



**APAT**

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

**Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale**

# Ruolo dei microrganismi negli ecosistemi del suolo

**Anna Barra Caracciolo e Paola Grenni**

**Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche**

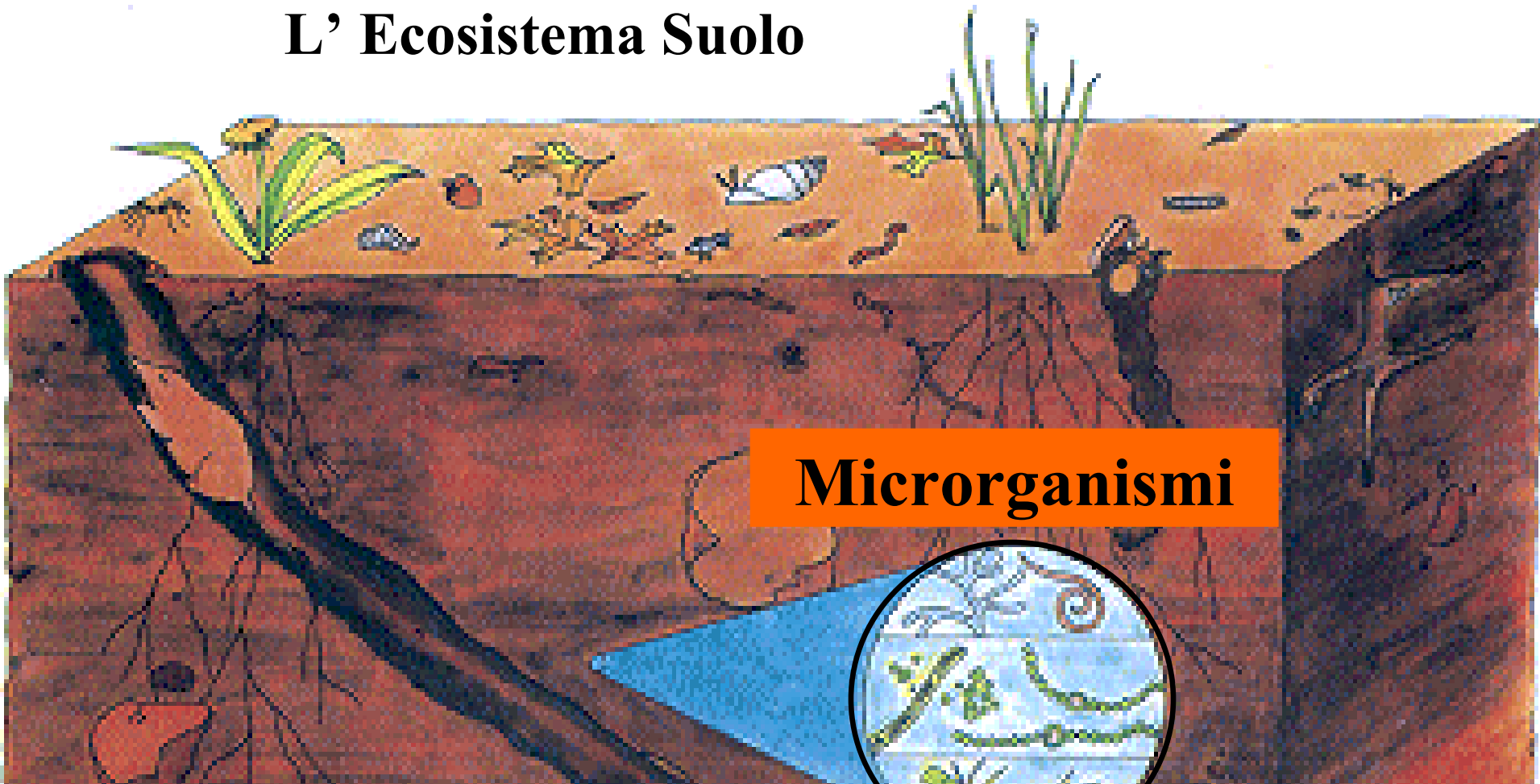
**Via Reno 1 - Roma**



**[parracaracciolo@irsa.cnr.it](mailto:parracaracciolo@irsa.cnr.it)**



# L' Ecosistema Suolo



## Microorganismi

Lo studio del suolo con un approccio ecosistemico è un prerequisito necessario per migliorare la comprensione e la gestione della biodiversità e per sviluppare una solida base di strumenti di valutazione e di monitoraggio del suo stato (OECD, 2003).



**APAT**

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

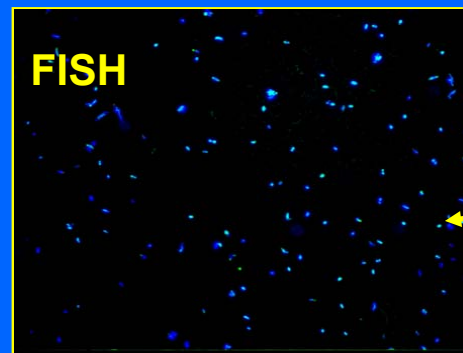
**Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale**

- I microrganismi occupano un ruolo chiave nei cicli degli elementi (C, N, P) e nel flusso energetico dell'ecosistema (rete alimentare a base detrito), trasformando la sostanza organica in inorganica (e viceversa per quelli autotrofi!).
- Gli studi di ecologia microbica dipendono dalla disponibilità di metodi che permettono di studiare le interazioni e le attività dei microrganismi



# Struttura e funzione comunità batterica

- **Abbondanza batterica: conta diretta in fluorescenza**
- **Vitalità cellulare: coloranti fluorescenti (live/dead)**
- **Classificazione filogenetica (FISH)**
- **Attività deidrogenasica**



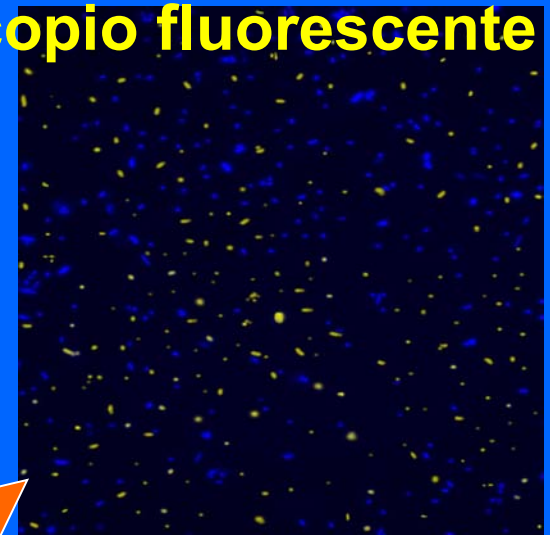
# Conta totale e vitalità cellulare al microscopio fluorescente



Suolo in soluzione  
con/senza Formalina

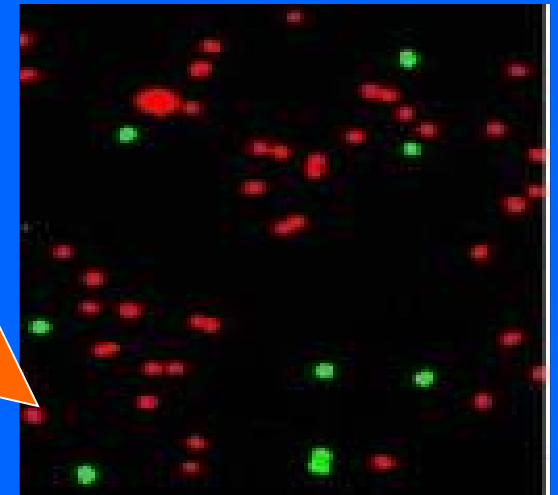
Syto13 (vivi) + Ioduro di propidio (morti)

