



Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura

Università degli Studi di Firenze

SOCIETÀ ITALIANA DELLA SCIENZA DEL SUOLO

---

III COMMISSIONE

*Giornata di Studio per dottorandi e giovani ricercatori*

**“La biodiversità microbica e la diversità funzionale del suolo”**

**REPORT ATTIVITA'**



**07 Novembre 2011, ore 8,30**

**AULA MAGNA dell'Università degli Studi di Firenze, P.za S.Marco n.4 – Firenze**

# Programma

Ore 8.30 - 9.00	Registrazione
Ore 9.00 - 9.15	Saluto di benvenuto (Prof. <b>Paolo Nannipieri</b> – Università di Firenze, Dott. <b>Marcello Pagliai</b> - CRA ABP)
Ore 9.15 - 9.30	Breve presentazione della Società Italiana di Scienza del Suolo e delle attività condotte dalla commissione III “Biologia del Suolo” (Dott. <b>Stefano Mocali</b> – CRA ABP, Dott.ssa <b>Sara Marinari</b> - Università della Tuscia, Viterbo)
Ore 9.30 - 10.00	Strategia nazionale della biodiversità in Italia (Dott.ssa <b>Anna Benedetti</b> – CRA RPS)
Ore 10.00 - 10.30	Attività enzimatica del suolo ed espressione genica (Prof. <b>Paolo Nannipieri</b> – Università di Firenze)
Ore 10.30 - 10.50	PAUSA
Ore 10.50 - 11.20	Il ruolo delle micorrize nel recupero e nel mantenimento della qualità del suolo (Prof.ssa <b>Manuela Giovannetti</b> – Università di Pisa)
Ore 11.20 -11.50	Metodologie di studio della biodiversità microbica del suolo (Dott. <b>Stefano Mocali</b> – CRA ABP)
Ore 11.50 - 12.20	Studio della diversità fenotipica dei microrganismi del suolo (Dott. <b>Carlo Viti</b> – Università di Firenze)
Ore 12.20 -12.50	La bioinformatica come strumento di analisi delle comunità microbiche (Dott. <b>Marco Fondi</b> – Università di Firenze)
Ore 12.50 - 14.00	PAUSA PRANZO

## Presentazione di casi studio

Chiarman: Prof. Paolo Nannipieri

14,00 - 14,30	Microbial biodiversity and system functioning in the deglaciated moraines in the Arctic Svalbard (Prof. <b>Daniele Daffonchio</b> – Università di Milano)
14,30 - 14.50	Ecological Genetics of Plant-Bacteria Association: Lessons from serpentinophytes and legumes (Dott. <b>Alessio Mengoni</b> – Università di Firenze)
14,50 - 15.10	Attività biochimica e diversità microbica in suoli contaminati da metalli pesanti e recuperati mediante phytoremediation (Dott. <b>Giancarlo Renella</b> – Università di Firenze)
15,10 - 15.30	PAUSA
15,30 - 15.50	Indicatori di qualità del suolo in sistemi colturali consociati leguminose/orzo (Dott. <b>Demetrio Tortorella</b> – Università Mediterranea di Reggio Calabria)
15.50 - 16.10	Biodiversità e funzionalità dei suoli agrari. Casi studio sul rapporto biodiversità e sanità dei suoli (Dott.ssa <b>Luisa Manici</b> – CRA CIN)
16.10 - 16.30	Diversità batterica di un sito inquinato da metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici di derivazione industriale (Dott. <b>Arturo Fabiani</b> - CRA ABP)
16.30 - 16.50	The fate and ecological relevance of extracellular DNA in soil (Prof. <b>Giacomo Pietramellara</b> – Università di Firenze)
17.00 – 17.30	Relazione di chiusura dei lavori (Prof. <b>Paolo Nannipieri</b> – Università di Firenze)

# INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>Premessa</b>	
<i>Stefano Mocali (CRA-ABP, Firenze)</i>	4
<b>Riassunti</b>	
<b>Strategia Tematica e conservazione delle risorse genetiche microbiche</b>	6
<i>Anna Benedetti (CRA-RPS, Roma)</i>	
<b>Genes codifying enzymes and enzyme activities in soil</b>	8
<i>Paolo Nannipieri (Università di Firenze)</i>	
<b>Il ruolo delle micorrize nel recupero e nel mantenimento della qualità del suolo</b>	9
<i>Manuela Giovannetti (Università di Pisa)</i>	
<b>Metodologie di studio della biodiversità microbica del suolo</b>	10
<i>Stefano Mocali (CRA-ABP, Firenze)</i>	
<b>Studio della diversità fenotipica dei microrganismi del suolo</b>	12
<i>Carlo Viti (Università di Firenze)</i>	
<b>La bioinformatica come strumento di analisi delle comunità microbiche</b>	13
<i>Marco Fondi (Università di Firenze)</i>	
<b>Soil formation in arctic and himalayan moraines: the interaction among autotrophic processes drives plant establishment</b>	14
<i>Daniele Daffonchio (Università di Milano)</i>	
<b>Ecological genetics of plant-bacteria association: lessons from serpentinophytes and legumes</b>	15
<i>Alessio Mengoni (Università di Firenze)</i>	
<b>Attività biochimica e diversità microbica in suoli contaminati da metalli pesanti e recuperati mediante phytoremediation</b>	16
<i>Giancarlo Renella (Università di Firenze)</i>	
<b>Indicatori di qualità del suolo in sistemi colturali consociati leguminose/orzo</b>	17
<i>Demetrio Tortorella (Università Mediterranea di Reggio Calabria)</i>	
<b>Biodiversità e funzionalità dei suoli agrari. casi studio sul rapporto biodiversità e sanità dei suoli</b>	18
<i>Luisa Manici (CRA-CIN, Bologna)</i>	
<b>Diversità batterica di un sito inquinato da metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici di derivazione industriale</b>	19
<i>Arturo Fabiani (CRA-ABP, Firenze)</i>	
<b>The fate and ecological relevance of extracellular dna in soil</b>	20
<i>Giacomo Pietramellara (Università di Firenze)</i>	

