

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata XXII ciclo**  
**Curriculum in ECOLOGIA**

*Diversità genetica ed attività della microflora  
di suoli a diverso impatto antropico*

Coordinatore:  
Prof. Ezio Ricca

Candidato:  
Dott. Fabiano De Luca Picione

Tutore:  
Dott.ssa Giulia Maisto

Tutore esterno:  
Dott.ssa Sonia Manzo

A.A. 2008–2009

*A Fabiano*

## **INDICE**

<b>PREMESSA</b> .....	1
-----------------------	---

### **CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE**

1.1. Il suolo come sistema biologico.....	3
1.2 La biodiversità.....	7
1.3 La diversità strutturale e funzionale dei suoli .....	9
1.4 Le comunità microbiche dei suoli e le loro funzioni.....	14
1.5 Fattori che influenzano diversità e attività delle comunità microbiche del suolo .....	18
1.6 Metodi di studio delle comunità microbiche dei suoli.....	21
1.6.1 Metodi coltura–dipendenti per lo studio della diversità delle comunità microbiche dei suoli .....	22
1.6.2 Metodi coltura–indipendenti per lo studio della diversità delle comunità microbiche dei suoli .....	24
1.6.2.1 Analisi degli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana (PLFA).....	24
1.6.2.2 Contenuto di guanina più citosina.....	25
1.6.2.3 Metodi per lo studio della diversità genetica delle comunità microbiche dei suoli .....	25
1.6.3 Attività microbica.....	31

### **CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA RICERCA**

2.1 Scopo della ricerca .....	34
-------------------------------	----

### **CAPITOLO 3 - STUDIO DELLA MICROFLORA EDAFICA IN SUOLI A DIFFERENTE TIPOLOGIA ED USO**

3.1 Premessa.....	35
3.2 Aree di studio .....	35
3.3 Piano sperimentale .....	37

3.4 Caratterizzazione dei suoli per tessitura, pH, contenuto di sostanza organica, tenore idrico e capacità idrica massimale.....	38
3.5 Estrazione del DNA totale dai suoli.....	39
3.5.1 Metodi classici .....	39
3.5.1.1 Estrazione diretta.....	40
3.5.1.2 Estrazione indiretta.....	42
3.5.2 Metodi commerciali .....	43
3.5.2.1 Estrazione del DNA con il FastPrep <sup>®</sup> System .....	43
3.5.2.2 Estrazione dell'RNA mediante RNA PowerSoil <sup>™</sup> Total RNA Isolation Kit.....	44
3.6 Caratterizzazione qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici.....	45
3.6.1 Metodo spettrofotometrico.....	45
3.6.2 Metodo elettroforetico.....	46
3.7 Purificazione del DNA estratto .....	48
3.7.1 Purificazione mediante gel elettroforesi.....	48
3.7.2 Purificazione mediante cesio cloruro .....	49
3.8 Amplificazione del DNA mediante Polymerase Chain Reaction .....	50
3.9 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis .....	52
3.10 Attività microbica .....	53
3.11 Elaborazione dei dati.....	55

## **CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE**

4.1 Caratteristiche dei suoli.....	57
4.2 Definizione di un metodo coltura–indipendente per lo studio della microflora edafica.....	59
4.3 Studio della microflora dei suoli con tecniche molecolari.....	64
4.3.1 Quantità e qualità degli acidi nucleici nei suoli .....	64
4.3.2 Rapporto RNA/DNA come indice biochimico dell'attività della microflora edafica .....	68
4.3.3 Diversità genetica delle comunità batteriche dei suoli.....	69
4.4 Studio dell'attività della microflora edafica con tecniche coltura–indipendenti.....	73
4.4.1 Quantità e qualità del DNA nei suoli .....	73

4.4.2 Respirazione dei suoli per la valutazione dell'attività della microflora edafica .....	76
4.5 Relazioni tra le proprietà chimiche, fisiche e biologiche dei suoli .....	78

## **CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI**

5.1 Conclusioni .....	85
-----------------------	----

## **CAPITOLO 6 – BIBLIOGRAFIA**

6.1. Bibliografia .....	87
-------------------------	----

## **PREMESSA**

Lo studio del suolo, come componente di sistemi complessi quali sono gli ecosistemi terrestri, rappresenta un aspetto di fondamentale importanza per la comprensione del suo funzionamento. Il suolo è stato per molto tempo considerato prettamente come superficie inerte per le diverse forme di insediamento e come fonte di risorse necessarie allo sviluppo delle popolazioni umane. Ma, se da un lato il prelievo di tali risorse e le attività ad esso correlate hanno permesso un miglioramento delle condizioni medie di vita, soprattutto per le popolazioni occidentali industrializzate, dall'altro hanno portato ad una decrescente qualità delle condizioni del suolo. Tali modifiche delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche, spesso drastiche ed irreversibili, sono talvolta osservabili anche a notevole distanza dai siti dove sono concentrate le stesse attività antropiche. Nonostante i suoli presentino, in molti casi, una capacità naturale di attenuazione dei processi di degradazione, spesso essi non sono in grado di contrastare l'azione dell'uomo mantenendo inalterate le proprie caratteristiche. Da qui, la presa di coscienza della vulnerabilità del sistema suolo, nonché la non inesauribilità delle sue risorse, hanno dato il via ad un cambiamento radicale nell'approccio di utilizzo del suolo stesso. Infatti, si è posta molta attenzione nell'utilizzo delle risorse del sottosuolo, sia per la riduzione significativa delle scorte che per i problemi legati alla produzione delle varie forme di inquinamento, soprattutto con la ricerca di vie alternative a basso impatto per la produzione di energia; inoltre, tutte le attività svolte sulla superficie terrestre, quelle che sono strettamente legate al suolo come quelle che interagiscono solo indirettamente con esso, sono state riconsiderate per un corretto uso del territorio mirato alla conservazione degli ambienti naturali in quanto patrimonio dell'umanità, e al mantenimento di livelli di qualità compatibili con la vita dell'uomo.

Nell'ottica della conservazione di un ambiente naturale, le sue caratteristiche abiotiche (geologiche e climatiche in primis) e biotiche (comunità viventi) rappresentano i fattori oggetto di studio nella decisione della destinazione d'uso di un dato sito. La salvaguardia del suolo dalla degradazione fisica (es. erosione) e chimica (es. inquinamento, acidificazione) risulta particolarmente importante ai fini del mantenimento della capacità del sistema suolo di assolvere

alle molteplici funzioni che permettono di conservare, dinamicamente, un equilibrio tra le due diverse componenti. La vita degli organismi che abitano il suolo è strettamente dipendente dalle sue condizioni chimico-fisiche e ne è, allo stesso tempo, diretta responsabile. Una perturbazione, anche di piccola entità, da uno stato di equilibrio di tale complesso sistema, può essere caratterizzata da una serie di reazioni da parte delle componenti. Il risultato può essere il ritorno alla situazione iniziale (elevata resistenza), oppure il raggiungimento di un nuovo stato di equilibrio anche molto diverso da quello iniziale (bassa resistenza). La struttura delle comunità subisce talvolta modificazioni significative portando nella maggior parte dei casi ad una riduzione della diversità biologica complessiva. La biodiversità è alla base del delicato equilibrio che regola gli ecosistemi terrestri e la natura nel suo complesso, ed una sua perdita potrebbe avere conseguenze imprevedibili sulla vita di ogni essere.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Il suolo come sistema biologico

Il suolo può essere considerato come la pelle, vivente, della Terra (Pepper *et al.*, 2009). Nel suolo, quella solida rappresenta la fase dominante. Essa consiste di particelle di diverse dimensioni costituite da organismi viventi, componenti inorganici (minerali) ed organici (resti di piante, animali e microrganismi, e humus), sia come entità indipendenti che in varie forme di aggregazione (Pietramellara *et al.*, 2002). La componente inorganica del suolo consiste di particelle di varia natura e dimensione, dalle sabbie (mm) al silt all'argilla ( $\mu\text{m}$ ), che sono responsabili dell'area superficiale dei costituenti abiotici che, a loro volta, influenzano le reazioni chimiche e i processi di trasformazione dei componenti sia abiotici che biotici del suolo stesso. La chimica che interessa lo strato superficiale del suolo è inoltre responsabile della biodisponibilità dei nutrienti.

Le reazioni chimiche che avvengono nel suolo dipendono dall'area e dalla carica superficiali delle particelle. L'area superficiale, la quale deriva direttamente dalle dimensioni e dalla forma delle particelle, nel suolo è in larga misura dovuta alle particelle di dimensioni  $\leq 2 \mu\text{m}$  e alla sostanza organica (principalmente la frazione umica). Tali particelle comprendono sia materiale inorganico, come le argille, che la sostanza organica derivante dalla decomposizione microbica dei residui vegetali (Pepper *et al.*, 2009; Pietramellara *et al.*, 2002). La carica del suolo associata a queste due frazioni (particelle argillose e sostanza organica), deriva dai meccanismi di sostituzione isomorfica e di ionizzazione dei gruppi funzionali che avvengono sulla superficie delle particelle dei minerali argillosi, degli ossidi, idrossidi e della sostanza organica. Il primo meccanismo consiste nella sostituzione di uno ione da parte di un altro di dimensioni simili ma carica diversa. Tale sostituzione solitamente avviene durante la cristallizzazione dei minerali ed è indipendente dalle condizioni ambientali. Nel secondo caso, invece, i gruppi funzionali (carbossile, idrossile, fenolico ed amino) sulla superficie particellare perdono o acquistano ioni  $\text{H}^+$ ; in questo caso la carica dipende essenzialmente dal pH del suolo. La carica risultante può essere quindi permanente oppure pH-dipendente, e il contributo delle due diverse forme

dipende sostanzialmente dalla composizione delle particelle colloidali e dall'ambiente ionico in cui il suolo si è formato (Bohn *et al.*, 1990). Alla luce di tali informazioni sono definite colloidali le particelle di dimensioni  $\leq 2 \mu\text{m}$  dalla elevata area superficiale e carica superficiale (Pietramellara *et al.*, 2002).

Il suolo, per la sua elevata eterogeneità chimica e fisica a piccola scala, per le caratteristiche microclimatiche e per la fenologia degli organismi che favoriscono lo sviluppo e il mantenimento di una grande varietà di nicchie, ospita una comunità molto diversificata e complessa (Ettema and Wardle, 2002; Tiedje *et al.*, 2001). Il suolo comprende un numero grandissimo di organismi come vermi, nematodi, artropodi, batteri, funghi e protozoi, che rivestono un ruolo importante nella salute delle piante guidando il ciclo dei nutrienti attraverso la decomposizione, la mineralizzazione, l'immagazzinamento ed il rilascio degli stessi nell'ambiente. Il biota del suolo è classificato in base alle dimensioni in microflora (1–100  $\mu\text{m}$ , es. batteri e funghi), microfauna (5–120  $\mu\text{m}$ , es. protozoi, nematodi), mesofauna (0.08–2 mm, es. collemboli, acari), macrofauna (2–20 mm, es. lombrichi, coleotteri, araneidi, molluschi).

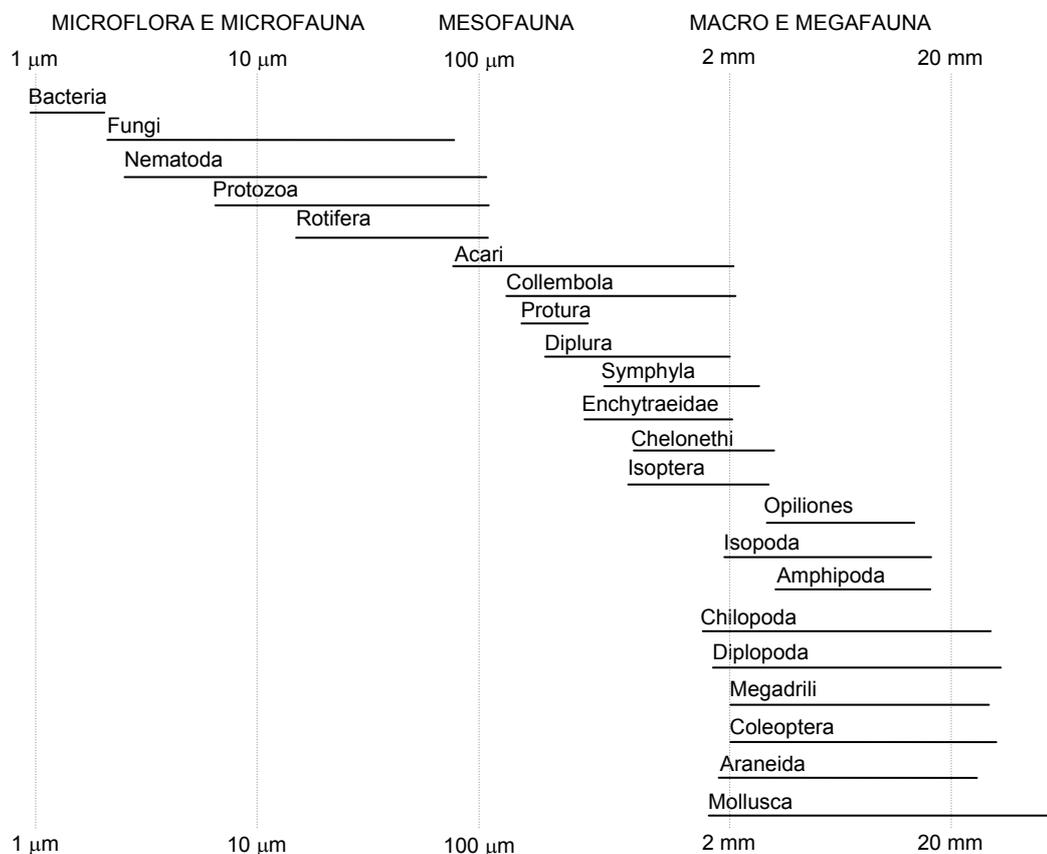


Figura 1.1. Classificazione dimensionale degli organismi (da Swift *et al.*, 1997 mod.)

(500  $\mu\text{m}$ –50 mm, es. vermi, termiti) e megafauna (>20 mm, insetti, lombrichi, mammiferi) (fig. 1; Swift *et al.*, 1979). Gli assemblaggi di tali organismi sono tra i più complicati, facendo del suolo tra gli habitat terrestri quello con la maggiore diversità. Si pensi che un solo grammo di suolo può contenere diverse migliaia di specie di batteri (Torsvik *et al.*, 1996), e delle 1500000 specie di funghi esistenti molto poco si conosce dei funghi del suolo (18000–35000 le specie conosciute), eccetto che per le specie patogene e micorriziche più comuni. Tra la fauna del suolo, è stata stimata l'esistenza di circa 200000 specie di protozoi (Wall *et al.*, 2001), 500000 specie di nematodi (Hawksworth and Mound, 1991), e 3000 specie di vermi (Lee, 1985), senza menzionare gli altri gruppi di invertebrati della mesofauna (collemboli, acari ed enchitreidi) e della macrofauna (formiche, termiti, coleotteri e ragni).

La microfauna è principalmente costituita da nematodi, protozoi (ciliati e amebe) e alcuni acari. Tali organismi sono legati al film d'acqua che occupa i pori del suolo, della rizosfera e della lettiera. Essi si nutrono soprattutto predando batteri e altri organismi della microfauna.

Gli organismi della mesofauna del suolo (collemboli, acari, proturi, dipluri, enchitreidi, ecc.) si nutrono soprattutto di miceli fungini, batteri e piccoli insetti. Attraverso la produzione di feci dalle caratteristiche (superficie e composizione) tali da avere una capacità di trattenere acqua maggiore di quella della lettiera, essi rivestono un ruolo importante nella formazione del suolo.

Gli organismi della macrofauna, (termiti, lombrichi, ecc.) con la loro attività sono in grado di alterare la disponibilità delle risorse modificando le proprietà fisiche di suolo e lettiera. Scavando gallerie e rompendo aggregati modificano la densità del suolo, incrementando l'aerazione e l'infiltrazione di acqua. Attraverso il mescolamento del suolo i lombrichi tendono a sfavorire la formazione di orizzonti distinti. Batteri ospiti mutualisti vivono nell'apparato digerente dei lombrichi stimolati dal suolo ingerito mescolato alle loro secrezioni. Nelle praterie delle regioni temperate, i lombrichi sono in grado di elaborare fino a 4 kg di suolo per metro quadrato al giorno; tale capacità geomorfica è superiore di alcuni ordini di grandezza a quelle del ruscellamento e dell'erosione. I primi studi relativi al ruolo della fauna del suolo negli ecosistemi terrestri risalgono alla fine del XIX secolo e riguardano proprio i lombrichi. Famosi sono gli studi di Darwin (1881) sulla loro capacità di produrre “muffa vegetale” risultante

dall'attività alimentare e dal mescolamento del materiale del suolo sia minerale che organico. Egli osservò la capacità degli oligocheti di movimentare grandi quantità di suolo, e dimostrò che questo gruppo rappresenta uno tra i più importanti coinvolti nella formazione del suolo stesso. Feller *et al.* (2003) Gli studi del naturalista inglese e di studiosi contemporanei sull'attività di questi organismi, ne evidenziano le principali funzioni negli ecosistemi terrestri.

Appartenenti alla macrofauna, le termiti, più abbondanti nelle regioni tropicali, sono particolarmente importanti nella formazione del suolo per la loro capacità di digerire la cellulosa della lettiera ingerita grazie alla presenza di protozoi mutualisti presenti nel loro intestino.

La fauna del suolo con la sua attività è in grado di migliorarne la fertilità e la produzione primaria. La capacità da parte della componente biotica del suolo di migliorarne le caratteristiche è stata confermata da abbondanti studi (Huhta, 2007). La fauna del suolo è diretta responsabile della decomposizione frammentando e trasformando la lettiera, utilizzandola come fonte di nutrimento e controllando in tal modo le popolazioni di batteri e funghi, e alterando la struttura del suolo stesso. La fauna del suolo ha un ruolo critico nelle dinamiche di carbonio e azoto nel suolo. Infatti, i microrganismi contengono il 70–80% di C e N labile del suolo, per cui variazioni della pressione predatoria su essi altera il turnover di C e N nel suolo. Nel suolo è presente una considerevole biomassa microbica che oscilla tra 110 e 2240 kg di C per ettaro (Smith and Paul, 1990). L'attività microbica nel suolo è di primaria importanza nel funzionamento del suolo stesso, al punto da influenzare l'importanza delle reazioni di tipo abiotica, le quali rivestono un ruolo importante nell'attività metabolica del suolo solo in caso di condizioni ambientali estreme (elevata temperatura ed umidità ridotta), cioè quando l'attività microbica è ridotta.

Benché gli organismi che vivono nel suolo (microflora, microfauna, mesofauna e macrofauna), comprese le radici delle piante, siano importanti, i batteri e i funghi, componenti la microflora, sono quelli da cui dipendono in gran parte le reazioni biotiche del suolo. Per questo motivo la qualità del suolo è in relazione principalmente alla sua attività microbiologica, da non confondersi con l'attività biologica del suolo; quest'ultima, solitamente viene misurata in campo ed è dovuta, oltre all'attività respiratoria della microflora, anche a quella degli animali presenti nel suolo e quella delle radici (Nannipieri *et al.*, 1990). La fauna

del suolo è responsabile solo del 5% della respirazione del suolo, così il maggior effetto sulla decomposizione è la sua stimolazione della biomassa microbica attraverso la frammentazione, piuttosto che la processazione respiratoria per la loro sussistenza energetica.

Lo spazio occupato dagli organismi viventi nel suolo è solitamente molto piccolo (meno dell'1%). I microrganismi sono localizzati in microhabitats, le cui caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche, variano nel tempo e nello spazio. L'alta variabilità delle proprietà dei microhabitats si pensa sia alla base della elevata diversità microbica nel suolo. Sulla base del DNA estratto dal suolo Torsvik e collaboratori (1996) hanno stimato che la diversità batterica nel suolo è dell'ordine di oltre 10000 genomi equivalenti. Considerando che con i normali metodi di conteggio delle CFU si possono trovare fino a  $10^9$  microrganismi coltivabili per grammo di suolo, resta da definire in modo più accurato il concetto di biodiversità microbica del suolo.

La biomassa microbica del suolo rappresenta la massa dei microrganismi di dimensioni inferiori a 5  $\mu\text{m}$ , ovvero la frazione vivente della sostanza organica del suolo escluse le radici delle piante e la pedofauna. In generale il contenuto di C microbico è correlato in modo significativo al contenuto di C organico del suolo, con un rapporto carbonio microbico/carbonio organico compreso in media tra 1 e 5 % in peso (Carter, 1991). Il contenuto di carbonio della biomassa microbica rappresenta circa il 2% del carbonio totale del suolo, che corrisponde a circa 20 mg di  $C_{\text{mic}}$  per g di  $C_{\text{org}}$ . Il rapporto  $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$  è in relazione con la tipologia di suolo e il suo uso. Esso può aumentare sensibilmente nei suoli agricoli sottoposti a rotazione colturale, anziché coltivati a monocoltura, o ad arricchimenti con letame o residui organici; quest'ultima pratica, per la presenza nei residui organici aggiunti di frazioni facilmente degradabili, stimola la crescita batterica (Chander *et al.*, 1997; Insam *et al.*, 1991).

## **1.2 La biodiversità**

Il termine biodiversità è una abbreviazione di diversità biologica che è divenuta di uso comune recentemente, specialmente dopo la dichiarazione di Agenda 21, un documento scaturito dalla Conferenza delle Nazioni Unite sullo Sviluppo e l'Ambiente tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992. Tale documento promuoveva la collaborazione scientifica a livello internazionale per incrementare

le conoscenze sulla biodiversità e le sue funzioni negli ecosistemi. La biodiversità può essere definita come l'insieme delle specie vegetali ed animali, del loro materiale genetico e gli ecosistemi a cui appartengono, e comprende ecosistemi, specie e diversità genetica. La diversità biologica è una funzione del tempo (evoluzione) e dello spazio (distribuzione geografica). Mentre la diversità a livello di ecosistemi definisce il numero e l'abbondanza degli habitat, delle comunità biotiche e degli ecosistemi all'interno dei quali i diversi organismi vivono e si evolvono, la diversità specifica riguarda il numero e l'abbondanza delle specie presenti in una data area. La diversità specifica si basa sulla definizione di specie quale "gruppo di individui in grado di riprodursi all'interno del gruppo e garantire una progenie feconda dalle medesime caratteristiche morfologiche e, quindi, capace di perpetuare la specie stessa" (Lynch *et al.*, 2004). Secondo questa definizione, tutti gli individui di una specie dovrebbero mantenere le caratteristiche proprie di quella specie. Questo, però, non può essere applicato agli organismi che si riproducono asessualmente, ad esempio i batteri ed i virus. La diversità genetica riguarda la variazione dei geni e del genotipo all'interno delle specie. Essa consiste nell'intero set di informazione genetica contenuta nei geni di tutti gli animali, i vegetali e i microrganismi che popolano la Terra. Le specie sono composte di individui aventi ciascuno un insieme di caratteristiche ereditarie, o genetiche, uniche. Secondo le attuali teorie sull'evoluzione, ogni singola specie è in grado di evolversi ed adattarsi ai cambiamenti ambientali grazie alla variabilità genetica ed alle capacità adattative (Ohtonen *et al.*, 1997).

Il principale ruolo della biodiversità è senza dubbio quello di assicurare la moltitudine delle funzioni che possono essere attribuite agli organismi che vivono in un dato ecosistema. Un secondo ruolo, interrelato al primo, è di assicurare che tali funzioni biologiche siano mantenute in condizioni di stress, ovvero al sopraggiungere di una perturbazione (Giller *et al.*, 1997). La variabilità genetica all'interno delle specie e tra le specie conferisce resistenza alle perturbazioni. Una specie con una maggiore resistenza a un determinato stress più probabilmente diventerà predominante di fronte a quello stress. Se l'adattamento genetico alle condizioni di stress è rapido, come avviene per gli organismi dal ciclo biologico molto breve, individui dalle caratteristiche nuove possono emergere e mascherare gli effetti dovuti alle perturbazioni. Ma, se si assume che la velocità di adattamento non è tanto alta da annullare gli effetti dovuti alle condizioni di

stress, allora si avranno effetti sul funzionamento di un ecosistema solo nel caso in cui sarà raggiunta una soglia al disotto della quale ci sono insufficienti individui in grado di svolgere un dato processo (Giller *et al.*, 1997). In quest'ottica, quindi, le funzioni più sensibili sono quelle svolte da un numero limitato di specie. Un esempio è dato dal caso estremo dei batteri appartenenti al genere *Rhizobium*, dove la scomparsa di una singola specie può comportare la perdita totale della fissazione dell'azoto atmosferico da parte di una specifica leguminosa ospite.

Attualmente c'è una evidenza sperimentale crescente secondo cui, in un dato ecosistema, molti organismi sono ridondanti dal punto di vista funzionale, e, inoltre, le caratteristiche funzionali delle specie componenti sono importanti almeno quanto il numero delle specie nel mantenimento delle funzioni essenziali dell'ecosistema stesso (Andren and Balandreau, 1999; Bardgett and Shine, 1999). Se si considerano le singole funzioni della biodiversità all'interno di un ecosistema si noterà una molteplicità di specie in grado di svolgerla, mentre, se si osservano le specie singolarmente, l'insieme dei processi di cui esse sono responsabili sarà lontano dall'essere ripetitivo. Inoltre, organismi funzionalmente simili, avranno esigenze diverse per vivere, sia dal punto di vista ambientale che fisiologico (Giller *et al.*, 1997). Secondo Nannipieri e collaboratori (2003) è necessario un numero minimo di specie per garantire il funzionamento di un ecosistema in condizioni stazionarie, e che un numero più grande di specie sia essenziale per il mantenimento di processi stabili in un ambiente in evoluzione (Loreau *et al.*, 2001).

### **1.3 La diversità strutturale e funzionale dei suoli**

Il suolo ospita una porzione molto importante della biodiversità delle Terra. Sebbene i suoli siano stati ampiamente studiati in termini delle loro caratteristiche chimiche e fisiche, le conoscenze relative alla biodiversità e alle sue funzioni sono ancora carenti (Swift *et al.*, 2004). Gli studi relativi agli ecosistemi terrestri si basano principalmente sulle osservazioni effettuate al di sopra della superficie terrestre, mentre pochi studi sono stati condotti tenendo conto di ciò che accade al disotto di essa (Griffiths *et al.*, 2000; Ohtonen *et al.*, 1997; Wardle and Giller, 1996).

La misurazione della biodiversità dei suoli incontra diversi ostacoli, tra i quali quelli relativi al campionamento e all'estrazione degli organismi dal suolo.

Per esempio, anche la dispersione del suolo attraverso la semplice agitazione può risultare in forze trasversali tra le particelle. Inoltre, le dimensioni del campione devono essere determinate considerando sia l'ecologia degli organismi in questione che l'eterogeneità spaziale dell'habitat oggetto di studio. Ad esempio, animali di dimensioni relativamente grandi come le termiti, possono foraggiare a distanze fino a 50 m dal proprio nido (Wood, 1998), e in volo possono spostarsi fino a distanze molto maggiori, mentre animali di piccole dimensioni sono relativamente sedentari. Anche tra i microrganismi, i funghi basidiomiceti sono in grado di foraggiare oltre diversi metri (Dowson *et al.*, 1988), ed è stato osservato un singolo individuo coprire una superficie di più di 15 ettari (Smith *et al.*, 1992), mentre l'habitat per i batteri viene stimato in modo più efficiente in termini di microaggregati (Harris, 1994). Assume infatti particolare importanza la dimensione del campione, le cui dimensioni ottimali sono determinate considerando il punto al di sopra del quale per incrementi delle dimensioni non si hanno aumenti significativi del numero delle specie campionate. Qualunque sia l'approccio di campionamento adottato è comunque difficile evitare il sottocampionamento degli individui rari (Giller *et al.*, 1997).

Una volta scelto un campione rappresentativo, la stima della diversità all'interno di quel campione soffre di molteplici difficoltà. Per i microrganismi del suolo, è stato stimato che i metodi di isolamento dei batteri permettono di recuperare solo l'1% di quelli presenti nel suolo (Torsvik and Øvreås, 2002). Tale limitazione risiede soprattutto nella selettività dei substrati impiegati, i quali favoriscono l'isolamento dei gruppi dalla crescita più rapida e sottostimano i gruppi dalla crescita lenta, magari più specializzati nella degradazione di substrati più complessi. I problemi legati all'uso di media selettivi per lo studio della diversità delle comunità microbiche dei suoli, possono essere risolti con l'estrazione diretta di DNA, sebbene sia ancora difficile ottenere materiale pulito dai microrganismi del suolo. Lo studio dei microrganismi del suolo può basarsi sui caratteri genetici e fenotipici, ovvero essere puramente funzionale, anche se in molti casi si basa sulla combinazione dei diversi metodi. Fino a qualche decennio fa, la classificazione dei batteri si basava quasi esclusivamente sui caratteri morfologici e funzionali. Attualmente, le tecniche di biologia molecolare stanno rivoluzionando le conoscenze sulle relazioni tra le specie di batteri del suolo. Esse, almeno teoricamente, possono essere applicate a tutti i gruppi tassonomici,

sebbene i batteri si prestino particolarmente bene a queste analisi. Le tecniche di biologia molecolare permettono di analizzare la diversità del DNA estratto direttamente dal suolo e di studiare a livello genetico la biodiversità delle comunità microbiche (Griffiths *et al.*, 1996).

La ricchezza in specie è una misura ben definita della diversità, sebbene è molto improbabile che essa riesca ad identificare e contare tutte le specie presenti anche in un solo ecosistema. Dal punto di vista funzionale le specie non sono tutte uguali, e, in generale, negli ecosistemi sono presenti specie il cui ruolo è tanto importante che la loro rimozione causerebbe un cambiamento significativo della funzione dell'ecosistema stesso (Griffiths, 1997). Un gruppo funzionale può essere definito come un gruppo di organismi che sono responsabili di un processo in un modo molto simile. Molti gruppi funzionali sono definiti rispetto ad alcune delle funzioni di un ecosistema. Da qui la possibilità di spiegare la funzione dell'ecosistema facendo riferimento alla diversità oppure alla presenza di determinati gruppi funzionali, ma questo impone una certa circolarità concettuale. Ciononostante, l'uso della diversità dei gruppi funzionali fornisce un legame tra una misura della diversità e la funzione, sebbene gli effetti della diversità dei gruppi funzionali possono provare, attualmente, la capacità di definire propriamente i gruppi funzionali, piuttosto che gli effetti della diversità (Jones and Bradford, 2001).