DAPI (blu) conta totale

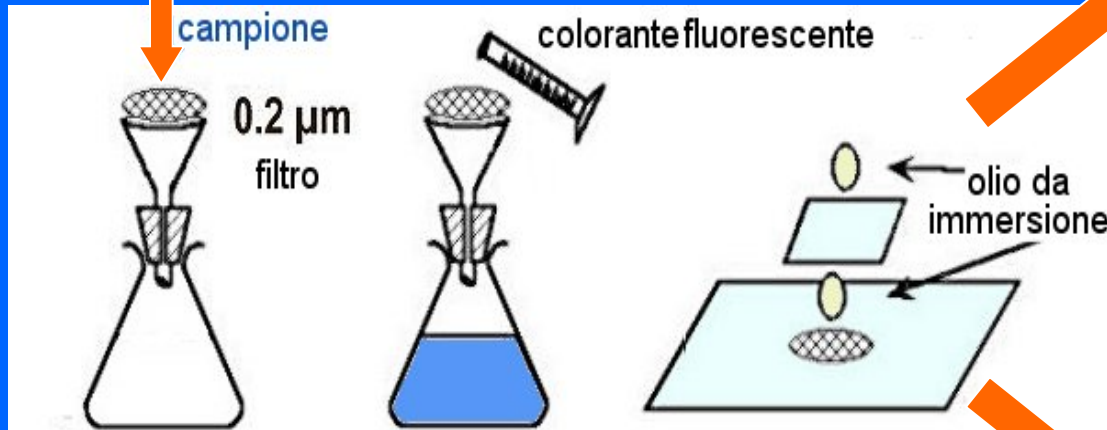


Conta batterica totale

Conta totale



Vitalità cellulare

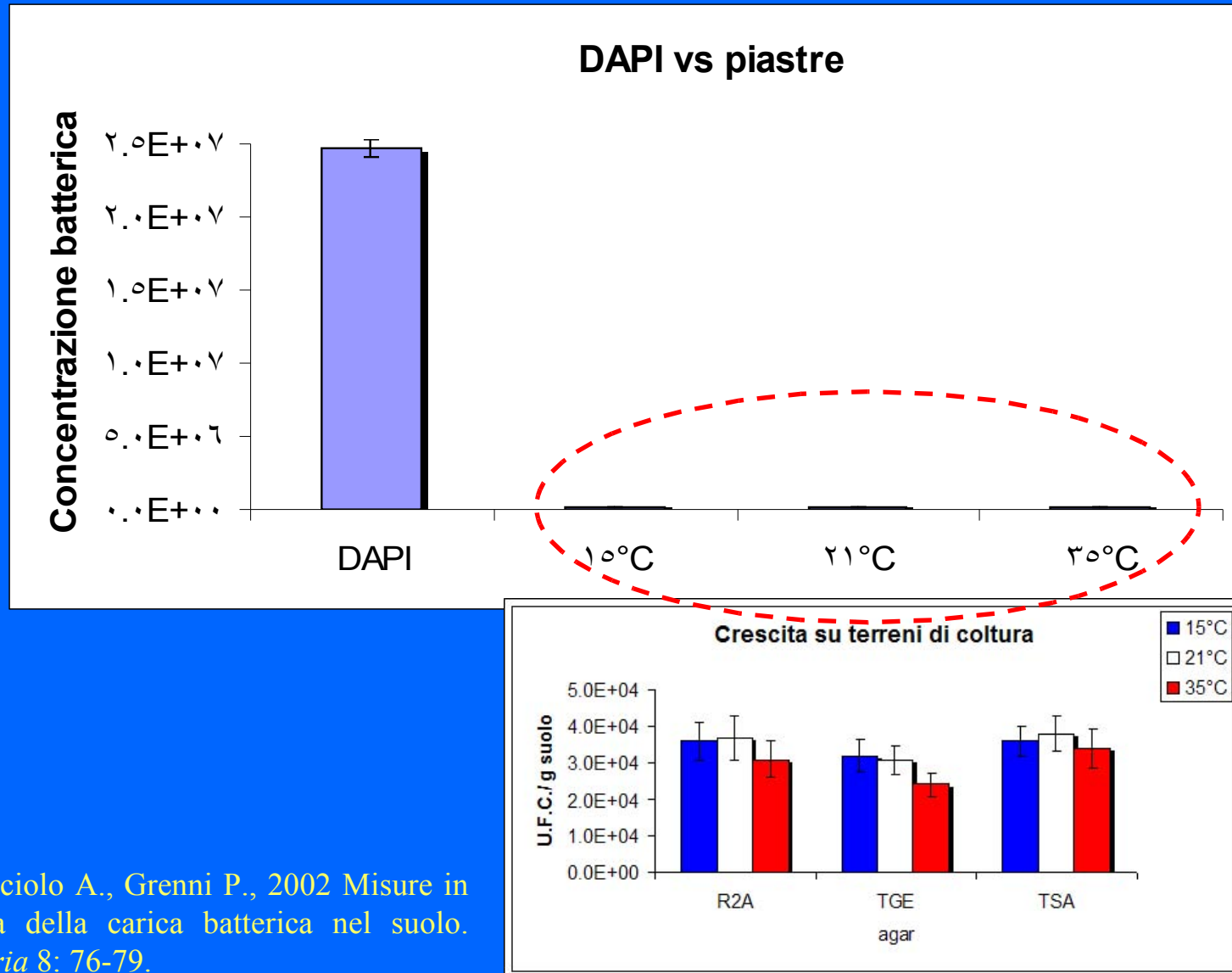


La conta totale e la vitalità cellulare sono metodi di facile applicazione

Barra Caracciolo et al., 2005. Environ. Toxicol. Chem. 24:1034-1040

Barra Caracciolo et al., 2005. Pest. Manag. Sci. 61:863-869

# Confronto tra i valori di abbondanza batterica ottenuti dalla conta diretta in fluorescenza (colorazione DAPI) vs la conta tradizionale su terreni di coltura.



Barra Caracciolo A., Grenni P., 2002 Misure in fluorescenza della carica batterica nel suolo. *Acqua ed Aria* 8: 76-79.

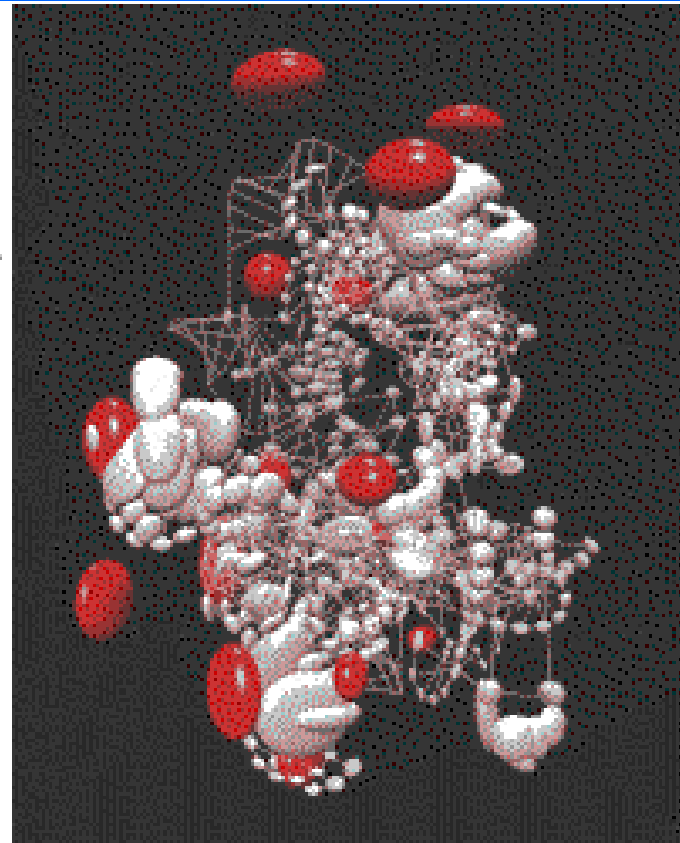
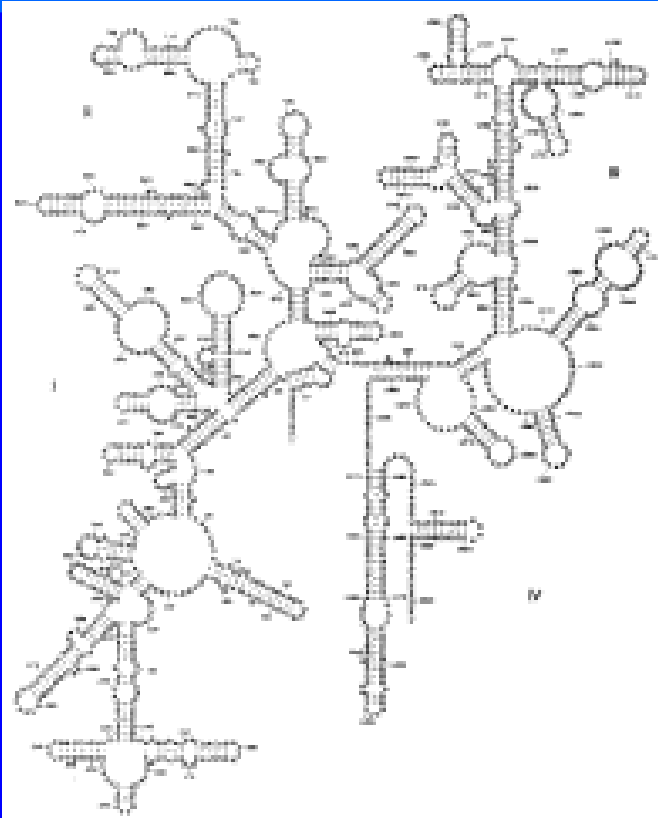
# I metodi di coltura non permettono l'identificazione filogenetica

Habitat	coltivabilità %
fanghi attivi	1-15
suolo	0.3
sedimenti	0.25
acqua dolce	0.25
acqua di mare	0.001-0.1

Amann et al., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59 (1): 143-169.