## **Premessa**

*Questa giornata di studio sulla “Biodiversità microbica e la diversità funzionale del suolo” si inserisce in un ciclo di iniziative formative per dottorandi e giovani ricercatori promosse dalla Commissione III (Biologia del Suolo) della Società Italiana della Scienza del Suolo (SISS). Essa è organizzata in collaborazione con il Dipartimento delle Scienze delle Produzioni Vegetali del Suolo e dell’Ambiente Agroforestale (DiPSA) dell’Università di Firenze, e con il Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura – Centro di Ricerca per l’Agrobiologia e la Pedologia (CRA-ABP) di Firenze.*

*Tale evento intende rappresentare un’occasione di approfondimento del concetto di “biodiversità del suolo” in relazione alle molteplici funzioni che essa svolge nell’agroecosistema e, più in generale, nell’ecosistema terrestre. La giornata, quindi, vuole costituire un momento di formazione e di sensibilizzazione sulle peculiari proprietà del sistema suolo e stimolare un confronto aperto e critico tra i ricercatori.*

*I lavori della giornata si sono articolati in due sessioni. Una sessione mattutina nel corso della quale saranno presentate delle relazioni ad invito su aspetti generali riguardanti il contesto legislativo, le problematiche e le metodologie di studio riguardanti la biodiversità del suolo. Nel pomeriggio seguirà una seconda sessione dedicata alla presentazione di singoli casi studio. I resoconti delle relazioni e dei contributi presentati nel corso della giornata saranno raccolti e pubblicati on-line sul sito della SISS ([www.scienzadelsuolo.org](http://www.scienzadelsuolo.org)) insieme a quelle delle precedenti iniziative della Commissione.*

*Rivolgo i miei più vivi ringraziamenti a tutti i partecipanti (ben oltre 60 persone), i relatori e i collaboratori che hanno contribuito alla realizzazione di questo evento e, infine (ma non meno importante), un particolare e sentito ringraziamento al Prof. Paolo Nannipieri per il suo prezioso supporto e la sua disponibilità.*

*Con l’auspicio che da giornate come questa possano venire gli stimoli per nuove attività di ricerca e l’impulso per “una maggior partecipazione da parte dei microbiologi, i quali sono i meno rappresentati nella Società Italiana della Scienza del Suolo”, come ricordava anche il Prof. Pignatelli, il primo presidente della SISS, già nel 1952.*

**Stefano Mocali**

# RIASSUNTI DELLE RELAZIONI



## **STRATEGIA TEMATICA E CONSERVAZIONE DELLE RISORSE GENETICHE MICROBICHE**

**Anna Benedetti**

*CRA - Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo (CRA-RPS), Roma*

Email: [anna.benedetti@entecra.it](mailto:anna.benedetti@entecra.it)

Nel 2010, anno mondiale della biodiversità, l'Italia si è dotata della strategia nazionale sulla biodiversità Il principale documento di riferimento a livello nazionale, per promuovere azioni rivolte alla conservazione delle risorse genetiche. Essa si colloca nell'ambito degli impegni assunti dall'Italia con la ratifica della Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD, Rio de Janeiro 1992) avvenuta con la Legge n. 124 del 14 febbraio 1994.

I tre obiettivi principali della Convenzione sono:

1. la conservazione della diversità biologica, considerata sia a livello di gene, sia a livello di specie, sia a quello di comunità ed ecosistema;
2. l'utilizzazione durevole, o sostenibile, dei suoi elementi;
3. la giusta ed equa ripartizione dei vantaggi che derivano dallo sfruttamento delle risorse genetiche e dal trasferimento delle tecnologie ad esso collegate.

L'Art. 6 della CBD stabilisce che ciascuna Parte contraente, a seconda delle proprie particolari condizioni e necessità, dovrà elaborare strategie, piani e programmi nazionali volti a garantire la conservazione e l'utilizzazione durevole della diversità biologica e dovrà integrare per quanto possibile e opportuno la conservazione e l'uso sostenibile della biodiversità nei pertinenti piani, programmi e politiche settoriali.

La Strategia Nazionale per la Biodiversità, rappresenta uno strumento di grande importanza per garantire, negli anni a venire, una reale integrazione tra gli obiettivi di sviluppo del Paese e la tutela del suo inestimabile patrimonio di biodiversità.

Con l'intesa (Repertorio n. 181/CSR) espressa dalla Conferenza Permanente per i rapporti fra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome nella seduta del 7 ottobre 2010 si è concluso l'iter di approvazione della Strategia Nazionale per la Biodiversità, a seguito di una proficua concertazione tra il Ministero dell'Ambiente e le Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano.

I capioli 4 e 5 della strategia nazionale riguardano in particolare l'Agricoltura e le Foreste. In questo contesto sono nate ulteriori iniziative ed atti normativi da parte dei dicasteri competenti. In particolare nel caso del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, è stato redatto il Programma Nazionale sulla Biodiversità di Interesse Agrario, che si articola in tre fasi progettuali A, B e C. In particolare la fase A si pone i seguenti obiettivi:

- 1) l'individuazione dei descrittori comuni per specie per la caratterizzazione delle varietà vegetali e delle razze-popolazioni animali locali;
- 2) la definizione di una metodologia comune e condivisa per la ricerca e la caratterizzazione delle varietà e razze-popolazioni locali al fine di permettere il confronto dei dati e dei risultati, l'uso comune dei termini e degli strumenti utilizzati a livello locale;
- 3) la definizione delle linee guida per la corretta conservazione "in situ", "on farm" ed "ex situ" delle varietà vegetali locali;
- 4) la definizione delle linee guida per la corretta conservazione "in situ", "on farm" ed "ex situ" delle razze-popolazioni animali locali;
- 5) la definizione di rischio di estinzione e di erosione genetica, attraverso soglie o criteri, per le principali specie vegetali del settore agricolo.

Fatto degno di particolare attenzione per quanto concerne il tema trattato in questa giornata di studio è che per la prima volta un atto normativo prende in considerazione la diversità delle comunità microbiche compresi i microrganismi del suolo.

