



Analisi della biodiversità del suolo

Stefano Mocali

CRA- Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo

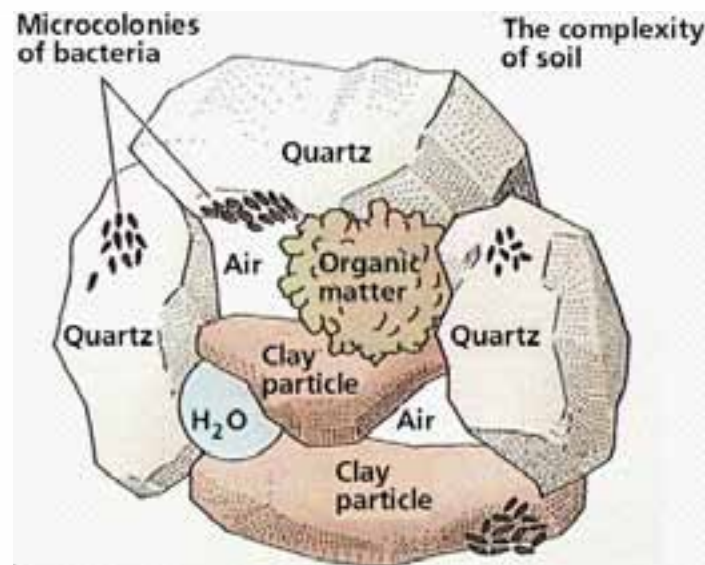
Indice

- Premessa
- Metodi, strumenti e fonti di informazione
- Indicatori selezionati
- Indice di fertilità biologica (IBF)
- I metodi molecolari
- Protocollo applicativo

PREMESSA: I MICRORGANISMI DEL SUOLO

- Il suolo nasconde un numero straordinario di forme di vita, un'intricata rete di interazioni che coinvolge un'enorme quantità di biomassa vivente, oltre 3000 Kg/ha in un suolo agricolo (Bloem *et al.*, 2003).

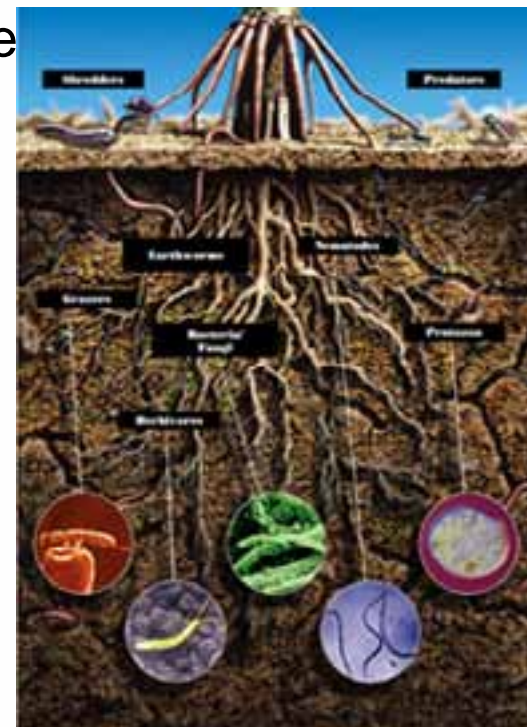
- Pochi grammi di terreno possono contenere miliardi di batteri, centinaia di chilometri di ife fungine, decine di migliaia di protozoi, migliaia di nematodi, alcune centinaia di insetti, aracnidi, vermi e centinaia di metri di radici di piante.



PREMESSA: I MICRORGANISMI DEL SUOLO

Costituiscono un enorme quantità di vita “invisibile” che è alla base di numerose attività come:

- Le trasformazioni della sostanza organica
- La mineralizzazione e il ciclo dell' N e del C
- Cicli di tutti i nutrienti indispensabili per le piante
- La stabilità della struttura del suolo
- Il flusso dell'acqua
- Il biorisanamento
- Le risposte allo stress e il mantenimento della fertilità



“Questo comparto multifunzionale è troppo spesso poco considerato ma rappresenta una straordinaria sorgente di vita per il nostro pianeta “ (Brussaard *et al.*, 1997)

Metodi, strumenti e fonti di informazione

I microrganismi come indicatori di qualità e sostenibilità del suolo

I microrganismi possono essere utilizzati come indicatori della qualità del suolo perché svolgono delle funzioni chiave nella degradazione e nel ricircolo della sostanza organica (e dei nutrienti) e rispondono prontamente ai cambiamenti dell'ambiente suolo. Inoltre l'attività microbica nel suolo rispecchia la somma di tutti i fattori che regolano la degradazione e la trasformazione dei nutrienti.

