quelli non tossici: questi ultimi, infatti, normalmente coesistono all'interno di una comunità planctonica senza presentare alcuna differenza visibile nella morfologia (Sivonen & Jones, 1999).

La conoscenza delle caratteristiche genetiche e dei meccanismi molecolari alla base della biosintesi delle tossine da parte di vari gruppi di cianobatteri ha permesso lo sviluppo di metodologie qualitative e quantitative di biologia molecolare a elevata specificità e versatilità. Le tecniche molecolari sono di rapida esecuzione ed estremamente sensibili, per cui si rivelano particolarmente utili negli studi di monitoraggio ambientale, specialmente quando la concentrazione del microrganismo non sia sufficientemente elevata da poter essere rilevata con i metodi tradizionali.

L'applicazione di tali metodologie ha pertanto trovato largo utilizzo nella ricerca di strategie volte al controllo del fenomeno, per una migliore gestione della qualità delle acque di balneazione e più generalmente destinate al consumo umano. Le metodologie molecolari sono rapide, offrono elevata specificità, consentono il diretto utilizzo del campione ambientale e sono estremamente sensibili, per cui si rivelano particolarmente utili negli studi di monitoraggio ambientale, soprattutto nei casi in cui la concentrazione del microrganismo target all'interno di un campione eterogeneo non sia sufficiente da poter essere rilevata con metodi classici (Vichi *et al.*, 2008). L'uso di queste tecniche permette di verificare la presenza di cianobatteri diversi all'interno di una fioritura nella quale una specie sia predominante, di identificare e caratterizzare i cianobatteri da un punto di vista genetico, come pure di quantificare la presenza di individui tossici all'interno di una popolazione o di valutare l'espressione di alcuni geni, in dipendenza delle condizioni ambientali. Questi risultati si ottengono attraverso l'applicazione di metodiche di tipo qualitativo e/o quantitativo, che variano a seconda dell'obiettivo da raggiungere. In questo capitolo saranno descritte finalità e procedure relative ad alcune delle tecniche più utilizzate.

C5.2. Identificazione e caratterizzazione molecolare dei cianobatteri

I cianobatteri tossici, descritti finora in tre delle quattro categorie dell'inquadramento tassonomico tradizionale (*Chroococcales*, *Oscillatoriales* e *Nostocales*) sono caratterizzati da

una notevole diversità morfologica, fisiologica e genetica. L'identificazione morfologica dei cianobatteri è subordinata a diversi fattori – tra cui il livello di conoscenze tassonomiche dell'operatore, lo stato fisiologico del ceppo o di conservazione del campione vivo – ed è difficilmente catalogabile secondo criteri predefiniti, anche a condizioni ottimali, a causa del grado di variabilità fenotipica delle singole specie/generi. I metodi molecolari sono più facilmente “standardizzabili”, sebbene esistano dei fattori di incertezza anche relativamente al dato genetico, dipendenti dalla plasticità evolutiva tipica dei procarioti, oltre che da errori di PCR e sequenziamento o contaminazione del DNA in studio (questi ultimi fattori intrinseci alla qualità del dato sperimentale). Nell'identificazione tassonomica dei cianobatteri la caratterizzazione molecolare è perciò di particolare importanza. Il beneficio di un approccio morfo-molecolare è essenzialmente quello di avere un metodo standard (molecolare) che può prescindere da quello classico, ma che è complementare. D'altro canto, per loro natura, i cianobatteri sono assai eterogenei anche dal punto di vista genetico, probabilmente ancor più che sul piano fenotipico: ciò ha una inevitabile ricaduta sul processo di definizione di metodi standard per l'identificazione molecolare. A dispetto di una generale divergenza genetica tra generi (individuabile anche con un numero molto limitato di marcatori molecolari), esiste una notevole diversità intra-genere e, ad oggi, non esiste unanime consenso su quali e quanti marcatori molecolari siano necessari per pervenire ad una identificazione non ambigua. Il metodo utilizzato per l'identificazione molecolare va quindi calibrato sul bersaglio da identificare/rilevare, tenendo altresì conto del livello di diversità intrinseca al bersaglio stesso.

Inoltre, è anche importante tenere presente che fare una identificazione su un campione ambientale lasciato ‘crescere’ per tempi lunghi in laboratorio potrebbe non essere corretto; infatti non sempre l'attribuzione filogenetica osservata/stabilita *in vitro* è rappresentativa della specie in natura, in quanto la specie si differenzia nel tempo e nello spazio. Per lo sviluppo di metodi molecolari standard è perciò indispensabile isolare, purificare, portare in coltura e mantenere in condizioni di purezza ceppi-tipo, per il tempo necessario allo sviluppo dei metodi stessi. Alla base dello sviluppo di un approccio molecolare, esiste quindi un costo quantificabile in uno sforzo di tipo tradizionale basato su coltivazione, identificazione morfologica e caratterizzazione fenotipica, al quale si aggiungono i costi della strumentazione e dell'expertise genetica necessaria: ma, una volta disponibili in letteratura, i metodi utilizzabili per la caratterizzazione tassonomica di un cianobatterio presente in un campione ambientale possono essere facilmente riprodotti. Conseguentemente, le tecniche molecolari possono essere considerate rapide e relativamente economiche una volta che si disponga della strumentazione e dell'expertise necessario.

L'utilità dell'approccio combinato morfo-molecolare è in alcuni casi indispensabile nel riconoscimento e nella caratterizzazione dei cianobatteri tossici, se il morfotipo osservato al microscopio si discosta dallo “standard” normalmente riscontrato. A titolo di esempio, si riporta il recente caso (Yang Liu *et al.*, 2013) in cui alcuni filamenti di cellule cianobatteriche dallo sviluppo tridimensionale elicoidale erano stati inizialmente attribuiti al genere *Arthrospira* (noto anche come *Spirulina*), cianobatterio dalla elevata capacità di crescita in termini di biomassa, caratteristico per la struttura elicoidale delle sue colonie, totalmente innocuo sul piano sanitario e utilizzato a fini alimentari (Vichi *et al.*, 2013). La successiva analisi della porzione 16S dell'rRNA hanno invece rivelato che i ceppi erano associabili ad una morfospécie inedita - mai riportata in precedenza e quindi totalmente ignota-all'interno del genere tossico *Planktothrix* (Yang Liu *et al.*, 2013).

Tradizionalmente, il locus molecolare 16SrRNA (RNA ribosomale 16S) è un marcatore efficace per l'identificazione molecolare dei cianobatteri a livello di genere (vedi paragrafi C5.2.2 e C5.2.3), insieme all'analisi dei frammenti genici *cpcBA-IGS*, ovvero lo spaziatore

genico (IGS) tra le due sub-unità *cpcB* e *cpcA* del ficobilisomache è altamente variabile, e al gene *rpoCI*, che codifica per la subunità γ dell'enzima RNA- polimerasi.

C5.2.1. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Il campione, costituito da un volume d'acqua potenzialmente contaminata da cianobatteri tossici, può essere utilizzato tal quale, oppure concentrato mediante centrifugazione (*Microcystis* a 3000 g, *Planktothrix* a 10000 g) e recupero del pellet, o ancora filtrato e raccolto su filtri in polietersulfone idrofilo o microfibra di vetro. Nella scelta del filtro è necessario avere l'accortezza di controllare che il diametro dei pori sia tale da trattenere le cellule durante la filtrazione; per le forme coloniali, come *Microcystis* spp. ma anche per *Planktothrix* spp. è sufficiente un diametro pari a 0,2 μm . Il campione (sia come filtro che come pellet) può essere conservato a -20°C fino al momento del processamento (Manganelli *et al.*, 2010).

Per l'estrazione del DNA si può ricorrere al metodo standard fenolo-cloroformio (Franche & Damerval, 1988), che prevede una preliminare lisi per shock osmotico e successivo trattamento con proteinasi K, estrazione mediante soluzione fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e purificazione della fase acquosa con cloroformio-alcol isoamilico, precipitazione in etanolo, lavaggio e ri-sospensione del DNA. Accanto alle metodiche classiche di estrazione, è oggi ampiamente diffuso l'utilizzo di kit basati sulla tecnologia "DNeasy" per l'estrazione del DNA da batteri o organismi vegetali contenenti polimeri complessi come la cellulosa. Questi metodi commerciali, basati generalmente sul principio della cromatografia, o avvalendosi di biglie magnetiche, assicurano in tempi rapidi una resa soddisfacente eliminando l'inconveniente dell'utilizzo di fenolo e cloroformio. Si rimanda ai successivi paragrafi per ulteriori dettagli in merito a metodi di estrazione del DNA e alla loro influenza sulla stima quantitativa di cianobatteri tossici in campioni ambientali.