In questo contesto è stato istituito presso il Mipaaf un Gruppo di lavoro che elaborasse linee guida per la conservazione delle risorse genetiche di interesse agrario. Nel corso del 2009 e 2010 sono state redatte le linee guida per la conservazione delle risorse genetiche animali, per quelle vegetali e per le microbiche.

A livello europeo altro documento importante di riferimento per la conservazione delle risorse microbiche del suolo è la Comunicazione della Commissione del 22 settembre 2006: "Strategia tematica per la protezione del suolo" [COM(2006) 231 ]. Tra le diverse emergenze da contrastare per conservare le funzioni del suolo una di queste riguarda la perdita di sostanza organica e biodiversità del suolo.

## GENES CODIFYING ENZYMES AND ENZYME ACTIVITIES IN SOIL

**Nannipieri Paolo**, Arenella Rita, Ascher Judith, Ceccherini Maria Teresa, Giagnoni Laura, Landi Loretta, Pietramellara Giacomo and Renella Giancarlo

*Department of Plant, Soil and Environmental Sciences, University of Firenze, Firenze, Italy*

Email: [paolo.nannipieri@unifi.it](mailto:paolo.nannipieri@unifi.it)

The discussion of links between genes codifying enzymes and enzyme activities of soil involves two different philosophical approaches since the classical soil enzymology is based on the holistic approach whereas the molecular approach is based on a detailed knowledge of enzymes involved in the measured enzyme activity. The latter approach requires the classification of the target enzyme. Soil enzymologists are dealing with enzyme activities which are the result of different enzymes catalyzing the same reaction and this is not always taken into consideration. Another drawback about the present soil enzymology is the fact that the extensive bibliography before the arrival of electronic searches is frequently ignored with the risk “to reinvent the wheel”.

Increases in chitinase activity of soil by sludge or sludge and lime treatment were associated with a lower diversity in chitinase enzymes whereas casein-hydrolysing activity was mainly associated with *sub* genes encoding subtilisin, mainly present in soil bacteria. Laccase-encoding genes of basidiomycetes paralleled laccase activity of the soil extract, are assumed to represent the respective soil enzyme activity.

Future research should involve to set up reliable soil assays for determining the activity of important enzymes such as nuclease, phytase, laccase, lignin peroxidase, etc. Since most of the microbial species inhabiting soil are unknown also some of the enzymes contributing to the measured enzyme activities are unknown. The degenerated primers may help if they cover a sufficiently long target region without losing their specificity as it has been recently shown in the amplification of dioxygenase encoding genes.

# IL RUOLO DELLE MICORRIZE NEL RECUPERO E MANTENIMENTO DELLA QUALITÀ DEL SUOLO

**Manuela Giovannetti**

*Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa*

Email: [mgiova@agr.unipi.it](mailto:mgiova@agr.unipi.it)

La qualità del suolo, definita come “la capacità di un suolo di sostenere la produttività biologica, mantenere la qualità ambientale e promuovere la salute delle piante e degli animali” (Doran and Parkin, 1994), non si può misurare direttamente, ma deve essere valutata utilizzando parametri chimici, biochimici e biologici, spesso collegati ai cicli biogeochimici. All'interno del biota del suolo, i funghi micorrizici arbuscolari, che vivono in simbiosi con le radici della maggior parte delle piante terrestri (80%), sono organismi fondamentali per la fertilità del suolo e la nutrizione delle piante, capaci di regolare la produttività primaria aumentando l'accesso delle piante ai nutrienti limitanti, come fosforo e azoto (Smith and Read, 2008). La rete extraradicale di ife che si estende dalle radici colonizzate al suolo rappresenta la struttura chiave per il passaggio di nutrienti minerali dal suolo alla pianta e di carbonio dalla pianta al suolo (Giovannetti e Avio, 2002; Giovannetti, 2008) e svolge un importante ruolo come fattore di carbon sink, sequestrando grandi quantità di carbonio organico nelle pareti ifali, in forma di composti recalcitranti come chitina e chitosano (Fortuna et al., 2011). La rete micorrizica influenza le caratteristiche fisico-chimiche del suolo e svolge un'azione stabilizzante nella formazione e mantenimento della struttura del suolo, contrastando l'erosione e aumentando la stabilità degli aggregati attraverso l'azione combinata delle ife, dei loro essudati e residui e di una sostanza proteinaica idrofoba e insolubile denominata glomalina. La relazione causa-effetto tra simbiosi micorrizica, produzione di glomalina e stabilità degli aggregati è stata definitivamente dimostrata in un recente studio (Bedini et al., 2009), che ha anche evidenziato la capacità di isolati fungini diversi di influenzare differenzialmente la produzione di glomalina e la stabilità degli aggregati. La sfida che ci attende riguarda la possibilità di isolare e selezionare i simbionti micorrizici più efficienti da utilizzare nel miglioramento della qualità del suolo e in programmi di recupero ambientale (Bedini et al., 2010).

## **Bibliografia**

- Bedini S., Pellegrino E., Avio L., Pellegrini S., Bazzoffi P., Argese E., Giovannetti M. (2009). *Soil Biology & Biochemistry* 41, 1491-1496.
- Bedini S., Turrini A., Rigo C., Argese E., Giovannetti M. (2010). *Soil Biology & Biochemistry* 42,758-765.
- Doran J.W., Parkin S. (1994). In: Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F., Stewart B.A. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, vol. 35. SSSA Special publication, pp. 3–21.
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Giovannetti M., Avio L. (2002). In: Khachatourians G. G. e Arora D. K. (Eds.), *Applied Mycology and Biotechnology*, Vol. 2 Agriculture and Food Production, pp. 275-310.
- Giovannetti M. (2008). In: Varma A. (Ed.), *Mycorrhiza*, Springer-Verlag, pp. 59-72.
- Fortuna P., Avio L., Morini S., Giovannetti M. (2011). *Mycological Progress*, DOI 10.1007/s11557-010-0721-2.