E' comunque estremamente difficile utilizzare i valori forniti dai parametri microbiologici poiché i microrganismi del suolo reagiscono molto rapidamente anche a variazioni stagionali e si adattano alle diverse necessità ambientali. Perciò diventa problematico distinguere fluttuazioni naturali da alterazioni causate da attività antropiche, specialmente quando il dato viene determinato sprovvisto di controllo.

Fattori da considerare

L'uso di indicatori microbiologici, biochimici e molecolari per la qualificazione e lo studio della biodiversità del suolo pone l'operatore di fronte ad una serie di problemi interpretativi che scaturiscono dalla estrema duttilità che ha "l'organismo suolo" di adattarsi e di rispondere a pressioni esterne.

E' consigliabile utilizzare i seguenti strumenti:

- Scheda di campagna
- Carta dei suoli
- Fattori climatici
- Uso del suolo
- Presenza di specie animali e vegetali
- Catene trofiche particolari



Fonti di informazione

Scheda di campagna:

La prima raccomandazione che si impone di suggerire è quella di raccogliere il numero maggiori di informazioni sul sito in esame che spaziano dal pregresso uso del suolo, all'esposizione, ai venti dominanti, alle caratteristiche climatiche, ecc. attraverso la redazione di una scheda di campagna nella quale vengano raccolte ed organizzate in maniera tale da essere leggibili nel tempo e da operatori diversi, come mostrato nella seguente scheda esemplificativa.

Ogni scheda è suddivisa in diverse parti.

Dati generali			
Oggetto:		Campione n.	
Rilevatore:		Data del rilievo:	
Località:			
Coordinate GPS della stazione		°N	
		°E	
Descrizione del sito			
Esposizione			
Venti dominanti			
Pendenza (%)		Quota s.l.m.	
Rocciosità		Qualità:	
		Quantità:	
Descrizione del suolo			
Profondità del prelievo (cm)			
Radici		Dimensioni:	
		Quantità:	
Precipitazioni (media mensile)			
Pioverse:		Nevose:	
Temperature (media mensile)			
Vicinanza di centri urbani, industriali, autostrade, ecc.			
Tipo di vegetazione e copertura (%)			
Prato	Alto fusto	Culture	Altro
Uso del suolo (agricolo, pascolo, riserva naturale, ecc.)			
Descrizione della superficie del terreno al momento del prelievo (colore, affioramento di plastiche, cemento, laterizi, ecc.)			
Altre NOTE:			

Dati generali: costituiscono l'elemento base per la identificazione del campione e dovranno seguire un criterio concordato ed omologato con un protocollo dettagliato e specifico da raccogliere in una piccola guida. In questa parte dovranno essere annotate l'oggetto, il numero e il nome dei campioni, la data del rilievo, il nome del rilevatore e la località con le relative coordinate GPS.

Descrizione del sito: in questa parte dovranno essere riportate alcune importanti caratteristiche del sito quali l'esposizione ai venti, la pendenza del suolo, la rocciosità e la quota sul livello del mare.

Descrizione del suolo: è fondamentale per l'interpretazione dei dati raccolti. Elementi come la profondità del prelievo, la presenza di falda, l'umidità e la presenza di radici devono essere riportati.

Condizioni climatiche: in questa parte vanno indicate la precipitazioni (piovose, nevose, medie, ecc), le temperature (medie) dell'aria e l'esposizione ai venti.

Uso del suolo: anche questo tipo di informazione risulta di fondamentale importanza al fine di interpretare al meglio i risultati delle analisi. Pertanto occorre specificare la coltura in atto e la gestione colturale abituale. Ad esempio se forestale (specificare la specie o la consociazione), prato pascolo, incolto o altro ((fruizione turistica, riserva naturale, giardino pubblico, ecc).