Sebbene molti autori ritengono che la misura della diversità funzionale dell'ecosistema sia il modo più efficiente ed utile per descrivere la biodiversità del suolo, bisogna anche essere consci che i gruppi funzionali definiti rispetto ad una particolare funzione spesso non sono gli stessi se definiti rispetto ad un'altra funzione. Nella comprensione di un ecosistema, quindi, risulta molto importante individuare la funzione che si sta considerando. Infatti, gli effetti che una specie o un gruppo funzionale può avere sui processi dell'ecosistema (produttività, decomposizione, ciclo dei nutrienti), sulla stabilità dell'ecosistema (resistenza e resilienza), sulla composizione e la stabilità della comunità possono essere molto diversi. Fondamentale è quindi l'individuazione del gruppo funzionale nell'ecosistema in studio. Infatti, i gruppi funzionali relativi al ciclo dell'azoto saranno diversi da quelli coinvolti nei processi di detossificazione. Inoltre, di particolare importanza risulta il tipo di diversità quale rilevante nel mantenimento della funzione di un ecosistema: considerare la diversità a più livelli, quali la

diversità dei gruppi funzionali, la diversità delle specie all'interno dei gruppi funzionali, e la diversità genetica nelle specie. Un'altra domanda a cui si dovrebbe trovare una risposta è quella relativa alle scale spaziale e temporale più appropriate allo studio dell'ecosistema suolo. Ad esempio, nel caso della produttività delle piante la scala a livello della rizosfera e quella temporale legata alla stagione di crescita dovrebbero essere le più rilevanti. Ci si potrebbe anche chiedere quanto gli effetti della diversità di un ecosistema siano importanti per il funzionamento dello stesso. In tal caso è importante considerare fattori quali la composizione e la stabilità delle comunità, in quanto, in termini funzionali, ci si aspetterebbero maggiori effetti in ambienti caratterizzati da fluttuazioni ripetute e da una certa povertà in specie. Infatti, ambienti fluttuanti richiedono un'elevata diversità per resistere alle perturbazioni, e la riduzione della diversità può comportare effetti sul funzionamento maggiormente durante le fluttuazioni che nei periodi di stabilità. Analogamente, negli ambienti poveri in specie, c'è una più alta probabilità che la perdita di diversità possa comportare la scomparsa di specie chiave responsabili di un dato processo. Per esempio, la scomparsa del 50% delle specie da un gruppo funzionale con diverse centinaia di specie avrà un effetto molto ridotto rispetto alla stessa perdita da un gruppo funzionale costituito da dieci specie. Naeem and Li (1998), hanno determinato dei microcosmi microbici replicati variando il numero delle specie per gruppo funzionale. Essi hanno trovato che al crescere del numero di specie per gruppo funzionale le comunità replicate erano più consistenti in biomassa e densità, suggerendo che la ridondanza (più specie responsabili dello stesso processo all'interno di un gruppo funzionale) può rappresentare un valido strumento per la preservazione della biodiversità in talune condizioni.

La considerazione della biodiversità nell'ecosistema suolo solo teoricamente può adattarsi ai microrganismi così come alla fauna. Infatti, motivi di tipo pratico impongono uno studio delle comunità microbiche dei suoli che tenga conto delle dimensioni e dei tempi a cui avvengono i processi di cui i microrganismi sono responsabili e che sono di fondamentale importanza per il funzionamento dell'ecosistema. Alla luce di queste considerazioni si può affermare che il funzionamento degli ecosistemi è il risultato di processi complessi che avvengono in modi difficilmente prevedibili e misurabili, e che tali

processi cambiano di intensità, aumentando o riducendosi, in risposta alle fluttuazioni della diversità dell'ecosistema a tutti i suoi livelli.

Nonostante molti studi sul funzionamento dell'ecosistema suolo siano stati condotti considerando le relazioni tra la diversità e le funzioni dello stesso al di sopra della superficie, di fondamentale importanza è lo studio di tali relazioni considerando gli organismi che vivono all'interno del suolo stesso. Gli studi già condotti sulla fauna del suolo suggeriscono che la composizione specifica risulta più importante della ricchezza specifica (Jones and Bradford, 2001). Tali esperimenti consistono generalmente nell'osservazione di alcuni processi in risposta ad azioni sulla composizione specifica di ecosistemi simulati in condizioni controllate. In uno di questi studi, Setälä e collaboratori (Setälä *et al.* 1998) hanno valutato le relazioni tra numero di specie, diversità dei gruppi funzionali e processi dell'ecosistema impiegando un mini-ecosistema in grado di simulare il piano di foresta boreale. Essi hanno mostrato che la produttività primaria non è sensibile né alla diversità specifica della fauna del suolo che si alimenta di batteri o detrito, né ai suoi predatori. Ad ogni modo, la rimozione di interi gruppi funzionali di organismi che si alimentano di batteri o detrito ha comportato la riduzione della mineralizzazione dell'azoto e della crescita delle piante.

In un altro esperimento, Faber and Verhoef (1991) hanno rimosso la fauna dalla lettiera di *Pinus nigra* (Coniferae, Pinaceae) e l'hanno reintrodotta in parte oppure non l'hanno reintrodotta per lo studio di mesocosmi in campo. Essi hanno osservato un aumento della mineralizzazione dei nitrati nel suolo dove solo una delle tre specie di Collembola era presente, mentre tale aumento non lo hanno osservato dove una delle altre due specie era presente. Le tre specie insieme non comportavano alcun effetto oltre il caso in cui una specie aveva effetti sui nitrati del suolo, mentre la reintroduzione completa della fauna ha mostrato un effetto significativo. Grazie a questo studio gli autori hanno concluso che il gruppo funzionale a cui appartengono i Collembola era decisivo nei processi che coinvolgono i nitrati del suolo.

Il cambiamento della diversità specifica in un gruppo di organismi può però comportare effetti anche nelle funzioni di altri gruppi. Questo risultato delle complesse interazioni biotiche che avvengono nella maggior parte degli ecosistemi, sono stati spiegati da diversi studi sperimentali. Per esempio, Naeem

*et al.* (2000) hanno modificato simultaneamente la diversità dei produttori e dei decompositori in ecosistemi acquatici. Essi hanno mostrato che la produzione di biomassa algale varia considerevolmente tra i microcosmi ma, né la diversità algale né quella batterica da sole potrebbero spiegarne la variazione. Secondo gli autori la produzione algale rappresenta una funzione combinata di entrambe le diversità algale e batterica. Sebbene la maggior parte dei progetti di ricerca in tale campo non monitori simultaneamente la diversità di tutti i gruppi di organismi, questa ipotesi potrebbe permettere una estrapolazione a tutti i gruppi.

Questi esperimenti portano a conclusioni sulle relazioni tra la diversità degli ecosistemi ed il loro funzionamento, ma, siccome i loro risultati sono sempre molto variabili, non permettono di sviluppare delle previsioni o teorie basate su specifiche funzioni dell'ecosistema in modo definitivo. I molteplici studi effettuati sia in campo che in micro- o mesocosmi, dimostrano comunque che gli effetti di una alterazione della biodiversità sul suolo sono inversamente proporzionali alla scala dimensionale; questo perché alla scala di campo ci sarà sempre maggiore eterogeneità, più specie e la possibilità di migrazione e colonizzazione. Questo tipo di esperimenti dovrebbe quindi essere condotto a scale dimensionali appropriate agli studi che si intende fare (Jones and Bradford, 2001).

#### **1.4 Le comunità microbiche dei suoli e le loro funzioni**

La microflora rappresenta la componente biotica più abbondante del suolo. Essa è costituita da un numero molto grande di specie microbiche, che includono batteri, attinomiceti, funghi e microalghe. Tra i vari gruppi, i batteri sono gli organismi più numerosi del suolo, infatti un grammo di suolo ne può contenere fino a  $10^9$ , mentre di attinomiceti, funghi, alghe e protozoi se ne possono trovare  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  e  $10^5$  individui rispettivamente (Pankhurst, 1997; Paul e Clark, 1996). I batteri costituiscono una parte importante della microflora del suolo per la loro abbondanza, la loro diversità in specie, e la molteplicità delle attività metaboliche di cui sono responsabili. I batteri costituiscono la parte più consistente della biomassa totale nel suolo (Brookes *et al.*, 1982) e rappresentano la principale componente del sottosistema dei decompositori che regolano il ciclo dei nutrienti, i flussi di energia e in ultimo la produttività degli ecosistemi. Essi rivestono un ruolo fondamentale nei cicli biogeochimici dei principali elementi (carbonio, azoto, zolfo, ecc.) e di quelli in traccia (ferro, nichel, mercurio, ecc.).

Inoltre, essi contribuiscono in modo importante nel regolare i flussi di gas serra (metano, ossidi di azoto e CO<sub>2</sub>) dal suolo.

Le condizioni ambientali possono influenzare fortemente la composizione e l'attività della microflora. I microrganismi manifestano forme di vita molto diverse da quelle autotrofe, litotrofe ed eterotrofe, con le forme eterotrofe responsabili del turnover della maggiore quantità di carbonio nel suolo. I microrganismi rappresentano il cibo di molti altri organismi del suolo. La predazione dei microrganismi, in particolare da parte di protozoi e nematodi, riveste un ruolo importante nel controllo della biomassa microbica e del mantenimento della diversità, evitando che determinati gruppi dominino. Questo è particolarmente vero per i batteri, i quali sono più sensibili al pascolamento (Wardle and Lavelle, 1997). Inoltre, essi sono responsabili della degradazione e mineralizzazione di materiali organici complessi, rilasciando minerali utili ad altri organismi. I microrganismi possono anche degradare una varietà di composti organici di origine antropica, anche dannosi per l'ambiente e per l'uomo stesso. Di conseguenza l'azione eterotrofa dei microrganismi è alla base del funzionamento dell'ecosistema suolo e può essere utilizzata per la determinazione della qualità del suolo (Winding *et al.*, 2005).

La diversità funzionale può essere definita come l'insieme di guilds (corporazioni) funzionali che conducono i diversi processi o i patterns di utilizzo delle fonti di carbonio che avvengono in una comunità. Quindi è importante sottolineare che i cambiamenti nella diversità microbica dovrebbero essere legati alla biodiversità funzionale con la determinazione della capacità delle specie batteriche di degradare i substrati con differenti composizione e disponibilità. Batteri e funghi sono generalmente di piccole dimensioni (<100 µm) e vivono nel film d'acqua presente tra le particelle del suolo e nei pori più piccoli. I movimenti di tali organismi nel suolo sono limitati e principalmente avvengono passivamente ad opera del flusso liquido. Tuttavia, l'alterazione delle condizioni ambientali può risultare in sostanziali modifiche della microflora (Winding *et al.*, 1997). Se da un lato sforzi notevoli sono stati fatti per indagare sui fattori responsabili della misura della biomassa microbica, pochi principi generali esistono sui modi della sua variabilità temporale, ovvero su quali sono i principali fattori che regolano questa variabilità (Wardle, 1998).

I microrganismi del suolo sono fondamentali per il mantenimento delle funzioni dei suoli, sia quelli non sottoposti all'azione dell'uomo che di quelli agricoli e forestali, per il loro coinvolgimento in alcuni processi chiave quali: la formazione della struttura del suolo; la decomposizione della sostanza organica; la rimozione delle sostanze tossiche; e il riciclo del carbonio, dell'azoto, del fosforo, e dello zolfo. Inoltre, i microrganismi giocano ruoli importanti nel controllo delle malattie da impoverimento dei suoli dovuto alla coltivazione delle piante, nel favorire la crescita delle piante, e nelle modifiche della vegetazione (Garbeva *et al.*, 2004).

Fin dagli anni '60 gli studi sono stati concentrati sull'impatto della diversità microbica sulla stabilità delle funzioni degli ecosistemi; recentemente si è assistito allo spostamento dell'interesse nell'effetto che la diversità delle comunità microbiche ha sulle funzioni ecologiche e sulla resilienza ai disturbi negli ecosistemi del suolo. Spesso le relazioni sono osservate tra la diversità microbica dei suoli, la qualità del suolo e delle piante, e la sostenibilità degli ecosistemi. In aggiunta, diversi studi hanno documentato la relazione tra il grado di soppressione dei suoli alle malattie delle piante e la diversità o l'abbondanza delle comunità microbiche dei suoli (Garbeva *et al.*, 2004). Che i trattamenti o la gestione del suolo abbiano effetti significativi sulla struttura delle comunità microbiche è stato ampiamente riconosciuto. L'applicazione di pesticidi, ammendanti, compost o concimi, e l'introduzione di microrganismi geneticamente modificati, sono tutte pratiche risultate avere effetti sulla struttura delle comunità microbiche. Le proprietà chimico-fisiche dei suoli, la distribuzione dimensionale delle particelle, la presenza e l'età di determinate specie vegetali, e la rotazione delle colture sono fattori determinanti (Garbeva *et al.*, 2004). L'idea che i batteri siano resistenti, resilienti e funzionalmente ridondanti è piuttosto diffusa in ecologia, alcuni gruppi microbici mostrano un elevato grado di flessibilità metabolica e tolleranza fisiologica al cambiamento delle condizioni ambientali (Meyer *et al.*, 2004), caratteristiche che potrebbero risultare in comunità microbiche resistenti a tali cambiamenti. Inoltre, queste ed altre caratteristiche legate ai microrganismi, come l'elevata abbondanza, la diffusa dispersione e i rapidi tassi di crescita, hanno portato a pensare che le comunità microbiche saranno anche resilienti ai cambiamenti. In più, i rapidi adattamenti evolutivi attraverso il trasferimento genico orizzontale (cioè il trasferimento indesiderato di

transgeni dalle piante geneticamente modificate ad organismi filogeneticamente lontani, attraverso trasformazione, coniugazione e trasduzione) potrebbero permettere ai microrganismi sensibili di adattarsi alle nuove condizioni ambientali e far tornare velocemente la comunità alla sua composizione originale (Allison and Martiny, 2008).

Le stime della diversità microbica del suolo vanno da migliaia a milioni di specie di batteri in solo pochi grammi di suolo (Gans *et al.*, 2005; Torsvik and Øvreås, 2002), e come questa diversità è legata ai processi degli ecosistemi è generalmente sconosciuto (Crawford *et al.*, 2005). Da studi condotti con metodi tradizionali di coltivazione è emerso che i batteri presenti nel suolo sono principalmente gram-positivi, in particolare varie specie dei generi *Clostridium* e *Bacillus*, attinomiceti (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Micrococcus*) e l'eterogeneo gruppo di organismi appartenenti al genere *Pseudomonas*. Altri generi solitamente isolati dal suolo includono gli *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Metallogenium*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Xanthomonas* (Liesak *et al.*, 1997).

Recentemente gli studi delle comunità microbiche si stanno occupando delle relazioni esistenti tra la diversità microbica dei suoli e i cambiamenti a breve termine della sostanza organica del suolo dovuta principalmente ai trattamenti (solitamente l'aggiunta di C organico) del suolo. Questi cambiamenti, definiti priming effects (PE), sono strettamente legati alla biomassa e all'attività microbiche, a loro volta fortemente dipendenti dai substrati utilizzabili dai batteri presenti in un suolo. Mondini *et al.* (2006) e Hamer and Marschner (2005) suggeriscono che le differenze nei priming effects (PE) osservati possono essere in relazione con la struttura della comunità microbica del suolo. Pochi studi hanno mostrato che i PE innescati da substrati diversi sono accompagnati da cambiamenti nella composizione della comunità microbica (Blagodatskaya *et al.* 2007; Falchini *et al.* 2003; Kramer and Gleixner 2006; Landi *et al.* 2006). Diverse specie microbiche potrebbero essere attivate dall'aggiunta di nuovi substrati, in funzione del tipo e della quantità del substrato stesso. Per cui, la composizione della comunità può cambiare e ciò può produrre PE. Comunque, secondo Nannipieri *et al.* (2003), la diversità microbica in generale non è in grado di modificare il tasso di processi importanti quali la mineralizzazione di C e N, in

quanto tali processi possono essere supportati dalla maggior parte delle specie microbiche presenti nel suolo.

### **1.5 Fattori che influenzano diversità e attività delle comunità microbiche del suolo**

I fattori che possono influenzare la composizione e l'attività delle comunità microbiche dei suoli sono molteplici. Essi vanno dalla contaminazione da xenobiotici, derivanti dalle attività dell'uomo, alle pratiche agricole e forestali.

Il suolo può essere contaminato da un grande numero di composti sia organici che inorganici derivanti dall'attività dell'uomo attraverso una contaminazione che può essere locale (es. attività industriale) oppure diffusa (es. agricoltura intensiva), e spesso si possono accumulare anche a notevoli distanze dalla loro fonte di origine. Negli ultimi tempi si è assistito ad un aumento dei livelli di tali composti nell'ambiente suolo, e ciò è stato associato, a ragione, ad un rischio per la salute umana. L'immissione in un ecosistema di sostanze estranee a quell'ambiente può sempre essere responsabile dello spostamento da una situazione di equilibrio; in relazione alla tipologia e al grado di contaminazione si può anche osservare la modifica della struttura della comunità edafica. Per molto tempo, in agricoltura, i fanghi degli scarichi fognari sono stati impiegati come fonte di nutrienti e sostanza organica. In particolare, quelli provenienti dalle aree industriali, spesso contengono quantità significative di metalli pesanti quali Cu, Ni, Cd, Zn e Cr (Sandaa *et al.*, 2001). Ma tra le fonti dei metalli pesanti, le attività di estrazione e di lavorazione nelle industrie metallurgiche rappresentano le più importanti per intensità di contaminazione. I metalli derivanti da tali attività contaminano acque e suolo localmente, mentre i processi geochimici e climatici agiscono su di essi provocando il trasporto e la diffusione dei metalli dalle aree contaminate e distribuendoli nei suoli adiacenti, nei corsi d'acqua e nelle falde sotterranee. Da qui, i metalli pesanti possono minacciare la qualità degli ecosistemi e la salute umana (McGrath *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002).

Molti studi hanno dimostrato che i metalli pesanti influenzano i microrganismi agendo in modo avverso sulla loro crescita, la morfologia e l'attività biochimica, portando solitamente ad una riduzione della biomassa (Sandaa *et al.*, 2001). Esposizioni a breve ed a lungo termine a metalli pesanti

risultano inoltre in riduzioni nell'attività e nella diversità delle comunità microbiche nei suoli (Lasat, 2002; McGrath *et al.*, 2001). Dal momento che queste ultime caratteristiche rappresentano degli importanti indici della qualità di un suolo, l'alterazione della composizione delle comunità microbiche è stata spesso proposta come indicatore degli effetti antropici in ecologia del suolo (Renella *et al.*, 2005).

Studi recenti sulle relazioni tra il contenuto di metalli pesanti dei suoli e l'attività e la composizione delle comunità di microrganismi si sono occupati di valutare gli effetti della frazione biodisponibile dei metalli. Wang *et al.* (2007) hanno trovato che la biodisponibilità rappresenta un fattore molto importante, e dai loro studi la diversità delle comunità, l'attività microbica e la frazione estraibile dei metalli pesanti in suoli contaminati sono risultati correlati negativamente. Essi hanno inoltre ottenuto dei risultati simili per il contenuto totale dei metalli per gli stessi suoli. Le interazioni tra metalli e batteri del suolo sono spesso complesse e coinvolgono vari livelli delle reti trofiche. E' stato osservato (Wen *et al.*, 2004) che incrementi della biomassa di batteri, attinomiceti e funghi in vermi del suolo sono associati ad incrementi della disponibilità di metalli alle piante. Probabilmente la stimolazione delle popolazioni batteriche presenti è responsabile della degradazione enzimatica della sostanza organica, rilasciando in soluzione i metalli legati organicamente (Sizmur *et al.*, 2009). Anche la presenza di acidi umici è ritenuta responsabile dell'aumento della disponibilità dei metalli per le piante attraverso la formazione di complessi organo-metallici (Evangelou *et al.*, 2004; Halim *et al.*, 2003).

I batteri, però, sono anche in grado di utilizzare i composti "tossici" immessi nei suoli dalle attività antropiche. Molti studi hanno mostrato che i batteri associati alle piante, come i batteri endofitici non patogeni normalmente presenti nelle piante e i batteri della rizosfera, cioè quelli che vivono sulle radici delle piante e nello spazio più prossimo ad esse, possono contribuire alla degradazione di composti organici tossici in suoli contaminati. Queste capacità dei batteri sono da qualche tempo al centro di intensi studi sul loro utilizzo nel fitorisanamento dei suoli contaminati (McGuinness, 2009).

I batteri rizosferici costituiscono comunità microbiche complesse che sfruttano gli essudati radicali e i tessuti vegetali morti. Essi generalmente sono responsabili, nei suoli vegetati, di una biomassa da 10 a 100 volte maggiore che

nei suoli privi di vegetazione (Lynch *et al.*, 1990). I batteri della rizosfera portano benefici alle piante sintetizzando composti in grado di proteggere le piante riducendone lo stress ormonale, fornendo nutrienti fondamentali, proteggendole dall'attacco di patogeni e, non ultimo, degradando i contaminanti prima che essi possano impattare negativamente verso esse (Gerhardt *et al.*, 2009).

Un altro fattore in grado di influenzare significativamente la diversità delle comunità microbiche dei suoli è rappresentato dall'agricoltura, in particolare quella intensiva. L'esempio più frequente di intensificazione dell'agricoltura che risulta in una riduzione della biodiversità, è quello del disboscamento delle foreste pluviali tropicali, dove la diversità delle specie vegetali ed animali è ridotta catastroficamente (Giller *et al.*, 1997). Eppure, dalla letteratura si evince che c'è una evidenza poco dettagliata riguardo la riduzione della biodiversità nel suolo dalla intensificazione dell'agricoltura. L'uso intensivo del territorio da parte dell'agricoltura può essere rappresentato mediante un gradiente d'intensità crescente. Ad un estremo si trovano quelle forme d'uso secondo cui un pezzo di territorio è usato solo per una piccola parte di tempo, ad esempio un anno ogni 10. All'altro estremo, invece, ci sono le forme di agricoltura permanente. Lungo questo gradiente di uso agricolo del territorio, spesso si assiste ad una sostituzione delle pratiche manuali da parte del lavoro meccanizzato, e dei concimi organici e del controllo degli infestanti dall'uso dei composti agrochimici.

Anche l'introduzione delle piante geneticamente modificate può comportare eventi inattesi a carico di organismi che rivestono un ruolo fondamentale nei cicli biogeochimici, quali i batteri e i funghi del suolo (Giovannetti, 2003). La maggior parte degli studi disponibili riguarda piante modificate per produrre proteine insetticide, come le tossine prodotte da un microrganismo del suolo, *Bacillus thuringiensis*, denominate *Bt*, che sono attive contro Lepidotteri, Ditteri e Coleotteri. Alcuni studi riguardano il rilascio della tossina *Bt* dalle radici di mais transgenico nella rizosfera, dove mantiene la sua attività per più di 200 giorni, in quanto capace di legarsi alle particelle di argilla del suolo, dove è protetta dalla degradazione microbica (Saxena *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 1999). Lavori recenti, effettuati in microcosmo, hanno mostrato differenze nelle comunità batteriche rizosferiche tra piante di mais *Bt* 11 e *Bt* 176 e piante di controllo, utilizzando la tecnica di fingerprinting molecolare mediante DGGE, analizzando i geni 16S rRNA. (Castaldini *et al.*, 2005). Alcuni autori

hanno dimostrato che piante di *Brassica napus* resistenti all'erbicida glifosato modificano la composizione e la diversità delle comunità microbiche del suolo e della rizosfera (Siciliano *et al.*, 1999). Tali dati sono stati confermati da altri lavori che riportano cambiamenti, sia nella struttura che nell'attività della comunità microbica del suolo, causati dalla presenza di piante geneticamente modificate (Mansouri *et al.*, 2002; Schmalenberger *et al.*, 2002, 2003).

## **1.6 Metodi di studio delle comunità microbiche dei suoli**

Il suolo rappresenta un habitat vivente, complesso e dinamico per un grande numero di organismi. I batteri, tuttavia, costituiscono una parte molto importante della microflora del suolo per la loro abbondanza, la diversità specifica e la molteplicità delle attività metaboliche che sono in grado di espletare. Risulta pertanto essenziale comprendere le relazioni esistenti tra i batteri del suolo ed il loro ambiente attraverso lo studio della diversità strutturale e funzionale delle comunità microbiche del suolo e come esse reagirebbero ai vari disturbi, sia naturali che dovuti all'uomo, che si possono avere (Zhang *et al.*, 2008).

La biodiversità microbica può essere considerata come la ricchezza e la variabilità di individui che afferiscono ai vari taxa. La messa a punto di metodi di indagine sempre più rapidi, precisi ed efficaci, ha permesso in tempi recenti di allargare questo concetto, che oggi include la diversità di individui al di sotto dei ranghi di specie e che può essere definita come la diversità ereditabile a livello di geni all'interno di una popolazione o specie, la variabilità di specie che compongono in parte o in toto una comunità, e la variabilità di comunità microbiche riferibili ai vari ecosistemi. Per la grande complessità dell'ambiente suolo, sarebbe opportuno definire la biodiversità in senso funzionale sia a livello di singole cellule batteriche che di comunità microbiche nei confronti dell'ambiente circostante (Bonari e Ceccon, 2002).

I metodi per valutare la diversità dei microrganismi del suolo, sia a livello di specie che di comunità, sono numerosi. Tra essi vi sono i metodi tradizionalmente basati sulla coltivazione dei ceppi batterici in terreni specifici, che permettono di valutare la ricchezza in specie e l'abbondanza specifica dei suoli oggetto di studio. Con i metodi colturali è possibile stimare fino a oltre  $10^9$  CFU (unità formanti colonia) per grammo di suolo. I loro vantaggi risiedono nel fatto che sono ormai di facile attuazione in laboratori microbiologici anche

semplici, forniti di strumentazione non necessariamente costosa. Ma la microflora edafica non può essere studiata in modo esaustivo attraverso le classiche tecniche di coltivazione dei ceppi batterici in condizioni di laboratorio. Infatti, è noto che i batteri coltivabili con i comuni terreni e alle condizioni riproducibili costituiscono soltanto una piccola frazione (0.1–1%) di quelli viventi nel suolo (Torsvik and Øvreås, 2002; Zhang *et al.*, 2008), per cui la grande diversità filogenetica che caratterizza le comunità microbiche dei suoli risulta solo molto parzialmente studiata.

I metodi cultura–indipendenti che recentemente hanno preso a svilupparsi consentono di studiare le comunità microbiche nel loro insieme, senza dover isolare ed identificare le singole specie. Tali metodi possono essere fatti appartenere a due gruppi: il primo, relativo ai metodi che si basano sullo studio delle funzioni delle comunità (Biolog<sup>®</sup>; Profilo della risposta catabolica di Degens *et al.*, 2000); il secondo gruppo comprende invece le tecniche che si basano sullo studio della struttura delle comunità, e che comprende varie tecniche di biologia molecolare per la determinazione della diversità genetica (DGGE; TGGE; T–RFLP; ARDRA; RISA; ecc.), il metodo del profilo degli acidi grassi di membrana (PFLA), il contenuto di guanina più citosina, e altri ancora.

Sebbene l'applicazione di queste tecniche abbia fortemente migliorato le conoscenze sulla struttura e la dinamica delle comunità microbiche del suolo, essa soffre ancora alcune limitazioni legate principalmente alle caratteristiche della matrice, e nessuna di esse, singolarmente, è in grado di fornire una misura completa sulla diversità delle comunità microbiche dei suoli. Per questo motivo la letteratura scientifica a riguardo raccomanda la combinazione di più metodi che si complementino a vicenda (Zhang *et al.*, 2008), nonché la determinazione di indicatori ampiamente utilizzati in ecologia microbica, come attività e biomassa microbica, e indici quali il quoziente microbico ed il coefficiente di mineralizzazione endogena (Widmer *et al.*, 2001).

### **1.6.1 Metodi coltura–dipendenti per lo studio della diversità delle comunità microbiche dei suoli**

La microflora edafica è responsabile di un numero molto grande di funzioni fondamentali per gli ecosistemi terrestri. Tra esse vi sono la decomposizione della sostanza organica morta, la trasformazione dei nutrienti, la

fissazione dell'azoto atmosferico, la formazione di associazioni simbiotiche con molte specie vegetali che favoriscono l'assorbimento dei nutrienti da parte delle radici, il miglioramento delle proprietà chimico-fisiche del suolo attraverso la formazione di molecole complesse (acidi umici), e tante altre (Giller *et al.*, 1997). Il numero elevato di attività svolte influenza le modalità di indagine, che si basa generalmente sulla equiripartizione dell'attività microbica tra attività più semplici (Degens *et al.*, 2000).

Il sistema Biolog<sup>®</sup> (Haywood, California, USA) permette di misurare l'attività catabolica dei microrganismi di un suolo in risposta a differenti substrati carboniosi. Il metodo si basa sull'utilizzo di micropiastre con 96 pozzetti in cui vengono aggiunti una sospensione del suolo campione, differenti substrati carboniosi e dei sali di tetrazolio. Un pozzetto contenente la sola sospensione di suolo viene considerato come controllo. Dalla riduzione dei sali di tetrazolio osservata misurando l'assorbanza allo spettrofotometro dopo un'incubazione di 24–48 ore, si riesce a stimare l'attività catabolica microbica in risposta a ciascun substrato. Questo metodo presenta gli stessi limiti dei metodi colturali, in quanto permette di valutare l'attività dei microrganismi in grado di crescere alle condizioni di incubazione e in presenza di determinati substrati. Pertanto, i risultati ottenuti con tale metodo potrebbero non riflettere la reale diversità funzionale della comunità microbica edafica.