C5.2.2. Rilevamento a livello di genere

Il moderno sistema tassonomico dei cianobatteri è sempre più basato sulla definizione molecolare dei genotipi vale a dire raggruppamenti con un indice di similarità pari approssimativamente al 95% utilizzando il 16S rRNA quale marcatore standard, i quali corrispondono grosso modo alla categoria classica "genere". Recentemente, la maggior parte dei generi di cianobatteri "tradizionali" e quelli di nuova istituzione (sulla base di caratteri morfologici selezionati alla luce di revisioni morfologiche ed ecologiche) sono stati "confermati" da metodi molecolari. Tra questi, alcuni taxa coinvolti nella produzioni di tossine come *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Planktothrix*; la posizione filogenetica di altri generi comprendenti forme tossiche, come *Aphanizomenon* e *Anabaena*, è risultata meno definita (Rajaniemi *et al.*, 2005).

Per l'identificazione a livello di genere, sono state sviluppate diverse tecniche basate su PCR³ mirate a ridurre al minimo il numero di *step* analitici, pervenendo comunque ad un accurato livello di identificazione, evitando laboriosi procedimenti di sequenziamento e di analisi di sequenze di DNA.

³ La tecnica classica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) attraverso l'utilizzo di corte sequenze oligonucleotidiche complementari a una porzione della sequenza del gene di interesse, permette l'amplificazione esponenziale del frammento genico oggetto di studio.

² La tecnica RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) è basata sulla digestione con endonucleasi dei prodotti di PCR. Il trattamento con endonucleasi di restrizione genera un profilo di restrizione caratteristico e spesso diagnostico di una specie (Neilan *et al.*, 2002).

Una volta isolato, il DNA dal campione da analizzare si sottopone ad amplificazione mediante l'uso di generici *primer* in grado di rilevare DNA cianobatterico; poiché il prodotto di amplificazione non è sufficiente a discriminare tra i diversi generi, si usa la tecnica nota come *restriction fragment length polymorphism* (RFLP)², basata sui loci 16S rRNA e ITS (*Internal Transcribed Spacer*) rRNA. La RFLP su sequenze ITS è stata largamente applicata per l'identificazione di generi di cianobatteri potenzialmente tossici, in quanto la natura stessa di queste regioni ad alta variabilità li rende buoni marcatori negli studi di tassonomia per distinguere ceppi più vicini evolutivamente e quindi con elevati livelli di omologia.

Un esempio è la tecnica di identificazione attraverso ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*), che prevede lo spezzettamento preliminare in diverse sotto-porzioni della molecola di DNA amplificato (ottenuto utilizzando *primer* di PCR universali per cianobatteri) attraverso l'utilizzo di enzimi di restrizione sito-specifici (in particolare gli enzimi *AvaII*, *BanII* e *TaqI*). I frammenti ottenuti sono poi sottoposti a gel-elettroforesi: in base alle diverse dimensioni, migrano con diversa velocità nel campo elettrico generato. Il numero e la dimensione dei segmenti di DNA prodotti consentono di identificare ceppi appartenenti a generi notoriamente tossici come *Phormidium*, *Aphanizomenon*, *Limnothrix*, *Planktothrix*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*.

La procedura per identificazione molecolare con RFLP (16S-ARDRA) è di seguito descritta (Valério *et al.*, 2009):

1. Preparazione della miscela di PCR

Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 50 µL contenente DNA genomico (10-15 ng), PCR buffer (1x), ciascuno dei quattro dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates* 0,5 mM), di ciascuno dei due primer (0,25 mM, CYAN106F e CYAN1281R), MgCl₂ (2 mM), BSA (0,5 mgml⁻¹) e *Taq DNA polymerase* (1 unità). Sequenze dei primer: *forward* CYAN106F, CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA (direzione 5'-3'), e *reverse* CYAN1281R, GCAATTACTAGCGATTCCTCC (5'-3').

2. Amplificazione DNA

Si applica il protocollo seguente: 10 minuti di denaturazione iniziale a 95°C, seguita da 35 cicli di denaturazione del DNA-innesco della polimerasi-allungamento della catena, rispettivamente a 94°C per 45 s, 55°C per 45 s e 72°C per 1 min. L'amplificazione viene infine completata con un step finale di 5 min a 72°C per consentire la completa estensione del prodotto.

3. Digestione prodotto di PCR

Circa 1 µg di prodotto di PCR (lunghezza 1260 bp), ottenuto come da *step* 1 e 2, viene digerito senza ulteriore purificazione con le endonucleasi di restrizione *AvaII* e *BanII* in reazioni separate secondo le istruzioni indicate dai produttori.

4. Visualizzazione dei prodotti di restrizione

I frammenti vengono separati su gel di agarosio 1,2% (peso/volume). Le diverse combinazioni nelle dimensioni dei prodotti di restrizione sono infine associate ai diversi taxacianobatterici, secondo lo schema in tabella 1.

Il metodo 16S-ARDRA sembra particolarmente efficace nel distinguere sul piano molecolare generi appartenenti a tre diversi raggruppamenti di cianobatteri tossici (Tabella C5.1), vista la differenza di grandezza in termini di paia di basi (o *base pairs*, bp). In particolare, i frammenti di restrizione prodotti dal *BanII* sul 16S di *Planktothrix* sono nettamente distinti da quelli prodotti dalla stessa endonucleasi per altri generi. Sebbene secondo Valerio *et al.* (2009) tale metodo consentirebbe di discriminare tra taxa anche a livello di specie, in particolare all'interno del genere *Planktothrix*; rimangono delle ambiguità, legate anche al limitato numero di ceppi utilizzati per lo sviluppo del protocollo analitico.

Tabella C5.1. Frammenti di 16S-ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) generati con le endonucleasi Ava II e Ban II

Genere	Frammenti 16S-ARDRA (bp)	
	Ava II	Ban II
Chroococcales		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1260	815; 445
<i>Synechococcus nidulans</i>	1260	715; 430; 115
Oscillatoriales		
<i>Limnothrix redekei</i>	630; 630	715; 445; 100
<i>Planktothrix agardhii</i>	1260	665; 420; 175
<i>Planktothrix pseudoagardhii</i>	1260	815; 320; 125
<i>Planktothrix rubescens</i>	1260	640; 490; 130
<i>Phormidium</i> spp.	900; 360	670; 420; 170
Nostocales		
<i>Anabaena flos-aquae</i>	1260	815; 445
<i>Anabaena planctonica</i>	810; 450	815; 445
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	810; 450	815; 445
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	1260	715; 445; 100
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	1100; 160	715; 430; 115

bp=base pairs

Un protocollo analogo a quello descritto sopra, è stato sviluppato dagli stessi autori prendendo come regione di riferimento l'ITS dell'RNA ribosomiale.

Il protocollo analitico dell'ITS-ARDRA è descritto di seguito (Valério *et al.*, 2009):

1. *Preparazione della miscela di PCR.*

Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 50 µL contenente DNA genomico (10-15 ng), PCR buffer (1x), ciascuno dei quattro dNTPs (0,4 mM), ciascuno dei due primer (0,5 mM, CYAN106F e CYAN1281R), MgCl₂ (2,5 mM), BSA (0,5 mg mL⁻¹) e Taq DNA polymerase (1 unità).

Sequenze dei primer: *forward* ITSCYA236F, CTGGTTCRAGTCCAGGAT(5'-3'), e *reverse* ITSCYA225R, TGCAGTTKCAAGGTCT(5'-3').

2. *Amplificazione DNA*

Si applica il protocollo seguente: 6 minuti di denaturazione iniziale a 95°C, seguita da 35 cicli a 95°C per 45 s, 52°C per 45 s e 72°C per 1 min. Step finale di 5 min a 72°C. Il prodotto di PCR viene visualizzato in gel di agarosio 1.2 % (p/v) e la lunghezza è variabile a seconda del genere cianobatterico.

3. *Digestione prodotto di PCR*

Circa 1 µg di prodotto di PCR, ottenuto come da step 1 e 2, viene digerito senza ulteriore purificazione con l'endonucleasi di restrizione *TaqI*, secondo le istruzioni indicate dal produttore.

4. *Visualizzazione dei prodotti di restrizione*

I frammenti vengono separati su gel di agarosio 1,2% (p/v). Le diverse combinazioni nelle dimensioni dei prodotti di restrizione sono infine associate ai diversi taxacianobatterici, secondo lo schema in Tabella C5.2.