Ubicazione: indicare la vicinanza a centri urbani, strade e autostrade, siti industriali, ferrovie, ecc.

Informazioni storiche: ogni in formazione utile a ricostruire l'evolversi dell'ecosistema. Ad esempio sarebbe interessante conoscere nel caso si osservasse un terreno incolto sapere se e da quanto tempo è incolto oppure se precedentemente hanno insistito coltivazioni, boschi ecc.

Descrizione del sito al momento del prelievo: colore del suolo, presenza di croste superficiali, affioramento di materiali particolari come metalli, plastiche, laterizi, residui organici di vario genere, ecc..

Altre informazioni utili: l'operatore dovrà qui annotare ogni altra informazione che riterrà utile segnalare. Ad esempio nel caso di aree destinate al pascolamento dovrà descrivere la consistenza delle deiezioni animali, il compattamento, lo scavo da parte di animali selvatici, ecc..

Caratteristiche climatiche (temperatura e precipitazioni medie): temperatura ed umidità sono due tra i fattori limitanti più importanti per la vita nel suolo. Ogni studio di caratterizzazione dell'agrobiodiversità del suolo non può prescindere dalla conoscenza delle caratteristiche climatiche dell'area.

Uso del suolo ed evidenziazione di situazioni particolari: questa parte del lavoro dell'osservatore deve essere sviluppata se dalla scheda di campagna vengono rilevate delle osservazioni particolari. Questo comporterà da parte dell'analista un approfondimento di indagine legato proprio alla corretta interpretazione del risultato.

Presenza di specie vegetali ed animali particolari: sarà cura dell'operatore di campo segnalare la presenza di eventuali specie animali e vegetali particolari che potrebbero essere considerati dei veri e propri indicatori dell'ecosistema, e quindi indirizzare il campionamento del suolo di conseguenza.

Individuazione di catene trofiche particolari: come abbiamo visto il suolo è un ecosistema ricco di catene trofiche, all'interno delle quali possono esistere organismi "chiave" che possono essere utilizzati come indicatori (ad esempio la presenza di determinate piante può essere correlata al pH del suolo o alla presenza di organismi azoto-fissatori, ecc).

La carta dei suoli

La carta pedologica (o dei suoli) è il miglior sistema di rappresentazione per analizzare e campionare i suoli di un tratto di territorio poiché indica, oltre alla natura dei suoli, la loro dislocazione e la loro distribuzione, cioè la loro importanza relativa all'interno del territorio considerato.

Criteri di campionamento:

- 1) La variabilità spaziale di un campo (distribuzione degli elementi, es. granulometria)
- 2) La variabilità degli elementi: ad es. il fosforo ha meno variabilità del potassio, perciò richiede un minor numero di prelievi.
- 3) L'imprecisione dei metodi di campionamento

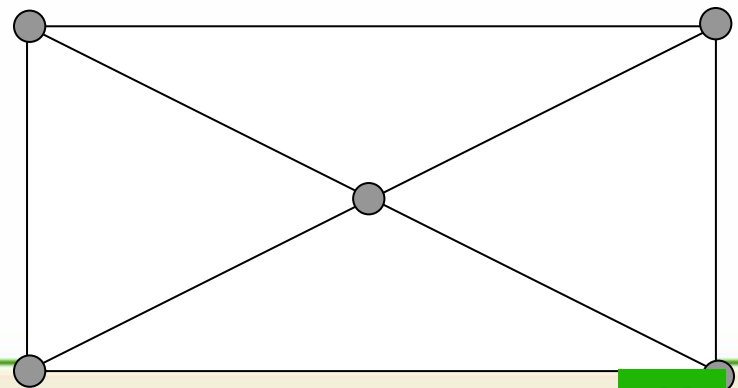
Il campionamento “ragionato”

Per effettuare un campionamento “ragionato” è opportuna la presenza di un pedologo di campagna o di chi utilizza il campo che ha acquisito tutta una serie di informazioni relative a quel determinato suolo sulla base della propria esperienza sul campo.