Il metodo proposto da Degens e collaboratori (2000) consiste nel misurare la diversità delle funzioni della decomposizione, come componente della diversità funzionale microbica. Il metodo si basa sul principio che specie diverse hanno diverse capacità nell'utilizzare le risorse trofiche. Pertanto, tale metodo consiste nel valutare la variazione (evenness) nei profili della risposta catabolica misurando l'utilizzo a breve termine (4 ore) di determinati substrati semplici (amminoacidi, carboidrati, acidi carbossilici) prontamente disponibili che vengono aggiunti al suolo (Degens, 1998a, b; 1999). La valutazione a breve termine permette di ottenere l'impronta catabolica della sola frazione attiva della comunità microbica del suolo, anziché quella costituita dai microrganismi dormienti o in forme resistenti. La scelta dei substrati, preferendo solo quelli in grado di discriminare maggiormente tra suoli diversi, come mostrato da Degens e Harris (1997) e Degens (1998a), ha portato alla riduzione del numero, da 83 a 26, rispetto a quelli utilizzati inizialmente. Il metodo descritto per la valutazione della

diversità catabolica dei microrganismi del suolo, fornisce informazioni sulla stabilità delle comunità microbiche edafiche in funzione dei fattori di stress o disturbo, come mostrato da Degens *et al.* (2001).

## **1.6.2 Metodi coltura–indipendenti per lo studio della diversità delle comunità microbiche dei suoli**

### ***1.6.2.1 Analisi degli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana (PLFA)***

Tra le tecniche di analisi delle comunità microbiche che non si basano sulla coltura dei microrganismi, la Fatty Acid Methyl Ester (FAME) consiste in un metodo biochimico che fornisce informazioni sulla composizione delle comunità microbiche raggruppando gli organismi in base alla composizione in acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA) presenti nella membrana cellulare (Zhang *et al.*, 2008). I fosfolipidi costituiscono una componente strutturale della membrana di cellule viventi, in quanto non vengono accumulati come prodotto di riserva e perché vengono rapidamente degradati da enzimi idrolitici quando una cellula muore. La composizione in acidi grassi dei fosfolipidi di membrana è specifica per gruppi di microrganismi, cosicché può essere impiegata per misurare la diversità di una comunità microbica, nonché valutarne i cambiamenti in funzione delle condizioni ambientali. I metodi basati sui PLFA prevedono l'estrazione degli stessi direttamente dal campione, una reazione di metilazione e l'analisi mediante gas cromatografia (Ibekwe and Kennedy, 1999). I diversi profili ottenuti possono poi essere confrontati mediante analisi multivariata. Questa tecnica è stata impiegata per studiare la diversità delle comunità microbiche e i suoi cambiamenti dovuti a contaminazione chimica (Kelly *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006), pratiche agricole (Esperschütz *et al.*, 2007; Steinbeiss *et al.*, 2009) e per la misura della qualità dei suoli (Mele *et al.*, 2007; Winding *et al.*, 2005). Ma in molti casi, l'utilizzo dei dati ottenuti con questa tecnica, in particolare le abbondanze relative di PLFA delle comunità di batteri studiate, per calcolare l'indice di diversità di Shannon non ha fatto rilevare differenze. Secondo Zhang e collaboratori (2008) una spiegazione ragionevole di ciò potrebbe essere che, sebbene la comunità fosse strutturalmente differente, la diversità non lo fosse allo stesso modo, per cui tale tecnica non sempre rappresenta uno strumento adatto per la misura della diversità.

### **1.6.2.2 Contenuto di guanina più citosina**

Il contenuto di guanina più citosina (G + C) del DNA può essere misurato per studiare la diversità delle comunità microbiche dei suoli (Zhang *et al.*, 2008); Questo metodo si basa sul fatto che il DNA dei microrganismi differisce nel contenuto in G + C e che gruppi tassonomicamente vicini differiscono solo per il 3–5% (Tiedje *et al.*, 1999). I vantaggi di questa tecnica sono: i) l'assenza di influenza dalla reazione a catena della polimerasi (PCR); ii) l'utilizzo di tutto il DNA estratto dal campione di suolo; iii) si tratta di una tecnica quantitativa; iv) ed è in grado di considerare anche le specie meno abbondanti all'interno di una comunità. Essa, però, richiede grandi quantità di DNA e una tecnica di lisi ed estrazione del DNA efficiente, ed ha un livello di risoluzione grossolano, infatti gruppi tassonomicamente differenti potrebbero trovarsi nello stesso intervallo di G + C. Inoltre, il contenuto di G + C permette di valutare i cambiamenti della struttura delle comunità microbiche, senza però dare informazioni sugli altri parametri della diversità quali la ricchezza, la evenness e la composizione (Torsvik and Øvreås, 2002).

### **1.6.2.3 Metodi per lo studio della diversità genetica delle comunità microbiche dei suoli**

Le tecniche molecolari cultura–indipendenti che si basano sull'estrazione degli acidi nucleici da una molteplicità di campioni ambientali (He *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2008) possono permettere di superare i problemi legati alle tecniche di coltivazione dei ceppi batterici. Sebbene l'applicazione di tali tecniche abbia implementato notevolmente le conoscenze relative alla struttura e alla dinamica delle comunità microbiche dei suoli, nonché di valutarne l'evoluzione nel tempo e nello spazio (Kirk *et al.*, 2004), essa presenta ancora alcune limitazioni; per esempio spesso è piuttosto difficile estrarre gli acidi nucleici dalle cellule batteriche presenti nel suolo, e ancor più complicato risulta purificarlo da campioni ricchi di sostanza organica. Dal momento che ciascun suolo presenta caratteristiche proprie, potrebbe richiedere l'applicazione di una metodica specifica, anche risultante dalla combinazione di diverse tecniche; molti autori a riguardo suggeriscono la combinazione di più metodi che si complementino tra loro (Harry *et al.*, 1999; Roose–Amsaleg *et al.*, 2001).

Le informazioni filogenetiche che si ottengono con i metodi cultura-indipendenti sono quasi sempre diverse da quelle ottenute con i metodi cultura-dipendenti: i phyla Proteobacteria, Cytophagales, Actinobacteria e Firmicutes sono ben rappresentati dagli organismi coltivati e da soli, questi quattro phyla, rappresentano circa il 90% di tutti i batteri coltivati caratterizzati mediante le sequenze del 16S rRNA. Alcuni phyla, invece, come Acidobacteria e Verrucomicrobia, che sono stati rivelati dalle analisi di clonaggio, sono poco rappresentati dalle sequenze degli organismi coltivati (Zhang *et al.*, 2008). Con i metodi basati sul DNA appare che in un grammo di suolo possono essere presenti da 4000 a 18000 genomi equivalenti, che pone il problema di una certa ripetitività di un singolo genoma equivalente. L'estrazione dell'RNA dai microrganismi del suolo permette di studiarne la componente metabolicamente attiva (Heuer and Smalla, 1997). Il rapporto RNA/DNA, infatti, può rappresentare un indice della qualità di un suolo, essendo proporzionale all'attività metabolica e al tasso di crescita batterica (Eriksson *et al.*, 2001; Hurt *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2006).

I metodi impiegati per la determinazione della diversità genetica delle comunità microbiche includono molte tecniche molecolari. Solitamente lo studio della diversità genetica delle comunità di microrganismi si basa sulla diversità dei geni del DNA batterico che codificano per l'RNA ribosomiale. I geni 16S e 23S rDNA vengono impiegati per studi filogenetici su Eubacteria ed Archea, mentre il gene 18S rDNA viene utilizzato per i funghi. Anche gli spaziatori ribosomiali trascritti (ITS, Intergenic Transcribed Spacers) tra i geni 16S e 23S possono essere impiegati per gli stessi scopi (de Oliveira *et al.*, 2006). L'individuazione di regioni conservate all'interno di tali geni ha permesso di individuare i primers in grado di studiare buona parte dei membri di gruppi definiti di tali organismi. L'amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), il sequenziamento e il confronto di questi geni con quelli di microrganismi già classificati presenti in apposite banche dati, permette la caratterizzazione delle comunità microbiche (Oren, 2004).

Diverse tecniche sono state sviluppate per valutare la diversità delle sequenze dei geni rDNA del DNA estratto dalle comunità microbiche dei suoli; tra esse vi sono la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), la Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), la Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), la Amplified rDNA Restriction

Analysis (ARDRA), la Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) e la Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). In particolare, la DGGE è stata applicata per valutare la diversità delle comunità microbiche edafiche (Crecchio *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2007; Agnelli *et al.*, 2004; de Liphay, 2004; Smalla *et al.*, 2001; Øvreås *et al.*, 1998).

Introdotta da Muyzer e collaboratori (Muyzer *et al.*, 1993), la DGGE è basata sulla variazione della composizione in basi dei frammenti del gene 16S rDNA ottenuto per amplificazione con set specifici di primers. La separazione dei frammenti si basa sulle differenze nella mobilità delle molecole di DNA amplificate mediante PCR in un gel di poliacrilammide caratterizzato da un gradiente lineare di agenti denaturanti (urea e formammide). La TGGE, invece, si basa su un gradiente di temperatura. Le molecole di DNA con sequenze differenti avranno un diverso comportamento di “fusione”. Dal momento che i frammenti del 16S migrano nel gel denaturante perché sottoposti ad una tensione elettrica, essi cominceranno a fondersi in corrispondenza di particolari domini di fusione e diventeranno parzialmente a singolo filamento. Le molecole di DNA parzialmente o completamente denaturate termineranno la loro migrazione nel gel e occuperanno nello stesso posizioni differenti in funzione della loro composizione in basi e della variazione della saquenza (Heuer and Smalla, 1997; Muyzer *et al.*, 1993). Regioni variabili del rDNA estratto dalle comunità microbiche vengono amplificate scegliendo primers che si inseriscono in regioni conservate che affiancano quelle variabili. Il primer forward viene legato covalentemente ad una sequenza ricca in guanina + citosina, che conferisce una certa stabilità all’oligonucleotide. Questa porzione, definita GC-clamp, impedisce la totale denaturazione del DNA a doppio filamento (Heuer and Smalla, 1997; Muyzer *et al.*, 1993). Sebbene con questa tecnica il 16S rDNA di diversi microrganismi possa contribuire alla formazione di una medesima banda nel gel denaturante, solitamente le popolazioni batteriche numericamente più abbondanti di una comunità edafica dalla complessità non molto elevata sono ben rappresentate da bande distinguibili (Øvreås *et al.*, 1997). Infine, bande ben separate mediante DGGE possono essere tagliate dal gel e per sequenziarne il DNA contenuto; confrontando tali sequenze con quelle di banche dati si riesce ad aumentare il grado di risoluzione della comunità (Heuer *et al.*, 2002; Smalla *et al.*, 2001). L’analisi DGGE degli ampliconi ottenuti mediante PCR condotta su RNA estratto

dal suolo e retrotrascritto permette di ottenere un'impronta molecolare della frazione metabolicamente attiva della comunità microbica (Heuer and Smalla, 1997). La scelta dei primers ha una notevole importanza nella PCR–DGGE. Infatti, impiegando primers universali o generici il profilo molecolare ottenuto mostrerà bande corrispondenti alle specie microbiche più rappresentate nel campione esaminato. In tal caso la sensibilità della tecnica potrebbe non essere sufficiente a mettere in evidenza le specie meno rappresentative, ma non meno importanti, di una comunità microbica edafica.

Come tutti i metodi che producono un profilo molecolare, anche la DGGE riesce a rilevare solo una parte della diversità microbica all'interno di una comunità, in quanto la diversità generalmente è alta. Le comunità microbiche del suolo possono presentare più di 10000 specie differenti ogni 100 g di suolo (Torsvik *et al.*, 1998), e la risoluzione di più di 20 bande in un gel è piuttosto difficile: secondo Casamayor e collaboratori, affinché una specie sia visibile in un gel DGGE come banda distinta deve costituire almeno l'1% dell'intera popolazione (Casamayor *et al.*, 2000).

La DGGE rappresenta un metodo rapido per indagare molti campioni contemporaneamente al fine di determinarne le differenze nella struttura delle comunità. Inoltre, questa tecnica risulta un valido strumento per valutare le differenze spaziali e temporali nelle comunità microbiche e fornire informazioni sui cambiamenti delle popolazioni dominanti (Øvreås *et al.*, 1998; Smalla *et al.*, 2001). Winding e collaboratori riportano i risultati di uno studio di cinque anni relativo al suolo di 60 siti diversi, i quali mostrano che il numero di bande di DNA era dipendente dalla tipologia di suolo e dal suo uso (Winding *et al.*, 2005).

Le tecniche molecolari che permettono di studiare la diversità genetica delle comunità microbiche dei suoli si basano, come già detto, principalmente sul gene 16S del DNA estratto dai campioni di suolo. L'amplificazione della porzione di interesse è caratterizzata da difficoltà che possono compromettere inevitabilmente le analisi post-PCR. Il principale problema è costituito dalla complessità della matrice suolo, che influenza le metodiche di estrazione mirate ad ottenere acidi nucleici dalle caratteristiche adatte all'amplificazione stessa mediante PCR. Le caratteristiche dei suoli possono influenzare notevolmente la scelta della tecnica di estrazione, che rappresenta una fase critica della tecnica molecolare. Infatti, per la complessità del campione durante l'estrazione del DNA

si può avere la coestrazione di sostanze organiche (acidi umici, acidi fulvici, detriti cellulari, proteine, solventi, pesticidi) ed inorganiche (metalli pesanti, minerali argillosi) che possono compromettere le fasi successive. Ad esempio, gli acidi umici, la cui presenza è rivelata dal colore bruno che presenta il DNA estratto, sono in grado di inibire la *Taq* DNA polimerasi nella reazione di amplificazione chelando gli ioni  $Mg^{2+}$  (Harry *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999; Roose–Amsaleg *et al.*, 2001; Takada–Hoshino and Matsumoto, 2004; Tsai *et al.*, 1992). Secondo Tebbe e Vahjen (Tebbe *et al.*, 1993)  $0.08 \mu\text{g ml}^{-1}$  di acidi umici inibiscono la *Taq* polimerasi, mentre  $0.5\text{--}1.17 \mu\text{g ml}^{-1}$  sono in grado di inibire determinati enzimi di restrizione. Alcuni autori hanno risolto il problema effettuando una diluizione del DNA estratto, oppure aggiungendo degli agenti in grado di sequestrare gli inibitori come la BSA direttamente nella miscela di reazione (Tebbe *et al.*, 1993; Yeates *et al.*, 1997). In molti casi, comunque, anche una diluizione molto spinta (1000 volte) non riesce ad eliminare l'effetto PCR inibitore degli acidi umici coestratti (Erb and Wagnerdöbler, 1993). Da qui la necessità di purificare il materiale genetico estratto anche quando ciò comporta perdite significative di DNA. Le tecniche più ampiamente applicate per la purificazione del DNA estratto dal suolo si basano su ultracentrifugazione in gradiente di densità di cesio cloruro, cromatografia a scambio ionico, elettroforesi in gel d'agarosio, o ancora su dialisi (Roose–Amsaleg *et al.*, 2001). Alcuni di questi metodi possono richiedere delle ottimizzazioni, specie se applicati a campioni particolarmente ricchi di sostanza organica (Harry *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1996).

Molti protocolli di estrazione di DNA da suolo sono stati sviluppati negli ultimi anni. Tutti prevedono diverse fasi: i) lisi cellulare; ii) rimozione dei frammenti cellulari e deproteinazione; iii) precipitazione del DNA. Successivamente l'estratto può richiedere un'ulteriore purificazione. La prima fase, quella della lisi cellulare, può seguire sostanzialmente due modalità: avvenire direttamente nella matrice suolo (estrazione diretta) oppure dopo aver separato le cellule batteriche dal suolo (estrazione indiretta). L'estrazione delle cellule dal suolo ha lo svantaggio di perdere una frazione non trascurabile di microrganismi, mentre dà un estratto solitamente più pulito da contaminanti organici (Roose–Amsaleg *et al.*, 2001). In ogni caso la lisi può avvenire per via, chimica, enzimatica o meccanica. I primi due metodi sono più delicati e

producono DNA piuttosto integro, ma spesso non sono efficaci contro determinate cellule e non penetrano in fondo tra le particelle di suolo. La lisi meccanica riesce a disgregare le particelle di suolo liberando e rompendo buona parte delle cellule presenti, ma spesso produce del materiale genetico degradato. Solitamente la lisi cellulare combina detergenti ed enzimi litici. Uno dei detergenti più comunemente utilizzato è il Sodio Dodecil Solfato (SDS), che può essere impiegato caldo oppure freddo per limitare la coesaturazione degli acidi umici (Zhou *et al.*, 1996; Volossiuk *et al.*, 1995). Tra gli enzimi litici vi sono il lisozima, in grado di idrolizzare i polisaccaridi che compongono la parete cellulare batterica; alcune proteasi come la proteinasi K, l'acromopeptidasi e la pronasi possono aiutare a liberare gli acidi nucleici (Niemi *et al.*, 2001; Tebbe *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1996). In questa fase dell'estrazione, l'uso di alcuni reagenti può migliorare la purezza del DNA ottenuto complessando gli acidi umici. E' il caso del polivinilpolipirrolidone (PVPP) e l'esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB), usati singolarmente o in miscela nel buffer di estrazione (Porteous *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1996). Alcuni campioni potrebbero richiedere una lisi meccanica, ad esempio perché contenenti cellule particolarmente resistenti ai detergenti ed agli enzimi, come avviene per certi batteri gram-positivi (Zhou *et al.*, 1996). La lisi meccanica può avvenire per semplice pestellamento in azoto liquido, oppure per shocks termici (congelamento-scongelamento), omogeneizzazione bead-mill, bead-beating, riscaldamento con microonde, ultrasonificazione, ecc. Diversi ricercatori hanno trovato che il metodo bead-beating è migliore sia del congelamento-scongelamento che della lisi chimica, nonostante le molecole di DNA raccolto siano più piccole (Cullen and Hirsch, 1998; Miller *et al.*, 1999). Generalmente è consigliabile la combinazione di metodi di lisi meccanica e chimica, e comunque tenendo in considerazione le proprietà del suolo, in particolare il contenuto in sostanza organica e in minerali argillosi, nonché le caratteristiche della comunità microbica del suolo in esame. Infatti, alcuni microrganismi come i batteri metanogeni sembrano essere più resistenti alla lisi di altri (Harris, 1994). Inoltre, sembrano esserci delle differenze nell'efficienza di estrazione da batteri gram-positivi o gram-negativi (Zhou *et al.*, 1996).

Dopo la lisi cellulare solitamente si adopera una rimozione delle proteine liberate mediante l'uso di solventi organici (fenolo, cloroformio, alcool isoamilico) usati singolarmente o in miscela (Tebbe *et al.*, 1993; Zhou *et al.*,

1996); la deproteinazione può anche essere effettuata con soluzioni saline contenenti sodio cloruro, potassio cloruro, ammonio acetato, potassio acetato o sodio acetato (Roose–Amsaleg *et al.*, 2001). Infine, gli acidi nucleici vengono precipitati principalmente con etanolo, isopropanolo oppure polietilenglicole (PEG). La precipitazione alcoolica sembra dare rese basse e favorire la coestrazione degli acidi umici, mentre l'uso del PEG dà buone rese ma richiede una ulteriore fase di purificazione con fenolo. La precipitazione con isopropanolo sembra raggiungere un giusto compromesso tra resa di recupero di DNA e purezza dell'estratto (Porteous *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1996).

Tra i metodi di estrazione non possono essere tralasciati quelli che fanno uso di kit commerciali specifici per l'estrazione diretta di DNA dal suolo. I più diffusi sono l'UltraCleanSoil™ DNA kit ed il PowerSoil™ DNA Isolation Kit Sample (MOBIO), ed il FastDNA® SPIN Kit for Soils (BIO101 Inc). I primi due si basano sulla lisi dei microrganismi nel suolo combinando calore, detergenti e scontri meccanici con particolari beads utilizzando un vortex. Il DNA rilasciato viene poi purificato attraverso uno spin filter. Il FastDNA® SPIN Kit, invece, si basa sulla lisi meccanica con beads di silice e ceramica in un bead-beater (FastPrep® Instruments), con una lisi efficiente di tutti i microrganismi, incluse le spore e le endospore di eubatteri e i batteri gram-positivi. Una procedura di purificazione attraverso una matrice di silice (GENECLEAN® procedure) purifica infine il DNA genomico estratto. Il materiale ottenuto con tali metodi è solitamente utilizzabile per la PCR senza la necessità di ulteriori fasi di purificazione.

### **1.6.3 Attività microbica**

Un metodo di valutazione dell'attività microbica del suolo consiste nel misurarne la respirazione basale come evoluzione di CO<sub>2</sub> dal suolo stesso. L'ossidazione dei composti organici a CO<sub>2</sub> operata dai microrganismi eterotrofi rappresenta un processo chiave nel ciclo del carbonio di tutti gli ecosistemi terrestri (Winding *et al.*, 2005). La respirazione del suolo rappresenta un aspetto importante della qualità del suolo ed anche un indicatore della sua fertilità. Secondo Alef (1995) la respirazione del suolo è correlata positivamente con il contenuto di sostanza organica e, spesso, con la biomassa microbica. Secondo alcuni autori la respirazione del suolo dipende dal tipo di suolo e dal suo uso

(Bloem and Breure, 2003). Essa è influenzata da diversi fattori quali la temperatura, l'umidità, la disponibilità di nutrienti e la struttura del suolo stesso. La respirazione del suolo può essere misurata sia come produzione di CO<sub>2</sub> che come consumo di O<sub>2</sub>. Tra i due metodi quello basato sulla misura della CO<sub>2</sub> è il più sensibile, in quanto la sua concentrazione in atmosfera è molto minore di quella dell'ossigeno. La respirazione del suolo può essere determinata sia in campo che in laboratorio. Quella misurata in campo è data sia dall'attività dei microrganismi e della pedofauna, che da quella delle radici delle piante. In laboratorio la respirazione è misurata generalmente sulla frazione di suolo < 2mm, in modo da escludere le radici delle piante e la pedofauna di maggiori dimensioni, e in condizioni controllate di temperatura e umidità. La CO<sub>2</sub> prodotta può essere misurata in modo semplice per titolazione chimica dopo incubazione del suolo per un certo tempo in presenza di una soluzione di potassio idrossido (KOH) oppure di sodio idrossido (NaOH). La base che reagisce con la CO<sub>2</sub> può essere retrotitolata con una soluzione acida di HCl in presenza dell'indicatore fenolftaleina, avendo così una misura della CO<sub>2</sub> rilasciata dai microrganismi del suolo (Anderson, 1982).

Conoscendo la respirazione di un suolo è possibile calcolare degli indici in grado di fornire utili informazioni sul metabolismo della comunità microbica. Tra essi vi sono il quoziente metabolico (qCO<sub>2</sub>) e il coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM).

Il qCO<sub>2</sub> rappresenta il tasso di respirazione per unità di biomassa microbica ed unità di tempo ( $qCO_2 = mg\ C-CO_2\ mg^{-1}\ C_{mic}\ d^{-1}$ ; Anderson and Domsch, 1993). In un ecosistema, esso tende a diminuire nel corso di una successione, in quanto l'efficienza di utilizzo delle risorse energetiche da parte del sistema tende a migliorare (Odum, 1969). Una sua riduzione indica quindi un'ottimizzazione dell'uso delle risorse da parte dei microrganismi (Insam and Haselwandter, 1989), mentre un suo aumento indica l'instaurarsi di condizioni di stress, ad esempio perchè le cellule tendono a consumare più energia per riparare i sistemi cellulari danneggiati (Anderson and Domsch, 1993).

Il CEM rappresenta la frazione di carbonio organico che viene mineralizzata a CO<sub>2</sub> nell'unità di tempo ( $CEM = mg\ C-CO_2\ g^{-1}\ C_{org}\ d^{-1}$ ). Questo indice può fornire informazioni sul tasso di mineralizzazione della sostanza organica e sulla capacità potenziale del suolo di accumulare o dissipare carbonio.

Alle condizioni di laboratorio a cui si effettuano le misure, solitamente non limitanti per la comunità microbica, valori più elevati di respirazione basale non associati ad aumenti proporzionati del contenuto di carbonio organico si traducono in valori più elevati di CEM. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto all'insorgere di condizioni di stress per la comunità, a cui i microrganismi tendono a consumare maggiormente le risorse energetiche e, quindi, dissipare maggiormente la frazione organica di carbonio (Odum, 1985).

## **2. SCOPO DELLA RICERCA**

### **2.1 Scopo della ricerca**

La microflora edafica riveste un ruolo fondamentale nell'equilibrio degli ecosistemi terrestri. La sua grande variabilità fenotipica e genotipica dipende fortemente dalle caratteristiche del suolo. L'applicazione di un approccio di studio multidisciplinare che valuti le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo può essere utile nella comprensione della struttura e delle funzioni delle comunità di microrganismi del suolo.

I metodi di studio coltura-indipendenti della microflora edafica permettono di superare l'ostacolo legato alla coltivabilità dei singoli organismi e di studiare le comunità microbiche del suolo nel loro insieme. Tra esse le tecniche di biologia molecolare permettono di valutare la diversità strutturale e genetica della microflora edafica e di valutarne in tempi brevi le risposte in seguito ad eventi perturbanti, quali possono essere le attività dell'uomo relativamente all'uso del territorio.

Lo scopo di questa ricerca è stata la valutazione della qualità e quantità di DNA in suoli dalla diversa tipologia ed uso. Pertanto, in una prima fase della ricerca ci si è proposti di selezionare, mediante una serie di esperimenti, un metodo di estrazione del DNA dal suolo tra quelli coltura-indipendenti. Successivamente, il metodo selezionato è stato applicato ai suoli oggetto di studio.

La ricerca si è anche proposta di relazionare contenuto e qualità di DNA con le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli e con il grado di contaminazione da metalli degli stessi.

Inoltre, al fine di evidenziare eventuali differenze in funzione dell'uso del suolo sono state anche valutate la diversità genetica delle comunità batteriche e l'attività della microflora edafica.

### **3. STUDIO DELLA MICROFLORA EDAFICA IN SUOLI A DIFFERENTE TIPOLOGIA ED USO**

#### **3.1 Premessa**

La presente ricerca è stata realizzata con l'intento di studiare la microflora edafica di suoli dalla diversa tipologia ed uso sottoposti a differente pressione antropica. La parte sperimentale è stata svolta principalmente presso il Centro Ricerche ENEA Portici. La realizzazione di questo studio è stata possibile grazie alla collaborazione con la Seconda Università degli Studi di Napoli e l'Università degli Studi di Bari, il cui contributo è relativo all'applicazione delle tecniche molecolari.

Le caratteristiche dei suoli, sia derivanti dai naturali processi di formazione e funzionamento degli ecosistemi che dalle attività antropiche, sono di fondamentale importanza nello studio della microflora del suolo. Suoli che differiscono per proprietà chimiche, fisiche e strutturali, saranno probabilmente caratterizzate da diverse associazioni di organismi, risultato di delicati meccanismi che ne regolano gli equilibri ecologici. La presenza dell'uomo, il cui impatto dipende dalle attività svolte, può a sua volta contribuire in modo significativo alla definizione di uno stato di equilibrio più o meno dinamico. Per tale scopo si è scelto di studiare la microflora di suoli provenienti da siti caratterizzati da una diversa localizzazione rispetto agli insediamenti umani e sottoposti a differenti pressioni.

#### **3.2 Aree di studio**

La ricerca è stata svolta utilizzando cinque suoli dalla diversa tipologia e destinazione d'uso campionati in altrettanti siti denominati S1, S2, S3 S4 ed S5 (fig. 3.1). Il sito S1 rappresenta un'aiuola adiacente ad una strada caratterizzata da elevato traffico veicolare situata nel centro della città di Napoli; il sito S2 consiste in un parco urbano situato nella città di Napoli confinante con una strada urbana ad elevato traffico veicolare; il sito S3 rappresenta un'aiuola adiacente ad una strada extraurbana principale tangente al centro urbano della città di Napoli; il sito S4 è un bosco situato alle spalle del parco della Reggia di Caserta, sede di un'oasi del WWF dal 1993 gestita con finalità didattiche e di ricerca; infine, il sito S5



Figura 3.1. Immagini indicative dei siti oggetto di studio.

rappresenta un'area agricola nel centro di un comune della fascia costiera vesuviana non lontano dalla città di Napoli. I siti S1, S2 ed S3 sono sottoposti ad impatti antropici costituiti sostanzialmente dall'apporto di contaminanti legati alla combustione degli idrocarburi da parte dei veicoli circolanti lungo le strade adiacenti. Il sito S4 può essere considerato un parco remoto in quanto lontano da centri abitati ed attualmente interessato da un impatto antropico diretto molto basso; tale sito, però, è stato utilizzato come riserva di caccia fino a pochi decenni fa. Il sito agricolo S5 si trova in un comune con un'elevata densità abitativa, ma non presenta un impatto legato al traffico veicolare; esso è stato oggetto di pratiche di agricoltura non intensiva da diversi decenni ad oggi.

### 3.3 Piano sperimentale

La ricerca è stata svolta su suoli dalla diversa tipologia e destinazione d'uso, al fine di valutare le differenze spaziali della microflora edafica. I suoli di quattro dei cinque siti (S1, S2, S3 ed S4) sono stati raccolti nell'autunno del 2008 e nella primavera del 2009. Il suolo del quinto sito (S5), invece, è stato raccolto all'inizio della stagione estiva degli stessi anni. Tutti i suoli, ad eccezione del suolo del sito S5, sono stati raccolti sotto chioma di leccio (*Quercus ilex* L.) ad una distanza di circa un metro dalla base del tronco, prelevando lo strato superficiale (0–10 cm) dopo la rimozione della lettiera. Nel sito S5 i campioni di suolo sono stati raccolti sotto la chioma di agrumi ovvero nelle immediate vicinanze degli stessi alberi. I campioni di suolo sono stati prelevati con l'ausilio di campionatori in materiale plastico atossico e conservati in sacchetti di polietilene fino all'arrivo in laboratorio per il trattamento e le analisi. Nei cinque siti sono stati raccolti 10–20 sub-campioni di suolo, ciascuno sotto la chioma di un differente albero, ad eccezione del sito S5, dove il campionamento non è avvenuto sempre sotto chioma.