# METODOLOGIE DI STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ MICROBICA DEL SUOLO

**Stefano Mocali**

*CRA - Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia (CRA-ABP), Firenze*

Email: [stefano.mocali@entecra.it](mailto:stefano.mocali@entecra.it)

Le teorie ecologiche nello studio della diversità biologica (biodiversità) sono state sviluppate essenzialmente per gli ecosistemi presenti sulla superficie del suolo, trascurando per lungo tempo tutte quelle forme di vita che sono presenti all'interno di esso, in particolare i microrganismi, e che rappresentano una enorme quantità di "vita invisibile" di fondamentale importanza per l'intera vita sulla terra. Se ti tiene conto che il numero di procarioti per tonnellata di suolo è pari a circa  $10^{16}$  cellule (Curtis and Sloan, 2009), è facile comprendere come la microflora tellurica rappresenti la parte più rilevante della biomassa del suolo. Inoltre è quella che maggiormente influisce sulle proprietà dei suoli regolandone tutti i processi biochimici che ne determinano le proprietà funzionali (Nannipieri et al., 2003). Le diverse specie di microrganismi presenti nel suolo hanno, infatti, ruoli prioritari nelle trasformazioni dell'energia e nei processi biogeochimici, intervenendo nella decomposizione del materiale organico attraverso processi biodegradativi e nel riciclo di elementi essenziali quali carbonio, fosforo, azoto ecc. fondamentali per la nutrizione e la salute delle piante (van der Heijden et al., 2008). Il numero dei microrganismi presenti nel suolo e l'abbondanza relativa di ciascun gruppo microbico variano enormemente sia all'interno di suoli differenti che in relazione alle specie vegetali e agli altri organismi presenti. Ma perché è così difficile definire e soprattutto "misurare" la diversità microbica del suolo? Perché, nonostante le comunità microbiche del suolo siano il punto focale di molte funzioni, in passato - prima della diffusione dei moderni approcci molecolari - è stato difficile definire il concetto di "diversità" per i microrganismi e attribuire alle diverse popolazioni microbiche la corrispondente funzione? I motivi sono molteplici, dai limiti della tassonomia batterica alla complessità del suolo, dall'inadeguatezza delle metodologie analitiche alla variabilità funzionale dei microrganismi.

In questa presentazione verranno brevemente illustrate le principali metodologie attualmente utilizzate per lo studio della diversità microbica del suolo, con particolare enfasi agli approcci molecolari. E' infatti noto che meno dell'1% del numero totale delle cellule batteriche presenti in campioni di suolo può essere coltivato in vitro, sui terreni di coltura comunemente utilizzati in laboratorio (Torsvik et al., 1990), rendendo impossibile mettere in relazione le proprietà delle cellule coltivabili con le reali funzioni del suolo. L'avvento delle tecniche molecolari e, recentemente, delle varie metodologie "omiche" ha consentito di superare tali limitazioni aprendo nuovi orizzonti di conoscenza fino a pochi anni fa impensabili. Uno degli approcci più promettenti utilizzati per lo studio della diversità genetica dei microrganismi del suolo è la "metagenomica", termine con cui si intende l'analisi delle sequenze di tutto il DNA presente nel suolo. Tali informazioni servono per studiare la flora microbica nel suo insieme, comprenderne le sue funzioni e scoprire nuovi geni per la produzione di nuovi enzimi, antibiotici, ecc. La conoscenza del metagenoma del suolo potrebbe aprire la strada alla comprensione del ruolo dei microrganismi nella sua fertilità e permetterà di comprendere fenomeni come l'erosione e il depauperamento e trovare nuove vie per il biorisanamento. Tuttavia l'applicazione di questo potente approccio non può prescindere dalla conoscenza del suolo, le sue caratteristiche e la sua variabilità spazio-temporale. Inoltre l'enorme mole di informazioni genetiche raccolte devono essere analizzate, confrontate, assemblate e interpretate mediante un'accurata analisi bioinformatica al fine di dare un senso compiuto all'enorme sforzo analitico (ed economico) ed evitare che servano solo a costituire un'enorme "enciclopedia megagenomica" senza alcun significato ecologico (Mocali e Benedetti, 2010).

## **Bibliografia**

- Curtis, T.P., Sloan, W.T., 2005. Exploring microbial diversity – a vast below. *Science* 309, 1331–1333.  
Mocali S. and Benedetti A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Res. Microbiol.* 161:497-505.

- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G., (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci*, 54: 655–670.
- Torsvik V., Goksøyr J., Daae F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
- van der Heijden M.G., Bardgett R.D., van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11(3): 296-310.

# STUDIO DELLA DIVERSITÀ FENOTIPICA DEI MICRORGANISMI DEL SUOLO

Carlo Viti e Luciana Giovannetti

*Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, sezione di Microbiologia e Laboratorio Genexpress, Università degli Studi di Firenze*  
Email: [carlo.viti@unifi.it](mailto:carlo.viti@unifi.it)

Il *fenotipo* è l'insieme dei caratteri che l'individuo manifesta: dipende dal suo genotipo, dalle interazioni fra geni e anche da fattori esterni. Lo studio dei caratteri fenotipici dei microrganismi viene tradizionalmente effettuato tramite esperimenti allestiti *ad hoc* che hanno lo scopo di valutare la capacità del microrganismo crescere in differenti condizioni e di rispondere a variazioni dei diversi parametri ambientali. Il maggiore limite associato a questi approcci è la loro bassa "processività". Oggi grazie ad un'evoluzione del sistema di identificazione microbica (Biolog-ID), prodotto dall'azienda Biolog, è disponibile una tecnologia innovativa definita Phenotype Microarray (PM), che ha permesso di aumentare notevolmente la velocità di conduzione degli esperimenti. Questa tecnologia offre la straordinaria possibilità di ottenere una rapida e ampia caratterizzazione fenotipica dei microrganismi permettendo di saggiare contemporaneamente fino a 2000 caratteri fenotipici quali utilizzazione di fonti di carbonio/energia, di fonti di azoto, di zolfo, di fosforo, tolleranza al pH e agli osmoliti, sensibilità a innumerevoli sostanze chimiche. Il PM, fornendo una descrizione fenotipica estremamente dettagliata delle caratteristiche funzionali di un microrganismo può essere definito, in parallelo con le tecniche "genomiche" di analisi degli acidi nucleici e di "proteomica" di analisi delle proteine, come "fenomica". La tecnologia PM, come l'approccio Biolog-ID, si basa sull'impiego di micropiastre a 96 pozzetti ciascuno dei quali rappresenta un saggio fenotipico. L'esito del saggio viene valutato mediante lo sviluppo del colore dovuto al viraggio del colore di un indicatore di potenziale redox, il violetto di tetrazolio, che cellule metabolicamente attive viene trasformato da una forma ossidata incolore ad una forma ridotta color violetto.