In questi casi si può procedere con un procedimento di “campionamento ragionato”, seguendo i seguenti passi:

- a) Individuare i diversi tipi di suolo (eventuali) nel campo
- b) Campionare al centro delle differenti unità individuate
- c) Prelevare 3-4 sottocampioni, il più uniformi possibili

Di solito si utilizza un approccio di tipo globale (o “olistico”) che tende a considerare il terreno considerato nella sua interezza per un eventuale intervento agronomico.



Strumenti

- **Indicatori fisici**: le caratteristiche fisiche del suolo sono in gran parte determinate dalle sue condizioni strutturali. La struttura del terreno, cioè “*la risultante della combinazione di differenti tipi di pori con le particelle solide (aggregati)*” (Vignozzi e Pagliai, 2006), è una delle più importanti proprietà che determinano lo sviluppo delle colture proprio perché è la struttura stessa che influenza la profondità che le radici possono esplorare, il volume dell’acqua che può essere immagazzinata, i movimenti dell’acqua stessa, dell’aria, degli elementi nutritivi, dei fitofarmaci e della fauna terricola. Insieme al pH e alla sostanza organica è il parametro che influenza maggiormente la diversità microbica del suolo! (Sessitsch et al., 2001)
- **Indicatori chimici**: tra i numerosi indicatori chimici del suolo, la *sostanza organica*, caratterizzata sotto diversi aspetti, è stata scelta come indicatore di qualità. Il suo contenuto nel suolo, infatti, è un potenziale indicatore ambientale in quanto si correla con numerosi aspetti della produttività e sostenibilità degli agroecosistemi e della conservazione ambientale (Smith et al., 2000)

Strumenti

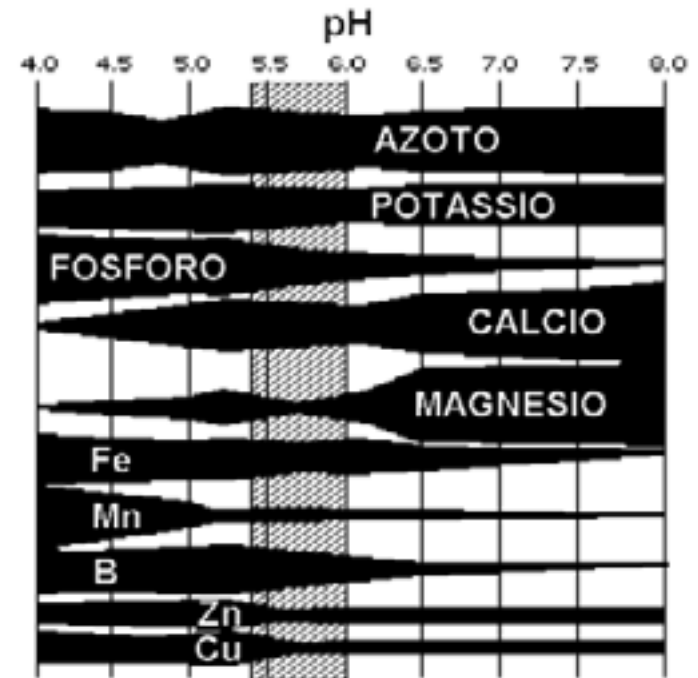
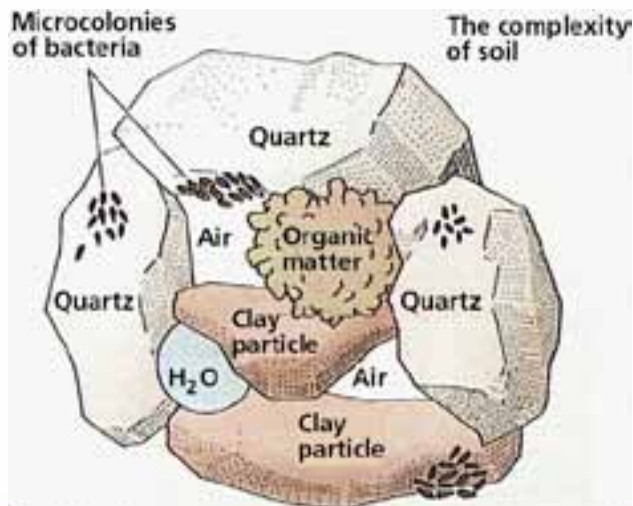
- **Indicatori biologici e microbiologici**: Quando i suoli presentano marcate variazioni rispetto a ciò che è considerato il valore normale (es. C biomassa/ C organico totale del suolo) in un particolare sistema di gestione del suolo, clima e tipo di suolo, tale valore diventa un indicatore del deterioramento e del cambiamento nelle funzioni dell'ecosistema suolo. Infatti c'è una relazione quasi lineare tra queste due variabili, anche se ci possono essere rilevanti discrepanze tra suoli con diverse caratteristiche fisiche o suoli gestiti in modo diverso.