I suoli studiati in questa ricerca sono stati oggetto di una valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche al fine di determinarne le principali differenze dovute alla loro pedogenesi ed alle attività antropiche ad essi legate. La microflora edafica è stata studiata mediante l'applicazione di tecniche coltura-indipendenti. Tali tecniche sono basate sull'estrazione degli acidi nucleici (DNA ed RNA) dalla matrice suolo e sulla misura dell'attività delle comunità di microrganismi. Per l'estrazione del DNA totale dai suoli sono stati confrontati diversi metodi tra cui scegliere il più efficiente nell'applicazione ai suoli studiati.

Dai suoli prelevati nel 2008 sono stati estratti sia il DNA che l'RNA. Il DNA estratto è stato utilizzato per l'amplificazione mediante PCR di una porzione di interesse del gene 16S rDNA. Gli ampliconi ottenuti sono quindi stati utilizzati per la valutazione della diversità genetica delle comunità batteriche dei suoli studiati mediante la tecnica della DGGE.

La ricchezza in DNA è stata considerata un parametro in grado di fornire utili informazioni sulla stato della microflora del suolo; per questo motivo essa è stata determinata anche per i suoli prelevati nel 2009. Degli stessi campioni è stata valutata anche l'attività della microflora misurando la CO<sub>2</sub> prodotta dai suoli in condizioni controllate.

Le relazioni tra i parametri biologici misurati (abbondanza del DNA ed attività della microflora) e le proprietà dei suoli studiati sono stati valutati. Per lo stesso scopo, sono stati calcolati il grado di contaminazione da alcuni metalli pesanti ed il loro effetto sui sistemi biologici. I livelli dei metalli pesanti dei suoli studiati impiegati nel calcolo del grado di contaminazione sono stati determinati nell'ambito del medesimo progetto di ricerca di cui fa parte questo studio (comunicazione personale).

### **3.4 Caratterizzazione dei suoli per tessitura, pH, contenuto di sostanza organica, tenore idrico e capacità idrica massimale**

I suoli prelevati sono stati setacciati attraverso setacci in plastica con maglie di 2 mm per eliminare lo scheletro e caratterizzati per pH, contenuto di sostanza organica (SO%), tenore idrico (TI%) e capacità idrica massimale (CIM%).

Il pH è stato determinato sul surnatante di una sospensione suolo:acqua (1:2.5) dopo agitazione per 30 min e decantazione; la misura è stata effettuata per via potenziometrica utilizzando un elettrodo in platino per pH ed uno strumento di misura multiparametrico (HACH).

Il contenuto di sostanza organica (SO%) è stato determinato su suolo seccato a 75 °C in modo da bloccare l'attività biologica della componente biotica senza però mineralizzare la sostanza organica. Il contenuto di sostanza organica è stato ricavato dopo calcinazione in muffola a 550 °C per 3 h di 1 g di detto suolo. Dal contenuto di sostanza organica è stato possibile determinare il contenuto di C organico sapendo che esso costituisce circa il 58 % della stessa.

Il tenore idrico dei suoli (TI%) è stato determinato per via gravimetrica seccando in stufa ad una temperatura di 105 °C quantità di 5 g dei campioni freschi, fino ad assenza di variazioni del peso. Il tenore idrico è stato espresso come percentuale di acqua rispetto al suolo secco.

La capacità idrica massimale (CIM%) è stata determinata per via gravimetrica su suolo fresco misurando la quantità di acqua necessaria a saturare un campione di massa nota di suolo e riportando tale parametro come percentuale riferita al suolo secco.

La tessitura dei suoli è stata determinata presso i laboratori della sezione ACS – PROT CHIM del Centro Ricerche ENEA – Casaccia seguendo il metodo proposto dal *United States Department of Agriculture* (USDA); secondo tale metodo un suolo viene fatto appartenere ad una delle 12 classi tessiturali individuate nel triangolo proposto in funzione della composizione percentuale in sabbia (particelle con diametro tra 0.05 e 2 mm), limo (particelle con diametro tra 0.002 e 0.05 mm) ed argilla (particelle con diametro < 0.002 mm).

### **3.5 Estrazione del DNA totale dai suoli**

L'estrazione del DNA dai suoli è stata effettuata applicando metodi classici e commerciali (kit) al fine di determinarne l'efficienza, per i suoli oggetto della ricerca, in termini di quantità e purezza del materiale genetico estratto. Il metodo classico di estrazione diretta che Zhou *et al* (1996) hanno ottimizzato per l'estrazione del DNA da suoli a diversa composizione è stato adottato per i suoli studiati. Tale metodo è stato applicato anche dopo aver apportato alcune modifiche, sia per adattarlo alle caratteristiche dei suoli studiati che per rendere più vantaggiosa e sicuro il suo utilizzo.

#### **3.5.1 Metodi classici**

I metodi classici applicati ai suoli sono basati sul protocollo proposto da Zhou *et al* (1996) per effettuare l'estrazione del DNA totale direttamente dai campioni di suolo. Tale metodo di estrazione si basa sull'utilizzo di Sodio Dodecil Solfato (SDS), esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB), polivinilpirrolidone (PVP) e proteinasi K, per la lisi cellulare e la riduzione della contaminazione da acidi umici. Il metodo è stato provato con modifiche sia relative ai reagenti ed ai volumi dei buffer di estrazione, che relative alla fase di lisi cellulare mediante l'introduzione di glass beads di vari diametri e un'agitazione più energica al fine di combinare la lisi meccanica a quella chimica. Il metodo è stato inoltre seguito dopo aver applicato ai suoli una procedura di purificazione da eventuali contaminanti organici quali gli acidi umici.

L'estrazione indiretta del DNA dal suolo è stata effettuata separando le cellule batteriche dalla matrice suolo mediante la separazione delle fasi ottenute per centrifugazione di una sospensione costituita dal suolo ed una soluzione di

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Al pellet di cellule ottenuto è stato poi applicato il medesimo protocollo utilizzato per l'estrazione diretta.

### ***3.5.1.1 Estrazione diretta***

Il protocollo seguito per l'estrazione diretta di DNA dai suoli è riportato di seguito:

un campione di suolo di 5 g è miscelato con 13.5 ml di buffer di estrazione e 100 µl di proteinasi K (10 mg ml<sup>-1</sup>) mediante agitazione a 225 rpm per 30 min a 37 °C. Dopo l'agitazione viene aggiunto 1.5 ml di SDS 20% e il campione incubato per 2 h in bagno a 65 °C con una delicata inversione ogni 15–20 min. Il surnatante viene raccolto dopo centrifugazione a 6000 rpm per 10 min a temperatura ambiente e trasferito in tubi da centrifuga da 50 ml. Il pellet di suolo viene estratto due volte aggiungendo 4.5 ml di buffer di estrazione e 0.5 ml di SDS 20%, vortexando per 10 s, incubando a 65 °C per 10 min, e centrifugando come prima. Il surnatante dei tre cicli di centrifuga viene unito, miscelato a un ugual volume di fenolo–cloroformio–alcool isoamilico (25:24:1, v:v) e agitato per inversione per 10 min. Alla fase acquosa recuperata dopo centrifugazione a 4000 rpm per 10 min viene aggiunto un ugual volume di cloroformio–alcool isoamilico (24:1, v:v) per eliminare eventuali tracce di fenolo. La fase acquosa ottenuta dopo centrifugazione a 4000 rpm per 10 min viene unita a 0.6 volumi di isopropanolo e lasciata a temperatura ambiente per 1 h per permettere la precipitazione degli acidi nucleici. Il pellet di DNA ottenuto centrifugando a 12000 rpm per 20 min a temperatura ambiente viene lavato con etanolo 70% freddo e trasferito in provetta da 1.5 ml. La sospensione viene centrifugata a 13000rpm per 20 min ed il surnatante scartato. Il pellet di DNA viene quindi liofilizzato, risospeso in un volume tra 50 e 500 µl di acqua deionizzata sterile e conservato ad una temperatura di –20 °C fino al suo utilizzo.

Il buffer di estrazione impiegato ha la seguente composizione:

- 100 mM Tris–HCl [pH 8.0];
- 100 mM sodio EDTA [pH 8.0];
- 100 mM sodio fosfato [pH 8.0];

- 1.5 M NaCl;
- 1% CTAB oppure 1% PVP oppure 1% CTAB + 1% PVP.

I reagenti CTAB e PVP del buffer di estrazione, la cui funzione è di trattenere gli eventuali contaminanti organici presenti, sono stati impiegati sia singolarmente che in miscela 1:1 per valutare la differenza nella capacità estrattiva del buffer e la purezza del DNA ottenuto nelle diverse condizioni.

Una variazione della procedura di estrazione diretta descritta è stata applicata ai suoli facendo precedere al protocollo una fase di “lavaggio” del campione con un tampone fosfato secondo tale procedura:

5 g di suolo sono fatti agitare con 20 ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM a 150 rpm, a 37 °C, per 1 h. La sospensione viene centrifugata a 6000 rpm per 10 min ed il surnatante scartato; al pellet sono aggiunti 20 ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM, e la sospensione ottenuta vortexando viene centrifugata nuovamente a 6000 rpm per 10 min. Al pellet ottenuto dopo aver scartato il surnatante è stato applicato il protocollo di estrazione diretta già descritto.

Una ulteriore modalità di estrazione diretta applicata ai suoli consiste nell'utilizzo di glass beads di varie dimensioni durante la lisi cellulare; essa prevede l'utilizzo di un adattatore per vortex al fine di praticare una lisi meccanica oltre quella chimica–enzimatica. La procedura appena descritta si basa sull'utilizzo di quantità minori di suolo e richiede quantità delle soluzioni e dei materiali altrettanto minori rispetto ai protocolli precedenti. Inoltre, questa procedura viene svolta in tempi più brevi e, a parità di tempo, può quindi essere applicata ad un numero maggiore di campioni. Essa si svolge come segue:

aggiungere 0.25 g di suolo e 1 ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM in una provetta da 2 ml contenente 0.5 g di beads da 0.1 mm e 0.32 g di beads da 4 mm; agitare al vortex con adattatore alla frequenza di 20 Hz per 15 min e centrifugare a 13000 rpm per 10 min prima di scartare il surnatante. Aggiungere 1 ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM al pellet e ripetere i due passaggi precedenti. Aggiungere al pellet 675 µl di buffer di estrazione con CTAB 1%, 5 µl proteinasi K 10 mg ml<sup>-1</sup> e agitare (40 Hz,

30 min) al vortex con adattatore; aggiungere 75 µl di SDS 20 % e incubare a 65 °C per 2 h invertendo delicatamente ogni 20 min. Centrifugare a 6000 rpm per 10 min e recuperare il surnatante. Al pellet aggiungere 225 µl buffer estrazione, 25 µl di SDS 20%, vortexare e incubare a 65 °C per 10 min. Centrifugare a 6000 rpm per 10 min, recuperare il surnatante e unirlo a quello già ottenuto. Ripetere i due passaggi precedenti in modo da avere tre surnatanti da unire e un pellet da scartare. Aggiungere al surnatante un ugual volume di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1) e agitare per inversione per 10 min; centrifugare a 4000 rpm per 10 min e recuperare la fase acquosa più leggera. Aggiungere un ugual volume di cloroformio:alcool isoamilico (24:1) e agitare per inversione per 10 min. Centrifugare a 4000 rpm per 10 min e recuperare la fase acquosa. Aggiungere alla fase acquosa contenente il DNA 0.6 volumi di alcool isopropilico ed incubare a temperatura ambiente per 1 h. Centrifugare a 13000 rpm per 20 min e scartare il surnatante. Lavare il pellet con 500 µl di alcool etilico 70% freddo e centrifugare la sospensione a 13000 rpm per 20 min. Scartare il surnatante e liofilizzare il pellet. Sospendere il pellet con 50 µl di H<sub>2</sub>O sterile e conservare a -20 °C.

### ***3.5.1.2 Estrazione indiretta***

L'estrazione indiretta del DNA dai suoli consiste nella separazione delle cellule batteriche dal suolo per poi applicare alle stesse il protocollo di estrazione. Il pellet di cellule batteriche è stato ottenuto nel modo seguente:

5 g di suolo sono fatti agitare con 20 ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM a 150 rpm, a 37 °C, per 1 h. La sospensione viene centrifugata a 300 rpm per 10 min ed il surnatante con le cellule batteriche recuperato; al pellet sono aggiunti 20 ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM, e la sospensione ottenuta vortexando viene centrifugata nuovamente a 300 rpm per 10 min. Il surnatante dei due cicli è stato unito al precedente è centrifugato a 6000 rpm per 20 min in modo da ottenere il pellet di cellule a cui è stato applicato il protocollo di estrazione già descritto per l'estrazione diretta.

### 3.5.2 Metodi commerciali

Gli acidi nucleici sono stati estratti dai suoli mediante metodi commerciali basati sull'uso di kit. Essi sono il FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (BIO101 Inc.) per il DNA, ed il RNA PowerSoil<sup>™</sup> Total RNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc.) per l'estrazione dell'RNA.

#### 3.5.2.1 Estrazione del DNA con il FastPrep<sup>®</sup> System

Il FastPrep<sup>®</sup> System è un metodo di estrazione diretta del DNA totale da suolo basato sulla lisi meccanica dei microrganismi edafici. Il FastPrep<sup>®</sup> System combina il FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for SOIL ed il FastPrep<sup>®</sup> Instrument (FastPrep<sup>®</sup> FP 120A Instrument), il quale consiste in un agitatore caratterizzato da un movimento sussultorio con velocità molto elevate ( $4.0-6.5 \text{ m s}^{-1}$ ); tale movimento, combinato con la presenza di beads di silice e ceramica di varie dimensioni nel tubo di lisi del kit associato, permette di lisare in modo efficiente tutti i microrganismi, anche quelli più resistenti alla lisi chimica ed enzimatica quali le endospore, le spore degli eubatteri, i batteri Gram-positivi, i lieviti, le alghe, i nematodi ed i funghi. Il FastPrep<sup>®</sup> System consente l'estrazione rapida di DNA direttamente dal suolo senza l'ausilio di solventi organici tossici come il fenolo ed il cloroformio. Il DNA genomico ottenuto con tale sistema ha dimensioni che variano tra 6 e 25 kbp; la sensibile degradazione del materiale genetico è dovuta all'energica forza applicata per lisare le cellule, ma solitamente ciò non rappresenta un problema per le applicazioni successive del DNA estratto. Anche la resa estrattiva in termini di quantità, dipendente dalle caratteristiche del suolo e dalla quantità degli organismi presenti, è buona ( $2-750 \mu\text{g DNA g}^{-1}$  di suolo). La purezza del DNA estratto generalmente è buona e permette di utilizzarlo senza dover applicare ulteriori fasi di purificazione.

I componenti principali con cui viene fornito il kit sono i seguenti:

- Lysing Matrix – si tratta di tubi da centrifuga contenenti una miscela di particelle di silice e ceramica per la lisi meccanica dei microrganismi; essa contiene una soluzione caotropa costituita da una miscela di detergenti e sali cha hanno la funzione di inattivare le nucleasi e favorire la separazione del DNA dalla matrice del suolo;

- Homogenization Reagents – l'omogenizzazione avviene in presenza del MT Buffer e del Sodium Phosphate Buffer, reagenti studiati per proteggere e solubilizzare gli acidi nucleici e permetterne l'estrazione con una contaminazione minima da RNA;
- DNA Purification and Elution Reagents – dopo la lisi il DNA viene purificato mediante la procedura GENE CLEAN<sup>®</sup>, che fa uso di SPIN filters costituiti da una resina di silice, della Binding Matrix, della Salt/Ethanol Wash Solution e della DNA Elution Solution, ed ha lo scopo di purificare il DNA dai contaminanti che inibiscono la Taq DNA Polimerasi.

In questa ricerca è stato seguito il protocollo suggerito dalla casa produttrice del FastPrep<sup>®</sup> System, che prevede l'utilizzo di 500 mg di suolo e condizioni di lisi mediante il FastPrep<sup>®</sup> Instrument riassumibili in tempi di 30–40 s e velocità di 5.5–6.0 m s<sup>-1</sup>.

### ***3.5.2.2 Estrazione dell'RNA mediante RNA PowerSoil<sup>™</sup> Total RNA Isolation Kit***

Il RNA PowerSoil<sup>™</sup> Total RNA Isolation Kit è studiato per estrarre l'RNA totale dai microrganismi del suolo. Il protocollo prevede l'estrazione da 2 g di suolo mediante l'utilizzo di diverse soluzioni estraenti, tra cui la Bead Solution che, associata ad agitazione, favorisce la separazione delle particelle di suolo e la sospensione delle cellule batteriche. Il materiale genetico viene poi estratto con una soluzione di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1, v:v) a temperatura ambiente; la fase acquosa ottenuta dopo centrifugazione viene trattata con altre soluzioni a basse temperature, fino ad avere un pellet contenente l'RNA che viene sospeso con una soluzione. L'RNA viene poi trattenuto da una colonna e successivamente eluito da una soluzione di eluizione. L'acido nucleico ottenuto viene fatto precipitare e raccolto dopo centrifugazione. A questo punto il pellet di RNA viene sospeso con una apposita soluzione inclusa nel kit.

L'RNA estratto è stato purificato da DNA eventualmente coestratto con il TURBO DNA-free<sup>™</sup> Kit (Ambion Inc., Applied Biosystem) e retrotrascritto con il RETROscript<sup>®</sup> Kit (Ambion Inc., Applied Biosystem), in modo da ottenere DNA complementare (cDNA) da utilizzare per le successive analisi.

### **3.6 Caratterizzazione qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici**

Gli acidi nucleici estratti dai suoli e quelli ottenuti per amplificazione sono stati valutati sia qualitativamente che quantitativamente. Tale valutazione ha diversi scopi: i) caratterizzare il materiale genetico per qualità e quantità dei suoli analizzati; ii) determinare le differenze tra i diversi metodi di estrazione applicati; iii) confrontare i metodi di quantificazione del DNA. Per caratterizzare gli acidi nucleici sono stati adottati due diversi metodi, spettrofotometrico ed elettroforetico, sia per confrontare i metodi stessi, che per ovviare a problemi legati alla contaminazione organica, in particolare acidi umici, che in alcuni casi non permette la stima della concentrazione di DNA di una sospensione con il metodo spettrofotometrico.

#### **3.6.1 Metodo spettrofotometrico**

L'analisi spettrofotometrica di molte molecole, ad esempio gli acidi nucleici, si basa sul fatto che esse possono assorbire l'energia di una radiazione incidente ad una determinata lunghezza d'onda. Una sospensione pura di DNA ha uno spettro di assorbimento nell'ultravioletto con il massimo alla lunghezza d'onda di 260 nm. Ogni oligonucleotide presenta un coefficiente di assorbimento che dipende dalle dimensioni della molecola. Tale fattore permette di determinare la precisa concentrazione di una sospensione di un determinato oligonucleotide, ma una sospensione di DNA dalla composizione non nota non presenta un unico coefficiente di assorbimento. Per una stima abbastanza precisa della concentrazione di una sospensione di DNA può essere utilizzato un fattore generale, derivato dalla media dei valori di coefficienti di assorbimento di DNA differenti per composizione e dimensione. Secondo tale fattore, ad una sospensione di DNA a doppio filamento (dsDNA) la cui concentrazione è di 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  corrisponde un'assorbanza a 260 nm pari ad una densità ottica ( $A_{260}=1$  OD). La tecnica spettrofotometrica può essere impiegata anche per valutare la qualità del materiale genetico, ovvero la purezza della sua sospensione. Infatti, durante l'estrazione di DNA dalle cellule si coestraggono anche altre sostanze organiche, come ad esempio le proteine. Queste ultime assorbono come il DNA nella regione ultravioletta, ma con il massimo alla lunghezza d'onda di 280 nm. Una misura del grado di purezza da materiale proteico del DNA estratto consiste nel rapporto tra l'assorbanza della sospensione alla lunghezza d'onda di

260 nm, tipica del DNA, e l'assorbanza a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Il valore di tale rapporto compreso tra 1.6 e 2.0 indica che la sospensione è abbastanza pura da proteine; valori inferiori a 1.6 indicano una contaminazione da proteine non trascurabile, mentre se il rapporto è maggiore di 2.0 si ha probabilmente una contaminazione da RNA. In un estratto di DNA possono però essere presenti molti altri contaminanti, tra cui polisaccaridi, carboidrati, fenoli, peptidi, ed in particolare per il DNA estratto da campioni di suolo, specialmente quelli ricchi di sostanza organica, composti come gli acidi umici e fulvici. Questi ultimi generalmente prevalgono in estratti da suolo, e il grado di contaminazione da essi può essere ricavato dal rapporto  $A_{260}/A_{230}$ , essendo il massimo di assorbimento per gli acidi umici a 230 nm. Tale rapporto non dovrebbe essere inferiore a 2.0 per un campione di DNA puro, ma solitamente è inferiore. Comunque campioni con un indice di purezza con  $A_{260}/A_{230}$  intorno a 1.6 si sono rivelati sufficientemente puri per le analisi successive quali la PCR.

Le misure di assorbimento di sospensioni non pure di DNA possono però mettere in risalto un limite di questa tecnica, cioè la sovrapposizione degli spettri di assorbimento di più composti o gruppi di composti che hanno picchi di assorbimento simili. In tal caso vi è la possibilità che si sovrastimi la concentrazione reale del composto di interesse, nel nostro caso il DNA. Questa tecnica risulta affidabile per valori di assorbimento non inferiori a 0.05 OD per l'elevata variabilità delle misure. Inoltre, richiede l'uso di quantità notevoli di DNA che generalmente non può essere riutilizzato.

I campioni di acidi nucleici sono stati analizzati allo spettrofotometro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) misurando l'assorbimento di piccoli volumi (1–2  $\mu$ l) delle sospensioni ovvero di soluzioni diluite (0.1–0.3%) alle lunghezze d'onda di 230, 260 e 280 nm.

### **3.6.2 Metodo elettroforetico**

L'elettroforesi si basa sulla migrazione di molecole che possiedono una carica elettrica, come gli aminoacidi, i peptidi, i nucleotidi e gli acidi nucleici, quando sono sottoposte ad un campo elettrico. A seconda del segno della propria carica, le molecole migrano verso il catodo o l'anodo. Gli acidi nucleici, risultando carichi negativamente per la presenza dei gruppi fosfato, migrano verso l'anodo. Per l'elettroforesi degli acidi nucleici in genere si utilizzano gel di

agarosio o di acrilamide. La velocità di migrazione del DNA/RNA dipende: i) dalle dimensioni delle molecole; ii) dalla concentrazione dell'agarosio nel gel; iii) dalla tensione in volt applicata; iv) dalla conformazione dell'acido nucleico. Frammenti lineari più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli più grandi, mentre, a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta super avvolta (super coiled DNA). In condizioni standard la mobilità elettroforetica delle molecole di DNA è inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare.

Per la separazione di molecole di DNA dalle dimensioni differenti solitamente si usano gel d'agarosio, la cui struttura rappresenta una sorta di rete con pori di 100–300 nm attraverso cui le molecole migrano. Siccome gli acidi nucleici non sono visibili, è necessario utilizzare un colorante in grado di legarsi alle molecole di DNA. Uno dei metodi più utilizzati consiste nel colorare il gel, prima o dopo la corsa elettroforetica, con l'etidio bromuro, un colorante fluorescente con un gruppo planare che si intercala tra le basi azotate del DNA. Il DNA, stimolato con una radiazione UV con lunghezza d'onda di 254 nm, trasmette l'energia al colorante ad esso legato che la rilascia sottoforma di radiazione visibile nella regione rosso-arancio a 590 nm. La vicinanza alle basi del DNA e il suo orientamento saranno responsabili dell'emissione di fluorescenza di intensità maggiore di quella del colorante libero. Il complesso DNA–etidio bromuro è quindi visualizzato irradiando il gel mediante un trans-illuminatore UV.

In questa ricerca è stato impiegato il buffer TBE 0.5X (45 mM Tris–borato, 1 mM EDTA, pH 8.0) sia per preparare i gel d'agarosio che come tampone della corsa elettroforetica; i gel avevano concentrazioni di agarosio dello 0.7% per il DNA genomico e dell'1.5% per i più piccoli prodotti di amplificazione. Il colorante è stato incorporato nei gel prima della corsa, alla concentrazione di  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ . L'elettroforesi è stata effettuata per tempi tra 40 e 60 min applicando una tensione di  $5\text{--}7 \text{ V cm}^{-1}$  di distanza tra gli elettrodi. Per facilitare il caricamento dei campioni nel gel e per poter verificare l'elettroforesi durante la corsa, è stato utilizzato un loading buffer contenente i coloranti visibili ad occhio nudo blu di bromofenolo e xilene cianolo, nonché il glicerolo, al fine di conferire al campione una densità maggiore di quella del tampone di corsa. Il blu

di bromofenolo migra verso l'anodo alla stessa velocità dei frammenti di DNA più piccoli (ca 300 bp), mentre lo xilene cianolo migra insieme ai frammenti di DNA a più elevato peso molecolare (ca 4000 bp). Per valutare quantità e peso molecolare dei frammenti caricati nei gel sono stati utilizzati due marker di massa e peso molecolare (Fermentas), uno con frammenti tra 80 e 10000 bp (Marker Mix), e l'altro con frammenti tra 80 e 1031 bp (Marker Low Range). I gel sono stati sia visualizzati al trans-illuminatore UV (Vilber Lourmat TFX-20.M) che acquisiti mediante il Fluor-S™ MultiImager (BIORAD) per poi essere elaborati con il software Quantity One® (BIORAD). Tale applicazione ha permesso di individuare le bande contenenti il DNA estratto dai suoli all'interno del gel e determinarne l'intensità misurando la fluorescenza emessa dall'etidio bromuro legato al DNA. Tale intensità è stata poi convertita in quantità di DNA attraverso il confronto con i marker di massa.

### **3.7 Purificazione del DNA estratto**

Il DNA estratto dai suoli con i metodi classici è stato purificato per poter essere utilizzato in successive applicazioni. La necessità di effettuare la purificazione è stata dettata principalmente dall'elevato contenuto di acidi umici in grado di inibire la Taq DNA polimerasi. Talvolta ad un campione sono state applicate diverse procedure di purificazione ovvero applicata più volte una medesima procedura. I metodi riportati sono quelli principalmente applicati, mentre altri basati sull'uso di colonne cromatografiche sono stati usati in combinazione con essi.

Il materiale genetico ottenuto con i metodi commerciali non ha richiesto generalmente ulteriori fasi di purificazione oltre quelle già previste dalla procedura del kit.

#### **3.7.1 Purificazione mediante gel elettroforesi**

Tale procedura consente di purificare il DNA da contaminanti organici che possono essere separati dal materiale genetico per le differenti proprietà elettroforetiche. In particolare, gli acidi umici coestratti con il DNA migrano più rapidamente del DNA stesso durante l'elettroforesi in gel d'agarosio, formando una scia di colore bruno nella parte bassa del gel.

In questo studio la purificazione del DNA da gel di agarosio è stata effettuata utilizzando il NucleoSpin<sup>®</sup> Extract kit (Promega). Tale metodo consiste nell'effettuare una elettroforesi in gel d'agarosio, non necessariamente del tipo low melting point, del DNA che si intende purificare. Individuata la banda del DNA che interessa, bisogna tagliare il pezzo di gel contenente la banda stessa limitandone la quantità. Il pezzo di gel viene pesato in provetta da 1.5 ml, a cui si aggiungono 300 µl di NT1 buffer ogni 100 mg di gel facendo attenzione a non caricarne più di 400 mg, e il campione incubato a 50 °C per 5–10 min vortexando ogni 2–3 min fino al completo scioglimento del gel. Il campione viene caricato in una colonna di estrazione posizionata in un tubo di raccolta; si aggiungono 600 µl di NT3 e si centrifuga a 11000 rpm per 1 min, dopodichè si scarta quello che passa e si ripone la colonna nel tubo di raccolta. Nella colonna si aggiungono 200 µl di NT3 e si centrifuga a 11000 rpm per 2 min; si scarta nuovamente quello che passa e si ripone la colonna nel tubo di raccolta. Si aggiungono 500 µl di NT2 e si centrifuga a 11000 rpm per 1 min; dopo aver scartato quello che passa si ripone la colonna nel tubo di raccolta, si aggiungono 600 µl di NT3 e si centrifuga a 11000 rpm per 1 min. A questo punto si posiziona la colonna in una nuova provetta da 1.5 ml e si aggiungono 50 µl di NE (per una migliore eluizione di DNA ad alto peso molecolare può essere vantaggioso utilizzare il buffer di eluizione NE preriscaldato a 70 °C); si incuba a TA per 1 min e si centrifuga a 11000 rpm per 1 min. La qualità del DNA ottenuto può essere verificata mediante elettroforesi in gel d'agarosio.

### **3.7.2 Purificazione mediante cesio cloruro**

Il DNA estratto da suolo può essere purificato da contaminanti organici coestratti con il DNA utilizzando cesio cloruro. Nella procedura seguita il pellet di DNA estratto deve essere sospeso in 0.5 ml di H<sub>2</sub>O sterile; ad esso si aggiungono 0.5 g di cesio cloruro e si lascia in incubazione per 3 h a TA. Dopo centrifugazione a 10000 rpm per 20 min si raccoglie il surnatante a cui si aggiungono 2 ml di H<sub>2</sub>O e 1.5 ml di isopropanolo, per poi incubare per 15 min a TA; dopo aver centrifugato a 13000 rpm per 15 min e scartato il surnatante, si sospende il pellet con 0.5 ml di H<sub>2</sub>O e 0.1 ml di K<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> 8 M, e si incuba per 15 min a TA. Al surnatante raccolto dopo centrifugazione a 10000 rpm per 15 min si aggiungono 0.3 ml di isopropanolo e si incuba per 15 min a TA; dopo aver

centrifugato a 13000 rpm per 15 min si ottiene un pellet che viene lavato con 1 ml di etanolo 70%. La sospensione viene centrifugata a 13000 rpm per 15 min e il surnatante scartato; lasciare asciugare il pellet e sospendere in 0.05–0.10 ml di H<sub>2</sub>O. A questo punto è possibile valutare l'efficacia della procedura mediante elettroforesi in gel d'agarosio 0.7–1.0 %.