L'approccio PM, grazie all'elevata processività che lo contraddistingue, trova impiego in differenti campi della ricerca: dallo studio della funzione dei geni a studi di patogenicità e di epidemiologia, dallo studio della diversità biologica dei batteri alla tassonomia, dallo sviluppo di processi bio-industriali alla "System biology" e recentemente è stata proposta per la caratterizzazione delle comunità microbiche dei suoli in studi di ecologia (Bochner et al 2008; Viti et al., 2010).

## Bibliografia

Bochner B.R., Giovannetti L., Viti C. (2008). Important discoveries from analysing bacterial phenotypes *Molecular Microbiology*70:274-280.

Viti C., Decorosi F., Giovannetti L. (2010). La tecnologia del MicroArray fenotipico. In *Il Metagenoma del suolo: problematiche di ricerca e prospettive applicative*, Accademia dei Georgofili - Quaderno IX\_2010.

# **LA BIOINFORMATICA COME STRUMENTO DI ANALISI DELLE COMUNITÀ MICROBICHE**

**Marco Fondi**

*Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università di Firenze*

Email: [marco.fondi@unifi.it](mailto:marco.fondi@unifi.it)

Lo sviluppo tecnologico a cui stiamo assistendo in questi ultimi anni ha completamente rivoluzionato i metodi di indagine dei sistemi biologici a qualsiasi livello, dai singoli organismi a strutture più complesse come, ad esempio, le comunità microbiche. Adesso è infatti possibile accumulare una enorme quantità di dati di diversa natura (dati di sequenza, di espressione, di concentrazione di metaboliti etc.) da singoli esperimenti ed in un lasso di tempo molto ridotto. Questa rapida accelerazione tecnologica ha immediatamente portato alla luce nuovi interrogativi riguardo alle modalità di conservazione, aggiornamento e (ancor più interessante) interpretazione dei dati di origine biologica raccolti. In questo contesto, la bioinformatica, ovvero quella disciplina che fonde insieme informatica e biostatistica con le scienze biologiche e quelle biomediche si sta ritagliando un ruolo sempre più centrale nella scienza contemporanea e ha iniziato a giocare un ruolo chiave nella progettazione e nello svolgimento degli esperimenti. Anche lo studio delle comunità microbiche ha beneficiato dell'introduzione delle nuove metodologie di esplorazione dei sistemi biologici come, ad esempio i metodi di sequenziamento massivo che hanno portato alla nascita di una vera e propria nuova disciplina nota come metagenomica. Di conseguenza, la bioinformatica sta diventando uno strumento indispensabile anche per coloro che, dedicandosi allo studio delle comunità microbiche, indagano semplici ma fondamentali aspetti quali il livello di biodiversità microbica presente all'interno di un campione, le funzioni codificate dall'intero pool genico della comunità, il livello di condivisione e interazione fra i singoli componenti della comunità (ad es. il livello complessivo di trasferimento genico fra i diversi microorganismi). Verranno quindi presentati e discussi alcuni degli strumenti bioinformatici che vengono comunemente impiegati nell'analisi massiva di comunità microbiche e alcuni dei più recenti risultati che sono stati ottenuti applicando tali metodologie.

# SOIL FORMATION IN ARCTIC AND HIMALAYAN MORAINES: THE INTERACTION AMONG AUTOTROPHIC PROCESSES DRIVES PLANT ESTABLISHMENT

**Daniele Daffonchio**

*Department of Food Science and Microbiology, University of Milan, via Celoria 2, Milan, Italy*

Email: [daniele.daffonchio@unimi.it](mailto:daniele.daffonchio@unimi.it)

Several mechanisms occurring in terrestrial environments are still unresolved like those driving soil formation and primary colonization by plants. Some key processes in land reclamation in hot and cold deserts are yet poorly understood despite a challenge for the future is to limit the actual ongoing desertification in many regions of the planet. Moraines refer to any glacially-formed accumulation of unconsolidated rock debris that occurs in currently or formerly glaciated regions. The ongoing global warming is causing the melting of glacier fronts in the moraines and exposes the formerly ice-covered rock debris to the atmosphere. For this reason, moraines are ideal environments where the driving mechanisms of soil formation and plant colonization processes can be studied. Himalayan, alpine and polar moraines are classified as cold deserts since for most of the year, water is immobilized as ice and precipitations is very sparse. At these sites, formation of soil and plant biocenosis on the substrate recently released from permanent ice cover is slow and hampered by the harsh environmental conditions (low water availability and low temperature) and by nutrient paucity that limits microbial primary production, the formation of organic matter and plant establishment. In these moraines photosynthesis by cyanobacteria and microbial heterotrophic assimilation of organic materials released by animals or transported by wind are commonly considered the processes initiating soil formation and mediating plant colonization. Here we show that peculiar microbial communities are selected in the biological soil crusts along an aridity gradient in the Lobuche moraine, Kumbu Valley, Himalaya and that a combination of autotrophic processes initiates soil formation in High Arctic moraines. In the glacier foreland of Midtre Lovénbreen glacier (78°56'N) in Ny Alesund, Svalbard, the chemolithoautotrophic iron-sulfur oxidation of pyrite triggers early soil formation and promotes primary colonization by plants. Rock pyrite weathering mediated by *Acidithiobacillus ferrooxidans* determines acidity and corresponding fertility gradients, where water retention, cation exchange capacity and nutrient availability are increased. A new, previously unrecognized soil genesis and crop formation model, with potential past and present, terrestrial and extraterrestrial analogues has been dissected by using an interdisciplinary investigation approach that interconnected molecular microbial ecology, strain isolation and biogeochemical and soil chemistry techniques.