Oltre ai metodi sopra illustrati, si ricorda che la letteratura offre numerosi altri metodi di rilevamento dotati di buona sensibilità e basati sul riconoscimento molecolare attraverso

l'utilizzo di *primer* discriminanti (Neilan *et al.*, 1997; Kurmayer *et al.*, 2002; Kurmayer & Schober, 2003; Hisbergues *et al.*, 2003; Ostermayer & Kurmayer, 2009; Saker *et al.*, 2009) che permettono la rilevazione di specifici generi di cianobatteri, la cui scelta sarà valutata volta per volta dall'operatore in base alle proprie esigenze sperimentali.

Tabella C5.2. Frammenti di ITS-ARDRA generati con la endonucleasi Taq I

Genere	Amplificato ITS (bp)	Frammenti ITS-ARDRA (bp)
Chroococcales		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Tipo1: 930; 300; 180 Tipo 2: 470; 300 Tipo3: 300; 180	ND ND ND
<i>Synechococcus nidulans</i>	300	190; 110
Oscillatoriales		
<i>Limnothrix redekei</i>	350; 250	ND
<i>Planktothrix agardhii</i>	220	120; 100
<i>Planktothrix pseudoagardhii</i>	220	100; 90; 30
<i>Planktothrix rubescens</i>	220	120; 100
<i>Phormidium</i> spp.	220	115; 105
Nostocales		
<i>Anabaena flos-aquae</i>	420; 300	ND
<i>Anabaena planctonica</i>	300	160; 95; 45
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	300	160; 95; 45
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	315	225; 90
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	300; 195	ND

ND, non determinato; bp=base pairs

C5.2.3. Rilevamento a livello di specie

Il concetto di specie nei cianobatteri è fonte di dibattito scientifico (Komárek, 2010; D'Alelio & Gandolfi 2012), in quanto si teorizza, in analogia a quanto concettualizzato per i batteri patogeni umani, l'assenza di specie propriamente dette. Si configurerebbe piuttosto l'esistenza di meta-specie in continuo divenire raggruppate all'interno di generi relativamente stabili. Così come per altri organismi procarioti, si è ancora lontani dal descrivere un concetto di specie definitivo per i cianobatteri.

Studi multi-locus condotti su due tra i generi più tossici, nello specifico *Planktothrix* (D'Alelio & Gandolfi, 2012; D'Alelio *et al.*, 2013) e *Microcystis* (van Gremberghe *et al.*, 2011; Tanabe & Watanabe, 2011) hanno mostrato come: i) le entità definite dal punto di vista fenotipico come specie distinte possono in realtà essere meta-popolazioni appartenenti ad un unicum genetico e ii) un singolo morfotipo contiene svariati genotipi estremamente differenziati. Il conseguente flusso genico tra queste meta-popolazioni determina l'ibridazione del loro DNA e una ampia condivisione, da parte di ceppi di specie diverse, di una o più varianti geniche comuni. È pertanto assai difficile associare una singola variante genica ad una singola specie. Per esempio, nel genere *Planktothrix*, è tuttora impossibile associare in maniera univoca varianti geniche del 16S rRNA ad un distinto morfotipo (es. le cosiddette specie *P. rubescens* e *P. agardhii*). Inoltre, uno studio recentemente pubblicato da Tooming-Klunderud e collaboratori (2013) mostra come ceppi di *Planktothrix* identificati come *P. rubescens* (classicamente di colore rosso per la presenza di ficoeritrina) e *P. agardhii* (di colore verde per la presenza di ficocianina) possano scambiarsi intere regioni geniche associate alla produzione di ficoeritrina, modificando in tal modo il corredo pigmentario. Ne consegue la non diretta relazione tra

genotipo e fenotipo e la possibilità che genotipi diversi afferiscano al medesimo genotipo. Il concetto morfologico di specie è pertanto pressoché totalmente dissociato da quello genetico.

Sul piano metodologico, a differenza di quanto riportato nel precedente paragrafo, l'identificazione a livello di specie (o raggruppamenti sub-generici) è ottenibile prevalentemente attraverso il sequenziamento di frammenti di DNA amplificato. La ricerca di marcatori in grado di discriminare in maniera non ambigua a livello di sub-genere cianobatteri tossici è tuttora in corso ed è concentrata prevalentemente sui due generi *Planktothrix* e *Microcystis*. Per quanto riguarda le Nostocales, data l'incerta tassonomia (anche molecolare) dei generi che le compongono, lo stato di avanzamento della ricerca è decisamente inferiore rispetto agli altri due generi. Per quanto attiene *Planktothrix*, uno dei marcatori molecolari recentemente indicati come risolutivi a livello di raggruppamenti di specie o *species-complexes* è il già menzionato *rpoC1*: per esempio, il gruppo di specie formato da *P. rubescens*, *P. agardhii* e *P. suspensadiverge* in maniera netta dal gruppo formato da *P. pseudoagardhi* e *P. mougeotii* (Lin *et al.*, 2010; D'Alelio & Salmaso, 2011). Questo marcatore a copia singola (a differenza del 16S rDNA), specifico dei cianobatteri e dei cloroplasti delle piante superiori (BergslandandHaselkorn, 1991), mostra una maggiore diversità intra-generica del più frequentemente utilizzato 16SrRNA gene (Palenik & Haselkorn, 1992; Palenik, 1994; Haande *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008).

La procedura per l'amplificazione e il sequenziamento dell'*rpoC1* in *Planktothrix* è descritta di seguito (Lin *et al.*, 2010; D'Alelio & Salmaso 2011; D'Alelio & Gandolfi, 2012; D'Alelio *et al.*, 2013):

1. Preparazione della miscela di PCR

Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 25 µL contenente DNA genomico (ca. 25ng), PCR buffer (1x), dNTPs (0,2 mM), ciascuno dei due *primer* (10 pmol), MgCl₂ (1.5 mM), Taqpolimerasi (1 unità). Sequenze dei *primer* entro il locus *rpoC1*: *forward* RPOF, TGGTCAAGTGGTTGGAGA, e *reverse* RPOR, GCCGTAAATCGGGAGGAA.

2. Amplificazione DNA e purificazione

Si applica il protocollo seguente: 5 minuti di denaturazione iniziale a 94°C, seguita da 40 cicli a 94°C per 40 s, 55°C per 50 s e 72°C per 2 min. Step finale di 5 min a 72°C. Il prodotto di PCR viene visualizzato in gel di agarosio 1% (peso/volume) e la lunghezza è variabile e di ca. 640 bp. La purificazione del DNA può essere realizzata attraverso l'impiego di kit appositamente ottimizzati (es. il QiaQuick DNA Remove, Qiagen) oppure attraverso la tecnologia di purificazione enzimatica a singolo step (es. la ExoSAP-IT® *for PCR Product Cleanup*, Affimetrix), più rapida, seguendo i protocolli indicati dai produttori.

3. Sequenziamento

Gli stessi *primer* utilizzati per la reazione di amplificazione vengono separatamente usati nelle reazioni di sequenziamento (due, una con il *primer forward* e una con il *primer reverse*). Nel metodo descritto da D'Alelio & Gandolfi (2012) i segmenti ottenuti vengono preparati per il sequenziamento attraverso la tecnologia BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Dopo purificazione in automatico utilizzando il kit Millipore Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup (Millipore Corporate), i prodotti vengono fatti correre su sequenziatore automatico (es. mediante Automated Capillary Electrophoresis Sequencer 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)).

4. Analisi di sequenze

I cromatogrammi *forward* e *reverse* vengono assemblati utilizzando un software di analisi di sequenze (es. il ChromasPro). Le sequenze in formato testo di diversi ceppi vengono allineate automaticamente utilizzando un programma per allineamento (es. l'applicazione

ClustalW inclusa nel software BioEdit). Infine, l'identificazione molecolare viene completata attraverso la comparazione delle sequenze derivate con quelle presente in rete attraverso analisi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) sul portale *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Alcuni limiti sono tuttavia da rilevare nell'utilizzo del locus *rpoC1* nell'identificazione di raggruppamenti sub-generici in *Planktothrix*. Dati derivanti da analisi genetiche bioinformatiche su frammenti genici del locus *rpoC1* appartenenti a centinaia di ceppi, suggeriscono che l'evoluzione di questo gene all'interno del dato genere è stata fortemente influenzata da ricombinazione omologa a livello sub-generico (D'Alelio & Gandolfi, 2012). Inoltre, il locus *rpoC1* traccia in maniera efficace i processi ricombinatori avvenuti tra le morfospesie *P. rubescens*, *P. agardhii* e *P. suspensa* e, in un clade genetico diverso, tra *P. pseudoagardhii* e *P. mougeotii*. In via semplificata, la ricombinazione omologa fa sì che due varianti geniche di tipo A o B generino una terza variante di tipo AB, ibrida tra le prime due ("A", dall'inizio della sequenza al punto di *crossing-over*, e "B", da quest'ultimo alla parte terminale della sequenza). Vista da una diversa prospettiva, la possibilità, tutt'altro che remota, che esistano varianti ricombinanti all'interno di un locus molecolare di un dato genere di cianobatteri tossico, espongono al rischio di associare all'una o all'altra specie "parentale" una terza e sconosciuta specie, a seconda della porzione di locus analizzata.

