

## INDICE

	<b>PREMESSA</b>	<b>1</b>
	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>2</b>
<b>1</b>	<b>SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>RIFERIMENTI NORMATIVI</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>TERMINI E DEFINIZIONI</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>ABBREVIAZIONI</b>	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>REAGENTI</b>	<b>7</b>
5.1	Reagenti per metodi morfologici	7
5.1.1	Soluzione isotonica	7
5.2	Reagenti per metodi molecolari	7
5.2.1	Primer	7
5.2.2	Miscela di deossinucleotide trifosfato (dNTPs)	7
5.2.3	DNA polimerasi termostabili	7
5.2.4	Tampone di reazione PCR	7
5.2.5	Gel di agarosio	8
5.2.6	Tampone per elettroforesi su gel	8
5.2.7	Tampone di caricamento	8
5.2.8	Scala del DNA	8
<b>6</b>	<b>APPARECCHIATURA</b>	<b>8</b>
6.1	Generalità	8
6.2	Apparecchiatura per metodi di identificazione morfologica	8
6.2.1	Sistema ottico a basso ingrandimento	8
6.2.2	Microscopio ottico	8
6.2.3	Letteratura scientifica sulla tassonomia	9
6.2.4	Vetrino per microscopio	9
6.2.5	Vetro di copertura del microscopio	9
6.3	Apparecchiatura per metodi di identificazione molecolare	9
6.3.1	Termociclatore	9
6.3.2	Dispositivo per elettroforesi su gel	9
6.3.3	Sequenziatore di DNA	9
6.3.4	Materiali di consumo in materia plastica monouso, privi di DNA	9
<b>7</b>	<b>PRINCIPIO</b>	<b>10</b>
7.1	Generalità	10
7.2	Metodi morfologici	10
7.3	Metodi molecolari	10
<b>8</b>	<b>PROCEDURA</b>	<b>10</b>
8.1	Requisiti generali di laboratorio	10
8.2	Scelta dei metodi	10
figura 1	Scelta dei metodi	11
<b>9</b>	<b>METODI DI IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA</b>	<b>12</b>
9.1	Generalità	12
9.2	Identificazione macroscopica ad occhio nudo o con una lente d'ingrandimento	12
9.3	Microscopia ottica	12
9.3.1	Generalità	12
9.3.2	Colorazione	12

9.3.3		Preparazione dei vetrini per microscopio .....	12
9.3.4		Identificazione microscopica.....	13
9.3.5		Utilizzo delle chiavi di identificazione.....	13
<b>10</b>		<b>METODI DI IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE</b>	<b>13</b>
10.1		Generalità .....	13
10.2		Estrazione e purificazione del DNA .....	13
10.3		Amplificazione del DNA.....	14
10.3.1		Principio dell'Amplificazione del DNA.....	14
10.3.2		Metodo .....	14
10.4		Selezione dei primer .....	14
10.5		Reazioni di controllo.....	15
	prospetto 1	Controlli richiesti per l'analisi dei campioni basata su PCR .....	15
10.6		Valutazione dei prodotti PCR.....	15
10.7		Clonazione del prodotto PCR .....	15
10.8		Sequenziamento del prodotto PCR.....	15
10.9		Valutazione dei dati di sequenza .....	16
10.10		Analisi/confronto di sequenze con sequenze di riferimento in banche dati pubbliche .....	16
<b>11</b>		<b>RAPPORTO DI PROVA</b>	<b>17</b>
<b>APPENDICE</b>	<b>A</b>	<b>ESEMPI DI PRIMER APPLICABILI</b>	<b>18</b>
(informativa)			
<b>APPENDICE</b>	<b>B</b>	<b>LETTERATURA SCIENTIFICA CHE SI PUÒ UTILIZZARE PER L'IDENTIFICAZIONE</b>	<b>20</b>
(informativa)			
		<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>22</b>

---

## PREMESSA

Il presente documento (EN 17477:2021) è stato elaborato dal Comitato Tecnico CEN/TC 454 "Algae and algae products", la cui segreteria è affidata al NEN.

Alla presente norma europea deve essere attribuito lo status di norma nazionale, o mediante pubblicazione di un testo identico o mediante notifica di adozione, al più tardi entro febbraio 2022, e le norme nazionali in contrasto devono essere ritirate al più tardi entro febbraio 2022.

Si richiama l'attenzione sulla possibilità che alcuni degli elementi del presente documento possano essere oggetto di diritti di brevetto. Il CEN non deve essere ritenuto responsabile dell'identificazione di alcuni o di tutti questi diritti di brevetto.

Il presente documento è stato elaborato nell'ambito di una Richiesta di Normazione conferita al CEN dalla Commissione Europea e dall'Associazione Europea di Libero Scambio ed è di supporto ai requisiti essenziali della(e) Direttiva(e) o del/dei Regolamento(i) dell'UE.

Qualsiasi commento o richiesta sul presente documento dovrebbe essere rivolta al proprio ente di normazione nazionale. Una lista completa di tali enti è disponibile nel sito web del CEN.

In conformità alle Regole Comuni CEN-CENELEC, gli enti nazionali di normazione dei seguenti Paesi sono tenuti a recepire la presente norma europea: Austria, Belgio, Bulgaria, Cipro, Croazia, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Irlanda, Islanda, Italia, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Malta, Norvegia, Paesi Bassi, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Repubblica Ceca, Repubblica della Macedonia del Nord, Romania, Serbia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia e Ungheria.