# ECOLOGICAL GENETICS OF PLANT-BACTERIA ASSOCIATION: LESSONS FROM SERPENTINOPHYTES AND LEGUMES

**Alessio Mengoni**

*Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università di Firenze, Firenze*

Email: [alessio.mengoni@unifi.it](mailto:alessio.mengoni@unifi.it)

As for the well known animal gut model, a diverse range of bacteria, including pathogens, mutualists, and commensals are supported by plants. These bacteria grow in and around roots, in the vasculature, and in the aerial tissues and are known as rhizospheric, endophytic and phyllospheric. Of these, rhizospheric and endophytic bacteria have been widely studied for their plant-growth promotion abilities, but several basic questions on their ecological roles are still unanswered. We have focused our curiosity on two plant species, *Alyssum bertolonii*, a nickel-hyperaccumulating endemic serpentinophyte, and *Medicago sativa* (alfalfa), one of the most diffused forage legume crops. *A. bertolonii* is intriguing for its peculiar habitat (serpentine soil) and the toxicity due to the heavy-metal Ni, while the legume alfalfa is interesting due to the symbiotic interaction taking place with nitrogen-fixing rhizobia. These two plant species allowed to shed some light on the ecological meaning of “being plant-associated” and on the many different genomic recipes of bacteria for colonizing a plant. Recent results coming from molecular ecology studies, genome sequencing and computational biology analyses will be discussed.

# ATTIVITÀ BIOCHIMICA E DIVERSITÀ MICROBICA IN SUOLI CONTAMINATI DA METALLI PESANTI E RECUPERATI MEDIANTE PHYTOREMEDIATION

**Giancarlo Renella**, Giacomo Pietramellara, Judith Ascher, Maria Teresa Ceccerini, Loretta Landi, Paolo Nannipieri

*Department of Plant, Soil and Environmental Sciences, University of Firenze, Firenze, Italy*

Email: [giancarlo.renella@unifi.it](mailto:giancarlo.renella@unifi.it)

I suoli contaminati da metalli pesanti sono caratterizzati da una ridotta diversità microbica dovuta alla selezione negativa delle specie microbiche metallo-sensibili e dell'affermazione delle specie metallo-tolleranti o metallo resistenti. Di norma, la riduzione della diversità microbica è accompagnata da una ridotta funzionalità dei suoli e una riduzione significativa dei flussi dei nutrienti. I suoli inquinati sono oggi gestiti in due modi radicalmente diversi: sono smaltiti in discarica allo scopo di far rientrare i suoli dei siti inquinati entro i limiti tabellari di legge per aree edificabili o industriali oppure possono essere recuperati mediante tecniche di fitorimediazione. Nel secondo caso, lo scopo dell'intervento è la messa in sicurezza operativa delle aree inquinate mediante la piantumazione con essenze erbacee od arboree e l'utilizzo di ammendanti organici ed inorganici capaci di immobilizzare i metalli pesanti, che consenta altresì il recupero del suolo in situ.

I suoli inquinati e recuperati mediante phytoremediation, oltre che un importante problema ambientale costituiscono anche ambienti interessanti per studiare alcune relazioni ecologiche fondamentali quali ad esempio: i) la relazione tra diversità microbica e specifiche funzioni del suolo, ii) la relazione tra complessità delle comunità vegetali e comunità microbiche, iii) la dinamica di colonizzazione del suolo successiva alla rimozione o riduzione dei fattori limitanti o selettivi.

Il nostro gruppo di ricerca ha studiato i tre aspetti precedentemente elencati con tecniche molecolari e biochimiche, utilizzando esperimenti reali di campo situati in vari paesi europei e i principali esperimenti hanno fin'ora dimostrato che durante il recupero del suolo, si verifica un rapidissimo recupero delle principali funzioni del suolo (biomassa microbica, attività enzimatiche, flusso dei nutrienti) e una rapida rivegetazione, fin dai primi stadi dell'intervento di recupero. Comunque, nella maggior parte dei casi, l'aumento della funzionalità del suolo non è seguito da un aumento della diversità microbica.

Le ragioni di un simile andamento potrebbero essere molteplici, quali ad esempio un lento adattamento dopo la rimozione dei fattori selettivi, la necessità dello stabilirsi di interazioni ecologiche complesse, oppure il basso livello di risoluzione delle metodologie utilizzate. Questi aspetti, insieme alle opportunità offerte dai suoli sotto phytoremediation per studiare alcune relazioni microbiche ecologiche fondamentali saranno discussi e approfonditi durante l'intervento.

## INDICATORI DI QUALITÀ DEL SUOLO IN SISTEMI COLTURALI CONSOCIATI LEGUMINOSE/ORZO

**Demetrio Tortorella**, Antonella Scalise, Aurelio Pristeri, Beatrix Petrovičová, Michele Monti, Antonio Gelsomino

*Dipartimento di Biotecnologie per il Monitoraggio Agro-Alimentare ed Ambientale (BIOMAA),  
Università degli Studi “Mediterranea”, Salita Melissari 89124 - Reggio Calabria*

Email: [demetrio.tortorella@unirc.it](mailto:demetrio.tortorella@unirc.it)

L'intensificazione dei sistemi agricoli ha recentemente subito un significativo rallentamento principalmente a causa del crescente interesse della CE per temi ambientali e per la salvaguardia della biodiversità dell'agroecosistema. Tuttavia, la sostenibilità ambientale di un moderno sistema agricolo risulta difficilmente perseguibile se non vengono considerati i cosiddetti “servizi ecologici” forniti da sistemi colturali che caratterizzano, secondo un approccio agroecologico, i modelli di gestione agronomica di tipo conservativo. L'efficiente gestione delle risorse naturali costituisce una delle sfide che vede impegnata la ricerca europea nell'ambito del FP7 – KBBE (Knowledge Based Bio-Economy), finalizzata ad ottenere rendimenti produttivi coerenti con la conservazione della fertilità e qualità del suolo. I risultati qui presentati nascono nell'ambito delle attività di ricerca del programma europeo Legume Futures, finalizzato allo sviluppo di nuovi sistemi colturali basati sull'impiego delle leguminose come fornitrici di servizi agroecologici capaci di coniugare la finalità produttiva e la tutela delle risorse ambientali. E' noto, infatti, che le leguminose costituiscono una preziosa fonte di composti proteici destinati sia all'alimentazione umana che all'uso zootecnico. In consociazione con i cereali, le leguminose ottimizzano l'uso delle risorse trofiche del suolo determinando così un significativo incremento del contenuto di N nella granella del cereale, migliorano le proprietà fisiche del suolo, contrastano lo sviluppo della flora infestante e concorrono ad interrompere il ciclo biologico dei patogeni dei cereali.