Un altro marcatore ampiamente indicato per l'identificazione molecolare di specie tossiche è il *cpcBA*-IGS. Questo marker, classicamente utilizzato negli studi di attribuzione filogenetica, può, in alcuni casi, avere una doppia valenza, ed essere sfruttato anche come indicatore del potenziale tossico di una popolazione all'interno del genere *Microcystis*. Infatti, analisi filogenetiche basate sullo studio di sequenze all'interno di questa regione (Tan *et al.*, 2010) hanno mostrato che ceppi di *M. wesenbergii* formano un raggruppamento distinto e separato da ceppi di altre specie all'interno del genere *Microcystis*. Poiché la presenza di *M. wesenbergii* non è mai stata associata alla presenza di microcistine (MC) nelle acque, ne consegue che il rilevamento di una fioritura prodotta da *M. wesenbergii*, in combinazione comunque con l'analisi del classico marcatore di tossicità *mcy* (vedi paragrafo C5.3), non desta preoccupazioni dal punto di vista sanitario (Tan *et al.*, 2010).

La procedura per l'identificazione di colonie di *Microcystis wesenbergii* è la seguente (Tan *et al.*, 2010):

1. *Preparazione della miscela di PCR*

Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 50 µL contenente DNA genomico (5-10 ng), PCR buffer (1×), dNTPs (0,2 mM), ciascuno dei due *primer* (10 pmol), MgCl₂ (1,5 mM), Taq DNA polymerase (1 unità). Sequenze dei *primer*: *forward* PCβ-F, TGGCGTAAGCAAAAATGAAAGAA (5'-3'), e *reverse* PCα-RRPOF, CGCCCTGGGTTAATTGGGAA (5'-3').

2. *Amplificazione DNA*

Si applica il protocollo seguente: 5 minuti di denaturazione iniziale a 94°C, seguita da 35 cicli a 94°C per 30 s, 55°C per 30 s e 72°C per 1 min. Step finale di 5 min a 72°C. Il prodotto di PCR viene visualizzato in gel di agarosio 1% (peso/volume) e la lunghezza è pari a ca. 680 bp.

3. *Sequenziamento*: come per l'*rpoC1*.

4. *Analisi di sequenze*: come per l'*rpoC1*.

Tuttavia, diverse ambiguità sono scaturite dall'osservazione dell'albero filogenetico di *Microcystis* pubblicato in Tan *et al.* (2010), come ad esempio la presenza di ceppi identificati

come *M. aeruginosa* e *M. flos-aquae* presenti contemporaneamente in cladi distinti e ampiamente separati, e la bassa significatività della divergenza tra *M. wesenbergii* e queste ultime specie, per cui si suggerisce la massima cautela nell'utilizzo della PCR e sequenziamento come unico strumento nell'identificazione di specie tossiche all'interno di questo genere.

C5.3. Stima quantitativa degli individui tossici attraverso qPCR

La stima accurata del numero di cellule tossigeniche all'interno di un campione ambientale mediante PCR quantitativa (*quantitative* PCR, qPCR) durante una reazione di *real time* è un ottimo indicatore del potenziale tossico di una popolazione e può aiutare a comprendere i parametri fisiologici ed ecologici che regolano la produzione delle cianotossine e i fattori che influenzano la dominanza e la variabilità delle specie *in situ* (Pearson & Neilan, 2008). La conoscenza della composizione di una colonia cianobatterica in termini di individui tossici e non tossici permette infatti di studiarne nel tempo l'evoluzione dinamica e di ipotizzare o escludere l'influenza di specifici parametri ambientali in grado di modulare la fitness di determinati genotipi.

Negli ultimi anni la qPCR ha trovato largo impiego nello studio dell'ecologia dei cianobatteri e nello studio delle variazioni spaziali e temporali delle sub-popolazioni tossiche in condizioni naturali (Hotto *et al.*, 2008; Briand *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2009; Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Sabart *et al.*, 2010). La concentrazione delle MC nelle acque interessate da fioriture di cianobatteri varia in modo considerevole nel tempo e questo è ascrivibile, almeno in parte, alle diverse proporzioni di sub-popolazioni tossiche e non tossiche che compongono la comunità (Kurmayer *et al.*, 2004). Dai numerosi lavori recentemente pubblicati emerge una composizione genotipica straordinariamente dinamica delle popolazioni cianobatteriche che vivono nei sistemi acquatici, con oscillazioni ampie e repentine delle frazioni di individui tossici e non tossici. In uno studio effettuato su *Microcystis* nel lago Wannsee (Germania) da giugno del 1999 a ottobre del 2000 (Kurmayer & Kutzenberger, 2003) è stato misurato un intervallo della proporzione delle cellule tossiche (*mcyB*) che va da 1,7 al 71,0% delle cellule totali, con una ciclicità stagionale nella proporzione dei genotipi tossici (frazione minima in inverno e massima in estate). Un'ampia variabilità emerge anche da uno studio condotto sulla comunità di *Microcystis* nel lago Erie (USA), con una proporzione dei genotipi tossici (*mcyD*) compresa tra lo 0,3% e la totalità delle cellule presenti. Anche la specie *Planktothrix* è stata caratterizzata in diversi lavori attraverso qPCR, sebbene la letteratura sia in questo caso più scarsa. Nel caso del Lago di Gerosa (Italia) interessato da fioriture di *P. rubescens* (Manganelli *et al.*, 2010) la proporzione stimata di cellule *mcyB*-positive rispetto alla popolazione totale nel periodo ottobre 2006 – giugno 2007 è compresa tra 31% e il 79% in superficie, e incrementa con la profondità lungo la colonna d'acqua. La frazione di individui tossici aumenta proporzionalmente alla densità di cellule, ad eccezione del periodo di fioritura, in cui è stato rilevato il valore minimo. Una forte variabilità nella composizione genotipica è stata osservata anche nella comunità di *P. rubescens* nel lago di Vico nel periodo da febbraio 2009 a dicembre 2010, con una percentuale di cellule tossiche compresa tra il 9% e il 95% (Scardala *et al.*, 2011), e in 12 laghi delle Alpi (primavera 2006 – autunno 2007), ove la proporzione delle cellule potenzialmente MC-produttrici varia tra il 18 e l'82% (Ostermaier & Kurmayer, 2010). Nel caso di *Planktothrix*, la correlazione tra la densità delle cellule e l'abbondanza di MC rinvenute non è sempre chiara: alcuni autori hanno osservato che la ricorrenza di genotipi-*mcy* inattivi è linearmente relazionata alla densità di popolazione e che questi mutanti non tossici non siano contro-selezionati durante la transizione

dalla fase pre-fioritura alla fioritura (Ostermaier & Kurmayer, 2009), o in alternativa che intervengano meccanismi di regolazione della trascrizione dell'mRNA che portano a una diminuzione dei livelli di trascritto dei geni *mcy* (Kaebernick *et al.*, 2000), oppure la correlazione tra la densità delle cellule e l'abbondanza di MC riguarda specifici congeneri strutturali (Ostermaier & Kurmayer 2010).

La qPCR, dotata di maggiore sensibilità rispetto alla media dei comuni metodi di analisi chimica basati sulla rilevazione delle tossine (Fortin *et al.*, 2010), permette inoltre di individuare la presenza di cellule tossiche sin dalle fasi più precoci delle fioriture, offrendo un potente strumento nel monitoraggio dei corpi idrici considerati ad alto rischio per la presenza di cianobatteri tossigenici.

La stima quantitativa dei cianobatteri in grado di produrre tossine si basa sul principio che all'interno di una stessa popolazione sono presenti sia individui tossici che non tossici, indistinguibili morfologicamente ma diversi sotto il profilo genetico, per la presenza o meno dei geni che codificano per le tossine. La stima del numero totale di individui viene ottenuta prendendo come riferimento specifiche sequenze marker diagnostiche nell'ambito di ogni phylum: si sfruttano a questo scopo geni universalmente presenti come il *16S rDNA*, o il gene *rpoC1*, oppure geni esclusivamente presenti nei cianobatteri, come lo spaziatore intergenico dell'operone della Ficocianina (PC-IGS) (Garcia-Pichel, 2008; Kurmayer & Kutzenberger, 2003; Rasmussen *et al.*, 2008). La stima delle cellule tossiche viene ottenuta valutando quanti individui, tra quelli rilevati, sono portatori dei geni marker di tossicità (Figura C5.1).