E' estremamente difficile applicare i risultati dei valori microbiologici poiché i microrganismi del suolo reagiscono molto rapidamente anche a variazioni stagionali e si adattano alle diverse necessità ambientali. Perciò diventa problematico distinguere fluttuazioni naturali da alterazioni causate da attività antropiche, specialmente quando il dato viene determinato tardi e sprovvisto di controllo.

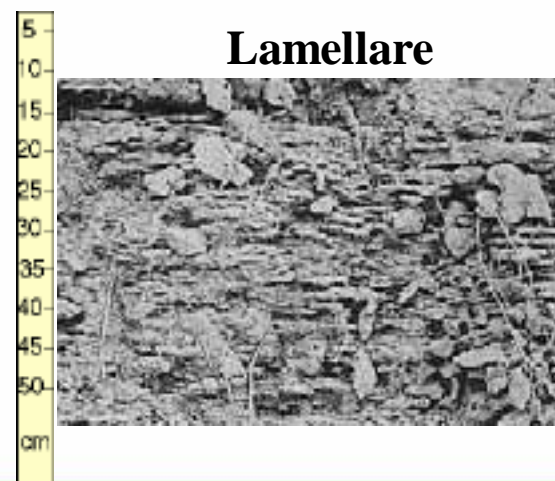
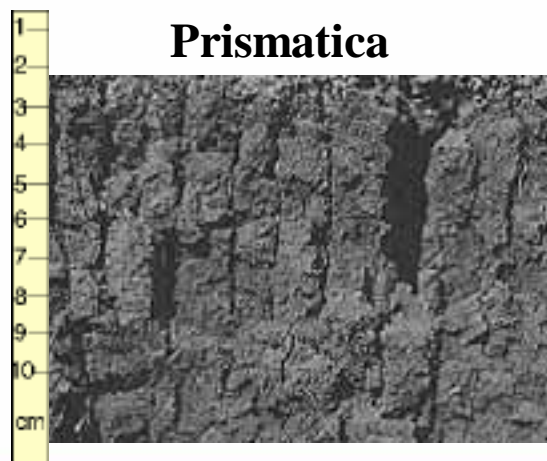
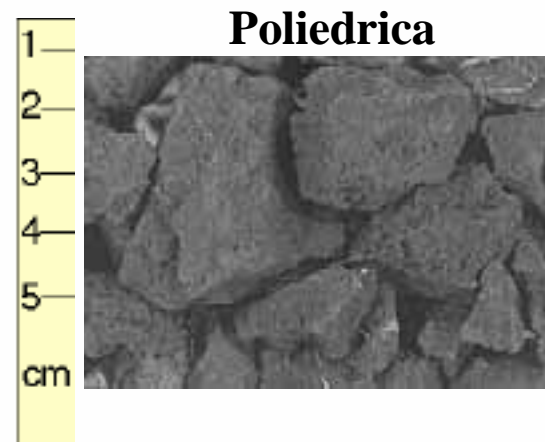
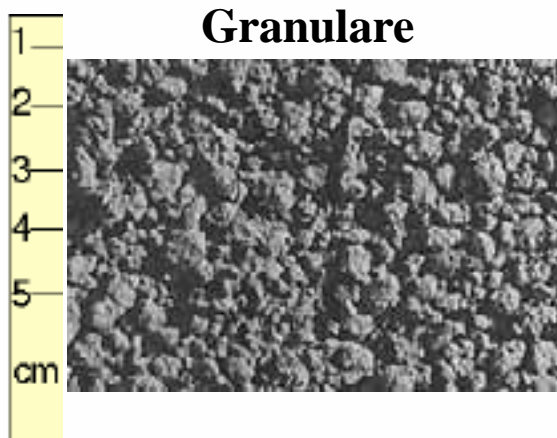
Indicatori fisici

La biodiversità microbica del suolo, a differenza di quella animale e vegetale, non varia tanto con le colture allevate quanto soprattutto con la tipologia e la qualità del terreno (Fierer and Jackson, 2006; Girvan et al. 2003; Sessitsch et al., 2001).