Obiettivo specifico della ricerca è quello di monitorare, sia nel breve che nel lungo periodo, l'impatto sulle variabili chimiche, biochimiche e biologiche del suolo di sistemi colturali consociati leguminose/cereale costituiti da pisello proteico (*Pisum sativum* L. var. Hardy) o favino (*Vicia faba* L. var. Sikelia) in combinazione additiva e sostitutiva con orzo polistico (*Hordeum vulgare* L. var. Aldebaran) allevati in ambiente mediterraneo. Nel corso del primo anno di attività del programma di ricerca Legume Futures è stata allestita una sperimentazione di pieno campo presso il Centro Sperimentale Dimostrativo dell'ARSSA (San Marco Argentano, CS). Il disegno sperimentale ha posto a confronto sette tesi: le tre colture pure e quattro combinazioni leguminosa/orzo: due combinazioni di consociazione additiva (pisello/orzo; favino/orzo) e le rispettive due combinazioni di consociazione sostitutiva. Campioni di suolo sono stati prelevati all'accestimento, alla fioritura e alla raccolta. Sono state determinate le seguenti variabili chimiche (C organico, N ammoniacale e nitrico, N solubile totale, N organico estraibile), biochimiche (respirazione basale, contenuto in C e N della biomassa microbica, C e N potenzialmente mineralizzabile, quoziente microbico e quoziente metabolico) e molecolari (struttura genetica delle comunità batteriche del suolo). I risultati relativi al primo anno di attività mostrano che le forme inorganiche dell'N nel suolo (e tra esse la forma nitrica), il C potenzialmente mineralizzabile e il quoziente metabolico rappresentano gli indicatori più sensibili alle variazioni nella struttura dei sistemi colturali. Le proprietà fisico-chimiche del suolo, piuttosto che la presenza dei diversi assortimenti colturali, sembrano costituire il principale determinante della struttura genetica della comunità batterica del suolo.

# BIODIVERSITÀ E FUNZIONALITÀ DEI SUOLI AGRARI. CASI STUDIO SUL RAPPORTO BIODIVERSITÀ E SANITÀ DEI SUOLI

Luisa Manici e Francesco Caputo

*CRA - Centro Ricerca per le Colture Industriali (CRA-CIN), Bologna*

Email: [luisa.manici@entecra.it](mailto:luisa.manici@entecra.it)

I funghi del suolo sono indicatori microbici con un impiego crescente nella ricerca in campo agronomico poichè hanno un ruolo primario nella demolizione dei residui organici ed un'efficienza di metabolizzazione delle fonti di carbonio marcatamente più alta di quella dei batteri (Bayley et al., 2002). Per questo, la diversità e la “dominance” delle comunità fungine dei suoli sono fortemente influenzata dalla composizione del materiale vegetale che entra nel ciclo di decomposizione. Inoltre molti funghi a sopravvivenza saprofitaria nel suolo colonizzano gli spazi intercellulari delle radici instaurando un rapporto simbiotico con la pianta, che può variare da mutualistico a patogeno, con una ampia variabilità di espressione in quanto è mediato da numerosi fattori legati all'ambiente e all'ospite, con il coinvolgimento in questo caso di una larga gamma di metaboliti secondari (Schulz et al., 1999). Quindi, lo studio biodiversità basato sui funghi come indicatori offre la possibilità di correlare la biodiversità con molti aspetti funzionali dei suoli che hanno un impatto importante sulla produttività delle colture (Manici e Caputo, 2009 e 2010).

Verranno presentati due casi studio in cui l'analisi di biodiversità e similarità delle comunità fungine dei suoli ha permesso di evidenziare le componenti microbiche e le interazioni coinvolte nella espressione della generale repressività, ovvero: “la capacità biologica potenziale del suolo di controllare gli agenti patogeni”, la quale rappresenta una parte importante della funzionalità nei suoli coltivati.

Verranno inoltre illustrati alcuni aspetti funzionali delle componenti biologiche dei suoli oggetto di studio, allo scopo di chiarire la complessa relazione fra biodiversità e funzionalità dei suoli.

## **Bibliografia**

- Bayley V.L., Smith J.L. Bolton Jr H (2002) Fungal-to-bacterial ratios in soil investigation for enhanced C sequestration. *Soil Biol. Biochem.* 34:997-1007.
- Manici L. M., Caputo F. (2009) Fungal community diversity and soil health in intensive potato cropping systems of the east Po valley, northern Italy. *Ann. Appl. Biol.* 155: 2 245-258
- Manici L.M., Caputo F. (2010) Soil fungal communities as indicators for replanting new peach orchards in intensively cultivated areas. *Eu J Agron* 33:188-196
- Schulz B., Rommert A.K., Dammann U., Aust H.J., Strack D. (1999) The endophyte–host interaction: a balanced antagonism? *Mycol. Res* 103:1275–1283.

# **DIVERSITÀ BATTERICA DI UN SITO INQUINATO DA METALLI PESANTI E IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI DI DERIVAZIONE INDUSTRIALE**

**Arturo Fabiani**

*CRA - Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia (CRA-ABP), Firenze*

Email: [arturo.fabiani@entecra.it](mailto:arturo.fabiani@entecra.it)

L'uso di microrganismi come bioindicatori del tipo di inquinamento e quindi dello stato di salute del suolo è un approccio molto interessante, raramente considerato per la caratterizzazione del suolo in siti industriali inquinati.