---

## INTRODUZIONE

Il presente documento è stato elaborato dagli esperti del CEN/TC 454 "Algae and algae products".

La Commissione europea (CE) ha chiesto al Comitato europeo di normazione (CEN) di redigere le norme europee o le pubblicazioni in materia di normazione europea per sostenere l'implementazione dell'articolo 3 della Direttiva 2009/28/CE sulle alghe e i prodotti a base di alghe o i loro prodotti intermedi.

Questa richiesta, presentata come Mandato M/547, contribuisce anche alla Comunicazione su "Innovare per una Crescita Sostenibile: una bioeconomia per l'Europa".

Il precedente gruppo di lavoro del CEN BT 218 "Algae", era stato creato nel 2016 per elaborare un programma di lavoro nell'ambito di questo mandato. Il comitato tecnico CEN/TC 454 "Algae and algae products" è stato costituito per realizzare il programma di lavoro ed elaborare una serie di norme.

L'interesse per le alghe e i prodotti a base di alghe o intermedi, ritenuti una fonte preziosa comprendente, a mero titolo di esempio, carboidrati, proteine, lipidi e diversi pigmenti, è aumentato in misura sostanziale in Europa. Questi materiali sono idonei all'utilizzo in un'ampia gamma di applicazioni, da alimenti e mangimi ad altri settori, tra cui il tessile, la cosmetica, i biopolimeri, i biocarburanti e i fertilizzanti/biostimolanti. Alla normazione è stato attribuito un ruolo di rilievo nella promozione dell'utilizzo di alghe e dei prodotti delle alghe.

Il lavoro del CEN/TC 454 dovrebbe migliorare l'affidabilità della filiera, rafforzando così la fiducia dell'industria e dei consumatori nelle alghe, comprendenti macroalghe, microalghe, cianobatteri, labyrinthulomycetes e prodotti a base di alghe o intermedi e promuove e sostiene la commercializzazione dell'industria europea delle alghe.

Il presente documento è stato elaborato con l'intento di coprire le definizioni orizzontali delle alghe e dei prodotti a base di alghe o intermedi. Pertanto altri termini e definizioni sono forniti nelle altre norme sviluppate dal CEN/TC 454 "Algae and algae products".

Altre definizioni supplementari possono esistere in altre norme specifiche relative ad applicazioni correlate a prodotti alimentari, a mangimi e a prodotti non alimentari e non destinati ai mangimi.

## SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento specifica un metodo per la ricerca e l'identificazione di microalghe, macroalghe, cianobatteri e labyrinthulomycetes utilizzando metodi morfologici e/o metodi molecolari.

I metodi morfologici descritti nel presente documento sono applicabili alla biomassa umida raccolta e alla biomassa secca non macinata raccolta, provenienti da microalghe, macroalghe, cianobatteri e labyrinthulomycetes precedentemente coltivati e/o raccolti per ulteriori lavorazioni e/o utilizzi.

I metodi molecolari descritti nel presente documento sono applicabili alla biomassa umida raccolta e alla biomassa secca e/o macinata raccolta, proveniente da microalghe, macroalghe, cianobatteri e labyrinthulomycetes precedentemente coltivati e/o raccolti per ulteriori lavorazioni e/o utilizzi.

Il presente documento descrive una serie di strumenti, articolati in metodi diversi di identificazione, da scegliere secondo l'applicabilità e il fine dell'identificazione:

- metodi morfologici basati sull'osservazione e riferiti alla letteratura scientifica sulla tassonomia:
  - identificazione macroscopica,
  - identificazione con il microscopio ottico;
- metodi molecolari per il sequenziamento e l'allineamento (blasting) di sequenze:
  - Sequenziamento dell'rDNA 16S;
  - Sequenziamento dell'rDNA 18S;
  - Sequenziamento del DNA *rbcL*;
  - Sequenziamento dell'ITS;
  - Sequenziamento del gene *COX1*;
  - Sequenziamento del gene *tufA*.

Il presente documento non tratta la purezza genetica della biomassa o la quantificazione dei taxa identificati.

Il presente documento non è idoneo per l'analisi di biomasse altamente lavorate contenenti DNA altamente degradato, in cui la lunghezza dei frammenti non è sufficiente per l'amplificazione dei target e le caratteristiche morfologiche non possono essere valutate.

## RIFERIMENTI NORMATIVI

Nel testo si fa riferimento ai seguenti documenti in modo tale che il loro contenuto, in tutto o in parte, costituisca i requisiti per il presente documento. Per quanto riguarda i riferimenti datati, si applica esclusivamente l'edizione citata. Per i riferimenti non datati vale l'ultima edizione del documento a cui si fa riferimento (compresi gli aggiornamenti).

ISO 24276:2006	Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions
EN 17399:2020	Algae and algae products - Terms and definitions

## TERMINI E DEFINIZIONI

Ai fini del presente documento, si applicano i termini e le definizioni di cui alla EN 17399:2020, alla ISO 24276:2006 e i termini e le definizioni seguenti.

Per l'utilizzo in ambito normativo l'ISO e l'IEC dispongono di banche dati terminologiche ai seguenti indirizzi:

- IEC Electropedia: disponibile all'indirizzo <https://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponibile all'indirizzo <https://www.iso.org/obp>