- Porosità
- Granulometria
- pH
- Stabilità degli aggregati



Per **struttura del suolo** si intende il modo in cui le sue particelle primarie, cioè sabbia, limo, argilla, si uniscono tra loro in particelle composte denominate **aggregati**.



Indicatori chimici

Sono stati considerati i seguenti parametri, il cui elenco non è da considerarsi esaustivo:

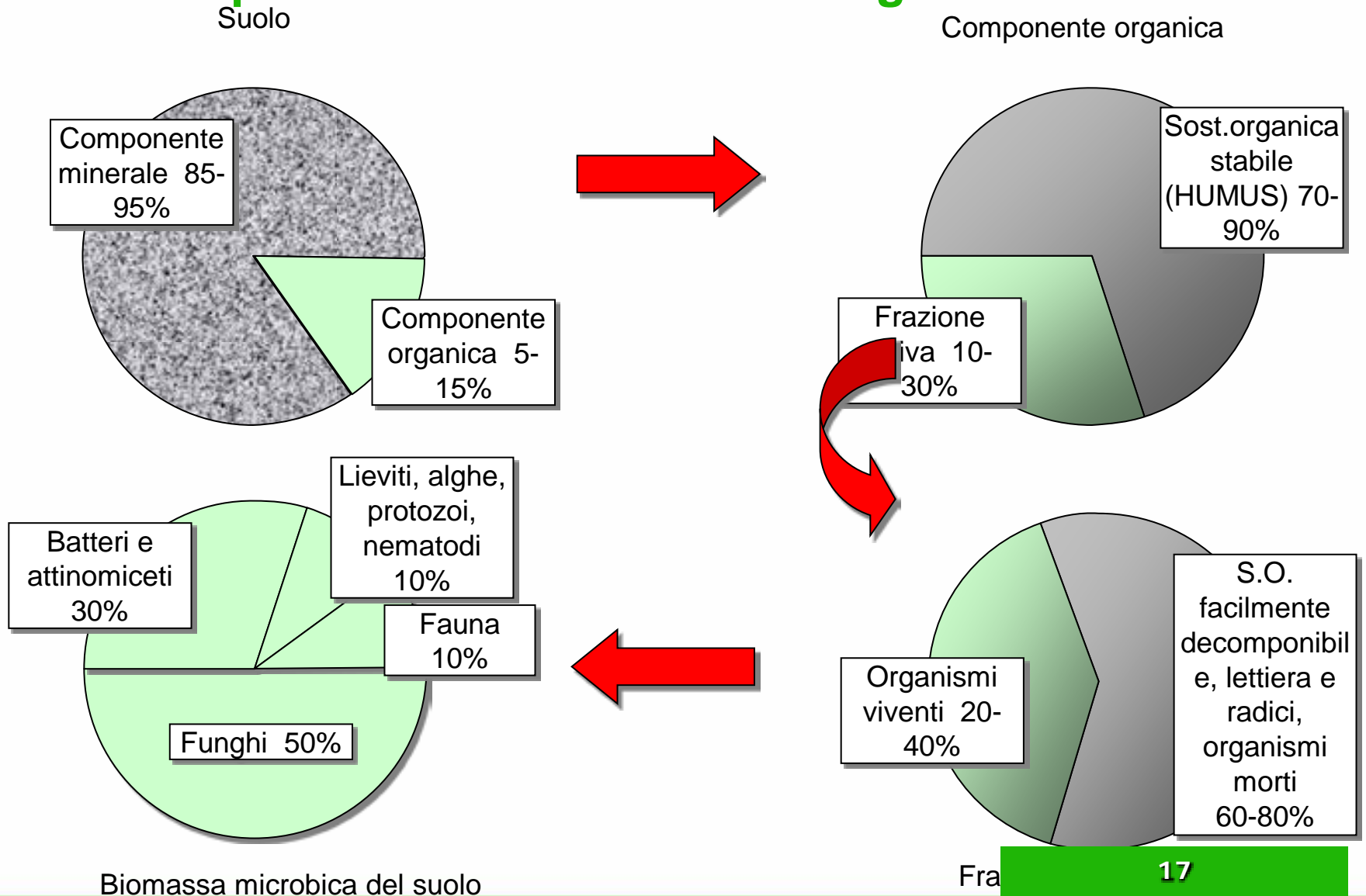
- C organico totale e N totale
- C delle frazioni umica e fulvica
- Parametri dell'umificazione (grado, tasso ed indice di umificazione)
- Azoto totale e rapporto C/N
- Sostanza organica (S.O.)