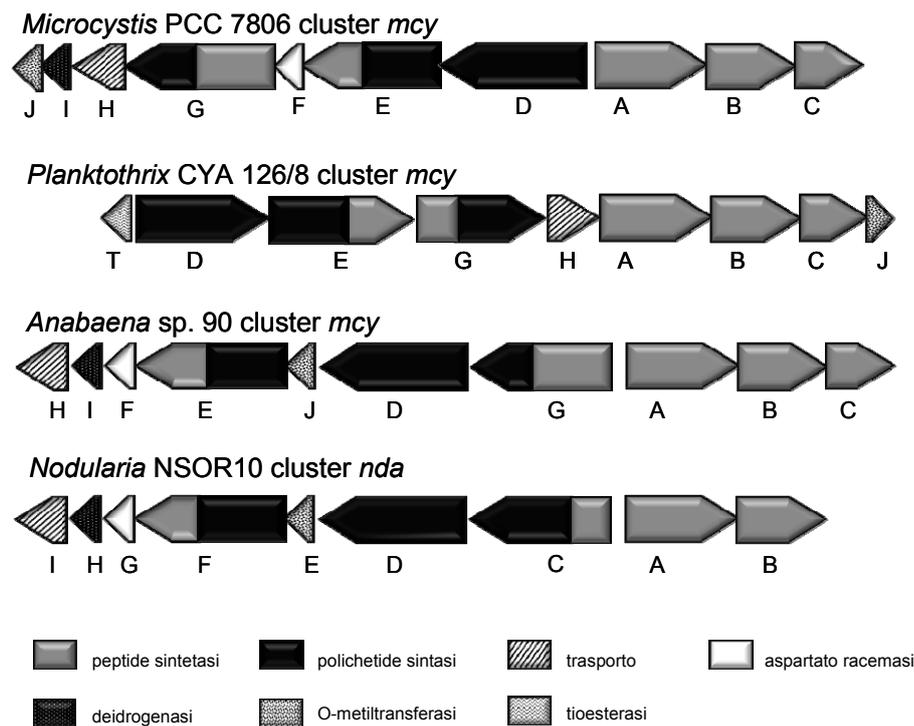


Figura C5.1. Rappresentazione schematica dei cluster microcistinasintetasi (*mcy*) in *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena*, e del cluster nodularinasintetasi (*nda*) in *Nodularia*

Tipicamente, per i cianobatteri produttori di MC come *Planktothrix*, *Microcystis* e *Anabaena* si ricerca la presenza dei geni appartenenti al cluster *mcy*, che partecipano alla sintesi delle MC attraverso un meccanismo non-ribosomale. Tra questi, *mcyB* e *mcyE* sono considerati marcatori affidabili in quanto la loro presenza correla generalmente con la potenziale epatotossicità dei cianobatteri. Tuttavia, il focus sull'utilizzo dell'operone *mcy* come indicatore di tossicità presenta alcune criticità. In primo luogo, altri marcatori nello stesso operone possono dar luogo a falsi negativi (*mcyA*) o falsi positivi (*mcyT*, *mcyTD*) per la presenza di polimorfismi genetici (Mbedi *et al.*, 2005). Inoltre, l'analisi di un elevato numero di ceppi e campioni ambientali appartenenti a *Microcystis* ha portato a identificare alcuni casi in cui i geni per la sintesi della MC erano presenti, ma l'organismo era incapace di produrle, probabilmente a causa di mutazioni all'interno della estesa macro-regione genica di regolazione (Sivonen, 2008). Anche se meno frequentemente, la qPCR è stata applicata anche allo studio di cianobatteri produttori di nodularina (NOD) e cilindrospermopsina (CYN). Per le cellule NOD-positive appartenenti a *Nodularia* è stato preso a riferimento il cluster che codifica per complesso nodularina sintetasi (generalmente *ndaF*) (Koskeniemi *et al.*, 2007), mentre per i produttori di CYN sono state identificate 2 sequenze coinvolte nella produzione della tossina, con funzione di peptide sintetasi (*ps*) e polichetidesintasi (*pks*), all'interno dei geni *aoaA*, *aoaB*, e *aoaC*, indicatori di tossicità in ceppi di *Cylindrospermopsis raciborskii* e altri produttori di CYN (Rasmussen *et al.*, 2008).

Va sottolineato che una delle maggiori criticità nello sviluppo di protocolli di qPCR consiste nella scelta dei geni da adottare come marcatori, per le difficoltà che possono scaturire nel convertire il numero delle copie dei geni nel numero delle cellule portatrici delle copie: infatti, la presenza di più copie o la presenza di copie alternative all'interno di una stessa specie può condurre a una erronea stima del numero delle cellule.

C5.3.1. Preparazione del campione

Per quanto attiene la preparazione del campione e l'estrazione del DNA, la sua quantificazione e identificazione della purezza non c'è alcuna differenza rispetto all'analisi qualitativa e le alternative sperimentali sono già state presentate; eventuali differenze possono essere evidenti tuttavia nelle fasi successive in cui si utilizzano tecniche molecolari diverse (Figura C5.2).

L'innegabile comodità di metodi basati sulla tecnologia *DNeasy*, rapidi nell'esecuzione, si accompagna a una resa generalmente più bassa rispetto ai metodi di estrazione tradizionali (es. fenolo/cloroformio), ovvero a un ritardo nell'emissione della fluorescenza nella fase esponenziale durante la reazione di *real time* PCR. Tale ritardo, tuttavia, nel caso di *Microcystis* spp. e *Planktothrix* spp. non sembra influenzare la sensibilità dei saggi, per cui l'impiego dei kit si rivela particolarmente utile nelle analisi *high throughput* di screening nei programmi di monitoraggio. Data la forte eterogeneità dei cianobatteri nella composizione polisaccaridica (De Phillipis & Vincenzini, 1998), non si esclude tuttavia che l'impiego dei sistemi di estrazione *DNeasy* possa dar luogo a differenze specie-specifiche nella resa da campioni ambientali (Schober & Kurmayer, 2006). Alcuni autori (Rasmussen *et al.*, 2008) propongono di sottoporre direttamente il campione ambientale tal quale alla reazione di qPCR, irradiando preliminarmente con microonde le cellule in un detergente contenente Triton X-100 e DTT (ditiotreitolo), eliminando la fase di estrazione del DNA. Questo metodo rapido di preparazione si rivela vantaggioso soprattutto nei casi in cui la concentrazione dei cianobatteri nel campione sia bassa, in modo da ovviare al problema della perdita di materiale durante il processamento. Tuttavia è opportuno valutarne caso per caso l'applicabilità, sia a causa delle differenze fisiche delle specie cianobatteriche, come la presenza di materiale mucillaginoso sulla superficie esterna della parete cellulare, che rende le cellule diversamente suscettibili al calore, sia alla possibile presenza di contaminanti presenti nel campione che potrebbero disturbare o inibire la reazione di qPCR.