Schleifer KH, 2004. Microbial diversity: facts, problems and prospects *Syst Appl Microbiol* 27 (1): 3-9

# La caratterizzazione dei batteri a livello filogenetico richiede l'applicazione di metodi molecolari basati sulla sequenza del gene che codifica l'rRNA 16S

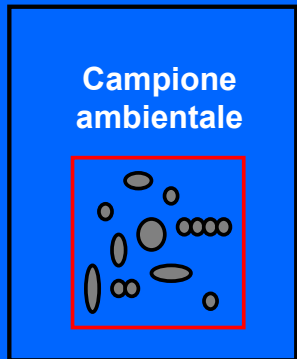


**Left: two-dimensional map of the secondary structure of 16S RNA.**  
**Right: low-resolution model of the large ribosomal subunit in bacteria.**

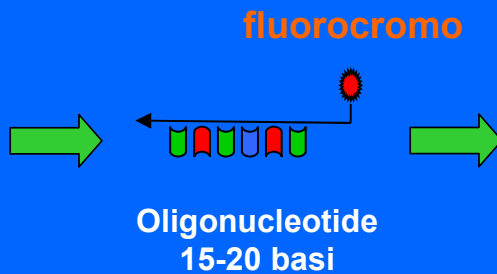


# Caratterizzazione delle comunità batteriche attraverso la Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH): identificazione *in situ* di batteri con sonde oligonucleotidiche fluorescenti con target l'rRNA 16S.

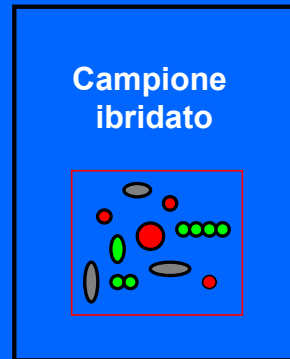
Fissaggio immediato



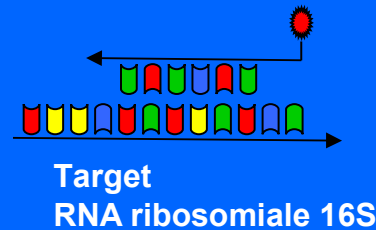
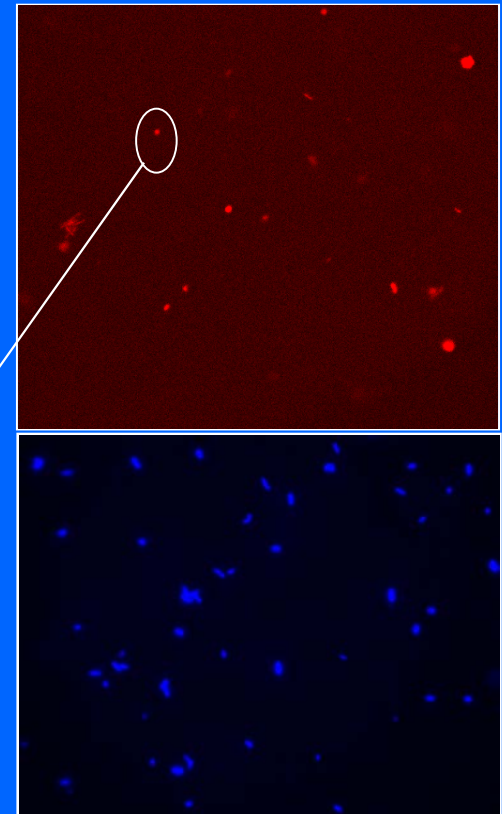
Trattamento con sonda fluorescente



Ibridazione



Osservazione al microscopio ad epifluorescenza



La stima delle cellule positive alla sonda fluorescente è espressa in percentuale rispetto alle cellule totali rilevate dal colorante DAPI.



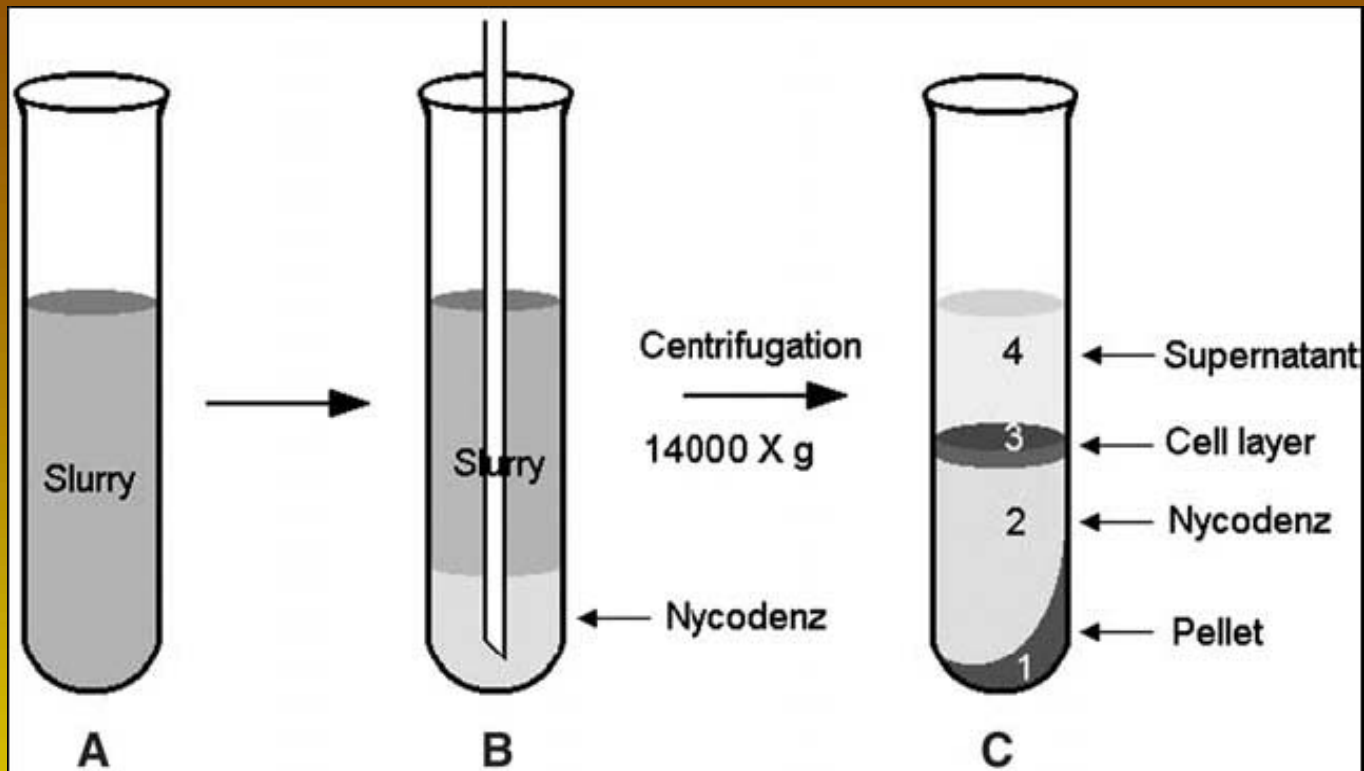
APAT

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale

**Analisi FISH:** messa a punto di un metodo, basato sulla centrifugazione con un gradiente di densità (Nycodenz), per la separazione delle cellule batteriche dalle particelle di suolo.



Barra Caracciolo A., Grenni P., Cupo C., Rossetti S., 2005. *In Situ* Analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. *FEMS Microbiology Letters* 253: 55-58.