### **3.8 Amplificazione del DNA mediante Polymerase Chain Reaction**

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica che consente di sintetizzare in grandi quantità ed in tempi relativamente brevi frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziale e terminale. Con questa tecnica, un filamento complementare ad un filamento stampo di DNA viene sintetizzato utilizzando nucleotidi liberi grazie all'azione dell'enzima termostabile Taq DNA polimerasi; tale enzima, estratto dall'organismo termofilo *Thermus aquaticus* da cui deriva la sigla dell'enzima, risulta stabile ed attivo ad alte temperature, permettendo di eseguire ripetutamente i tre cicli dell'amplificazione del DNA con una sola aggiunta di enzima all'inizio della procedura. L'amplificazione dei frammenti di interesse avviene utilizzando come innesco oligonucleotidi la cui sequenza è complementare a quella della porzione da amplificare. In tal caso i primer sono detti specifici e permettono di studiare geni poco rappresentati nel campione in esame. Le fasi della PCR consistono in:

- Denaturazione – in questa fase la soluzione di reazione contenente DNA stampo, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, primers e Taq DNA polimerasi, viene portata a una temperatura di 94 °C. La doppia elica si denatura e i due filamenti di cui essa è composta sono liberi e distesi;
- Appaiamento – durante questa fase, la temperatura di 50–58 °C permette il legame dei primers alle regioni complementari dei filamenti del DNA denaturato;
- Estensione – fase in cui la temperatura è di circa 72 °C, condizione ottimale per l'attività della Taq polimerasi. L'azione dell'enzima determina un allungamento dei filamenti di DNA grazie agli oligonucleotidi liberi in soluzione che si legano in successione partendo

dai primers, ed utilizzando come stampo i singoli filamenti di DNA originati durante la denaturazione.

Per lo studio delle comunità microbiche edafiche solitamente si utilizzano dei primers specifici per determinate regioni del gene 16S rRNA eubatterico. Siccome essi permettono di analizzare tutti gli eubatteri sono considerati universali. I primers impiegati in questa ricerca si posizionano nelle regioni variabili V6 e V8 di detto gene, permettendo l'amplificazione di un frammento altamente conservato costituito da 473 basi, più precisamente il frammento 968–1401 del 16S rRNA. I primers sono appunto il 968f ed il 1401r, dove il numero indica la posizione 5' sul gene 16S rRNA di *Escherichia coli* e la lettera la direzione di estensione. Per effettuare la DGGE, l'amplificazione avviene utilizzando dei primers che permettono di avere all'estremità 5' dell'amplicone un frammento la cui sequenza sia ricca di GC; in tal modo il frammento avrà la giusta stabilità che garantirà un'adeguata denaturazione nelle condizioni di elettroforesi denaturante.

La PCR è stata effettuata in volumi della miscela di reazione di 50 µl; per ciascun campione di DNA sono state provate diverse combinazioni dei reagenti della miscela di reazione e diverse quantità di template, partendo sempre da diluizioni della sospensione di DNA. Le concentrazioni dei reagenti impiegati nella miscela di reazione sono riportate in tab. 3.1. La Bovine Serum Albumine (BSA) è stata utilizzata per la presenza di eventuali inibitori della Taq DNA polimerasi come gli acidi umici.

Tabella 3.1

Concentrazioni dei reagenti usati per la PCR del DNA estratto dai suoli studiati

Buffer	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs Mix	Primers	Taq	DNA	BSA
1X	1.5 mM	0.2 mM (1X)	2 µM	0.06 U µl <sup>-1</sup>	0.2–0.8 ng µl <sup>-1</sup>	0.1 µg µl <sup>-1</sup>

La sequenza dei primers utilizzati è la seguente:

- GC-968f: 5' – CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC – 3' (forward);
- 1401r: 5' – CGG TGT GTA CAA GAC CC – 3' (reverse).

Il programma seguito al termociclatore (Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700, Applied Biosystem) è il seguente: una denaturazione iniziale di 3min a 95 °C, seguita da 40 cicli di 10 sec a 95°C, 20 sec a 56°C, 40 sec a 72 °C, ed un'estensione finale di 10 min a 72 °C.

Al termine della PCR, l'esito dell'amplificazione è stato verificato mediante elettroforesi in gel di agarosio su aliquote di 3 µl, e le immagini dei gel elaborati come descritto nel par. 3.7.2.

### **3.9 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis**

Il principio su cui si basa la tecnica della DGGE è che le molecole a doppia elica di DNA, cioè costituite dai due filamenti complementari, si denaturano a temperature elevate ovvero in presenza di determinati agenti chimici. Nel caso in cui è la temperatura a causare la separazione dei due filamenti del DNA (Melting Temperature,  $T_M$ ), il valore al quale avviene la denaturazione dipende sia dal tipo di legami idrogeno tra le basi complementari poste sui due filamenti, che dall'attrazione tra basi adiacenti poste sullo stesso filamento. Nel primo caso, regioni ricche in GC richiederanno per denaturarsi temperature più alte di regioni ricche in AT. Da qui l'importanza della sequenza in basi di una molecola di DNA nel caratterizzare la stessa in termini di proprietà di denaturazione. Teoricamente, molecole di DNA la cui sequenza differisce in una sola base sono caratterizzate da temperature di denaturazione diverse. La DGGE usufruisce di questa importante caratteristica per separare frammenti di DNA sulla base della loro sequenza in nucleotidi. L'elettroforesi avviene in gel di poliacrilamide preparati con un gradiente crescente di agenti chimici in grado di denaturare appunto le molecole di DNA. Gli agenti denaturanti solitamente utilizzati sono la formammide e l'urea. Essi causano la rottura dei legami idrogeno tra le basi dei filamenti complementari, riducendo la mobilità elettroforetica del DNA. Infine, la struttura ramificata derivante dalla denaturazione della doppia elica comporta l'arresto dei due filamenti dissociati, che restano intrappolati nelle maglie del gel. Ogni molecola di DNA caricata nel gel si denaturerà in un preciso punto del gel, che corrisponderà ad una precisa combinazione delle concentrazioni dei due agenti denaturanti. Per ottenere una buona risoluzione delle bande rappresentanti i diversi frammenti di DNA è necessario impedire la completa dissociazione della doppia elica. Ciò si ottiene

aggiungendo all'estremità 5' di uno dei primers impiegati per amplificare il frammento desiderato una regione ricca in GC, la cosiddetta GC-clamp. Tale porzione non si denaturerà e farà sì che il frammento si fermerà in un punto del gel dipendente dalle sue proprietà di denaturazione.

Per la valutazione della diversità genetica dei suoli studiati sono stati preparati gel al 6% di poliacrilamide caratterizzati da un gradiente lineare "top-filling" di urea-formamide, parallelo alla direzione dell'elettroforesi, con percentuale di agenti denaturanti tra il 45% ed il 60%. I gel sono stati preparati utilizzando una soluzione al 40% di acrilamide:bis-acrilamide (37.5:1), e per le due soluzioni denaturanti rispettivamente 18.9 g urea + 18 ml formamide e 25.2 g urea + 24 ml formamide. La concentrazione di urea e formamide nella soluzione al 45% di agenti denaturanti è rispettivamente 3.1 M e 18% v:v, mentre nella soluzione al 65% di agenti denaturanti è rispettivamente 4.2 M e 24% v:v. Per far avvenire la polimerizzazione del gel sono stati aggiunti alle soluzioni ammonio persolfato (APS) e tetrametiletilendiamina (TEMED) alla concentrazione di 0.09% per entrambi. Per ciascun suolo circa 300 ng di DNA amplificato sono stati caricati nel gel dopo aggiunta di un colorante, e la corsa elettroforetica avviata a temperatura e tensione costanti, rispettivamente di 60 °C e 75 V, in tampone TAE 1X (Tris-Acido acetico glaciale-acido Etilendiaminotetracetico). La DGGE è stata realizzata con il Dcode System (BIORAD). Dopo 15 h il gel è stato colorato al buio per 30 min con una soluzione 1:10000 di SYBR Green I ed acquisito con il Gel Doc 2000 System (BIORAD).

### **3.10 Attività microbica**

L'attività della microflora di un suolo può essere valutata attraverso la misura della CO<sub>2</sub> prodotta in condizioni controllate. In laboratorio la respirazione di un suolo viene determinata sulla frazione < 2 mm, in modo da eliminare la componente dovuta alla fauna di maggiori dimensioni.

Per la realizzazione degli esperimenti ci si è avvalsi dell'utilizzo di un particolare tipo di biometer flask costituito da una beuta principale a cui è collegata una provetta (fig. 3.2). Il suolo trova posto nella beuta, mentre la provetta laterale ospita una soluzione basica, solitamente NaOH oppure KOH, che funge da trappola chimica della CO<sub>2</sub> liberata. Il sistema risulta chiuso da due tappi in gomma; quello posto sulla beuta è attraversato da un tubo in vetro con

un'alloggiamento per Ascarite, un composto in grado di trattenere la CO<sub>2</sub> atmosferica, e chiuso a sua volta da un rubinetto; il tappo che chiude la provetta, invece, è attraversato da un ago a cui è possibile collegare una siringa per le

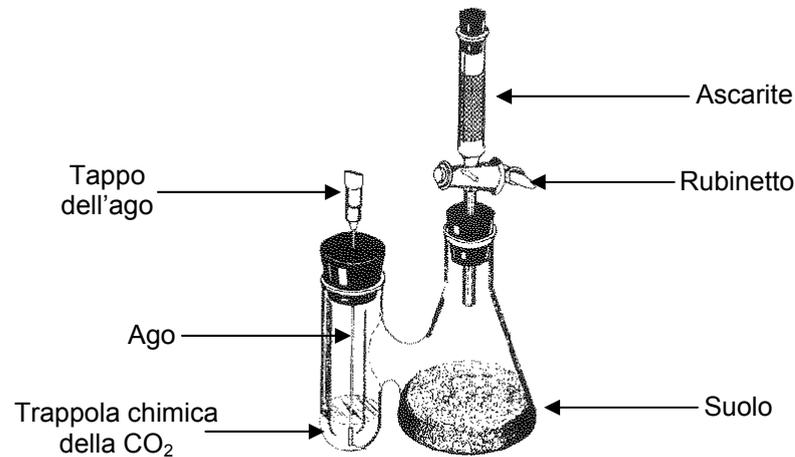


Figura 3.2. Biometer flask impiegata per la misura della CO<sub>2</sub> liberata dai suoli studiati durante il periodo di incubazione

attività di prelievo della soluzione basica, per il rinnovo della stessa e per il rinnovo dell'aria interna.

Per ogni esperimento di misura della respirazione basale sono state preparate almeno due biometer flasks per ciascun suolo. La preparazione di un sistema è avvenuto seguendo le fasi sotto riportate:

- Le flasks sono state sterilizzate in autoclave a 121 °C per 20 min;
- In ogni beuta è stata aggiunta una quantità di suolo fresco equivalente a 10 g di suolo secco;
- Al suolo è stata aggiunta acqua sterile fino al raggiungimento del 60 % della sua capacità idrica massimale;
- La beuta è stata chiusa con il tappo e l'Ascarite è stata inserita nell'apposito alloggiamento sopra il rubinetto;
- Il tappo con l'ago è stato inserito nella provetta fino a chiudere il sistema;
- Con il rubinetto aperto, aspirando l'aria interna con una siringa collegata all'ago è stata cambiata tutta l'aria all'interno del sistema, in modo da

rimpiazzarla con aria atmosferica ossigenata ma priva di CO<sub>2</sub>, in quanto trattenuta dall'Ascarite;

- Con l'ausilio di una siringa sono stati aggiunti nella provetta 10 ml di una soluzione di KOH 0.1–0.5 M, dopodiché nell'ago è stato inserito un tappo, il rubinetto è stato chiuso e la flask incubata.

Tutte le suddette operazioni di caricamento delle flasks con il suolo sono state effettuate in cappa a flusso laminare per eliminare il rischio di contaminazione da microrganismi esterni al campione da studiare. Tutte le biometer flasks sono state incubate in camera termostata ad una temperatura di 25 °C ed assenza di luce.

Periodicamente, la CO<sub>2</sub> liberata dai suoli ed intrappolata dalla soluzione di KOH secondo la reazione acido–base che porta alla formazione delle forme ioniche dell'acido carbonico, è stata titolata con una soluzione di HCl 0.1–0.25 M. Gli indicatori fenolftaleina e metilarancio, aggiunti in sequenza alla soluzione da titolare, hanno permesso di determinare la quantità di CO<sub>2</sub> che ha reagito con la base utilizzata. Ad ogni misura è corrisposto il rinnovo dell'aria all'interno del sistema chiuso e l'aggiunta di una nuova soluzione di KOH.

### **3.11 Elaborazione dei dati**

I dati riportati nel capitolo 4 rappresentano la media (errore standard) delle misure dei parametri valutati per i suoli studiati. Per le proprietà chimico–fisiche sono state effettuate 3–5 misurazioni per ciascun campione.

Per ciascun suolo l'estrazione degli acidi nucleici con i diversi metodi è stata effettuata almeno due volte. La significatività tra le differenze delle quantità di DNA estratto con i diversi metodi è stata valutata mediante il t–Test (Sigma Stat 3.0, Jandel Scientific, USA).

Le immagini digitali dei gel relativi al DNA estratto dai suoli sono state analizzate con il software Quantity One<sup>®</sup> (BIORAD). La cluster analysis basata sul calcolo dell'indice di Pearson con il metodo UPGMA dei patterns elettroforetici relativi ai gel DGGE è stata effettuata con il Gel Doc Documentation (BIORAD).

La Principal Component Analysis (PCA) delle proprietà dei suoli studiati è stata effettuata utilizzando il software SIN-TAX 2000. L'analisi è stata effettuata calcolando la PCA a due componenti basata sulla distanza Euclidea tra le coppie.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Caratteristiche dei suoli

I suoli studiati hanno diverso uso e sono sottoposti a diverso impatto antropico. Alcuni di essi, come per il sito S1 ed S3, si tratta molto probabilmente di suoli di riporto la cui costituzione risale a diversi decenni fa. I siti S1 ed S3 sono aiuole adiacenti a strade urbane altamente trafficate dove talvolta si rinviene materiale di risulta di attività edili. La composizione in sabbia, limo e argilla, e la classificazione tessiturale secondo il metodo USDA dei suoli sono riportate in tab. 4.1 e in fig. 4.1.

I suoli dei siti S1, S3 ed S5 appartengono alla classe tessiturale franco-sabbiosa secondo il criterio USDA; tra i tre quello del sito S5 presenta un più elevato contenuto di sabbia. I suoli dei siti S2 ed S4 hanno un contenuto in

Tabella 4.1

Percentuali delle frazioni tessiturali dei suoli studiati secondo il criterio USDA

Campione	Sabbia	Limo	Argilla
	0.05 mm < Ø < 2 mm	2 µm < Ø < 50 µm	Ø < 2 µm
S1	61	35	4
S2	38	52	10
S3	54	43	3
S4	24	31	45
S5	70	26	4

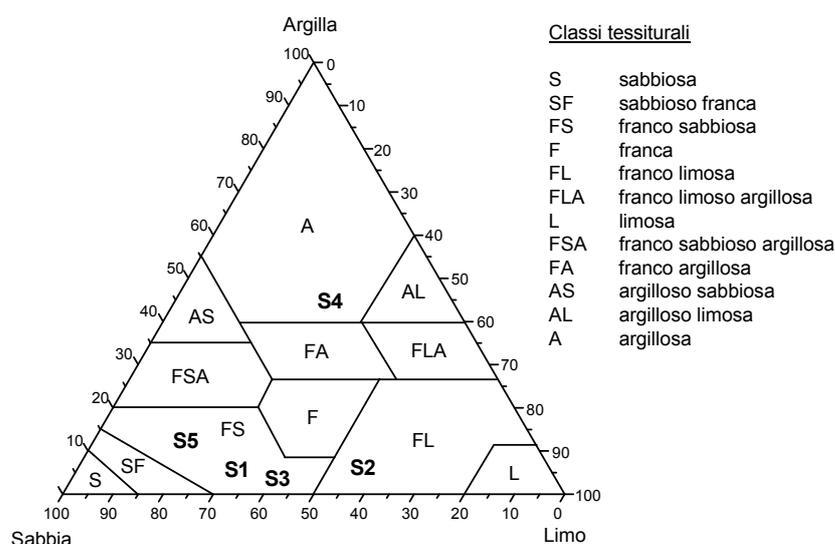


Figura 4.1. Tessitura dei suoli studiati mediante il metodo USDA.

sabbia più basso e di conseguenza un apporto di limo più argilla maggiore. Il suolo S2 appartiene alla classe franco–limosa, mentre il suolo del sito S4 risulta essere argilloso.

Nelle tabb. 4.2–4.3 sono riportate le proprietà chimico–fisiche dei suoli prelevati negli anni 2008 e 2009. I diversi campioni presentano valori del pH simili e prossimi alla neutralità, tranne che per i suoli dei siti S4 ed S5 del 2008 e quello del sito S3 del 2009, per i quali è stata osservata una leggera acidità. Il tenore idrico indica che poco prima del campionamento del 2008 non ci sono stati

Tabella 4.2

Valori medi (err.std.) di pH, tenore idrico (TI), capacità idrica massimale (CIM), contenuto di sostanza organica (SO) e di carbonio organico dei suoli prelevati nel 2008

Campione	pH	TI (% p.s.)	CIM (% p.s.)	SO (% p.s.)	C <sub>org</sub> (% p.s.)
S1	6.51 (0.09)	19.79 (0.05)	65.26 (2.67)	8.50 (0.58)	4.76 (0.34)
S2	7.05 (0.02)	28.66 (0.05)	129.83 (3.84)	22.50 (0.26)	13.11 (0.14)
S3	6.94 (0.06)	25.54 (0.08)	73.55 (1.90)	9.50 (0.26)	5.57 (0.14)
S4	6.19 (0.01)	28.30 (0.34)	106.08 (2.14)	21.50 (0.45)	12.41 (0.23)
S5	6.19 (0.06)	9.44 (0.00)	44.72 (0.35)	4.00 (0.41)	2.32 (0.18)

fenomeni meteorici importanti; ciononostante i suoli dei siti S2 ed S4, rispettivamente con tessitura franco–limosa ed argillosa, presentavano un tenore idrico maggiore, a conferma del fatto che le particelle di minori dimensioni come limo ed argilla trattengono una maggiore quantità d’acqua (Wu *et al.*, 1990). Osservando lo stesso parametro per i suoli del 2009 si notano valori di umidità elevati per i suoli dei siti S2, S3 ed S4. Il contenuto idrico medio–alto per questi campioni è dovuto alle intense precipitazioni che hanno interessato l’area di studio all’inizio della primavera del 2009, periodo in cui è stato effettuato il campionamento. La capacità di campo dei suoli studiati riflette la classificazione tessiturale degli stessi, con valori di capacità di campo più elevati per i suoli con contenuto di limo più argilla maggiore (S2 ed S4).

Tabella 4.3

Valori medi (err.std.) di pH, tenore idrico (TI), capacità idrica massimale (CIM), contenuto di sostanza organica (SO) e di carbonio organico dei suoli prelevati nel 2009

Campione	pH	TI (% p.s.)	CIM (% p.s.)	SO (% p.s.)	C <sub>org</sub> (% p.s.)
S1	6.67 (0.03)	19.55 (0.17)	57.57 (0.51)	8.00 (0.00)	4.64 (0.00)
S2	6.77 (0.04)	42.21 (0.22)	108.27 (0.78)	25.00 (0.58)	14.50 (0.33)
S3	6.21 (0.05)	40.15 (0.66)	62.90 (1.49)	11.33 (0.67)	6.57 (0.39)
S4	6.66 (0.03)	59.88 (0.51)	117.99 (3.56)	37.45 (0.20)	21.72 (0.12)
S5	6.54 (0.02)	7.84 (0.28)	35.66 (0.31)	5.33 (0.33)	3.09 (0.19)

Il più basso contenuto di sostanza organica è stato misurato per entrambi i prelievi (4.0% e 5.3% ) nel suolo del sito agricolo S5. I valori misurati, comunque, non si discostano notevolmente da quelli riportati da altri autori per la stessa tipologia di suolo (Grønsten and Børresen, 2009; Prechtel *et al.*, 2009). Il suolo del sito S5 è stato campionato in una zona aperta a ridosso di un agrumeto ed interessata da un'agricoltura non intensiva soprattutto ad ortaggi. La continua rimozione delle colture, con brevi e non regolari periodi di assenza dell'attività agricola, è probabilmente il motivo principale della scarsa quantità di sostanza organica. I più alti contenuti di sostanza organica sono stati misurati nei suoli dei siti S2 e S4, caratterizzati da parchi urbani a lecceta. Il sito S2 si trova all'interno di un parco urbano storico nella città di Napoli; al momento del campionamento è stato osservato un abbondante strato di lettiera ricca di pedofauna e di miceli fungini. Il sito S4, invece, si trova in un parco lontano da strade e centri abitati ed è sede di un'oasi gestita da un'associazione ambientalista dal 1993, fino a quando è stata adibita a riserva di caccia. Sebbene il sito S4, come il sito S2, presentasse una vasta lecceta, questa si presentava notevolmente differente da quella del sito S2: i lecci sono più alti e meno fitti. Lo strato di lettiera è meno abbondante di quello osservato nel sito S2, ma ugualmente ricca in pedofauna e pedoflora. Il contenuto di sostanza organica dei suoli dei siti S1 ed S3 è risultato simile: entrambi mostravano una scarsa quantità di lettiera, probabilmente per il continuo calpestio del suolo ad opera di persone ed animali domestici e al continuo rastrellamento della lettiera che si deposita sul suolo nel sito S1, e per la presenza di un pratello basso nel sito S3.

#### **4.2 Definizione di un metodo coltura–indipendente per lo studio della microflora edafica**

La microflora edafica dei suoli dei siti indagati è stata studiata applicando tecniche coltura–indipendenti. Tra i metodi applicati, quelli utilizzati per la valutazione della diversità genetica delle comunità microbiche si basano sull'estrazione degli acidi nucleici, sia direttamente dalla matrice suolo che dalle cellule separate dal suolo stesso. Al fine di valutare l'efficienza estrattiva in termini quantitativi e qualitativi, ai suoli sono stati applicati metodi di estrazione del DNA totale sia classici che basati sull'utilizzo di kit. Le estrazioni effettuate

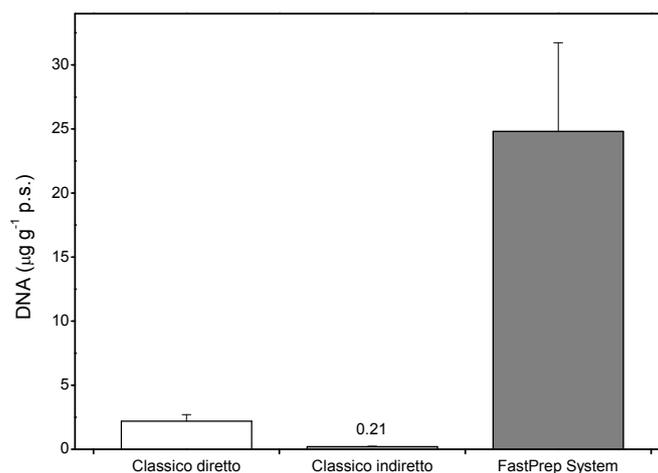


Figura 4.2. Quantità medie (err.std.) di DNA ottenuto dai suoli con i diversi metodi di estrazione.

con i metodi classici fanno riferimento alla procedura proposta da Zhou *et al.* (1996) per l'estrazione diretta; tale procedura è stata applicata per effettuare sia un'estrazione diretta dalla matrice suolo che indiretta, dopo la separazione delle cellule batteriche dal suolo stesso. La quantità di DNA estratto con i metodi classici non sempre era sufficiente per una corretta quantificazione con il metodo spettrofotometrico, pertanto, per un valido confronto delle diverse tecniche estrattive è stato adottato il metodo elettroforetico. I risultati in termini di efficienza estrattiva dei metodi classici sono confrontati con quelli relativi al metodo commerciale (FastPrep<sup>®</sup> System) in fig. 4.2. Le quantità di DNA ottenute con l'estrazione classica diretta variano tra 0.47 e 5.30 µg g<sup>-1</sup> p.s.. Yeates e collaboratori (1997) riportano rese medie di 2.5–26.6 µg DNA g<sup>-1</sup> p.s., ottenute con metodi simili, mentre Kozdroj *et al.* (2000) hanno ottenuto rese di 26.6–78.0 µg DNA g<sup>-1</sup> p.s.. La differenza nelle rese potrebbe essere dovuta al diverso metodo di misura impiegato dagli autori, cioè quello spettrofotometrico; infatti, in presenza di contaminanti organici nella sospensione di DNA il cui spettro di assorbimento è simile a quello degli acidi nucleici, tale metodo può indurre in una sovrastima del DNA stesso (Cullen and Hirsch, 1998).

L'estrazione classica indiretta ha dato rese sensibilmente inferiori a quella classica diretta, con valori tra 0.06 e 0.33 µg DNA g<sup>-1</sup> p.s. mediamente circa 10 volte inferiore al metodo diretto e di due ordini di grandezza inferiore alla quantità estratta da Kozdroj *et al.* (2000) con un metodo di estrazione indiretto (5.1–13.5 µg DNA g<sup>-1</sup> p.s.). La resa inferiore in DNA tra i due metodi applicati in questa

ricerca è dovuta molto probabilmente al fatto che la procedura di separazione delle cellule batteriche dal suolo comporta una perdita di cellule. Una interessante review (Roose–Amsaleg *et al.*, 2001) riporta che la procedura di separazione delle cellule dal suolo può determinare una perdita delle stesse che può variare tra il 30% e il 50% per suoli torbosi e tra il 20% ed il 30% per suoli agricoli e forestali con elevato contenuto di limo e argilla. Øvreås *et al.* (1998) hanno applicato un metodo di estrazione indiretta a due differenti suoli ottenendo una resa in DNA corrispondente a circa il 15% di quello contenuto nelle cellule batteriche contate microscopicamente per gli stessi campioni. Tale perdita cellulare è fortemente dipendente dal contenuto di particelle argillose, in quanto i batteri del suolo vi restano attaccati. Inoltre, con il metodo indiretto non si estrae la componente di DNA extracellulare che invece viene estratta con la lisi diretta.

Il FastPrep<sup>®</sup> System ha permesso di ottenere quantità di DNA di 3.24–77.65  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.s.. La quantità media di DNA estratta con questo metodo è pari a 24.80  $\mu\text{g g}^{-1}$  di suolo, mentre le rese riportate dal produttore sono di 2–750  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  di suolo. Con il medesimo metodo de Liphay e collaboratori (2004) hanno ottenuto quantità di 14.8 e 17.3  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  p.s. da due suoli dalle caratteristiche simili a quelle dei suoli studiati.

In termini di quantità il metodo basato sulla lisi meccanica ha quindi permesso di ottenere circa 10 volte più materiale genetico che con il metodo classico diretto, mentre la differenza con il metodo indiretto è di circa due ordini di grandezza, con differenze statisticamente significative ( $P < 0.01$ ) tra le quantità ottenute con tale metodo e quelle relative ai metodi classici. Il processo di bead–beating su cui si basa il FastPrep<sup>®</sup> System è in grado di aumentare la resa di estrazione del DNA dal suolo (Miller *et al.*, 1999).

Gli acidi nucleici estratti con i diversi metodi sono stati caratterizzati qualitativamente per valutarne le dimensioni e il grado di purezza. L'elettroforesi in gel d'agarosio ha rivelato che il DNA estratto dai campioni è ad alto peso molecolare, con dimensioni quasi sempre maggiori di 10 kbp. I metodi classici, generalmente delicati, hanno fornito quasi sempre materiale genetico visibile nel gel come una banda piuttosto netta. Il DNA estratto con il FastPrep<sup>®</sup> System, invece, presenta una sensibile degradazione con frammenti fino a circa 3–5 kbp. Questo fenomeno è dovuto alla energica lisi meccanica (bead–beating) su cui si

basa il metodo di estrazione. La variazione delle frazioni ad alto e basso peso molecolare del DNA estratto mediante bead-beating da campioni di suolo è stata determinata da de Liphay *et al.* (2004). Essi hanno riscontrato una diminuzione della frazione ad alto peso molecolare (9.4–23.1 kbp) ed un contemporaneo aumento delle frazioni a più basso peso molecolare (< 3.4 kbp) con l'aumentare del tempo di trattamento dei campioni.

Il grado di purezza del DNA estratto dai suoli studiati rappresenta un fattore molto importante nelle tecniche come la PCR. Qualora possibile esso è stato valutato attraverso la misura dell'assorbanza a 230, 260 e 280 nm di piccole aliquote della sospensione contenente il DNA. I rapporti  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  calcolati hanno permesso di valutare il grado di contaminazione degli estratti rispettivamente da proteine e acidi umici. I valori di  $A_{260}/A_{280}$  compresi tra 1.69 e 1.89 hanno indicato l'assenza di contaminazione da materiale proteico. Tebbe *et al.* (1993) hanno osservato un incremento del rapporto  $A_{260}/A_{280}$  da 1.2 a 1.8 per campioni di DNA estratto da suolo dopo l'applicazione di procedure di purificazione. La contaminazione da sostanze organiche del DNA estratto è risultata molto diversa in funzione del metodo utilizzato. Entrambi i metodi classici hanno dato estratti molto contaminati da materiale organico sospeso, che conferiva alle sospensioni un colore dall'ambra al bruno scuro. Tra i due metodi, quello indiretto ha fatto ottenere estratti visibilmente più puliti ma, come già discusso, a discapito della resa. Per i metodi classici, comunque, non sempre è stato possibile valutare il grado di contaminazione spettrofotometricamente, proprio per la massiccia presenza di tali composti. Solo in alcune condizioni il materiale genetico estratto è risultato amplificabile mediante PCR, anche dopo aver applicato delle procedure di purificazione. Dal momento che il rapporto di assorbanza  $A_{260}/A_{230}$  è risultato inferiore (0.30–0.95) al valore limite di 1.5 che indica il grado di purezza da acidi umici del DNA estratto dal suolo, si presume che il DNA estratto con il FastPrep<sup>®</sup> System presenti una contaminazione da acidi umici non trascurabile. Ciononostante tali estratti sono risultati amplificabili alle stesse condizioni applicate agli estratti ottenuti con i metodi classici, e senza la necessità di purificarli ulteriormente.