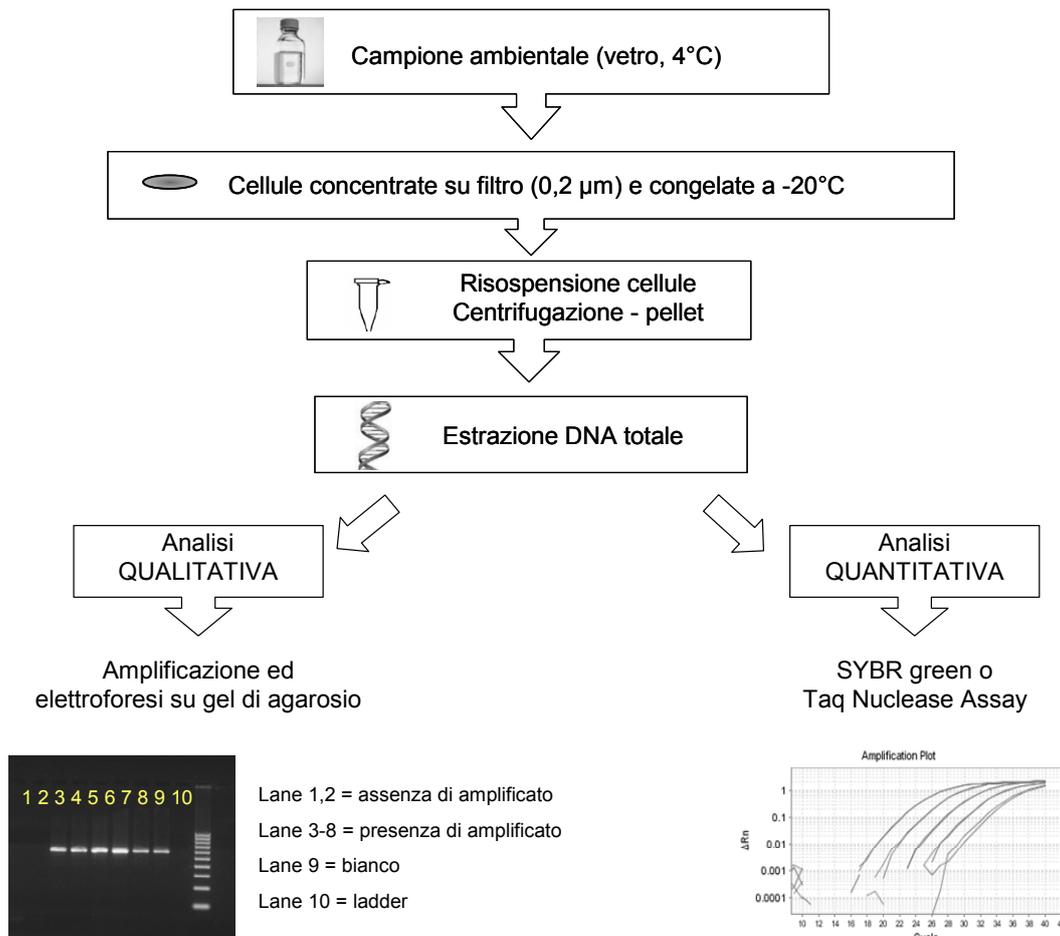


Figura C5.2. Schema della procedura da seguire per testare la presenza di cianobatteri in un campione ambientale attraverso tecniche molecolari

È necessario ricordare che per la messa a punto dei metodi di PCR e la preparazione delle rette standard (*vedi* paragrafo C5.3.2.), fasi indispensabili per la stima quantitativa dei vari genotipi, è necessario l'allestimento di colture standard del cianobatterio dominante la comunità oggetto di studio e di tutti gli altri che possono essere di interesse da un punto di vista tossicologico. La disponibilità di ceppi di controllo positivi e negativi, ovvero tossigenici e non, permette di accertare la specificità di un saggio sviluppato per la quantificazione dei soli genotipi potenzialmente produttori di tossine all'interno di una popolazione.

C5.3.2. SYBR-green e Taq Nuclease Assay: principi fondamentali e applicazioni nell'ecologia dei cianobatteri

La PCR *real time* si basa sulla rilevazione e quantificazione di un reporter fluorescente, il cui segnale cresce in modo direttamente proporzionale alla quantità di prodotto generato durante la reazione. Registrando l'intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo, è possibile monitorare

la reazione di PCR durante la fase esponenziale, all'interno della quale il prodotto è strettamente correlato al numero di copie target presenti.

Il ciclo in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo soglia (*threshold cycle*, o Ct) e corrisponde alla fase log-lineare della reazione. Il Ct è un parametro fondamentale per la quantificazione: infatti, maggiore è la quantità di template inizialmente presente, minore è il numero di cicli necessari affinché il prodotto arrivi alla fase esponenziale. La pendenza della curva di amplificazione nella fase log-lineare fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Gli agenti fluorescenti più comunemente usati nei saggi di qPCR sono gli agenti intercalanti come il *SYBR-green* e le sonde *Taqman* contenenti un fluoroforo reporter e un quencher (Tabella C5.3).

Tabella C5.3. Alcuni metodi di qPCR sviluppati per lo studio quantitativo di cianobatteri tossici

Gene target	Primer e probe	Metodo qPCR	Rif.
<i>Microcystis</i> Ficocianina	For: GCTACTTCGACCGCGCC Rev: TCCTACGGTTAATTGAGACTAGCC Probe: CCGCTGCTGTGCCTAGTCCCTG	TNA	Kurmayer & Kutzemberger, 2003
mcyB	For: CCTACCGAGCGCTTGGG Rev: GAAAATCCCCTAAAGATTCCTGAGT Probe: CACCAAAGAAACACCCGAATCTGAGAGG		
<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>			
mcyE	For: GAA ATT TGT GTA GAA GGT GC Mic Rev: CAA TGG GAG CAT AAC GAG Ana Rev: CAA TCT CGG TAT AGC GGC	SYBR green	Vaitomaa <i>et al.</i> , 2003
<i>Planktothrix</i> 16S rDNA	For: ATCCAAGTCTGCTGTAAAGA Rev: CTCTGCCCTACTACACTCTAG Probe: AAAGGCAGTGGAACTGGAAG	TNA	Ostermaier & Kurmayer, 2010
mcyBA1	For: ATTGCCGTTATCTCAAGCGAG Rev: TGCTGAAAAAAGTCTGCATTAA Probe: TTTTGTGGAGGTGAAGCTCTTTCCTCTGA		
<i>C. raciborskii</i> rpoC1	For: GGCATTCCTAGTTATATTGCCATACTA Rev: GCCCGTTTTGTCCCTTTGCTGC Probe: TCCTGGTAATGCTGACACACTCG	TNA	Rasmussen <i>et al.</i> , 2008
pks	For: CCTCGCACATAGCCATTTGC Rev: GAAGCTCTGGAATCCGGTAA Probe: CGGCAGCAACACTCACATCAGT		
<i>Nodularia</i> ndaF	For: GTGATTGAATTTCTTGGTTCG Rev: GGA AATTTCTATGTCTGACTCAG	SYBR green	Koskeniemi <i>et al.</i> , 2007

Probes = sonde; For: = Forward; Rev: = Reverse; TNA = Taq Nuclease Assay

I saggi in *SYBR Green*, che hanno il vantaggio di essere più economici, risultano tuttavia generalmente meno specifici, in quanto l'agente intercalante si lega a ogni molecola di DNA a doppio filamento che si forma, indipendentemente che si tratti o meno del target. Tuttavia, l'analisi della curva di *melting* al termine della reazione di amplificazione permette di superare

questo inconveniente, assicurando la specificità del prodotto e rilevando l'eventuale formazione di dimeri di *primer*, in base al principio che ogni amplicone ha una specifica temperatura di *melting* (T_m), che dipende della sua composizione in basi (Figura C5.3).

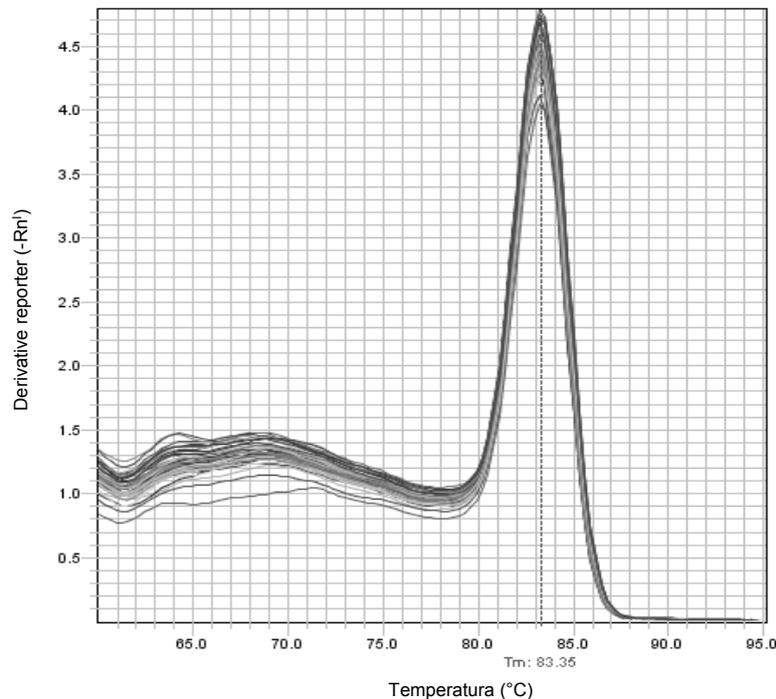


Figura C5.3. Curva di *melting* per l'identificazione del prodotto di amplificazione rispetto a prodotti aspecifici ottenuta attraverso graduale incremento della temperatura fino al superamento del valore T_m dell'amplicone

Per la determinazione quantitativa in *SYBR green* di cianobatteri appartenenti a *Microcystis* e *Anabaena* spp. in campioni ambientali può essere applicato il metodo di Vaitomaa *et al.* (2003), che si avvale dell'utilizzo di *primer* discriminanti localizzati sul gene *microcistina sintetasi E* (*mcyE*). Nel metodo, la stima del numero di copie *mcyE* nel campione ambientale è ottenuta per confronto con la retta standard costruita utilizzando quantità note di DNA estratto da cellule appartenenti a ceppi standard di *Microcystis* e *Anabaena*. Per l'analisi quantitativa di specie di *Nodularia* produttrici di nodularina può essere applicato il metodo in *SYBR green* descritto da Koskeniemi *et al.* (2007), dotato di buona sensibilità, essendo in grado di rilevare la presenza di 30 copie del gene *ndaF* per mL di campione d'acqua. La tecnologia SYBR-green risulta particolarmente utile nei casi in cui non sia possibile identificare una regione sufficientemente conservata, all'interno dell'amplicone generato dai due *primer*, per l'appaiamento di una sonda, o quando la ricerca è diretta verso una classe filogenetica di appartenenza ampia, ad esempio verso tutti i cianobatteri potenzialmente produttori di una classe di tossine. Nel metodo descritto da Al-Tebrineh (2011) la tecnologia della qPCR basata sull'impiego di SYBR green è sfruttata nella gestione della qualità delle acque per la rilevazione a tappeto di cianobatteri epatotossici produttori di microcistina e nodularina appartenenti alle classi più diffuse, come *Microcystis*,

Planktothrix, *Nodularia* e *Anabaena*, attraverso amplificazione all'interno dei geni *mcyE* e *ndaF*.