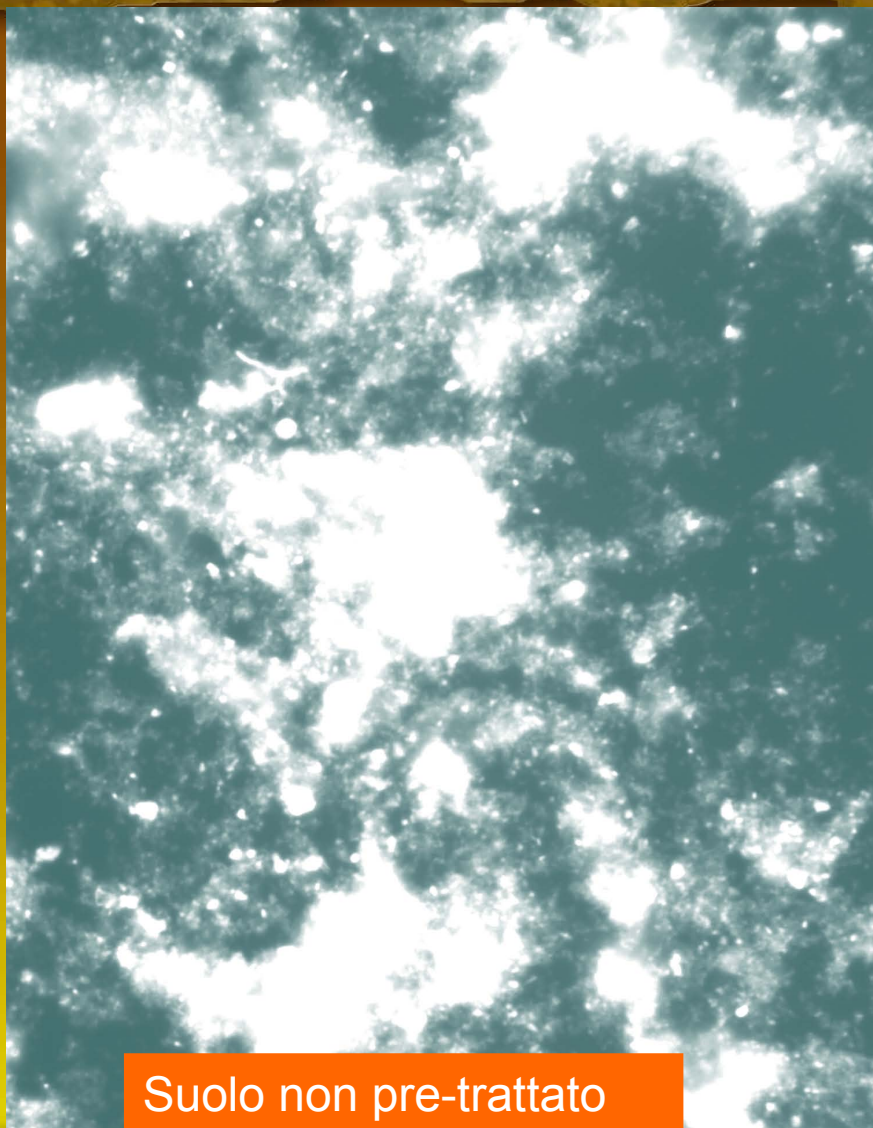


**APAT**

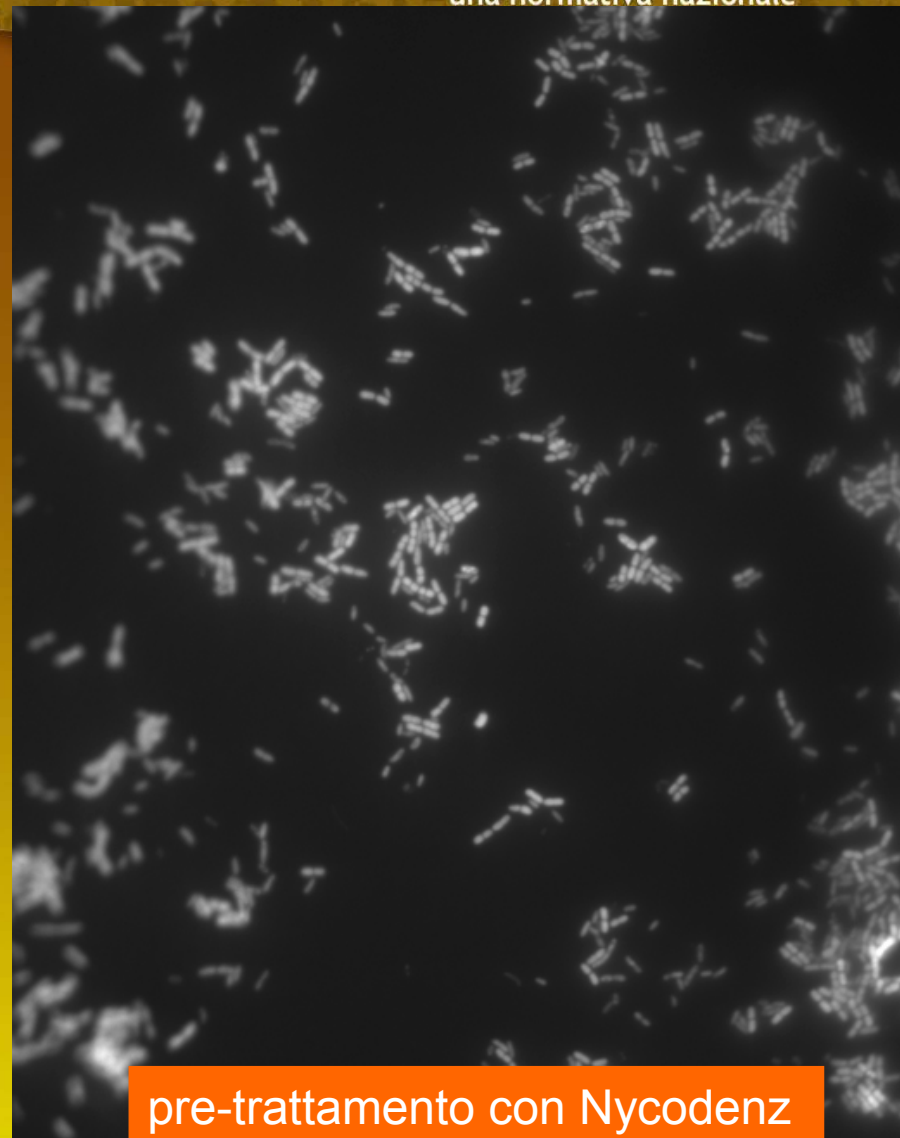
Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

**Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale**

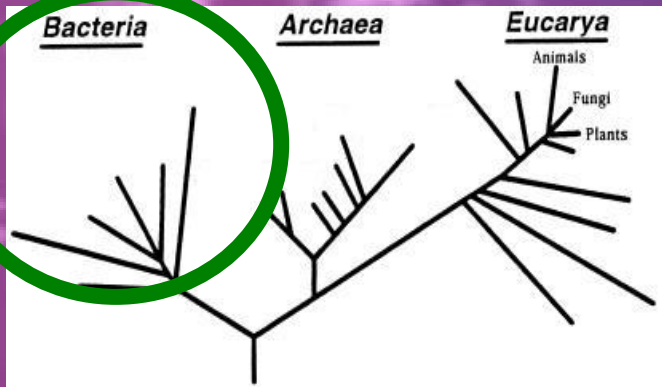


**Suolo non pre-trattato**



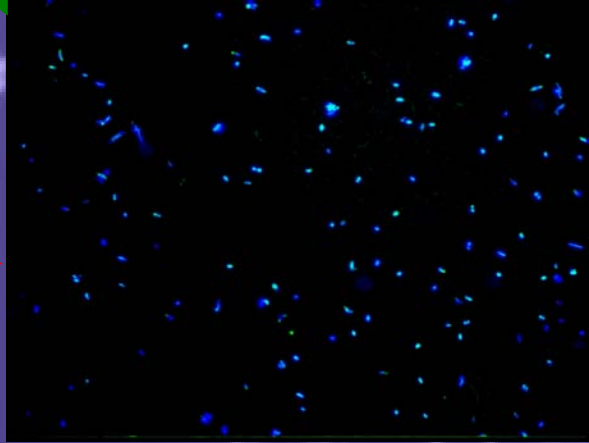
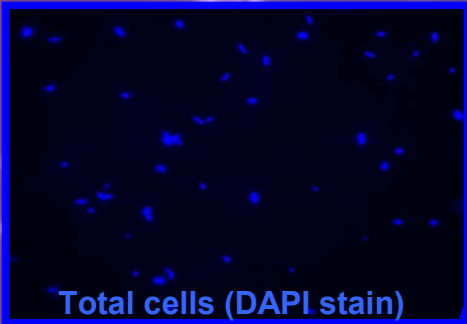
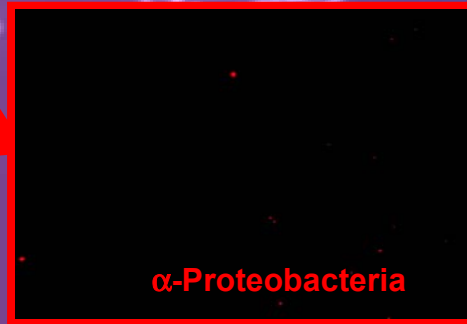
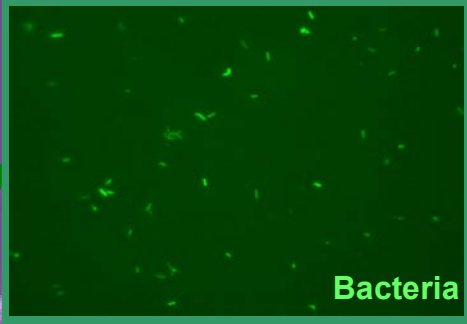
**pre-trattamento con Nycodenz**



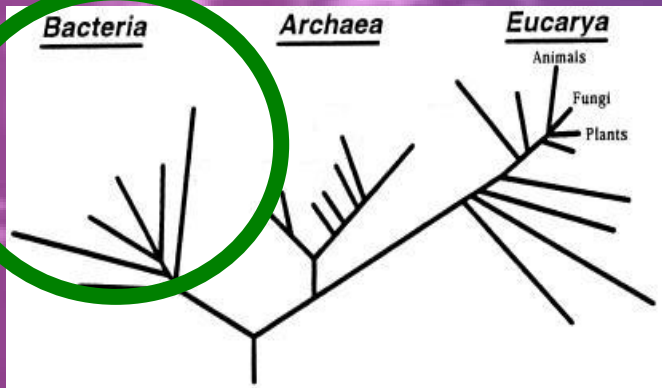


Ibridizzazione con le sonde EUB338 e ALF1B per identificare simultaneamente **Bacteria** e  **$\alpha$ -Proteobacteria**

EUB338	<i>Bacteria</i>
EUB338 II	<i>Bacteria</i>
EUB338 III	<i>Bacteria</i>
ALF1B	<i><math>\alpha</math>-Proteobacteria</i>
BET42a	<i><math>\beta</math>-Proteobacteria</i>
GAM42a	<i><math>\gamma</math>-Proteobacteria</i>
Pla46	<i>Planctomycetes</i>
Pla886	<i>Planctomycetes</i>
HGC69A	<i>Actinobacteria</i>
Nso190	<i>Nitrosomonadaceae</i>
Nsr1225	<i>Nitrospira</i>

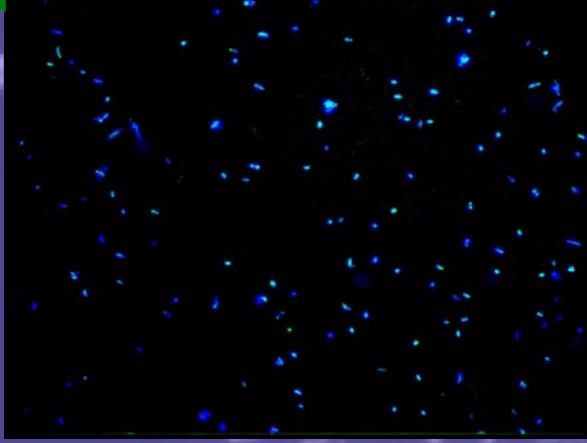
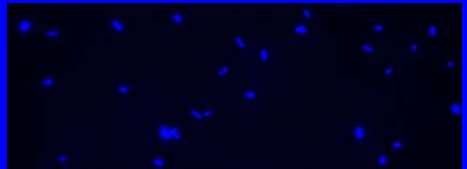
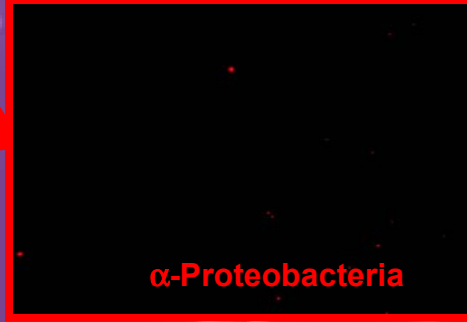
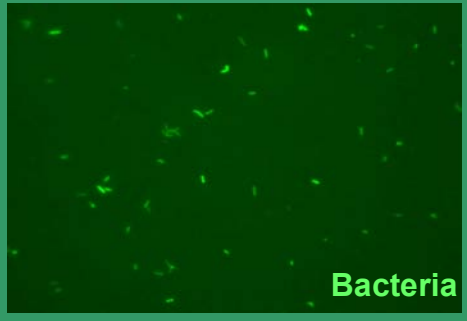


3 immagini sovrapposte



Ibridizzazione con le sonde EUB338 e ALF1B per identificare simultaneamente **Bacteria** e  **$\alpha$ -Proteobacteria**

EUB338	<i>Bacteria</i>
EUB338 II	<i>Bacteria</i>
EUB338 III	<i>Bacteria</i>
ALF1B	<i><math>\alpha</math>-Proteobacteria</i>
BET42a	<i><math>\beta</math>-Proteobacteria</i>
GAM42a	<i><math>\gamma</math>-Proteobacteria</i>
Pla46	<i>Planctomycetes</i>
Pla886	<i>Planctomycetes</i>
HGC69A	<i>Actinobacteria</i>
Nso190	<i>Nitrosomonadaceae</i>

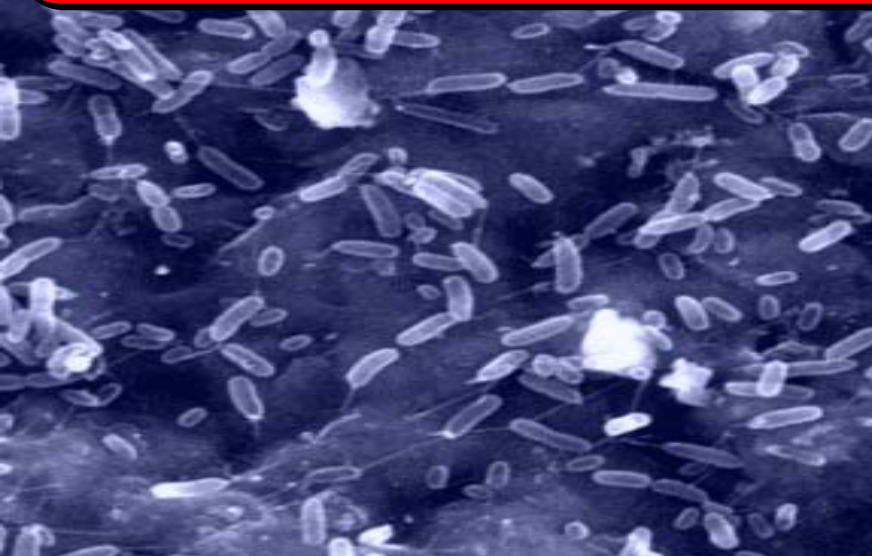
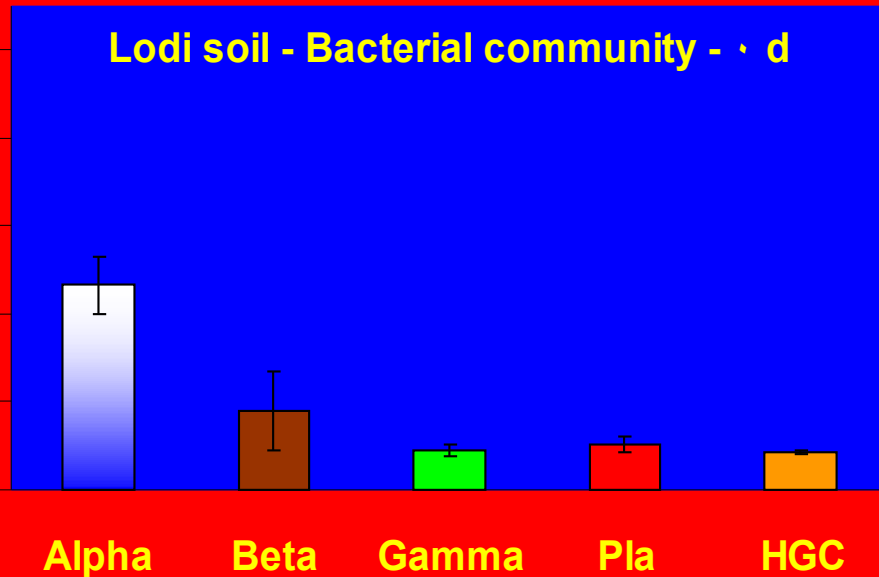


3 immagini sovrapposte

La FISH permette di caratterizzare filogeneticamente la comunità batterica e valutarne la biodiversità in termini di presenza e abbondanza relativa dei differenti taxa.