I contaminanti organici sono spesso presenti negli estratti di DNA ottenuti da suolo a prescindere dal metodo di estrazione applicato, come è ampiamente riportato in letteratura (Cullen and Hirsch, 1998; Kuske *et al.*, 1998; Niemi *et al.*,

2001; Robe *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 1996). Molti autori suggeriscono nella fase di estrazione l'utilizzo di sostanze in grado di allontanare gli acidi umici e l'applicazione di diverse procedure di purificazione degli estratti per l'impiego in analisi successive (Kuske *et al.*, 1998; Porteous *et al.*, 1997; Roose-Amsaleg *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1996). In uno studio Young e collaboratori (1993) propongono un metodo di purificazione del DNA estratto dal suolo mediante elettroforesi in gel d'agarosio, preparando i gel con diverse concentrazioni di polivinilpirrolidone (PVP). L'aggiunta di questo composto ha la funzione di ridurre la mobilità elettroforetica dei contaminanti fenolici presenti nell'estratto, permettendo una migliore separazione del DNA. I risultati positivi ottenuti dai ricercatori sono stati valutati in termini di amplificabilità del materiale genetico purificato con tale metodo. In un lavoro recente (Sharma *et al.*, 2007) è riportato un metodo per la purificazione dagli acidi umici del DNA estratto dal suolo mediante l'utilizzo di Q-Sepharose. Gli autori, che propongono l'applicazione ad estratti ottenuti con metodiche tradizionali, riportano una riduzione degli acidi umici dell'84% e una minima perdita di DNA. I metodi di purificazione richiedono però tempo, materiale e comportano generalmente la perdita di una quantità significativa del DNA estratto, che se ottenuto con metodi classici non sempre la sua quantità è sufficiente per applicazioni successive.

La presenza di acidi umici coestratti con il DNA può interferire con la sua quantificazione mediante il metodo spettrofotometrico. Come riportato in precedenza per gli estratti ottenuti con i metodi classici, non sempre è possibile

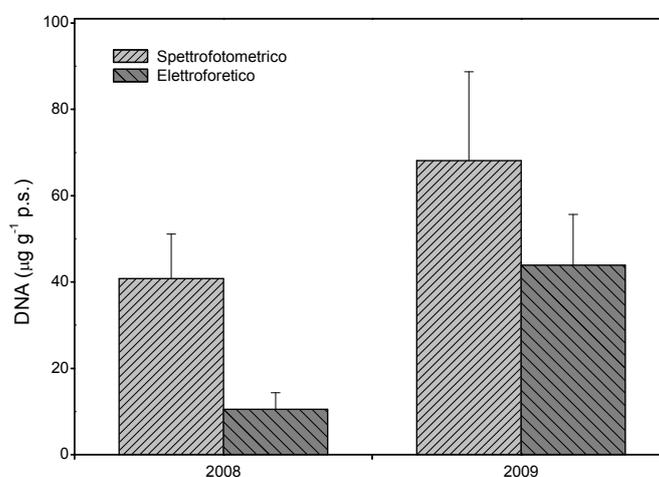


Figura 4.3. Quantità medie (err.std.) ottenute con i due metodi di misura del DNA estratto con il FastPrep® System dai suoli prelevati negli anni 2008-2009 .

utilizzare tale metodo per la caratterizzazione del materiale genetico estratto da un suolo. Cullen and Hirsch (1998) hanno dimostrato, confermando i risultati riportati da altri autori, che le determinazioni spettrofotometriche di  $A_{260}$  non rappresentano una misura accurata della concentrazione del DNA di campioni non purificati. Questo è dovuto principalmente all'espansione degli intervalli di assorbimento a 260 nm da parte dei contaminanti umici coestratti, che produce una sovrastima del contenuto di DNA del campione fino ad un fattore 10. Le misure di assorbanza a 260 nm mostrano una mancanza di specificità per il DNA, in quanto molti altri composti assorbono la radiazione UV intorno a tale lunghezza d'onda (proteine, RNA, nucleotidi, alcuni detergenti). A tal proposito in fig. 4.3 sono riportate le stime ottenute con i metodi spettrofotometrico ed elettroforetico della quantità di DNA estratto con il FastPrep<sup>®</sup> System dai suoli studiati. La stima effettuata elettroforeticamente si basa sull'utilizzo di uno standard di massa e sulla misura dell'intensità della radiazione emessa dai complessi formati tra il DNA ed il colorante utilizzato (etidio bromuro). Per i suoli prelevati in entrambi gli anni le quantità di DNA stimate spettrofotometricamente sono maggiori, con rapporti tra le due stime rispettivamente pari a 3.9 e 1.6.

La maggiore efficienza estrattiva del FastPrep<sup>®</sup> System, oltre che i vantaggi relativi ai tempi richiesti per l'estrazione e alle piccole quantità di suolo necessarie, è stata fondamentale nella scelta del metodo da applicare ai suoli per lo studio della microflora edafica.

### **4.3 Studio della microflora dei suoli con tecniche molecolari**

La microflora dei suoli prelevati nel 2008 è stata studiata mediante tecniche molecolari basate sull'estrazione di DNA ed RNA. La tecnica della DGGE applicata ai frammenti del 16S rDNA amplificati a partire dal materiale genetico estratto ha permesso di valutare la diversità genetica delle comunità batteriche. Inoltre, l'attività della microflora edafica è stata studiata discutendo il contenuto di RNA e DNA dei suoli.

#### **4.3.1 Quantità e qualità degli acidi nucleici nei suoli**

Il DNA dai suoli è stato estratto mediante il metodo basato sul FastPrep<sup>®</sup> System, mentre l'RNA è stato estratto mediante il PowerSoil<sup>™</sup> DNA Isolation Kit

Sample. La fig. 4.4 rappresenta l'immagine del gel d'agarosio che contiene gli acidi nucleici estratti. Il DNA è ad alto peso molecolare ( $> 10$  kbp) per tutti i suoli. Esso presenta una sensibile frammentazione fino a circa 3 kbp dovuta al metodo di estrazione meccanica.

Le bande più intense, nelle lanes 2 e 6, sono relative ai suoli dei siti S2 ed S4, rispettivamente. Nella parte destra della figura è visibile l'RNA in forma di due bande relative alle rispettive sub-unità ribosomiali, una costituita da un frammento di circa 900 bp e l'altra costituita da un frammento di circa 1500 bp.

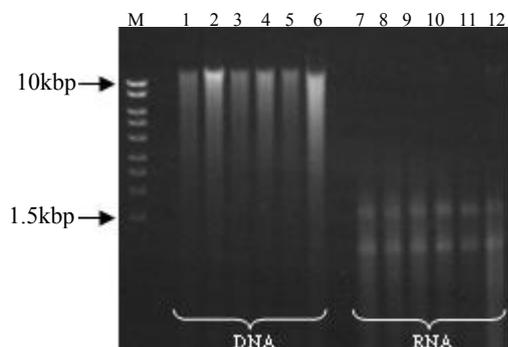


Figura 4.4. Valutazione degli acidi nucleici estratti dai suoli del 2008 mediante elettroforesi in gel d'agarosio 0.7%. Lanes: M-High range marker; 1, 7-S3; 2, 8-S2; 3, 9-S1; 5, 11-S5; 6, 12-S4.

In fig. 4.5 sono riportate le quantità di DNA estratto dai suoli studiati; la stima delle quantità è stata effettuata spettrofotometricamente. I suoli S2 ed S4 sono risultati i più ricchi di DNA con  $76.20$  e  $51.65 \mu\text{g g}^{-1}$  p.s. rispettivamente. I suoli dei siti S1, S3 ed S5 presentavano rispettivamente  $27.69$ ,  $28.66$  e  $19.71 \mu\text{g DNA g}^{-1}$  p.s.. Tali concentrazioni sono confrontabili con quelle ottenute da altri autori con lo stesso metodo di estrazione e tipologia di suoli (de Liphay *et al.*, 2004). Il suolo del sito S2, che presentava il contenuto più alto di DNA,

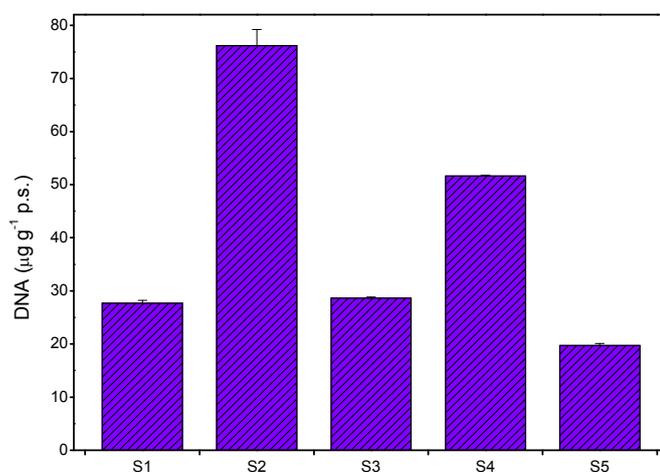


Figura 4.5. Valori medi (err.std.) del DNA estratto con il FastPrep® System dai suoli raccolti nel 2008.

presentava anche il maggiore contenuto di sostanza organica (22.50%), e analogamente quello del sito S5, che è risultato il più povero in DNA, presentava il contenuto di sostanza organica più basso (4.00%). Corrispondenza diretta tra contenuto di DNA, estratto utilizzando il FastPrep<sup>®</sup> System, e contenuto di sostanza organica nei suoli è stata riportata da Liphay *et al.* (2004). Gli stessi autori hanno ottenuto maggiore quantità di DNA da suoli con maggiore contenuto di limo più argilla. Quantità tra 14.6 e 21.3  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  p.s., confrontabili con quelle ottenute per i suoli dei siti S1, S3 ed S5 in questo studio, sono state ottenute da Kuske *et al.* (1998) da suoli sabbioso–franchi con basso contenuto di sostanza organica (ca 2–3%). Essi, però, da un suolo sabbioso con contenuto di sostanza organica < 1% hanno ottenuto una quantità di DNA molto minore (0.18  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  p.s.). Øvreås *et al.* (1998) hanno estratto rispettivamente 9 e 27  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  p.s. da due suoli con contenuto di sostanza organica di 9.7% e 53.4% rispettivamente.

In tab. 4.4 sono riportati i rapporti di assorbanza  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  calcolati per i campioni di DNA. Per tutti i campioni è stata riscontrata una

Tabella 4.4  
Valori medi (err.std.) dei rapporti di assorbanza del DNA estratto dai suoli prelevati nel 2008

Campione	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
S1	1.80 (0.01)	0.52 (0.01)
S2	1.78 (0.00)	0.49 (0.01)
S3	1.78 (0.00)	0.30 (0.00)
S4	1.89 (0.01)	0.31 (0.00)
S5	1.84 (0.00)	0.45 (0.01)

contaminazione da proteine trascurabile, mentre i bassi rapporti  $A_{260}/A_{230}$  fanno presumere una simile contaminazione da acidi umici per tutti i campioni. Questa valutazione della qualità ha suggerito il confronto delle stime della quantità di DNA utilizzando i metodi di misura già discussi. In fig. 4.6 sono riportati i valori medi in  $\mu\text{g DNA g}^{-1}$  p.s. misurati con i due metodi. Per tutti i campioni è stata osservata una differenza tra i valori ottenuti con i diversi metodi. Per i campioni S3 ed S5 tale differenza è risultata di un fattore maggiore di sei, mentre per gli altri la stima mediante il metodo spettrofotometrico è stata circa tre volte più alta

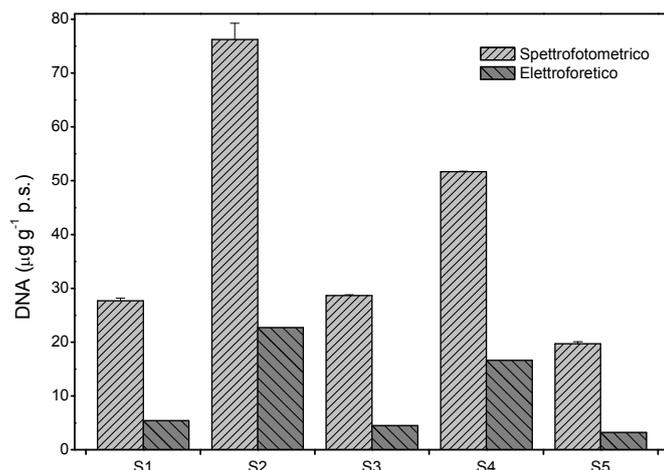


Figura 4.6. Quantità medie (err.std.) del DNA estratto dai suoli del 2008 ottenute con i due metodi di misura.

di quella ottenuta elettroforeticamente. In tal caso le reali concentrazioni di DNA dei suoli sarebbero inferiori a quelle assunte dalle misure di assorbanza a 260 nm.

Le quantità di RNA estratto dai suoli studiati variano tra 1.55 e 5.44 µg g<sup>-1</sup> p.s. (fig. 4.7). Il valore più alto è osservabile per il campione S2, mentre il più basso corrisponde al suolo del sito agricolo S5, come è stato osservato per il contenuto di DNA degli stessi suoli. Nel caso dell'RNA, però, le differenze tra le quantità nei diversi suoli sono più piccole. Duarte *et al.* (1998) hanno ottenuto rese di 0.25–1.00 µg RNA g<sup>-1</sup> di suolo da quattro suoli diversi per tessitura e contenuto di sostanza organica con un metodo non commerciale che combina la lisi chimica a quella meccanica. Hahn *et al.* (1990) hanno estratto 0.85 µg RNA

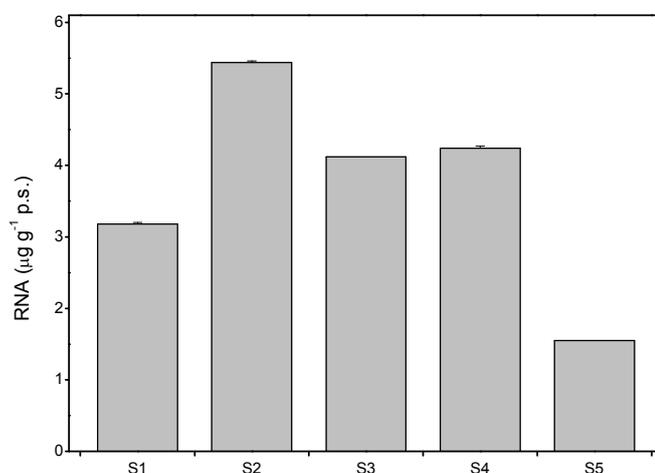


Figura 4.7. Quantità medie (err.std.) dell'RNA estratto dai suoli del 2008.

$\text{g}^{-1}$  di suolo, mentre Felske *et al.* (1996)  $0.2 \mu\text{g RNA g}^{-1}$  p.s.. Moran e collaboratori (1993) hanno estratto tra  $1.1$  e  $1.9 \mu\text{g RNA g}^{-1}$  di suolo forestale. Le quantità ottenute in questa ricerca sono sensibilmente maggiori a quelle ottenute dagli altri ricercatori. La spiegazione di questa differenza potrebbe risiedere in una maggiore attività metabolica della microflora dei suoli studiati (Eriksson *et al.*, 2001), ma in parte potrebbe essere dovuta all'efficienza dei diversi metodi di estrazione adottati.

#### **4.3.2 Rapporto RNA/DNA come indice biochimico dell'attività della microflora edafica**

La concentrazione di RNA in un campione di suolo indica il tasso di sintesi enzimatica. In quest'ottica i risultati ottenuti per i suoli studiati suggeriscono che la microflora del suolo S2 sia interessata da un'attività enzimatica maggiore, mentre quella del suolo del sito S5 sia meno attiva in questo senso (Portillo and Gonzalez, 2009). Da sola però la quantità di RNA estratto da un suolo non fornisce informazioni sullo stato della microflora edafica; se la si rapporta al contenuto di DNA degli stessi campioni, invece, si possono ottenere utili informazioni sull'attività delle comunità di microrganismi. Infatti, se a livello cellulare le concentrazioni di DNA possono essere considerate relativamente costanti, i livelli di RNA possono cambiare in funzione delle risposte cellulari fisiologiche agli stress esterni. Il rapporto RNA/DNA è tra gli indici biochimici che vengono applicati largamente per la valutazione dei tassi di crescita e delle condizioni fisiologiche e trofiche negli organismi, in particolare i pesci (Buckley *et al.*, 1999). La relazione tra il rapporto RNA/DNA e l'attività di una popolazione o di una comunità è stata discussa per diversi ambienti, come suoli (Hurt *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2006), sedimenti marini (Dell'Anno *et al.*, 1998) ed organismi, come batteri marini (Kerkhof *et al.*, 1993), nematodi (Ibiam and Grant, 2005) e pesci (Tanaka *et al.*, 2007; Vinagre *et al.*, 2008). In tutti i casi tale rapporto è stato utilizzato come indice del fattore di crescita o di una determinata funzione fisiologica. Per le comunità di microrganismi del suolo esso indica l'intensità della sua attività metabolica, che può essere dipendente dai fattori ambientali più diversi (Eriksson *et al.*, 2001).

I valori del rapporto RNA/DNA per i suoli studiati in questa ricerca sono riportati in fig. 4.8. Come si può osservare in figura i valori più alti si hanno per i

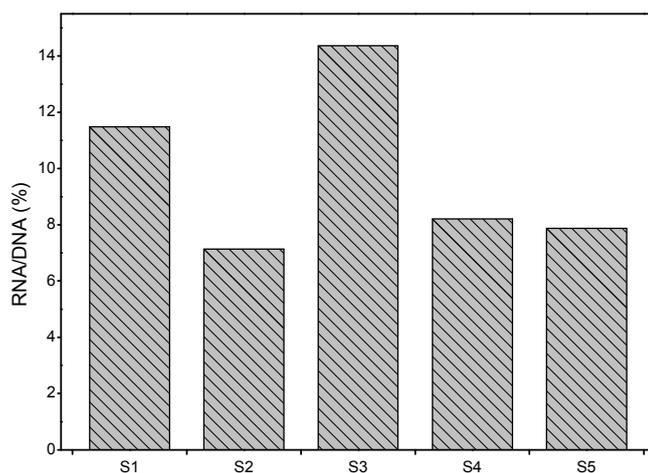


Figura 4.8. Rapporto percentuale tra il contenuto medio di RNA e DNA dei suoli raccolti nel 2008.

campioni S3 ed S1, mentre il campione S2, che presentava il contenuto più alto di RNA, è caratterizzato dal più basso rapporto RNA/DNA. Il fatto che i suoli dei siti S1 ed S3, non particolarmente ricchi di sostanza organica, siano caratterizzati da una maggiore attività di sintesi di RNA potrebbe essere dovuto alla presenza di condizioni di stress. Infatti, in condizioni sfavorevoli le comunità di microrganismi possono utilizzare in modo più rapido ed intenso le risorse energetiche disponibili. Uno di questi fattori può essere la presenza di metalli pesanti a basse concentrazioni che altrimenti inibirebbero l'attività microbica (Khan *et al.*, 2000). Un fattore in grado di influenzare lo stato metabolico della microflora edafica di tali campioni potrebbe essere la presenza di contaminanti derivanti dalle attività antropiche che vi si svolgono.

#### 4.3.3 Diversità genetica delle comunità batteriche dei suoli

Le comunità batteriche dei suoli prelevati nel 2008 sono state studiate dal punto di vista della diversità genetica mediante la 16S rDNA PCR – DGGE del DNA e del cDNA, ottenuto mediante retrotrascrizione a partire dall'RNA, estratti dai medesimi suoli. L'amplificazione mediante PCR della porzione di interesse del gene 16S è stata effettuata utilizzando un set di primers universali per eubatteri che si colloca nella regione variabile V6. L'amplificabilità del DNA estratto rappresenta un parametro della qualità del materiale estratto, e in questa ricerca è stato necessario mettere a punto la tecnica per ottenere ampliconi adatti per le successive analisi. Nelle varie prove è stato necessario diluire la

sospensione di DNA da usare come template; questa operazione ha lo scopo sia di ottenere concentrazioni di acido nucleico ottimali che di apportare meno contaminanti possibile, e quindi inibitori della Taq DNA polimerasi, alla soluzione di reazione. In alcuni casi la diluizione del campione è stata spinta fino ad un fattore pari a 40. L'amplificazione è avvenuta in modo efficiente per tutti i campioni (fig. 4.9), con una banda intensa di dimensioni valutabili in 400–500 bp e la presenza ridotta di artefatti dovuti probabilmente alla degradazione del DNA di partenza. Siccome per ciascun campione è stata utilizzata circa la stessa quantità di DNA stampo, la differenza nell'intensità delle bande è probabilmente da attribuire alla presenza di qualche inibitore della PCR che in alcuni casi ha rallentato la reazione.

Le molecole di DNA e cDNA amplificate sono state separate in base alle loro proprietà elettroforetiche mediante un gel con gradiente di agenti denaturanti

la cui immagine è riportata in fig. 4.10. I pattern elettroforetici ottenuti con gli ampliconi del DNA totale estratto dai suoli studiati sono mostrati in fig. 4.10–a. In essi sono visibili molte bande, tra cui solo alcune ben definite. Se si analizza il gel nel suo insieme, infatti, nella parte centrale vi è una zona con un'intensità diffusa dove sono individuabili diverse bande. La maggior parte delle bande visibili, in particolare quelle più intense, sono comuni a tutti i campioni, come quelle indicate dalle frecce nere. Nel gel sono visibili altre bande non comuni a tutti i campioni, come quelle nella zona indicata dalla freccia bianca e in particolare relative al campione S3. La presenza di bande per questo campione e non per gli altri sembrerebbe indicare una maggiore diversità relativa della comunità batterica di tale suolo. Le due bande principali comuni a tutti i campioni sono più intense nella lane 4 (S4), probabilmente ad indicare per questo suolo una maggiore abbondanza nella comunità di determinate specie. L'indice di similarità di Sørensen (IS) calcolato considerando il numero totale di bande per ciascun campione e quelle comuni ad essi mostrano la più elevata similarità tra le

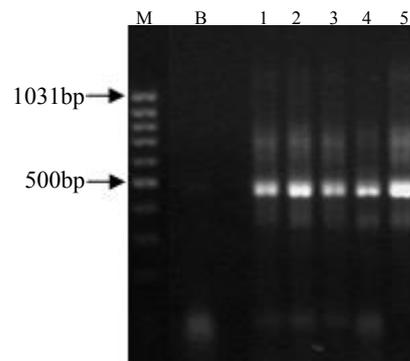


Figura 4.9. Prodotti della 16S rDNA – PCR del DNA estratto dai suoli del 2008 in gel d'agarosio 1.5%. Lanes: M–Low range marker; B–Bianco; 1–S1; 2–S3; 3–S2; 4–S5; 5–S4.

comunità dei suoli dei siti S4 ed S5 (IS=0.89), mentre il valore più basso è stato ottenuto per la coppia S1–S3 (IS=0.50).

In fig. 4.10–b sono riportati i pattern elettroforetici ottenuti caricando nel gel di poliacrilamide gli ampliconi del DNA complementare (cDNA) all'RNA estratto dai suoli studiati. I pattern elettroforetici dei diversi campioni non presentano molte bande visibilmente distinguibili, ma si può osservare la presenza di alcune bande principali, indicate dalle frecce, comuni a tutti i campioni. Il motivo di un pattern elettroforetico non particolarmente ricco potrebbe essere indice di una comunità microbica metabolicamente attiva costituita da poche specie dominanti. Anche il periodo dell'anno in cui è stato effettuato il campionamento potrebbe spiegare la struttura delle comunità microbiche. I suoli studiati sono stati prelevati all'inizio dell'autunno, dopo la stagione estiva. Le caratteristiche dei suoli come la temperatura, l'umidità e la disponibilità di nutrienti, dopo un lungo periodo caldo e asciutto potrebbero aver favorito la dominanza solo di alcune specie batteriche in grado di tollerare tali condizioni. Analizzando le bande visibili per i diversi campioni si nota che quelle relative al suolo del sito S3 sono più intense, ad indicare una maggiore abbondanza delle popolazioni attive tra le diverse comunità batteriche. Tali popolazioni batteriche

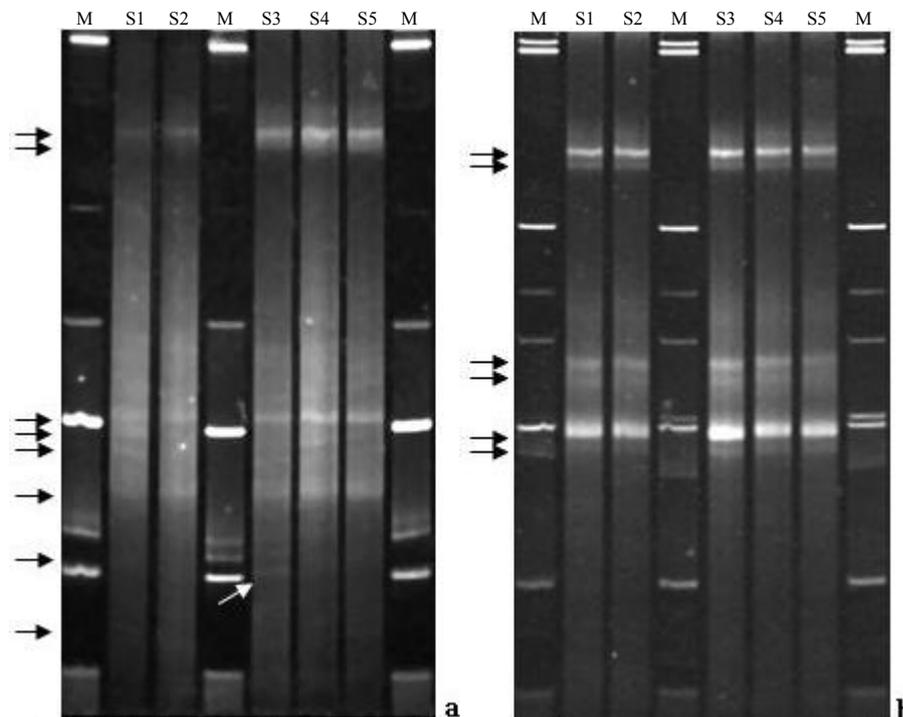


Figura 4.10. 16S PCR–DGGE (a) del DNA e (b) del cDNA dei suoli del 2008 amplificati con i primers GC–968f e 1401r. Lanes: M–Low range marker; 1–S1; 2–S2; 3–S3; 4–S4; 5–S5.

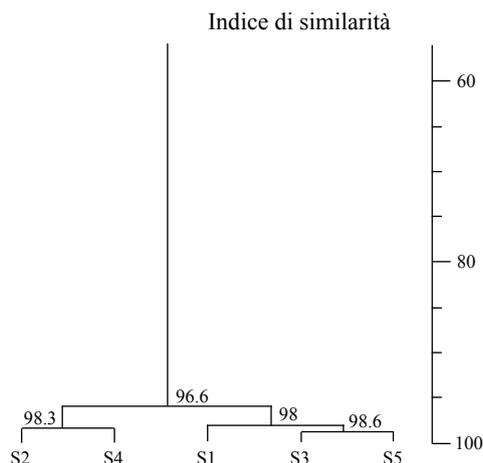


Figura 4.11. Dendrogramma che mostra la cluster analysis dei patterns elettroforetici del 16S amplificato dal cDNA basato sul coefficiente di similarità di Pearson.

potrebbero quindi essere responsabili per questo suolo del rapporto RNA/DNA più alto, e quindi della maggiore attività enzimatica relativa. Analizzando i patterns relativi ai diversi suoli si nota che le bande visibili sono comuni a tutti i campioni, eccetto per l'assenza di una banda dal campione S5.

La similarità dei pattern elettroforetici dei vari suoli indagati è stata valutata calcolando il coefficiente di similarità di Pearson basato sul metodo delle coppie non pesate (UPGMA) e rappresentata nel dendrogramma relativo alla cluster analysis (fig. 4.11). I campioni risultano molto simili tra loro, con valori non inferiori a 0.97. Tale analisi però mette in evidenza la presenza di due raggruppamenti principali: un primo gruppo costituito dai campioni S2 ed S4; un secondo gruppo costituito dai campioni S1, S3 ed S5. Tra questi ultimi, infine, S3 ed S5 sono maggiormente simili tra loro. Nonostante le dissimilarità siano molto piccole, questo raggruppamento conferma le osservazioni fatte sulle proprietà chimico-fisiche ed il contenuto di DNA dei suoli analizzati.

I pattern elettroforetici relativi ai due gel DGGE mostrano delle differenze sostanziali relativamente al numero totale di bande. Le bande attribuibili alle comunità batteriche metabolicamente attive (fig. 4.10-b) sono tutte presenti nei pattern corrispondenti alle comunità non necessariamente attive (fig. 4.10-a); queste ultime sono risultate generalmente caratterizzate da una maggiore diversità genetica. Le popolazioni presenti nei suoli ma non attive potrebbero essere costituite da forme dormienti o con un'attività tale da non permettere una

risoluzione con la tecnica adottata in questa ricerca. Tale differenza è comunque non trascurabile e probabilmente attribuibile al periodo di campionamento.

#### 4.4 Studio dell'attività della microflora edafica con tecniche coltura-indipendenti

La microflora dei suoli dei siti indagati prelevati nella primavera del 2009 è stata studiata con metodi coltura-indipendenti basati sull'estrazione del DNA totale direttamente dai suoli e sulla misura della CO<sub>2</sub> evoluta dagli stessi in condizioni controllate.

##### 4.4.1 Quantità e qualità del DNA nei suoli

Il DNA è stato estratto dai suoli studiati mediante il FastPrep<sup>®</sup> System. La fig. 4.12 rappresenta l'immagine del gel d'agarosio contenente il materiale genetico estratto dai suoli. Il DNA estratto possiede un peso molecolare superiore a 10 kbp per i suoli dei siti S1 ed S4 e non superiore a 8 kbp per il sito S2. In tutti i campioni è presente una sensibile frammentazione fino ai pesi molecolari più bassi, dovuta al metodo di estrazione meccanica. Comunque, la maggiore concentrazione di DNA si ha tra 6 kbp e 10 kbp. Le bande più intense, nelle lanes 2 e 4, sono relative ai suoli dei siti S2 ed S4, rispettivamente.