I saggi *Taqman* (*Taq Nuclease Assay* o TNA) sfruttano l'attività 5'esonucleasica di una DNA polimerasi per idrolizzare una sonda ibridata alla sequenza bersaglio del gene da amplificare (Heid *et al.*, 1996).

Le sonde *TaqMan* sono oligonucleotidi complementari alla sequenza posta tra i siti di legame dei *primer* e marcata alle due estremità con due differenti fluorocromi, il *reporter* al 5' (es. FAM) e il *quencher* al 3' (es. TAMRA). Fin quando entrambe si trovano sulla stessa sonda integra, la molecola *quencher* ha la capacità di inibire la fluorescenza della molecola *reporter*. Nel corso dell'amplificazione, però, la sonda viene rotta mediante idrolisi dall'attività esonucleasica della polimerasi, effettuando il distacco del *reporter* dal *quencher* e provocando emissione di fluorescenza, con un incremento proporzionale alla velocità di idrolisi della sonda stessa. I saggi *Taqman*, mediamente più costosi ma dotati di una maggiore specificità e sensibilità, sono largamente applicati allo studio dell'ecologia dei cianobatteri (Kurmayer & Schober, 2003; Manganeli *et al.*, 2010).

Prima di procedere con l'analisi del campione ambientale, per assicurare la specificità dei *primer* nei confronti di una specie bersaglio sarà opportuno controllare alcuni parametri del saggio quantitativo scelto: per inciso, la formazione di prodotto con Ct tardivo può essere indicativa di un appaiamento dei *primer* con una sequenza diversa dal target, per cui alla fine della reazione sarà necessario valutare con cautela i cicli di uscita della fase log-lineare. Una elettroforesi di controllo evidenzierà la presenza di un singolo amplicone la cui lunghezza è quella corrispondente alla regione di interesse, quando i *primer* saranno preliminarmente testati con ceppi di riferimento la cui appartenenza alla specie target è documentata, mentre nessun prodotto sarà presente quando il saggio sarà provato sottoponendo come template il DNA di altre specie. In alternativa, come già ricordato, l'analisi della *melting-curve*, per i saggi in SYBR-Green, rivelerà la presenza di un unico picco di *melting* corrispondente alla Tm del prodotto, escludendo la formazione di dimeri di *primer* (Savichtcheva *et al.*, 2011).

La determinazione quantitativa si ottiene attraverso la costruzione, per ogni gene, di una curva di calibrazione ottenuta amplificando, contemporaneamente ai campioni ignoti, diluizioni seriali di DNA a concentrazione nota estratto da ceppi standard di riferimento (Figura C5.4).

Poiché il campione ambientale potrebbe contenere contaminanti in grado di disturbare o inibire la PCR, è importante accertarsi che l'efficienza di reazione negli *standard* e nei campioni ambientali sia comparabile (Kurmayer & Schober, 2003). In aggiunta, la realizzazione di test *in silico* preliminari alla fase sperimentale permetterà di valutare la reazione in termini di efficienza e selettività dei *primer*, tenendo conto di molteplici fattori quali il contenuto di GC, l'efficienza di *binding*, la complementarità tra i *primer*, la formazione di strutture secondarie e il *melting point*.

Recentemente, la messa a punto di metodiche di RT-qPCR (*quantitative Reverse Transcription PCR*) nei saggi di espressione genica ha reso possibile una più completa caratterizzazione dei ceppi tossici, poiché è stato osservato che la produzione di tossine può essere indotta o repressa in risposta a specifici stimoli ambientali come la temperatura, l'intensità di luce, lo stress ossidativo, l'abbondanza o scarsità di nutrienti e metalli (fosforo, azoto, ferro) (Sevilla *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2008).

Tuttavia, occorre tenere presente che l'influenza di tali fattori sulla produzione delle tossine non è a oggi completamente chiara, soprattutto per la difficoltà nella definizione di condizioni sperimentali standard, poiché le risposte possono variare in modo consistente in base ai ceppi di cianobatteri scelti per gli esperimenti, alle condizioni di coltura, ai livelli di stress ambientali testati e non ultimo ai diversi metodi usati per l'estrazione e la quantificazione delle tossine nelle cellule.

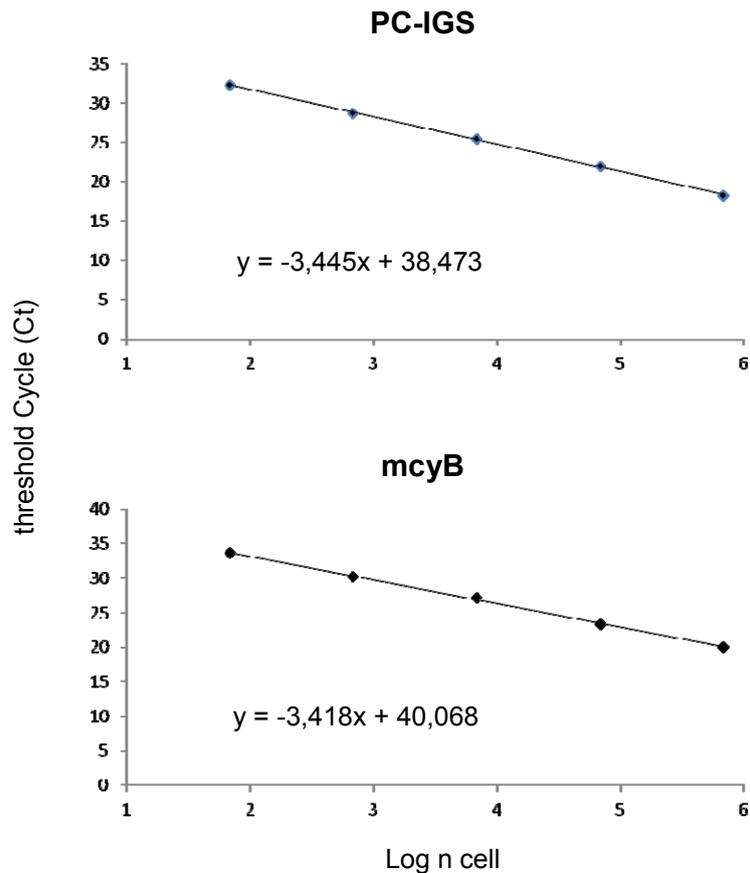


Figura C5.4. Curve standard per i marcatori PC-IGS e mcyB costruite sulla base di concentrazioni predeterminate di *P. rubescens* CCAP 1460/3 correlando le concentrazioni note di DNA (in equivalenti di cellule) nelle diluizioni seriali ai Ct

Parallelamente, occorre anche ricordare che, laddove sia rilevato un aumento di mRNA dovuto a induzione dei geni coinvolti nella biosintesi delle tossine (es *mcy*), non consegue necessariamente un aumentato livello di queste ultime nelle cellule (Kaebernik *et al.*, 2000), per cui l'analisi quantitativa del trascritto, fondamentale nella comprensione dei processi fisiologici che regolano le risposte cellulari, non deve prescindere dalla verifica del prodotto finale.