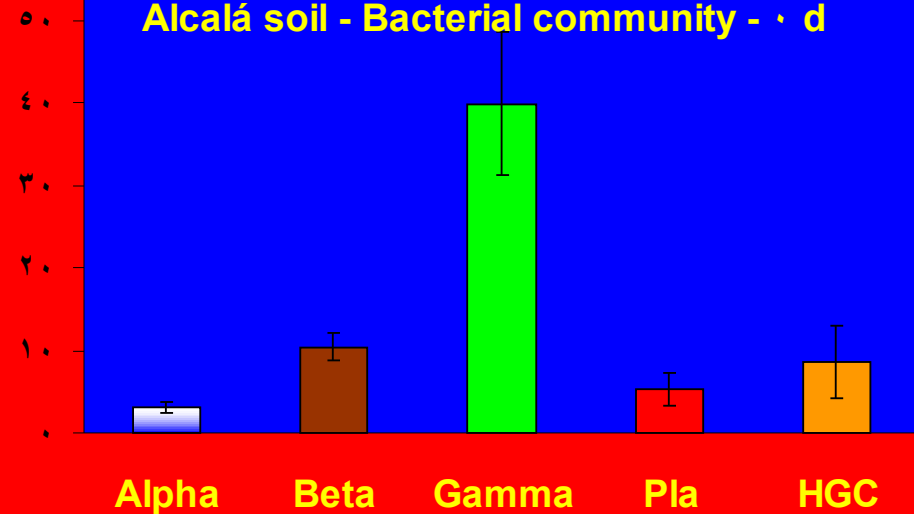
% of total cell count

Lodi soil - Bacterial community - 1 d



% total cell count

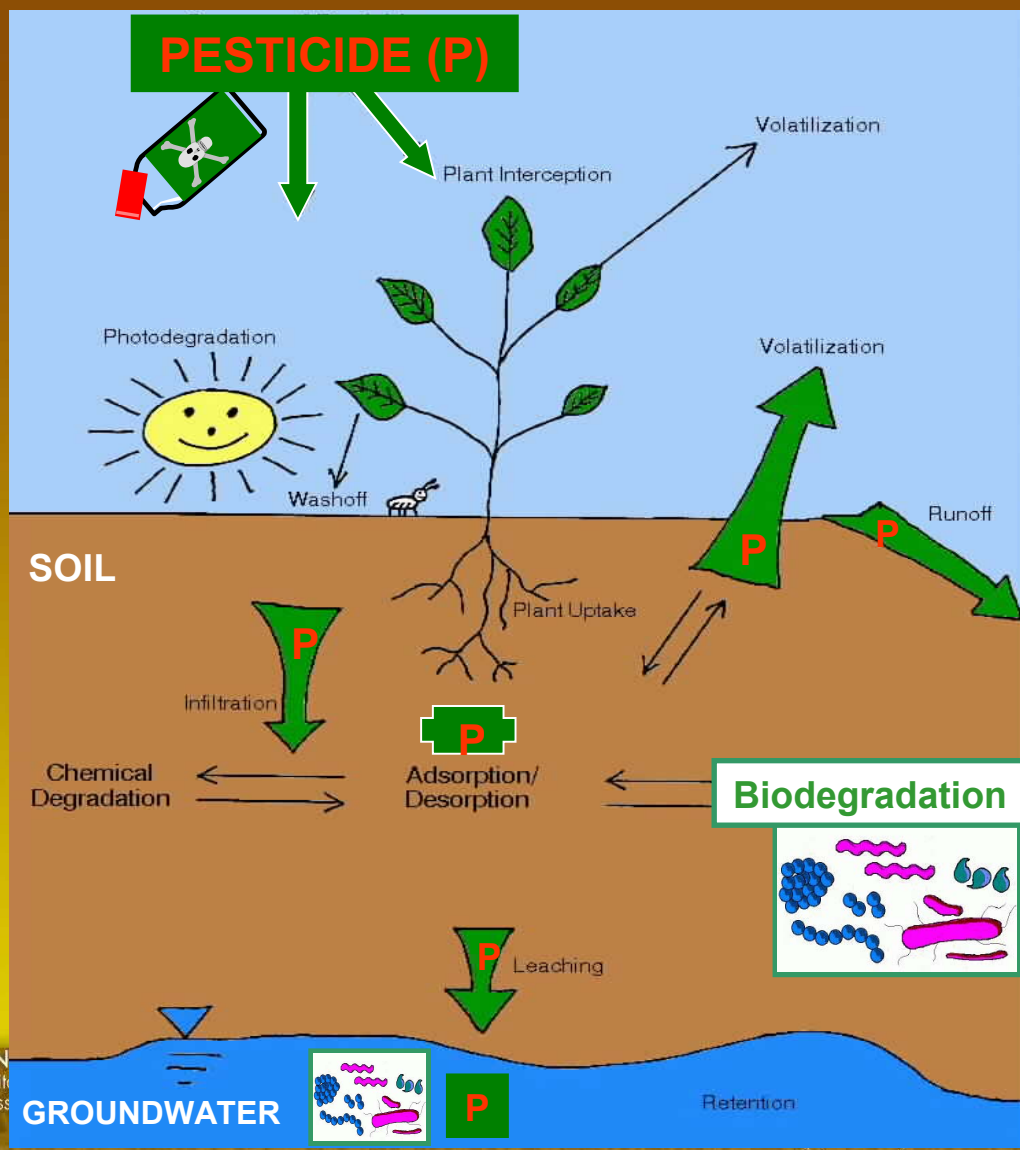
Alcalá soil - Bacterial community - 1 d



**Il metodo FISH permette una caratterizzazione dei principali gruppi filogenetici presenti dandoci indicazioni sulla biodiversità dei suoli analizzati**

# Ruolo dei batteri nella degradazione di pesticidi

Workshop tematico:  
Biodiversità dei suoli italiani:  
Indicatori di qualità e ruolo  
una normativa nazionale