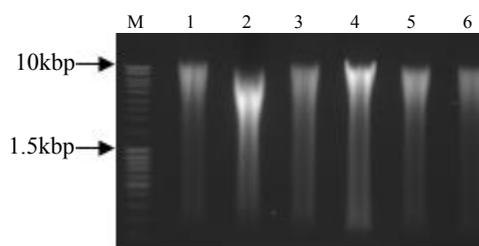


Figura 4.12. Gel d'agarosio (0.7%) del DNA estratto dai suoli prelevati nel 2009. Lanes: M- Marker Mix; 1-S1; 2-S2; 3-S3; 4-S4; 5, 6-S5.

In fig. 4.13 sono riportate le quantità medie, ottenute con il metodo spettrofotometrico, del DNA estratto, che variando da 24.4 a 139.9  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.s. superano i valori misurati nel campionamento del 2008. In particolare, il suolo S2 mostra una quantità doppia di quella misurata nel 2008, i suoli S3 ed S4 un leggero incremento, mentre i suoli S1 ed S5 valori simili.

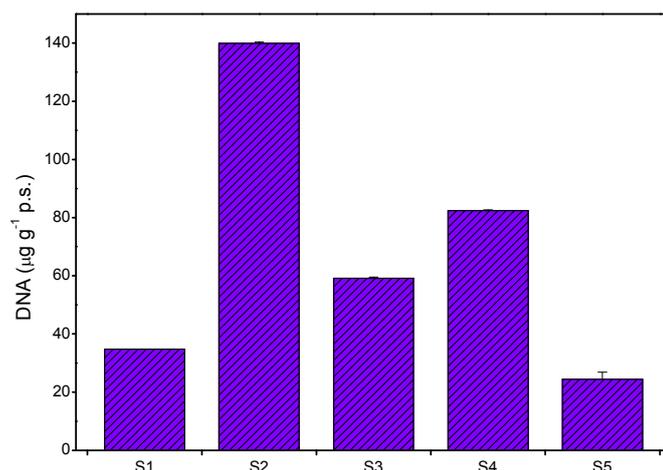


Figura 4.13. Valori medi (err.std.) del DNA estratto con il FastPrep® System dai suoli raccolti nel 2009.

Il suolo da cui è stata estratta la quantità maggiore di DNA ( $139.9 \mu\text{g g}^{-1}$  p.s.) presenta un contenuto di sostanza organica del 25%, mentre il suolo del sito S4, da cui sono stati ottenuti  $82.4 \mu\text{g DNA g}^{-1}$  p.s., ha un contenuto di sostanza organica del 37%. Sembra che non ci sia corrispondenza diretta tra il contenuto di sostanza organica e la quantità di DNA estratto dai suoli prelevati nel 2009, in particolare quelli dei siti S2, S3 ed S4. Complessivamente, è evidente che nei suoli campionati nel 2009 è presente una maggiore quantità di DNA, suggerendo una più abbondante biomassa edafica. Tale risultato potrebbe essere dovuto ad una maggiore disponibilità idrica ed una maggiore disponibilità di risorse nutritive.

La qualità del DNA estratto è stata valutata calcolando i rapporti di assorbanza  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  delle sospensioni contenenti il materiale genetico (tab. 4.5). Osservando i valori del rapporto  $A_{260}/A_{280}$  si deduce che per tutti i campioni il DNA estratto presenta una contaminazione trascurabile da materiale proteico. L'elevata assorbanza a 230 nm, invece, ha determinato rapporti

Tabella 4.5

Valori medi (err.std.) dei rapporti di assorbanza del DNA estratto dai suoli prelevati nel 2008

Campione	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
S1	1.77 (0.01)	0.56 (0.01)
S2	1.69 (0.00)	0.95 (0.01)
S3	1.78 (0.00)	0.43 (0.00)
S4	1.82 (0.01)	0.79 (0.00)
S5	1.81 (0.00)	0.60 (0.00)

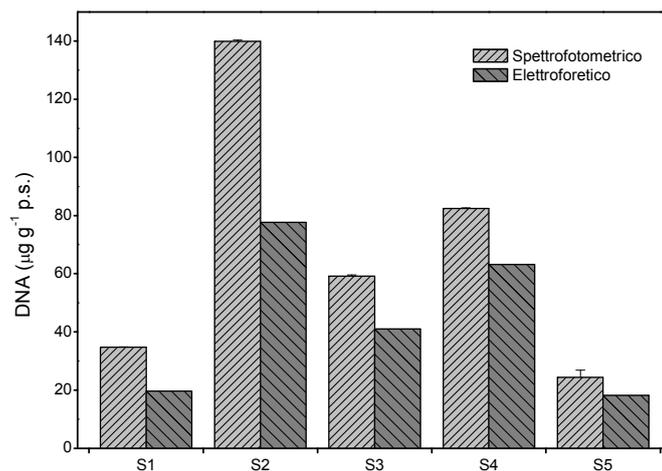


Fig 4.14 Quantità medie (err.std.) del DNA estratto dai suoli del 2009 ottenute con i due metodi di misura.

$A_{260}/A_{230}$  i cui valori indicano contaminazione da acidi umici. I livelli più alti di contaminazione, però, non sono stati riscontrati per i suoli con il maggiore contenuto di sostanza organica.

I rapporti tra le quantità di DNA stimate con il metodo spettrofotometrico e con quello elettroforetico variano tra 1.3 e 1.8 (fig. 4.14). Questi valori sono sensibilmente inferiori a quelli ottenuti per i suoli prelevati nel 2008; ciò è dovuto probabilmente alla maggiore accuratezza della misura elettroforetica effettuata per i campioni del 2009, i quali sono risultati meno frammentati dal metodo di estrazione applicato, ma probabilmente anche alla minore contaminazione da acidi umici. Diversamente da quanto ci si sarebbe atteso la differenza maggiore tra le quantità stimate con i due metodi è stata osservata per il DNA estratto dal suolo del sito S2, che invece ha riportato il rapporto  $A_{260}/A_{230}$  più elevato.

La qualità del DNA estratto dai suoli del 2009 è stata effettuata valutando l'amplificabilità degli estratti mediante PCR. Le diverse concentrazioni dei reagenti utilizzati per preparare la soluzione di reazione non hanno

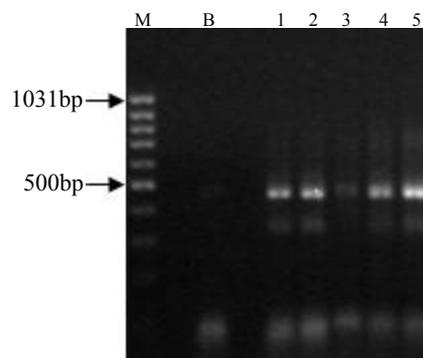


Figura 4.15. Prodotti della 16S rDNA – PCR del DNA estratto dai suoli del 2009. Lanes: M– Low range marker; B–Bianco; 1–S1; 2–S3; 3–S2; 4–S5; 5–S4.

prodotto differenze nell'amplificazione quanto la variazione dei volumi delle sospensioni di DNA. Infatti, per ottenere ampliconi utilizzabili per eventuali analisi successive è stato necessario diluire dieci volte le sospensioni del materiale genetico dei campioni S1, S3 ed S5, di un fattore 20 quelle del campione S4 ed addirittura di 40 volte la sospensione di DNA estratto dal suolo del sito S2. I risultati ottenuti, una parte dei quali è mostrata in fig. 4.15, hanno sottolineato la presenza di inibitori della Taq DNA polimerasi coestratti già notata per i suoli campionati nel 2008. Gli ampliconi ottenuti hanno dimensioni tra 400 e 500 bp come atteso, ed hanno un'intensità ottimale per altre applicazioni, tranne che per il campione S2, che ha prodotto una banda appena visibile. Inoltre, sono presenti quantità trascurabili di frammenti indesiderati coamplificati.

#### 4.4.2 Respirazione dei suoli per la valutazione dell'attività della microflora edafica

I microrganismi eterotrofi ossidano i composti organici a CO<sub>2</sub>. Tale ossidazione rappresenta un processo di fondamentale importanza nel ciclo del carbonio di tutti gli ecosistemi terrestri (Winding *et al.*, 2005). La respirazione basale del suolo può essere utilizzata per la valutazione dell'attività della microflora edafica (Gajda, 2009; Taok *et al.*, 2007; Włodarczyk *et al.*, 2008). Essa può essere determinata misurando la CO<sub>2</sub> liberata dal suolo in condizioni di laboratorio, come è stato fatto per i suoli prelevati nella primavera 2009. La

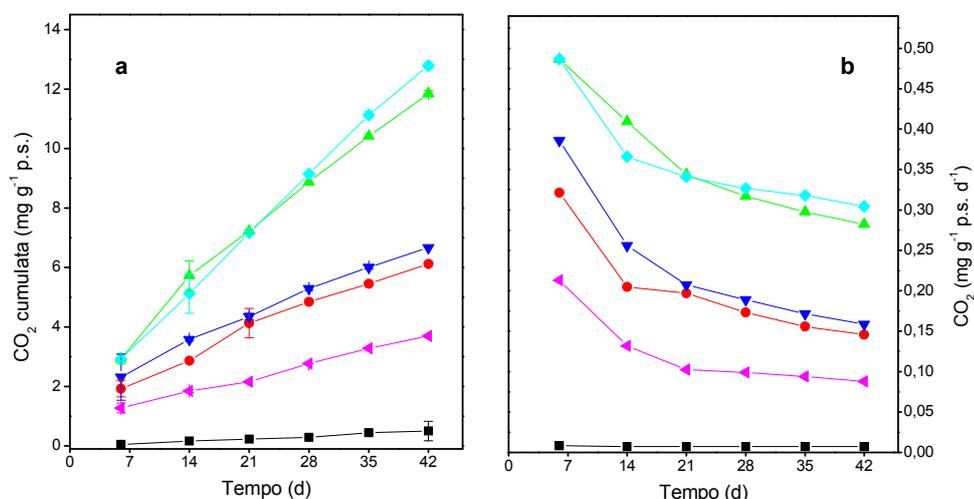


Fig 4.16. Valori medi (err.std.) della CO<sub>2</sub> liberata dai suoli raccolti nella primavera 2009.

Legenda: —■— Controllo; —●— S1; —▲— S2; —▼— S3; —◆— S4; —◀— S5

respirazione dei diversi suoli (fig. 4.16–a, b) presenta delle differenze già dopo sei giorni dall'incubazione. Tali differenze nella quantità totale di CO<sub>2</sub> prodotta diventano più marcate all'aumentare del tempo di incubazione. Ciononostante nella fig. 4.16–a si possono osservare delle similarità nella quantità di CO<sub>2</sub> prodotta dai diversi suoli: le quantità di CO<sub>2</sub> evoluta dai suoli dei siti S1 ed S3, come quelle liberate dai suoli dei siti S2 ed S4, sono risultate simili nello stesso periodo di osservazione, mentre la CO<sub>2</sub> prodotta dal suolo del sito S5 è risultata la più bassa tra tutti i suoli studiati. I valori della pendenza delle rette di regressione determinate per le quantità di CO<sub>2</sub> cumulate hanno valori pari a 1.2, 2.5, 1.2, 2.8 e 0.7 per i suoli dei siti S1, S2, S3, S4 ed S5 rispettivamente. I valori per le rette relative ai suoli S1 ed S3 evidenziano una simile velocità di emissione di CO<sub>2</sub>, nonostante la respirazione del suolo del sito S3 sia leggermente superiore. Analogamente è stato osservato per le rette relative ai suoli dei siti S2 ed S4, anche se dal giorno 21 di incubazione la velocità di emissione di CO<sub>2</sub> dal suolo del sito S4 diventa maggiore. Dopo 21 giorni dall'incubazione la quantità di CO<sub>2</sub> evoluta quotidianamente diminuisce per tutti i suoli, sebbene vengano mantenute differenze tra i siti per quel che riguarda la quantità di CO<sub>2</sub> emessa (fig. 4.16–b). In particolare, i suoli dei siti S2 ed S4 anche dopo 42 giorni dall'incubazione sono ancora caratterizzati da alti valori di CO<sub>2</sub> prodotta.

Le quantità di CO<sub>2</sub> evoluta dai suoli studiati sono leggermente superiori a quelle ottenute da altri autori con lo stesso metodo di analisi titrimetrico. Pajares e collaboratori (2009) hanno studiato il ciclo del carbonio in suoli di origine vulcanica sottoposti a diversi trattamenti agricoli. Essi hanno misurato la respirazione del suolo non trattato, con pH=5.3 e C<sub>org</sub>=1.85 %, dopo 30 giorni di incubazione, ottenendo una quantità di CO<sub>2</sub> pari a 0.06 mg g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Analogamente per un compost con pH=6.5 Taok *et al.* (2007) hanno misurato una quantità di 0.04 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> dopo 24 giorni di incubazione. Tra i suoli studiati in questa ricerca quello caratterizzato dalla minore produzione di CO<sub>2</sub> totale, dopo 28 giorni di incubazione aveva un'emissione di CO<sub>2</sub> pari a 0.10 mg g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. La differenza nei valori di CO<sub>2</sub> liberata è probabilmente dovuta alle diverse caratteristiche dei suoli.

Analizzando le differenze tra i suoli la respirazione basale misurata è risultata maggiore per i suoli con il contenuto di sostanza organica più elevato (S2 ed S4) e minore per il suolo più povero di sostanza organica (S5). I suoli dei siti

S1 ed S3, che presentavano un contenuto di sostanza organica simile, sono risultati avere un tasso di respirazione simile per tutto il periodo di incubazione. Nel suolo esiste una stretta relazione tra la respirazione, il contenuto di sostanza organica e la biomassa microbica (Růžek *et al.*, 2004; Włodarczyk *et al.*, 2003).

La misura della respirazione del suolo può anche essere impiegata per la valutazione della sua qualità in relazione all'utilizzo. In un recente studio sulla valutazione del recupero della qualità di suoli agricoli abbandonati nella regione mediterranea della Spagna, Zornoza *et al.* (2009) hanno messo in relazione le proprietà chimiche, fisiche e biologiche dei suoli indagati. I ricercatori hanno ottenuto correlazioni positive tra la respirazione basale, la biomassa microbica e il contenuto di sostanza organica. Analogamente Gregory *et al.* (2009), in uno studio relativo alle proprietà di 15 suoli a diverso uso, hanno trovato relazioni fortemente positive tra il contenuto di sostanza organica e gli indici biologici valutati, tra cui la respirazione basale. In particolare i suoli agricoli arabili erano caratterizzati dai valori più bassi di sostanza organica e dalla minore attività microbica.

#### **4.5 Relazioni tra le proprietà chimiche, fisiche e biologiche dei suoli**

L'attività della microflora edafica è il risultato delle complesse interazioni tra la componente biotica e i fattori chimico-fisici che avvengono nel sistema suolo. Le proprietà di un suolo quali il pH, il tenore idrico, il contenuto di sostanza organica, la composizione ed altre ancora sono di fondamentale importanza nello stabilire la dinamica della comunità edafica. La struttura e l'attività delle comunità di microrganismi del suolo, però, possono essere fortemente influenzate anche dalle attività antropiche che vi si concentrano. Tra esse lo sfruttamento agricolo e forestale del suolo, con il prelievo di grandi quantità di biomassa, rivestono un ruolo molto importante nel regolare i flussi di materia (Giller *et al.*, 1997). Altre attività, come quelle industriali, indirettamente possono impattare sugli ecosistemi terrestri anche a grande distanza dalla fonte di inquinamento (McGuinness and Dowling, 2009; Wang *et al.*, 2007). Questi fattori di disturbo comportano generalmente uno spostamento dello stato di un sistema verso una nuova situazione di equilibrio.

L'impatto a cui sono sottoposti i suoli urbani è strettamente legato a fattori quali la popolazione, l'importanza commerciale, culturale e geografica della città;

questi fattori quasi sempre si traducono in un traffico veicolare intenso e, di conseguenza, l'immissione nell'atmosfera di ingenti quantità di prodotti della combustione degli idrocarburi utilizzati dai veicoli (Cao *et al.*, 2007; Maliszewska *et al.*, 2003). Tali contaminanti inevitabilmente si depositano sul suolo per deposizione secca o umida in quantità variabili. Tra essi i più comuni sono gli idrocarburi e alcuni metalli pesanti. Il D.M. 471/99 sulla difesa del suolo stabilisce i limiti per le concentrazioni di una varietà di composti organici ed inorganici nei suoli urbani italiani. Le concentrazioni dei contaminanti presenti in un suolo possono essere utilizzate per la valutazione dello stato di salute del suolo se riferite a tali limiti. Un modo di effettuare tale stima si basa sul calcolo di indici che considerano sia il livello della contaminazione dai vari inquinanti che l'effetto che essi hanno sui sistemi viventi (Madiseh *et al.*, 2009; Bastida *et al.*, 2008; Qingjie *et al.*, 2008).

Un indice di semplice applicazione è quello proposto da Hakanson (1980) per il controllo della contaminazione dei sedimenti; esso consiste nel calcolo di un fattore di contaminazione (Contamination factor – Cf) per i diversi contaminanti. Il fattore di contaminazione per ciascun contaminante è dato dal rapporto tra il livello del contaminante nella matrice indagata, nel nostro caso il suolo, e il valore di riferimento. La somma dei fattori di contaminazione calcolati per tutti i contaminanti analizzati per un sito produce il grado di contaminazione (Contamination degree – Cd) per quel sito. La valutazione dell'effetto dei contaminanti sugli organismi di un ambiente offre maggiori informazioni sulla qualità di un sistema che la valutazione della sola contaminazione. Gli effetti potenziali dipendono da fattori quali la concentrazione del contaminante, la forma chimico-fisica, la biodisponibilità e la complessità biologica degli organismi bersaglio. I risultati sperimentali ottenuti relativamente alla tossicità degli inquinanti nei confronti di vari organismi possono essere integrati in indici per la valutazione del rischio ecologico di un sito contaminato. Partendo dal concetto espresso da Hakanson (1980) è possibile integrare i fattori di contaminazione per diversi contaminanti in un indice di rischio (Risk Index – RI) che tiene conto della tossicità dei singoli contaminanti nei confronti di vari organismi studiati.

In questa studio, i livelli dei metalli determinati nell'ambito dello stesso progetto di ricerca (comunicazione personale) sono stati impiegati per calcolare il grado di contaminazione da metalli pesanti per i suoli prelevati nel 2008 e 2009. Come valori di riferimento sono stati utilizzati quelli imposti dal D.M. 471/99 per i suoli urbani. In fig. 4.17 sono riportati i valori degli indici calcolati per i metalli pesanti Cd, Cr, Cu, Pb e Zn. Per tutti i suoli la contaminazione è risultata maggiore per il campionamento del 2008. Questa differenza potrebbe essere dovuta all'allontanamento dei metalli dallo strato superficiale del suolo da parte delle intense piogge cadute tra i due campionamenti. Tra i suoli studiati quello del sito S2 ha mostrato il grado di contaminazione più elevato in entrambi i campionamenti, mentre tra gli altri suoli si possono osservare differenze solo per il grado di contaminazione calcolato per l'anno 2009.

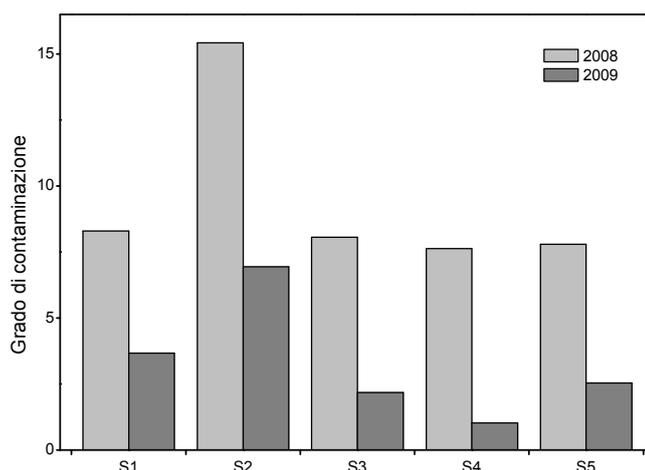


Figura 4.17. Grado di contaminazione dai metalli pesanti Cd, Cr, Cu, Pb e Zn dei suoli prelevati nel 2008 e 2009.

I valori elevati per il suolo del sito S2 sono dovuti ai livelli più elevati di Cu, Pb e Zn per entrambi i campionamenti. Tra essi il Pb è probabilmente derivante dall'elevato traffico veicolare che interessa la strada adiacente. In base alla terminologia utilizzata da Hakanson (1980) i suoli prelevati nel 2008 risultano avere un moderato grado di contaminazione tranne il suolo del sito S2, che presenta un considerevole grado di contaminazione. I suoli prelevati nel 2009, invece, hanno un basso grado di contaminazione, mentre il suolo del sito S2 presenta un grado di contaminazione moderato.

Per ciascun suolo è stato calcolato un indice di rischio ecologico (RI) sommando i prodotti ottenuti moltiplicando un parametro sintetico dell'effetto tossico di ciascun metallo per il rispettivo fattore di contaminazione. In fig. 4.18 sono riportati i valori degli RI determinati per i suoli prelevati nel 2008 e 2009. In accordo a quanto riportato da Hakanson (1980) in tutti i casi il rischio ecologico calcolato è risultato basso; per tutti i suoli, comunque, il rischio ecologico è risultato maggiore per il campionamento del 2008. La differenza osservata è confrontabile per tutti i suoli tranne che per quello del sito S2, dove il rischio ecologico non sembra aver subito variazioni nel tempo.

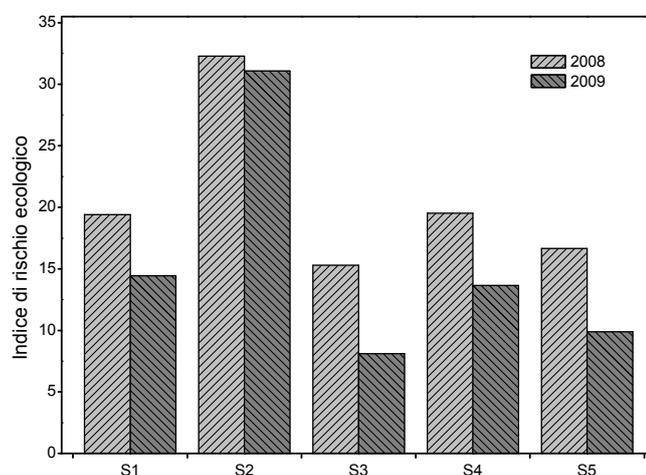


Figura 4.18. Indice di rischio ecologico per i suoli prelevati nel 2008 e 2009.

L'integrazione delle proprietà chimiche, fisiche e biologiche è considerata più utile dello studio delle variabili individuali nella descrizione della qualità del suolo (Insam and Domsch, 1988). L'utilizzo di indici basati su due o pochi parametri soffrono la stessa carenza di informazioni che caratterizza la valutazione di una sola proprietà di un suolo (Bastida *et al.*, 2008). Inoltre, un indice che integri diversi parametri per la valutazione della qualità di un suolo dovrebbe tenere conto dell'importanza di quei parametri nel sistema studiato. Purtroppo non sempre si è in grado di individuare, ovvero misurare, determinati parametri, magari fondamentali nella descrizione del funzionamento di un ecosistema. Questo è uno dei motivi della scarsa diffusione di impiego degli indici per la valutazione della qualità del suolo.

In questa ricerca sono state cercate eventuali relazioni tra le proprietà indagate per i suoli studiati. Le proprietà chimico-fisiche, i dati relativi all'abbondanza di acidi nucleici estratti e i livelli di contaminazione da metalli pesanti e i loro effetti sugli organismi sono stati analizzati insieme. Mediante un'analisi dei componenti principali (PCA); la PCA è stata impiegata in diversi studi per spiegare le interazioni tra le comunità di microrganismi del suolo e le sue proprietà (Pajares et al., 2009; Wang et al., 2007). Per i suoli studiati è stata adottata per descrivere le possibili interazioni tra le proprietà individuali del suolo ed estrarre i fattori comuni responsabili della variabilità totale tra i suoli e le proprietà stesse. I risultati degli ordinamenti dei dati relativi ai suoli studiati ed alle proprietà degli stessi sono riportati in fig. 4.19.

La variabilità tra i siti può essere spiegata osservando la posizione degli stessi rispetto all'asse della prima componente principale, in quanto da sola spiega oltre l'82% della variabilità stessa (fig 4.19-a). I suoli dei siti S1 ed S5 di entrambi i campionamenti ed il suolo del sito S3 prelevato nel 2008 sono raggruppati lungo la direzione positiva dell'asse. Gli altri suoli sono piuttosto separati lungo lo stesso asse, eccetto il suolo del sito S3 prelevato nel 2009 e quello del sito S4 del 2008. La maggiore variabilità tra il suolo del sito S2 e gli altri suoli messa in evidenza dall'analisi multivariata conferma quanto osservato analizzando individualmente le singole proprietà dei suoli. Tale suolo infatti si distingue per la tessitura, il contenuto di sostanza organica, l'abbondanza di DNA e per il grado di contaminazione da metalli pesanti. La variabilità è osservabile anche relativamente al periodo di campionamento; essa è trascurabile per i suoli dei siti S1 ed S5 ed è risultata più elevata per il suolo del sito S2, probabilmente per le differenze temporali nella quantità di DNA estratto, la disponibilità idrica e il grado di contaminazione osservati.

In fig. 4.19-b si può valutare la variabilità tra le proprietà chimiche, fisiche e biologiche dei suoli prelevati nel 2008 e 2009. Essa è spiegata per più dell'86% dalla prima componente principale. Lungo la direzione del primo asse si distinguono due raggruppamenti, il primo tra il pH e il grado di contaminazione dei suoli, ed il secondo tra il contenuto di sostanza organica e l'indice di rischio. L'abbondanza di DNA è risultata molto lontana da tutte le altre proprietà. Ciò potrebbe suggerire che la sua abbondanza nei suoli studiati non dipenda dalle proprietà analizzate, tra cui il grado di contaminazione da metalli pesanti valutato.

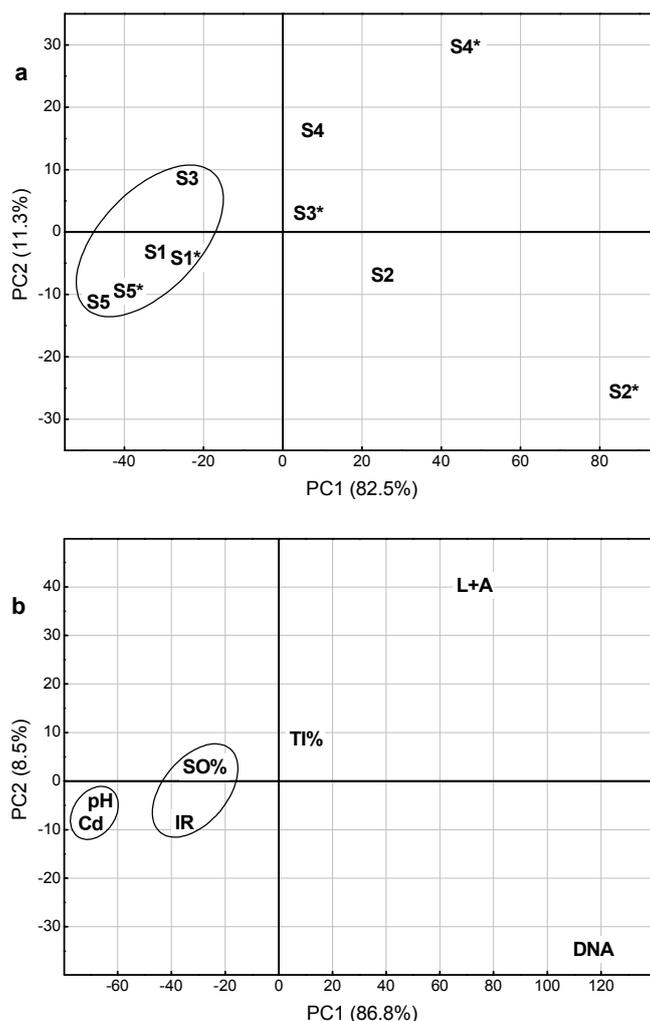


Figura 4.19. Analisi dei componenti principali (PCA) con ordinamento per i suoli (a) e le proprietà chimiche, fisiche e biologiche (b) dei suoli prelevati nel 2008 e 2009. L'asterisco accanto al nome del sito in fig. a indica l'anno di campionamento 2009. Fig. b: TI% - tenore idrico %; SO% - contenuto di sostanza organica %; L+A - frazione tessiturale < 0.05 mm; Cd - grado di contaminazione; IR - indice di rischio.

Gli effetti sulle comunità di microrganismi del suolo da parte di contaminanti quali i metalli possono essere diversi, non solo in funzione delle loro concentrazioni. Mediante lo studio delle cinetiche di riassociazione del DNA batterico estratto da suoli contaminati da metalli Gans *et al.* (2005) hanno stimato una riduzione di oltre il 99.9% della diversità batterica per effetto della elevata contaminazione da metalli. Tale riduzione riguarda soprattutto i taxa rari, responsabili della gran parte della diversità delle comunità edafiche, dei quali è tuttora sconosciuta l'importanza funzionale negli ecosistemi terrestri. Essi, però, hanno osservato che la biomassa batterica totale degli stessi suoli non ha risentito dell'elevata contaminazione. Altri studi hanno dimostrato che l'esposizione a

breve o lungo termine a metalli risulta in una riduzione della diversità e dell'attività microbica nei suoli (Lasat, 2002; McGrath *et al.*, 2001). Wang *et al.* (2007) hanno ottenuto correlazioni negative tra attività batterica nel suolo, diversità della comunità e i metalli pesanti estraibili. In particolare essi hanno osservato una correlazione altamente significativa tra il Cu totale presente in suoli contaminati e la frazione estraibile. Tuttavia l'esposizione a breve o lungo termine a concentrazioni non elevate di metalli può non avere effetti sulla struttura della comunità. La risposta delle comunità di microrganismi del suolo alla pressione derivante dai fattori esterni dipende dalle molteplici interazioni tra tutte le variabili in causa, tra cui lo stato iniziale della comunità stessa (Anderson *et al.*, 2009).