In questo lavoro è stato utilizzato un approccio microbiologico polifasico, basandosi sui microrganismi propri del suolo come bioindicatori e combinando metodi dipendenti e indipendenti dalla coltivabilità dei microrganismi, per valutare la diversità della comunità batterica del suolo di quattro siti (1a, 1b, 2a, 2b) all'interno di un'industria chimica con un'attività centenaria alle spalle. Sono stati considerati globalmente sia gli aspetti funzionali che quelli strutturali e i risultati sono stati correlati al tipo di inquinanti presenti in ogni sito. Nei siti 1b e 2b è stato riscontrato prevalentemente un inquinamento da metalli pesanti, mentre i siti 1a e 2a sono stati caratterizzati dalla presenza di inquinanti sia organici che inorganici. Considerando solo le proprietà chimiche e fisiche dei quattro suoli, i siti 1b e 2b formavano un gruppo mentre i siti 1a e 2a erano separati dagli altri. Nel sito 2a è stata riscontrata una densità molto bassa per i batteri coltivabili, inoltre, sono stati individuati solo batteri Gram-positivi. In seguito all'identificazione dei batteri coltivabili, il sito 2a ha mostrato la similarità più bassa in confronto agli altri siti. L'attività microbica è stata riscontrata solo nei siti 1b e 2b.

La tecnica PCR-DGGE è stata applicata per lo studio della comunità batterica totale, di quella metabolicamente attiva e della frazione coltivabile. In accordo con i dati relativi all'identificazione dei batteri della frazione coltivabile ottenuta con lo studio dei profili metabolici, l'analisi dei profili molecolari ottenuti con la tecnica DGGE ha evidenziato una netta distinzione di quello della comunità batterica coltivabile del sito 2a rispetto a quelli degli altri siti.

I profili DGGE della comunità batterica totale e di quella metabolicamente attiva sono caratteristici per i quattro siti studiati ed i cluster ottenuti mostrano una correlazione con il tipo di inquinanti presenti in ciascun sito. La presenza di possibili specie chiave in ciascun sito è stata valutata considerando le sequenze ottenute dalle bande del DGGE delle specie totali e di quelle attive.

In virtù del fatto che i risultati ottenuti con le analisi microbiologiche mostrano una chiara correlazione con i dati chimici, si può ipotizzare che l'impiego di questo approccio microbiologico polifasico e dei microrganismi come bioindicatori intrinseci siano adeguati per la valutazione dello stato di salute del suolo.

# THE FATE AND ECOLOGICAL RELEVANCE OF EXTRACELLULAR DNA IN SOIL

Giacomo Pietramellara<sup>1</sup>, Richard Jeannotte<sup>2</sup>, Martha Hawes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Florence, Dept. of Plant, Soil and Environmental Sciences, Italy

<sup>2</sup>University of California, Davis, School of Veterinary Medicine Population Health & Reproduction, USA

<sup>3</sup>University of Arizona, Dept. of Soil Water and Environmental Sciences, USA

Email: [giacomo.pietramellara@unifi.it](mailto:giacomo.pietramellara@unifi.it)

Chemical characteristics of organic molecules underlie the soil organic matter cycle. Recent studies report that under varying soil environmental conditions, the stable and labile carbon pool could respectively be less or more recalcitrant to degradation. These theories perfectly explain the fate of extracellular DNA (eDNA) in soil, as reported in several research and review papers published in the last years. The relevance of these studies results are clear when we consider the plethora of ecological functions in which eDNA is involved. This fraction can be actively extruded by living cells or discharged during cellular lysis and may exert a key role in the stability and variability of the soil bacterial genome. In fact, c eDNA the extracellular fraction of the mobile genetic information present in the soil environment, defined as *mobiloma*, available for bacterial competent cells capable to adopt transformation. This gene transfer strategy could permit to bacterial competent cell to acquire genes to increase its survival capacity, such as those encoding resistance to toxic molecules and/or or production of defensive molecules. Moreover, bacterial eDNA acquisition could also represent a mechanism to repair damaged genomic DNA fragments, contributing to genome stability.

The adhesive properties of the DNA molecule confer to eDNA at high concentrations the capacity to inhibit or kill pathogenic bacteria by *cation limitation induction*, and to facilitate the formation of biofilm and extracellular traps (ETs), that may protect microorganisms inhabiting biofilm and plant roots against pathogens and allelopathic substances. Moreover, eDNA at *sub-inhibitory concentration* could create a cation limited environment that cause an inducible antibiotic resistance in biofilm inhabiting bacteria. Finally the cation limitation induction may also represent an eDNA self-defence from DNases degradation due to Mg<sup>2+</sup> limitation, cation required as co-factor by DNases. The ecological relevance of ETs, actively extruded by root border cells when they are dispersed in the rhizosphere, consist in empower plants to extend an endogenous pathogen defensive system outside the organism.

One of the most promising areas for future development is the manipulation of the rhizosphere to produce sustainable and efficient agriculture production systems. Using Omics approaches, to define the distinctive features of eDNA systems and structures, will facilitate progress in rhizo-enforcement and biocontrol studies.

Finally the relevance of eDNA from soil bacteria could also be extended to human health applications. In fact, one of the most modern and sufficiently perspective trends in immunotherapy, particularly against cancer, is to culture selected soil inhabiting bacteria to obtain an eDNA rich in cytosine-guanine (CG) dinucleotides with respect to mammalian cells, that confer to these molecules a high immuno-stimulatory activity. An example is the so called CpG island rich eDNA (C and G are connected by a phosphodiester bond), obtained from soil *Bacillus subtilis* culture medium filtrate (CMF). Moreover the knowledge of the complex molecular mechanism that affect DNA release, the biofilm development and the induction of antibiotic resistance in biofilm inhabiting bacteria, may be useful for creating strategies to control biofilm formation and eradicate persistent infections.