**APAT**

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

**Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale**

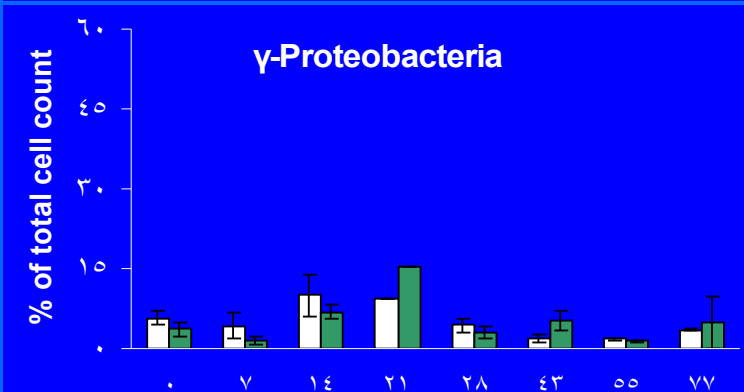
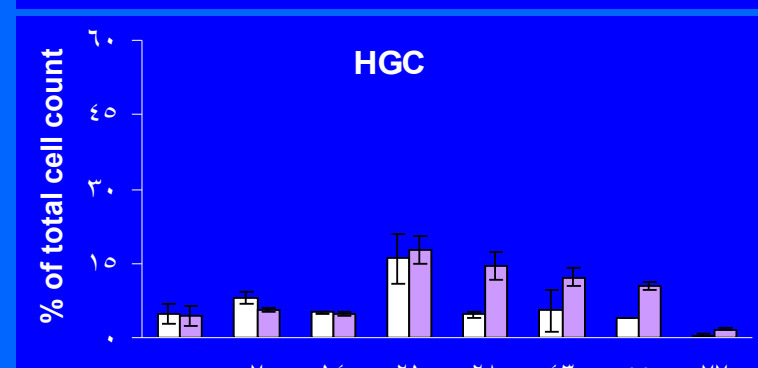
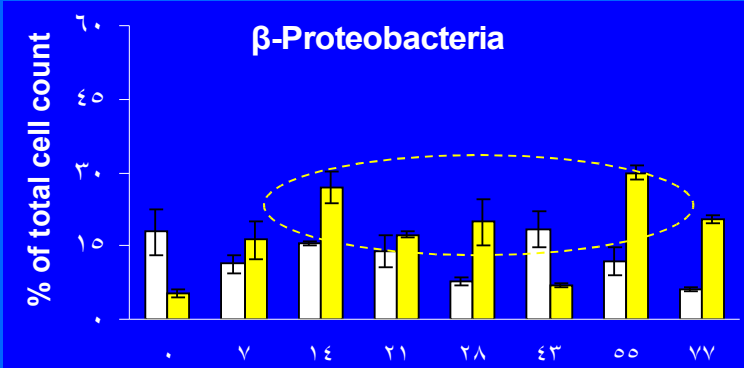
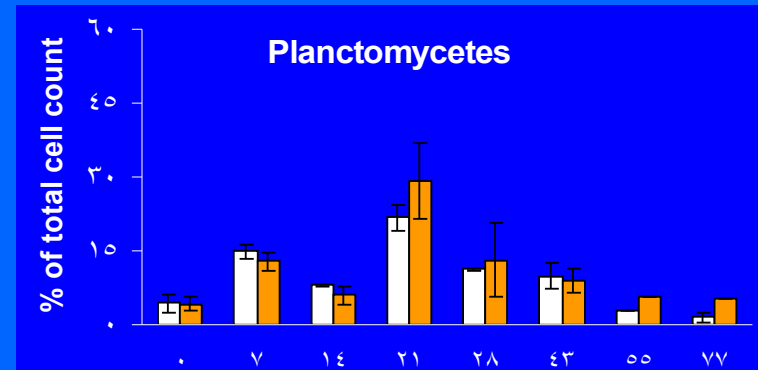
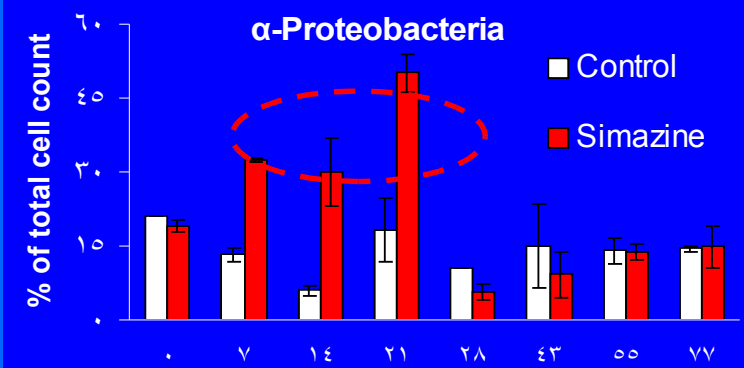
# Effetti di un pesticida sulla struttura di comunità

3. Cambiamento della sua struttura (es. perdita di specie o di rapporti di dominanza)
2. Alcune popolazioni possono adattarsi ed utilizzare il pesticida come fonte di carbonio e degradarlo.





# Effetto dell'erbicida Simazina sulla struttura di comunità



$\alpha$ - e  $\beta$ -Proteobacteria positivamente influenzati dalla presenza dell'erbicida, suggerendo un loro ruolo nella degradazione



**APAT**

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

**Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale**

## Attività Deidrogenasica

- La concentrazione di formazan è direttamente proporzionale alla vitalità della comunità batterica non-fotosintetica del suolo.
- Può essere utilizzata per valutare l'effetto diretto di chemicals o pesticidi sull'attività di una comunità microbica del suolo

**Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W. (Ed.), Methods of Soil Analysis: 903–947.**  
**Bending GD, Rodruguez-Cruz MS. 2007. Chemosphere 66: 664-671.**





APAT

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

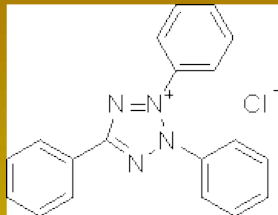
Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale

# Attività Deidrogenasica

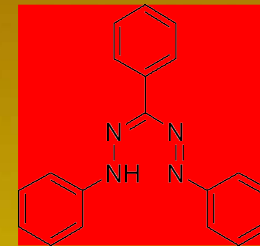
La deidrogenasi, enzima chiave della respirazione microbica, ha un ruolo importante nella produzione di energia degli organismi ed è una misura dell'attività microbica nel suolo.

Processo di riduzione da parte dei microorganismi del TTC in TPF

TTC



TPF



2,3,5-Trifeniltetrazolio: incolore,  
idrosolubile, forma ossidata

Formazan: colorante rosso,  
non idrosolubile, estraibile con  
metanolo



# Caso di studio: DHA in suolo trattato con erbicida e/o ammendanti organici

DHA ( $\mu\text{g TPF/g}$  suolo)

Ammendante 1: pino; Ammendante 2: quercia

	3 giorni	30 giorni	50 giorni
<b>Suolo + Linuron</b>	101 $\pm$ 8	41 $\pm$ 5	59 $\pm$ 2
<b>Suolo Controllo</b>	69 $\pm$ 9	46 $\pm$ 3	64 $\pm$ 5
<b>+ Ammendante 1</b>	66 $\pm$ 4	111 $\pm$ 17	152 $\pm$ 8
<b>+ Ammendante 2</b>	117 $\pm$ 8	84 $\pm$ 9	147 $\pm$ 8
<b>Suolo + Terbutilazina</b>	64 $\pm$ 3	48 $\pm$ 1	50 $\pm$ 7
<b>Suolo Controllo</b>	74 $\pm$ 6	53 $\pm$ 1	57 $\pm$ 7
<b>+Ammendante 1</b>	114 $\pm$ 35	174 $\pm$ 32	163 $\pm$ 14
<b>+Ammendante 2</b>	190 $\pm$ 31	329 $\pm$ 32	550 $\pm$ 150

# Caso di studio: DHA in suolo trattato con erbicida e/o ammendanti organici

N batteri vivi/g suolo

Ammendante 1: pino; Ammendante 2: quercia

<b>Suolo + Linuron</b>	$5 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$5 \times 10^7$
<b>Suolo Controllo</b>	$2 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$4 \times 10^7$
<b>+ Ammendante 1</b>	$4 \times 10^7$	$7 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
<b>+ Ammendante 2</b>	$4 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$6 \times 10^7$
<b>Suolo + Terbutilazina</b>	$3 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	$7 \times 10^7$
<b>Suolo Controllo</b>	$2 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$4 \times 10^7$
<b>+ Ammendante 1</b>	$4 \times 10^7$	$2 \times 10^8$	$4 \times 10^8$
<b>+ Ammendante 2</b>	$4 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$1 \times 10^8$



**APAT**

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

**Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale**

**1. La DHA non è inibita dalla presenza di erbicidi in suoli in cui la comunità batterica è adattata**

**2. la DHA è significativamente correlata al numero di batteri vivi**

**3. la DHA è significativamente correlata al contenuto di carbonio organico**

**La DHA può essere utilizzata come un bio-indicatore del suolo**





APAT

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale

In un ecosistema una determinata funzione può essere dovuta all'azione di più organismi anche distanti da un punto di vista filogenetico (ridondanza). La perdita di una specie può non corrispondere alla perdita di una funzione ecosistemica.