## **5. CONCLUSIONI**

### **5.1 Conclusioni**

I risultati ottenuti nella presente ricerca hanno messo in luce l'importanza dell'approccio di studio nella comprensione del funzionamento degli ecosistemi terrestri. Il sistema suolo è caratterizzato da una complessità tale da non permettere la comprensione dei suoi meccanismi di funzionamento attraverso lo studio di poche variabili individualmente. Per queste ragioni le comunità edafiche dovrebbero essere studiate con un approccio multidisciplinare che consideri i diversi aspetti delle interazioni tra le diverse componenti del suolo.

Nella prima parte della ricerca il confronto tra diversi metodi di estrazione del DNA dal suolo ha permesso di valutare vantaggi e svantaggi delle tecniche classiche e di quelle che fanno uso di kit. Tale confronto ha portato alla scelta del metodo commerciale come metodo da applicare per lo studio della microflora edafica. La qualità del materiale genetico estratto è stato il motivo principale della scelta del metodo. Ciononostante il DNA ottenuto con questo metodo ha risentito dell'elevato contenuto di sostanza organica che caratterizza determinati suoli. La presenza di acidi umici nei suoli studiati ha probabilmente causato una sovrastima della quantità misurata con il metodo spettrofotometrico del DNA estratto.

Per i suoli studiati è stata osservata una relazione tra la quantità di DNA estratto e le loro caratteristiche chimico-fisiche, in particolare il contenuto di sostanza organica e la disponibilità idrica. La maggiore quantità di DNA è stata estratta dai suoli di bosco con il più elevato contenuto di sostanza organica, mentre dal suolo del sito agricolo, con il contenuto di sostanza organica più basso, sono state estratte le quantità minori di DNA. Per tutti i suoli prelevati nella primavera 2009 sono state ottenute quantità di materiale genetico maggiore che da quelli prelevati nell'autunno 2008. La differenza tra le quantità di DNA ottenute dai suoli prelevati nei diversi periodi potrebbe indicare una più elevata abbondanza della microflora nei suoli prelevati in primavera, probabilmente dovuta alla maggiore disponibilità idrica osservata per tali suoli.

L'analisi multivariata effettuata considerando le proprietà chimiche, fisiche e biologiche dei suoli studiati ha messo in evidenza una notevole variabilità tra l'abbondanza di DNA e le proprietà considerate. Anche il grado di

contaminazione da metalli pesanti non sembra influire per i suoli studiati sulla quantità di DNA.

L'analisi dei *fingerprints* del 16S rDNA effettuata mediante la tecnica della DGGE ha evidenziato per i suoli studiati delle differenze in termini di ricchezza specifica tra la comunità totale dei batteri e la sua frazione attiva, con la presenza di alcune specie dominanti comuni a tutti i campioni. La cluster analysis dei pattern elettroforetici ottenuti ha confermato la notevole similarità tra le comunità dei diversi suoli, mostrando al contempo una similarità maggiore tra i suoli più ricchi in sostanza organica e in DNA. Una diversità genetica lievemente maggiore sembrerebbe comunque caratterizzare la comunità batterica totale del suolo del sito S3.

L'attività della microflora dei suoli studiati valutata mediante la misura della respirazione in condizioni controllate ha evidenziato una relazione tra la produzione di CO<sub>2</sub> e il contenuto di sostanza organica. In particolare i suoli di bosco sono stati caratterizzati dai livelli più alti di respirazione, mentre dal suolo del sito agricolo è stata liberata la minore quantità di CO<sub>2</sub>. Il rapporto RNA/DNA per i suoli studiati non ha mostrato invece una corrispondenza tra l'attività della microflora e i parametri indagati. La maggiore attività della microflora dei suoli dei siti S1 ed S3 potrebbe essere la risposta ad una situazione di stress dovuta a parametri non indagati.

## 6. BIBLIOGRAFIA

### 6.1 Bibliografia

- Agnelli A., Ascher J., Corti G., Ceccherini M.T., Nannipieri P., Pietramellara G., 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology & Biochemistry*, 36 (5): 859–868.
- Alef K., 1995. Soil respiration. In: Alef K., Nannipieri P. (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp. 214–218.
- Allison S.D. and Martiny J.B.H., 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 105: 11512–11519.
- Anderson J.P.E., 1982. Soil respiration. In: Page A.L., Miller R.H. and Keeney D.R. (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison Wisconsin, pp. 831–871.
- Anderson T.H. and Domsch K.H., 1993. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental-conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 25 (3): 393–395.
- Anderson J.A.H., Hooper M.J., Zak J.C., Cox S.B., 2009. Molecular and functional assessment of bacterial community convergence in metal-amended soils. *Microbial Ecology*, 58 (1): 10–22.
- Andren O., Balandreau J., 1999. Biodiversity and soil functioning—from black box to can of worms? *Applied Soil Ecology*, 13 (2): 105–108.
- Bardgett R.D., Shine A., 1999. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. *Soil Biology & Biochemistry*, 31 (2): 317–321.
- Bastida F., Zsolnay A., Hernández T., García C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147 (3–4): 159–171.
- Blagodatskaya E.V., Blagodatsky S.A., Anderson T.H., Kuzyakov Y., 2007. Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology*, 37 (1–2): 95–105.

- Bloem J. and Breure A.M., 2003. Microbial indicators. In: Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. (Eds.), *Bioindicators and Biomonitors*. Elsevier, Oxford, pp. 259–282.
- Bohn H.L., McNeal B.L., O'Connor G.A., 1990. *Soil Chemistry*. Jhon Wiley and Sons, New York, USA.
- Bonari E. e Ceccon P., 2002. *Verso un approccio integrato allo studio dei sistemi colturali*. Franco Angeli Ed., Milano, 201 pp.
- Brookes P.C., Powlson D.S., Jenkinson D.S., 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 14 (4): 319–329.
- Buckley L., Caldarone E. and Ong T.-L., 1999. RNA–DNA ratio and other nucleic acid–based indicators for growth and condition of marine fish. *Hydrobiologia* 401: 265–277.
- Cao L., Shen G., Lu Y., 2007. Combined effects of heavy metal and polycyclic aromatic hydrocarbon on soil microorganism communities. *Environmental Geology*, 54 (7): 1531–1536.
- Carter M.R., 1991. The influence of tillage on the proportion of organic–carbon and nitrogen in the microbial biomass of medium–textured soils in a humid climate. *Biology and Fertility of Soils*, 11 (2): 135–139.
- Casamayor E.O., Schäfer H., Baneras L., Pedros–Alio C., Muyzer G., 2000. Identification of and spatio–temporal differences between microbial assemblages from two neighbouring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2): 499–508.
- Castaldini M., Turrini A., Sbrana C., Benedetti A., Marchionni M., Fabiani A., Landi S., Santomassimo F., Pietrangeli B., Nuti M.P., Miclaus N., Giovannetti M., 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 6719–6729.
- Chander K., Goyal S., Mundra M.C. and Kapoor K.K., 1997. Organic matter, microbial biomass and enzyme activity of soils under different crop rotations in the tropics. *Biology and Fertility of Soils*, 24 (3): 306–310.
- Crawford J.W., Harris J.A., Ritz K., Young I.M., 2005. Towards an evolutionary ecology of life in soil. *Trends in Ecology & Evolution*, 20 (2): 81–87.

- Crecchio C., Curci M., Pellegrino A., Ricciuti P., Tursi N., Ruggiero P., 2007. Soil microbial dynamics and genetic diversity in soil under monoculture wheat grown in different long-term management systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 39 (6): 1391–1400.
- Cullen D.W. and Hirsch P.R., 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology & Biochemistry*, 30 (8–9): 983–993.
- Darwin C., 1881. The formation of vegetation mould, through the action of worms. University of Chicago Press.
- Degens B.P., Schipper L.A., Sparling G.P., Duncan L.C., 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology & Biochemistry*, 33 (9): 1143–1153.
- Degens B.P., Schipper L.A., Sparling G.P., Vojvodic–Vukovic M., 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 32 (2): 189–196.
- Degens B.P., 1998a. Microbial functional diversity can be influenced by the addition simple organic substrates to soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 30 (14): 1981–1988.
- Degens B.P., 1998b. Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 30 (14): 1989–2000.
- Degens B.P., Harris J.A., 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 29 (9–10): 1309–1320.
- de Liphay J.R., Enzinger C., Johnsen K., Aamand J., Sørensen S.J., 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology & Biochemistry* 36 (10): 1607–1614.
- Dell'Anno A., Fabiano M., Duineveld G.C.A., Kok A., and Danovaro R., 1998. Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: comparison of spectrophotometric, fluorometric, and High-Performance Liquid Chromatography methods and estimation of detrital DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9): 3238–3245.

- de Oliveira V.M., Manfio G.P., da Costa Coutinho H.L., Keijzer–Wolters A.C., van Elsas J.D., 2006. A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. *Journal Of Microbiological Methods*, 64 (3): 366–379.
- Dowson C.G., Rayner A.D.M., Boddy L., 1988. Inoculation of mycelial cord–forming basidiomycetes into woodland soil and litter . 2. Resource capture and persistence. *New Phytologist*, 109 (3): 343–349.
- Duarte G.F., Rosado A.S., Seldin L., Keijzer–Wolters A.C., van Elsas J.D., 1998. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *Journal of Microbiological Methods*, 32 (1): 21–29.
- Erb R.W., Wagnerdöbler I., 1993. Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes in polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (12): 4065–4073.
- Eriksson M., Ka J.O., Mohn W.W., 2001. Effects of low temperature and freeze–thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in Arctic tundra soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11): 5107–5112.
- Esperschütz J., Gattinger A., Mäder P., Schloter M. and Fließbach A., 2007. Response of soil microbial biomass and community structures to conventional and organic farming systems under identical crop rotations. *FEMS Microbiology Ecology*, 61 (1): 26–37.
- Ettema C.H., Wardle D.A., 2002. Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 17 (4): 177–183.
- Evangelou M.W.H., Daghan H., Schaeffer A., 2004. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere*, 57 (3): 207–213.
- Faber J.H. and Verhoef H.A., 1991. Functional differences between closely–related soil arthropods with respect to decomposition processes in the presence or absence of pine tree roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 23 (1): 15–23.
- Falchini L., Naumova N., Kuikman P.J., Bloem J., Nannipieri P., 2003. CO<sub>2</sub> evolution and denaturing gradient gel electrophoresis profiles of bacterial communities in soil following addition of low molecular weight substrates to simulate root exudation. *Soil Biology & Biochemistry*, 35 (6): 775–782.

- Feller C., Brown G.G., Blanchart E., Deleporte P., Chernyanskii S.S., 2003. Charles Darwin, earthworms and the natural sciences: various lessons from past to future. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 99 (1–3): 29–49
- Felske A., Engelen B., Nubel U., Backhaus H., 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (11): 4162–4167.
- Gajda A.M., 2009. Effect of different tillage systems on some microbiological properties of soils under winter wheat. *International Agrophysics*, 22 (3): 201–208.
- Gans J., Wolinsky M., Dunbar J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309 (5739): 1387–1390.
- Garbeva P., van Veen J.A., and van Elsas J.D., 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 243–70.
- Gerhardt K.E., Huang X.-D., Glick B.R., Greenberg B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, 176 (1): 20–30.
- Giller K.E., Beare M.H., Lavelle P., Izac A.-M.N., Swift M.J., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6 (1): 3–16.
- Giovanetti M., 2003. The ecological risks of transgenic plants. *Biology Forum*, 96 (2): 207–224
- Gregory A.S., Watts C.W., Griffiths B.S., Hallett P.D., Kuan H.L., Whitmore A.P., 2009. The effect of long-term soil management on the physical and biological resilience of a range of arable and grassland soils in England. *Geoderma*, 153 (1–2): 172–185.
- Griffiths B.S., Ritz K., Glover L.A., 1996. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: Application of the community DNA hybridization technique. *Microbial Ecology*, 31 (3): 269–280.
- Griffiths B.S., 1997. Theoretical background: Definitions, hypotheses, models. In: Wolters V. (Eds.), *Functional Implications of Biodiversity in Soil*. European Commission, Brussels, pp. 13–16.

- Griffiths B.S., Ritz K., Bardgett R.D., Cook R., Christensen S., Ekelund F., Sørensen S.J., Bååth E., Bloem J., de Ruiter P.C., Dolfing J. and Nicolardot B., 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos*, 90 (2): 279–294.
- Grønsten H.A., Børresen T., 2009. Comparison of two methods for assessment of aggregate stability of agricultural soils in southeast Norway. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil And Plant Science*, 59 (6): 567–575.
- Hakanson L., 1980. An ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. *Water Research*, 14: 975–1001.
- Halim M., Conte P., Piccolo A., 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere*, 52 (1): 265–275.
- Hamer U., Marschner B., 2005. Priming effects in different soil types induced by fructose, alanine, oxalic acid and catechol additions. *Soil Biology & Biochemistry*, 37 (3): 445–454.
- Hahn D., Kester R., Starrenburg M.J.C., Akkermans A.D.L., 1990. Extraction of ribosomal–RNA from soil for detection of frankia with oligonucleotide probes. *Archives of Microbiology*, 154 (4): 329–335.
- Harris D., 1994. Analyses of DNA extracted from microbial communities. In: Ritz K., Dighton J., Giller K.E. (Eds.), *Beyond the Biomass*. Chichester, UK, pp. 111–118.
- Harry M., Gambier B., Bourezgui Y., Garnier–Sillam E., 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. *Analisis* 27 (5): 439–442.
- Hawksworth D.L. and Mound L.A., 1991. Biodiversity databases: the crucial significance of collections. In: Hawksworth D.L. (Eds.), *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role In Sustainable Agriculture*, C.A.B International, Wallingford UK., 302 pp.
- He J.Z., Xu Z.H., Hughes J., 2006. Molecular bacterial diversity of a forest soil under residue management regimes in subtropical Australia. *FEMS Microbiology Ecology*, 55 (1): 38–47.
- Heuer H., Krögerrecklenfort E., Egan S., van Overbeek L.S., Guillaume G., Nikolakopoulou T.L., Wellington E.M.H., van Elsas J.D., Collard J.–M.,

- Karagouni A.D., Smalla K., 2002. Gentamycin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 42 (2): 289–302.
- Heuer H. and Smalla K., 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas J.D., Wellington E.M.H., Trevors J.T. (Eds.), *Modern soil microbiology*. Dekker, New York, pp 353–373.
- Hurt A., Qiu X., Wu L., Roh Y., Palumbo A.V., Tiedje J.M. and Zhou J., 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4495–4503.
- Huhta V., 2007. The role of soil fauna in ecosystems: A historical review. *Pedobiologia*, 50 (6): 489–495.
- Ibekwe A.M., Kennedy A.C., 1999. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant Soil*, 206 (2): 151–161.
- Ibiam U. and Grant A., 2005. RNA/DNA ratios as a sublethal endpoint for large-scale toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (5): 1155–1159.
- Insam H., Domsch K.H., 1988. Relationship between soil organic-carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial Ecology*, 15 (2): 177–188.
- Insam H. and Haselwandter K., 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia*, 79 (2): 174–178.
- Insam H., Mitchell C.C. and Dormaar J.F., 1991. Relationship of soil microbial biomass and activity with fertilization practice and crop yield of 3 ultisols. *Soil Biology & Biochemistry*, 23 (5): 459–464.
- Jones T.H. and Bradford M.A., 2001. Assessing the functional implications of soil biodiversity in ecosystems. *Ecological Research*, 16 (5): 845–858.
- Kelly J.J., Favila E., Hundal L.S. and Marlin J.C., 2007. Assessment of soil microbial communities in surface applied mixtures of Illinois River sediments and biosolids. *Applied Soil Ecology*, 36 (2–3): 176–183.
- Kerckhof L., Ward B.B., 1993. Comparison of nucleic-acid hybridization and fluorometry for measurement of the relationship between RNA/DNA ratio and

- growth-rate in a marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (5): 1303–1309.
- Khan M., Scullion J., 2000. Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environmental Pollution*, 110 (1): 115–125.
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58 (2): 169–188.
- Kozdrój J., van Elsas J.D., 2000. Bacterial community DNA extracted from soils polluted with heavy metals. *Polish Journal of Environmental Studies*, 9 (5): 403–407.
- Kramer C., Gleixner G., 2006. Variable use of plant- and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 38 (11): 3267–3278.
- Krave A.S., Lin B., Braster M., Laverman A.M., van Straalen N.M., Roling W.F.M., van Verseveld H.W., 2002. Stratification and seasonal stability of diverse bacterial communities in a *Pinus merkusii* (pine) forest soil in central Java, Indonesia. *Environmental Microbiology*, 4 (6): 361–373.
- Kuske C.R., Banton K.L., Adorada D.L., Stark P.C., Hill K.K., and Jackson P.J., 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (7): 2463–2472.
- Landi L., Valori F., Ascher J., Renella G., Falchini L., Nannipieri P., 2006. Root exudate effects on the bacterial communities, CO<sub>2</sub> evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 38 (3): 509–516.
- Lasat M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31 (1): 109–120.
- Lee K.E., 1985. *Earthworms: Their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, New York.
- Liao M., Xie X.M., 2007. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 217–223.

- Liesack W., Janssen P.H., Rainey F.A., Ward–Rainey F.A., Stackebrandt E., 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: *Modern Soil Microbiology*, Eds. J.D. Van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington, 375–439. Marcel Dekker Inc., New York.
- Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J., Hector A., Hooper D., Huston M., Raffaelli D., Schmid B., Tilman D. and Wardle D., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*, 294 (5543): 804–808.
- Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M.P., Smalla K., Torsvik V., Nanipieri P., 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 40 (6): 363–385.
- Lynch J.M., Whipps J.M., 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129 (1): 1–10.
- Madiseh S.D., Savary A., Parham H., Sabzalizade S., 2009. Determination of the level of contamination in Khuzestan coastal waters (Northern Persian Gulf) by using an ecological risk index. *Environmental Monitoring and Assessment*, 159 (1–4): 521–530.
- Maliszewska–Kordybach B., Smreczak B., 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International*, 28 (8): 719–728.
- Mansouri H., Petit A., Oger P., Dessaux Y., 2002. Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine–producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (5): 2562–2566.
- McGrath S.P., Zhao F.J., Lombi E., 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal–contaminated soils. *Plant and Soil*, 232 (1–2): 207–214.
- McGuinness M. and Dowling D., 2009. Plant–associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6 (8): 2226–2247.

- Mele P.M., Crowley D.E., 2007. Application of self-organizing maps for assessing soil biological quality. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 126 (3–4): 139–152.
- Meyer A.F., Lipson D.A., Martin A.P., Schadt C.W., Schmidt S.K., 2004. Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas sensu stricto*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1): 483–489.
- Miller D.N., Bryant J. E., Madsen E.L. and Ghiorse W.C., 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (11): 4715–4724.
- Mondini C., Cayuela M.L., Sanchez-Monedero M.A., Roig A., Brookes P.C., 2006. Soil microbial biomass activation by trace amounts of readily available substrate. *Biology and Fertility of Soils*, 42 (6): 542–549.
- Moran M.A., Torsvik V.L., Torsvik T., Hodson R.E., 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3): 915–918.
- Muyzer G., de Waal E.D., Uitterlinden A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3): 695–700.
- Naeem S. and Li S.B., 1998. Consumer species richness and autotrophic biomass. *Ecology* 79 (8): 2603–2615.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54 (4): 655–670.
- Niemi R.M., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K., 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 45 (3): 155–165.
- Odum E.P., 1969. The strategy of ecosystem development. *Science*, 164 (3877): 262–270.
- Ohtonen R., Aikio S., Vare H., 1997. Ecological theories in soil biology. *Soil Biology & Biochemistry*, 29 (11–12): 1613–1619.

- Oren A., 2004. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B—Biological Sciences*, 359 (1444): 623–638.
- Øvreås L., Jensen S., Daae F.L., Torsvik V., 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (7): 2739–2742.
- Øvreås L., Torsvik V., 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, 36 (3): 303–315.
- Øvreås L., Forney L., Daae F.L., Torsvik V., 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (9): 3367–3373.
- Pankhurst C.E., 1997. Biodiversity of soil organisms as an indicator of soil health. In: Pankhurst, C. (Ed.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, pp. 297–324.
- Pajares S., Gallardo J.F., Masciandaro G., Ceccanti B., Marinari S., Etchevers J.D., 2009. Biochemical indicators of carbon dynamic in an Acrisol cultivated under different management practices in the central Mexican highlands. *Soil & Tillage Research*, 105 (1): 156–163.
- Paul E.A., Clark F.E., 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego USA.
- Pepper I. L., Gerba C. P., Newby D. T., and Rice C. W., 2009. Soil: A public Health Threat or Savior? *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39 (5): 416–432.
- Pietramellara G., Ascher J., Ceccherini M.T., Renella G., 2002. Soil as a biological system. *Annals Of Microbiology*, 52 (2): 119–131.
- Porteous L.A., Seidler R.J. and Watrud L.S., 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology*, 6 (8): 787–791.
- Portillo M.C., Gonzalez J.M., 2009. Fluorescent measurements of dna, rna and proteins to perform comparative analyses of microbial communities from the environments. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 17 (3): 398–410.

- Powlson D.S., 1994. The soil microbial biomass: Before, beyond and back. In: Ritz K., Dighton J. and Giller K.E. (Eds.), *Beyond the Biomass*, pp 3–20. John Wiley & Sons, Chichester.
- Prechtel A., von Lutzow M., Schneider B.U., Bens O., Bannick C.G., Kogel-Knabner I., Huttl R.F., 2009. Organic carbon in soils of Germany: Status quo and the need for new data to evaluate potentials and trends of soil carbon sequestration. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172 (5): 601–614.
- Qingjie G., Jun D., Yunchuan X., Qingfei W., Liqiang Y., 2008. Calculating pollution indices by heavy metals in ecological geochemistry assessment and a case study in parks of Beijing. *Journal of China University of Geosciences*, 19 (3): 230–241.
- Renella G., Mench M., Landi L., Nannipieri P., 2005. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 37 (1): 133–139.
- Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T.M., Simonet P., 2003. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 39 (4): 183–190.
- Roose-Amsaleg C.L., Garnier-Sillam E., Harry M., 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 18 (1): 47–60.
- Růžek L., Voříšek K., Strandová S., Nováková M., Barabasz W., 2004. Microbial characteristics, carbon and nitrogen content in cambisols and luvisols. *Plant, Soil and Environment*, 50 (5): 196–204.
- Sandaa R.-A., Torsvik V., Enger Ø., 2001. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33 (3): 287–295.
- Saxena D., Flores S., Stotzky G., 2002. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology & Biochemistry*, 34 (1): 133–137.
- Saxena D., Flores S., Stotzky G., 1999. Transgenic plants–Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 402 (6761): 480–480.
- Schmalenberger A., Tebbe C.C., 2003. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*, 12 (1): 251–262

- Schmalenberger A., Tebbe C.C., 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiology Ecology* 40 (1): 29–37.
- Schwarz M., Fuchs S. and Hahn H.H., 2006. Nucleic acids: indicators for dynamic processes of clogging in soil filter systems. *Water Science & Technology*, 54 (11–12): 183–189.
- Setälä H., Laakso J., Mikola J. and Huhta V., 1998. Functional diversity of decomposer organisms in relation to primary production. *Applied Soil Ecology*, 9 (1–3): 25–31.
- Sharma P.K., Capalash N., Kaur J., 2007. An improved method for single step purification of metagenomic DNA. *Molecular Biotechnology*, 36 (1): 61–63.
- Shen J.P., Zhang L.M., Zhu Y.G., Zhang J.B., He J.Z., 2008. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammoniaoxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 10 (6): 1601–1611.
- Sizmur T., Hodson M.E., 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? A review. *Environmental Pollution*, 157 (7): 1981–1989.
- Shi W., Bischoff M., Turco R., Konopka A., 2002. Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 21 (2): 169–177.
- Shishido M., Sakamoto K., Yokoyama H., Momma N., Miyashita S.I., 2007. Changes in microbial communities in an apple orchard and its adjacent bush soil in response to season, land-use, and violet root rot infestation. *Soil Biology & Biochemistry*, 40 (6): 1460–1473.
- Siciliano S.D., Germida J.J., 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Excel and *Brassica rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiology Ecology*, 29 (3): 263–272.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G., 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4742–4751.

- Smith J.L. and Paul E.A., 1990. The significance of soil microbial biomass estimation. In: G.M. Bollag and G. Stotzkey (Eds.). *Soil Biochemistry*. Vol. 6. Marcel Dekker, New York, NY. p. 357–396.
- Steinbeiss S., Gleixner G., Antonietti M., 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry*, 41 (6): 1301–1310.
- Swift M.J., Heal O.W., Anderson J.M., 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. Blackwell University of California Press, Berkeley, CA.
- Swift M.J., Izac A.M.N., van Noordwijk M., 2004. Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes – are we asking the right questions? *Agriculture Ecosystems & Environment*, 104 (1): 113–134.
- Takada–Hoshino Y. and Matsumoto N., 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes and Environments*, 13 (1): 13–19.
- Tanaka Y., Gwak W.S., Tanaka M., Sawada Y., Okada T., Miyashita S., Kumai H., 2007. Ontogenetic changes in RNA, DNA and protein contents of laboratory–reared Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 73 (2): 378–384.
- Taok M., Cochet N., Pauss A., Schoefs O., 2007. Monitoring of microbial activity in soil using biological oxygen demand measurement and indirect impedancemetry. *European Journal of Soil Biology*, 43 (5–6): 335–340.
- Tebbe C.C., Vahjen W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (8): 2657–2665.
- Tiedje, J.M., Cho J.C., Murray A., Treves D., Xia B. and Zhou J., 2001. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. pp. 393–412. In R.M. Rees, B.C. Ball, C.D. Campbell and C.A. Watson (Eds.), *Sustainable Management of Soil Organic Matter*. CABI Int, Wallingford, U.K.
- Tiedje J.M., Asming–Brempong S., Nüsslein K., Marsh T.L., Flynn S.J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13 (2): 109–122.
- Torsvik V. and Øvreås L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (3): 240–245.

- Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.-A., Øvreås L., 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64 (1): 53–62.
- Torsvik V., Sorheim R., Goksoyr J., 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – A review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17 (3–4): 170–178.
- Tsai S.H., Selvam A., Yang S.S., 2007. Microbial diversity of topographical gradient profiles in Fushan forest soils of Taiwan. *Ecological Research*, 22 (5): 814–824.
- Tsai Y., Olson B.H., 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (7): 2292–2295.
- Vinagre C., Fonseca V., Maia A., Amara R., Cabral H., 2008. Habitat specific growth rates and condition indices for the sympatric soles *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* (Kaup 1858) in the Tagus estuary, Portugal, based on otolith daily increments and RNA–DNA ratio. *Journal of Applied Ichthyology*, 24 (2): 163–169.
- Volossiouk T., Robb E.J. and Nazar R.N., 1995. Direct DNA extraction for PCR–mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (11): 3972–3976.
- Wall D.H., Adams G., Parsons A.N., 2001. Soil Biodiversity. In: Chapin F.S., Sala E.O., Huber–Sannwald E. (Eds.), *Global Biodiversity in a Changing Environment: Scenario for the 21<sup>st</sup> century*. Springer–Verlag, New York, pp. 47–82.
- Wang Y.P., Shi J.Y., Wang H., Lin Q., Chen X.C., Chen Y.X., 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67 (1): 75–81.
- Wardle D.A., 1998. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global–scale synthesis. *Soil Biology & Biochemistry*, 30 (13): 1627–1637.
- Wardle D.A. and Giller K.E., 1996. The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology – Discussion. *Soil Biology & Biochemistry*, 28 (12): 1549–1554.

- Wardle D.A., Lavelle P., 1997. Linkages between soil biota, plant litter quality and decomposition. In: Gadish G., Giller K.E. (Eds.), *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International, Wallingford, UK, 107–124.
- Wen B., Hu X.Y., Liu Y., Wang W.S., Feng M.H., Shan X.Q., 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 40 (3): 181–187.
- Widmer F., Fliessbach A., Laczko E., Schulze–Aurich J., Zeyer J., 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA–, PLFA–, and Biolog<sup>TM</sup>– analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, 33 (7–8): 1029–1036.
- Winding A., Hund–Rinke K., Rutgers M., 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62 (2): 230–248.
- Winding A., Ronn R., Hendriksen N.B., 1997. Bacteria and protozoa in soil microhabitats as affected by earthworms. *Biology and Fertility of Soils*, 24 (2): 133–140.
- Włodarczyk T., Księżopolska A., Gliński J., 2008. New aspect of soil respiration activity measuring. *Teka Kom. Ochr. Kszt. Środ. Przyr. – OL PAN*, 5 A, 153–163.
- Włodarczyk T., Stępniewska Z., Brzezińska M., 2003. Denitrification, organic matter and redox potential transformation in Cambisols. *International Agrophysics*, 17 (4): 219–227.
- Włodarczyk T., Stępniewska Z., Brzezińska M., 2002. Dehydrogenase activity, redox potential, and emissions of carbon dioxide and nitrous oxide from Cambisols under flooding conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 36 (3): 200–206.
- Wood T.G., 1988. Termites and soil environment. *Biology and Fertility of Soils*, 6 (3): 228–236.
- Wu L., Vomocil J.A., Childs S.W., 1990. Pore–size, particle–size, aggregate size, and water–retention. *Soil Science Society of America Journal*, 54 (4): 952–956.
- Yeates C., Gillings M.R., Davison A.D., Altavilla N., Veal D.A., 1997. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology* 25 (4): 303–307.

- Young C.C., Burghoff R.L., Keim L.G., Minak–Bernero V., Lute J.R., and Hinton S.M., 1993. Polyvinylpyrrolidone–agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction–amplifiable DNA from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (6): 1972–1974.
- Zhang C.B., Huang L.N., Luan T.G., Jin J. and Lan C., 2006. Structure and function of microbial communities during the early stages of revegetation of barren soils in the vicinity of a Pb/Zn Smelter. *Geoderma*, 136 (3–4): 555–565.
- Zhang L., Xu Z.H., 2008. Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 8 (6): 379–388.
- Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (2): 316–322.
- Zornoza R., Mataix–Solera J., Guerrero C., Arcenegui V., and Mataix–Beneyto J., 2009. Comparison of soil physical, chemical, and biochemical properties among native forest, maintained and abandoned Almond orchards in mountainous areas of Eastern Spain. *Arid Land Research and Management*, 23 (4): 267–282.