Bibliografia

- Al-Tebrineh J, Gehringer MM, Akcaalan R, Neilan BA. A new quantitative PCR assay for the detection of hepatotoxigenic cyanobacteria. *Toxicon* 2011; 15;57(4):546-54.
- Bergsland KJ, Haselkorn R. Evolutionary relationships among Eubacteria, Cyanobacteria, and Chloroplasts – evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC-7120. *J Bacteriol* 1991;173:3446-55.
- Briand E, Escoffier N, Straub C, Sabart M, Quiblier C, Humbert J. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *ISME J* 2009;3:419-29.
- D'Alelio D, Salmaso N, Gandolfi A. Frequent recombination shapes the epidemic population structure of *Planktothrix* (Cyanoprokaryota) in Italian subalpine lakes. *J Phyco* 2013;49:1107-17.

- D'Alelio D, Gandolfi A. Recombination signals in *rpoC1* suggest gene flow between *Planktothrix* (Cyanoprokaryota) species. *J Phycol* 2012; 48:1424-32.
- D'Alelio D, Salmaso N. Occurrence of an uncommon *Planktothrix* (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) in a deep lake south of the Alps. *Phycologia* 2011;50:379-83.
- De Phillipis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol Rev* 1998;22,151-75.
- Fortin N, Aranda-Rodriguez R, Jing H, Pick F, Bird D, Greer CW. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:5105-12.
- Frache C, Damerval T. Test on *nif* probes and DNA hybridizations. *Methods Enzymol* 1988;167:803-8.
- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38(2):97-125.
- Garcia-Pichel F. Molecular ecology and environmental genomics of cyanobacteria. In: Herrero A, Flores E (Ed.). *The cyanobacteria: molecular biology, genomics, evolution*. Norfolk: Caister Academic Press; 2008. p. 59-87.
- Haande S, Rohrlack T, Ballot A, Roberg K, Skulberg R, Beck M, Wiedner C. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 2008;7:692-701.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.
- Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* 2003;180:402-10.
- Hotto AM, Satchwell MF, Berry DL, Gobler CJ, Boyer GL. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 2008;7:671-81.
- Jiang Y, Ji B, Wong RNS, Wong MH. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae* 2008;7:127-36.
- Kaebernick M, Neilan BA, Borner T, Dittmann E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3387-92.
- Komárek J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 2010;639:245-59.
- Koskenniemi K, Lyra C, Rajaniemi-Wacklin P, Jokela J, Sivonen K. Quantitative real-time PCR detection of toxic *Nodularia* cyanobacteria in the Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:2173-9.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Borner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* 2004;6:831-41.
- Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology* 2002;43:107-18.
- Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:6723-30.
- Kurmayer R, Schober E. *A manual for the use of in situ genetic techniques to quantify genotypes of cyanobacteria in freshwater under non-bloom conditions and to predict cyanopeptide occurrence under bloom conditions*. Deliverable 2.2 of the EU project PEPCY "Toxic and other bioactive peptides in cyanobacteria" Dec 2003; QLK4-CT-2002-02634. Disponibile all'indirizzo: <http://www.uibk.ac.at/limno/files/pdf/deliverable2.pdf>; ultima consultazione 20/12/14.

- Lin S, Wu ZX, Yu GL, Zhu ML, Yu BS, Li RH. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) strains from China. *Harmful Algae* 2010;9:87-97.
- Liu Y, Wang Z, Lin S, Yu G, Li R. Polyphasic characterization of *Planktothrixspiroides* sp. nov.(Oscillatoriales, Cyanobacteria), a freshwater bloom-forming alga superficially resembling *Arthrospira*. *Phycologia* 2013;52(4):326-32.
- Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Funari E, Vichi S, Buratti FM, Testai E. Emerging health issues of cyanobacterialblooms. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(4):415-28.
- Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Vichi S, Mattei D, Bogialli S, Ceccarelli P, Corradetti E, Petrucci I, Gemma S, Testai E, Funari E. Health risk evaluation associated to *Planktothrixrubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Res* 2010;44(5):1297-306.
- Mbedi S, Welker M, Fastner J, Wiedner C. Variability of the microcystinsynthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol Lett* 2005;245(2):299-306.
- Neilan BA, Jacobs D, Del Dot T, Blackall LL, Hawkins PR, Cox PT, Goodman AE. rRNA sequences and evolutionary relationshipsamong toxic and non-toxic cyanobacteria of the genus*Microcystis*. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:693-7.
- Ostermaier V, Kurmayer R. Application of real-time PCR to estimate toxin production by the cyanobacterium*Planktothrix* sp. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(11):3495-502.
- Ostermaier V, Kurmayer R. Application of Real-Time PCR to estimate toxin production by the cyanobacterium*Planktothrix* sp. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:3495-502.
- Ostermaier V, Kurmayer R. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microb Ecol* 2009;58(2):323-33.
- Palenik B, Haselkorn R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b-containing prokaryotes. *Nature* 1992;355:265-7.
- Palenik B. Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequence analysis. *Appl Environ. Microbiol* 1994;60:3212-9.
- Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs*2010;8:1650-80.
- Pearson LA, Neilan BA. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:281-8.
- Rajaniemi P, Hrouzek P, Kaštovská K, Willame R, Rantala A, Hoffmann L, Komárek J, SivonenK. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55(1):11-26.
- Rasmussen JP, Giglio S, Monis PT, Campbell RJ, Saint CP. Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *J Appl Microbiol* 2008;104:1503-15.
- Rinta-Kanto JM, Konopko EA, DeBruyn JM, Bourbonniere RA, Boyer GL, Wilhelm SW. Lake Erie *Microcystis*: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae* 2009;8:665-73.
- Sabart M, Pobel D, Briand E, et al. Spatiotemporal variations in microcystin concentrations and in the proportions of microcystin-producing cells in several *Microcystis aeruginosa* populations. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:4750-9.
- Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DF, Vasconcelos VM. Detection of microcystinsynthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium*Aphanizomenonflos-aquae*. *Toxicon* 2005;46(5):555-62.

- Savichtcheva O, Debroas D, Kurmayer R, Villar C, Jenny JP, Arnaud F, Perga ME, Domaizon I. Quantitative PCR enumeration of total/toxic *Planktothrix rubescens* and total cyanobacteria in preserved DNA isolated from lake sediments. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(24):8744-53.
- Scardala S, Stefanelli M, Vichi S. Fioriture di cianobatteri tossici in acque dolci: un approccio integrato per la valutazione e la gestione del rischio. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/23). p.46-63.
- Schober E, Kurmayer R. Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. *Lett Appl Microbiol* 2006;42(4):412-7.
- Sevilla E, Martin-Luna B, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. An active photosynthetic electron transfer chain required for *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystisaeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology* 2012;21(3):811-9.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO). p. 41-111.
- Sivonen K. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer; 2008. p. 539-57.
- Tan W, Liu Y, Wua Z, Lin S, Yu G, Yu B, Li R. *cpcBA*-IGS as an effective marker to characterize *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek in *Kondratieva* (cyanobacteria). *Harmful Algae* 2010;9:607-12.
- Tanabe Y, Watanabe M. M. Local expansion of a panmictic lineage of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystisaeruginosa*. *PLoS One* 2011;6(2):e17085.
- Tooming-Klunderud A, Sogge H, Rounge TB, Nederbragt AJ, Lagesen K, Glöckner G, Hayes PK, Rohrlack T, Jakobsen KS. From Green to Red: Horizontal Gene Transfer of the Phycoerythrin Gene Cluster between *Planktothrix* Strains *Appl Environ Microbiol* 2013;79(21):6803-12.
- Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Mokolke L, Sivonen K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for microcystis and anabaena in lakes. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(12):7289-97.
- Valério E., Chambel L, Paulino S, Faria N, Pereira P, Tenreiro R. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology* 2009;155(2):642-56.
- van Gremberghe I, Leliaert F, Mergeay J, Vanormelingen P, Van der Gucht K, Debeer A-E, Lacerot G, De Meester L, Vyverman W. Lack of phylogeographic structure in the freshwater *Cyanobacterium Microcystisaeruginosa* suggests global dispersal. *PLoS ONE* 2011;6:e19561.
- Vichi S, Gemma S, Testai E. Metodi genetici nell'identificazione di cianobatteri e della loro potenziale tossicità. In: Funari E, Scardala S, Testai E (Ed.). *Cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/6). p. 59-67.
- Vichi S, Lavorini P, Funari E, Scardala S, Testai E. Contamination by *Microcystis* and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. *Food Chem Toxicol* 2012;50(12):4493-9.
- Liu Y, Wang Z, Lin S, Yu G, Li R. Polyphasic characterization of *Planktothrix spirooides* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria), a freshwater bloom-forming alga superficially resembling *Arthrospira*. *Phycologia* 2013;(52)4:326-32.
- Yoshida M, Yoshida T, Satomi M, Takashima Y, Hosoda N, Hiroishi S. Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *J Appl Microbiol* 2008;105:407-15.