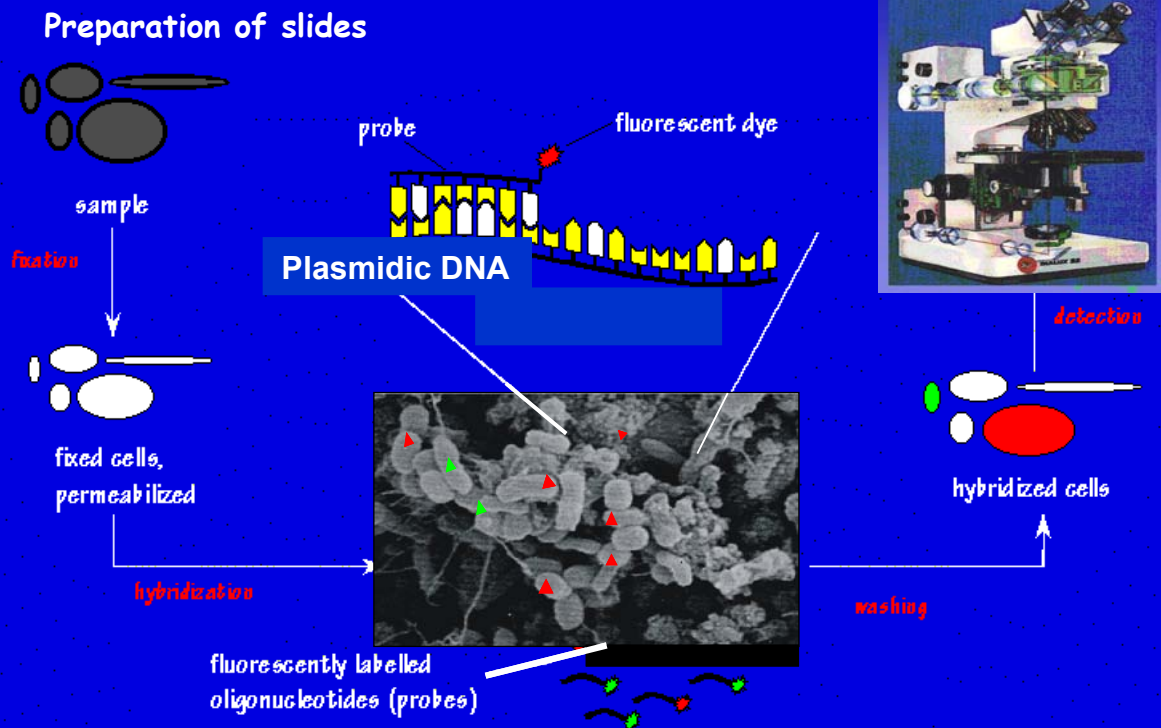
Questo fenomeno può essere riscontrato anche nel mondo microbico per esempio attraverso la trasmissione di geni plasmidici codificanti per una particolare attività enzimatica (es. la degradazione di un contaminante).

In tal caso può essere utile l'identificazione dell'attività enzimatica o del gene responsabile piuttosto che quello delle specie, "superando il problema dell'identificazione della specie".



# Applicazione della Fluorescence *In Situ* Hybridization con una sonda specifica per un gene responsabile della degradazione erbicidi triazinici

## Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)







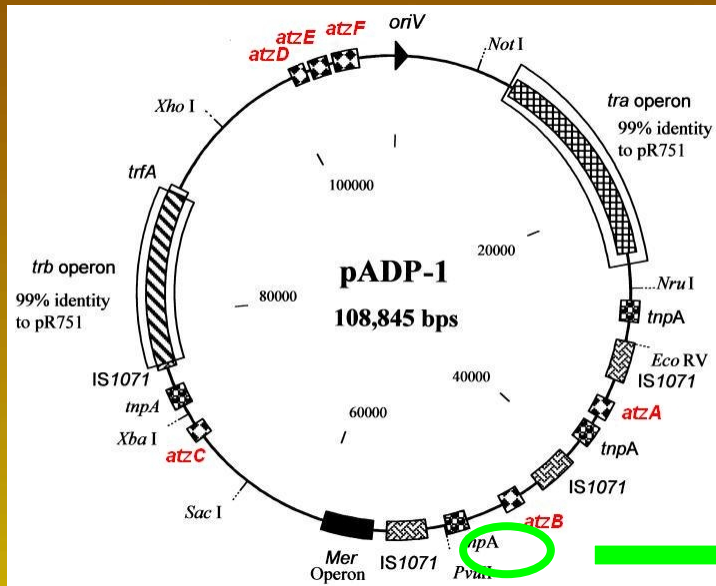
APAT

Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

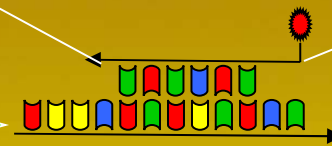
Biodiversità dei suoli italiani: indicatori ed applicazioni verso una normativa nazionale

La sonda AtzB1, disegnata dall'Università di Madrid, ha come target il gene *atzB* responsabile della deaminazione idrolitica delle s-triazine.



Il gene *atzB* gene è presente su un plasmide

5'-GGA GAG CAC CGA TAC TTT TCT T-3'



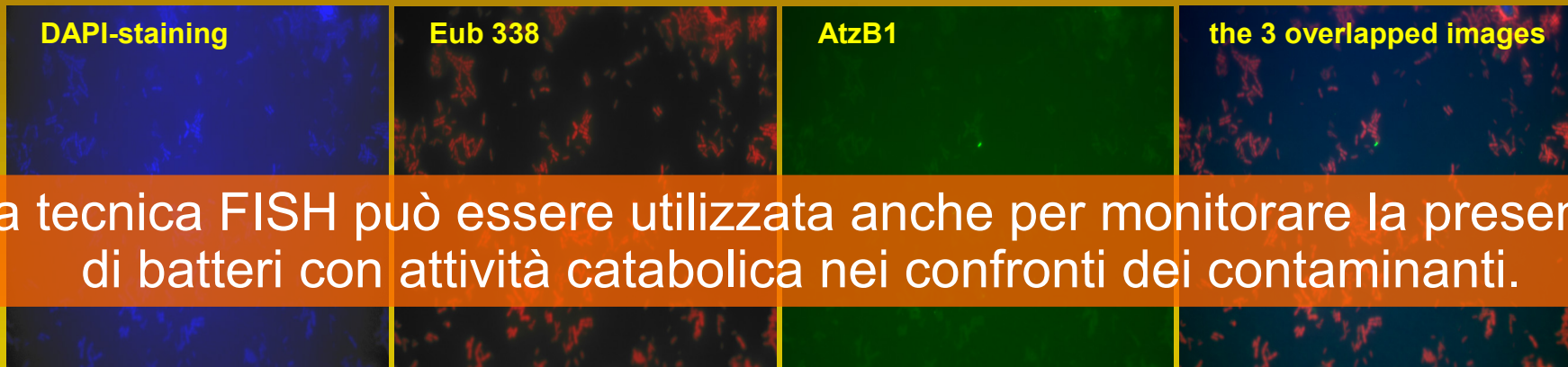
Target: DNA plasmidico

Individuazione di batteri con potenzialità di degradare le s-triazine tramite FISH



# Gene *atzB* individuato in 2 suoli trattati con s-triazine

SO11S	Loc1	Monza	de Henares	SO10
Texture class	Loam	Silty Loam	Loam	Clay
pH (H <sub>2</sub> O)	5.9	7.3	8.2	7.7
O.C. (%)	0.8	2.0	0.0	6.2
Total N (%)	0.1	0.2	0.6	0.0
Herbicide treatment	s-triazines	-	s-triazines	-
% <i>atzB</i>	8.2 ± 0.6	0	6.0 ± 0.0	0



La tecnica FISH può essere utilizzata anche per monitorare la presenza di batteri con attività catabolica nei confronti dei contaminanti.

Martín M, Gibello A, Martínez-Iñigo MJ, Lobo MC, Nande M, Garbi C, Barra Caracciolo A, Grenni P, 2008. Application of fluorescence in situ hybridization technique to detect simazine-degrading bacteria in soil samples. *Chemosphere* 71: 703–710.



APAT

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale

## Caratteristiche di un bioindicatore:

- esprima una funzione rilevante del suolo
- dia una risposta in un arco di tempo accettabile
- comodo per la valutazione o misura
- metodologia robusta con tecniche di campionamento standardizzate
- efficace dal punto di vista dei costi
- compatibile con gli indicatori del suolo fisici e chimici

Gli strumenti e le metodologie da adottare dovrebbero dipendere *dall'end user* (agricoltori, decisori istituzionali, ricercatori)





APAT

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale

## Indicatori di perdita di qualità di un suolo facilmente applicabili sono:

- diminuzione abbondanza microbica, metodo: conta diretta in epifluorescenza
- diminuzione della attività microbica: vitalità cellulare con coloranti selettivi, misura attività deidrogenasica
- diminuzione diversità microbica attraverso l'analisi FISH (richiede tempi di esecuzione più lunghi)





**APAT**

Agenzia per la protezione  
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Workshop tematico:

**Biodiversità dei suoli italiani:  
indicatori ed applicazioni verso  
una normativa nazionale**

Fine

Grazie per l'attenzione!

<http://www.irsacnr.it>