Il contenuto di S.O. nel suolo, infatti, è un potenziale indicatore ambientale in quanto si correla con numerosi aspetti della produttività e sostenibilità degli agroecosistemi e della conservazione ambientale (Smith et al., 2000). La sostanza organica influenza non solo le proprietà chimiche e biologiche del suolo, ma anche quelle fisiche.

Inoltre alla sostanza organica vengono attribuite attività fisiologiche da parte di alcune molecole organiche, in particolare le sostanze umiche, che modificano direttamente il metabolismo dei microrganismi e delle piante.



Composizione della sostanza organica del suolo



Tipi di sostanza organica

La sostanza organica include residui di piante, di animali e di microrganismi, ai vari stadi di decomposizione, e sostanze sintetizzate dalla popolazione vivente del terreno.

La frazione organica è quindi costituita:

- 1) dalle biomasse vegetali, animali e microbiche;
- 2) dalle necromasse integre o in fase di demolizione delle strutture cellulari;
- 3) da molecole semplici che si liberano dalle biomasse o dalle necromasse;
- 4) da molecole umiche che si originano dalle unità organiche più semplici per effetto di una serie di reazioni biochimiche.

Quando la sostanza organica è molto ben decomposta costituisce **l'humus**, un materiale di colore bruno scuro, poroso, di consistenza spugnosa.

Le quantità di sostanza organica ed umica presenti nel terreno dipendono non solo dalle quantità e qualità dei residui e dei concimi organici che pervengono al suolo, ma anche dalla velocità e dal tipo di processi di **mineralizzazione** ed **umificazione** a cui tali residui sono sottoposti.

Proprietà della sostanza organica

Proprietà	Osservazioni	Effetti nel suolo
Colore	Il tipico colore scuro di molti suoli è determinato dalla sostanza organica	Facilita il riscaldamento
Ritenzione idrica	La sostanza organica può trattenere 20 volte il suo peso in acqua	Aiuta a prevenire l'essiccamento. Migliora il trattenimento dell'acqua nei suoli sabbiosi
Combinazione con i minerali argillosi	Cementa le particelle del suolo in unità strutturali chiamate aggregati	Permette lo scambio dei gas. Stabilizza la struttura. Incrementa la permeabilità
Chelazione	Forma complessi stabili con Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ed altri cationi bivalenti	Accresce la disponibilità dei micronutrienti per le piante superiori
Solubilità in acqua	L'insolubilità della sostanza organica in acqua è dovuta alla sua associazione con le argille; inoltre i cationi bivalenti e trivalenti associati con la sostanza organica ne aumentano l'insolubilità in acqua	La sostanza organica può accumularsi nel suolo (carbon sink) e costituire una riserva di nutrienti
Azione tampone	Presenta azione tampone in range di pH leggermente acidi, basici e neutri	Aiuta a mantenere una reazione uniforme nel suolo
Scambio cationico	L'acidità totale delle frazioni isolate di humus varia da 300 a 1400 cmoli/kg	Incrementa la capacità di scambio cationico del suolo. La sostanza organica provoca l'aumento del 20-70% della CSC di molti suoli
Mineralizzazione	La decomposizione della sostanza organica produce CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-}	Fonte di nutrienti per la crescita delle piante
Si combina con gli xenobiotici	Influenza la biodegradabilità, la persistenza e la bioattività dei pesticidi	Modifica il tasso di applicazione dei pesticidi

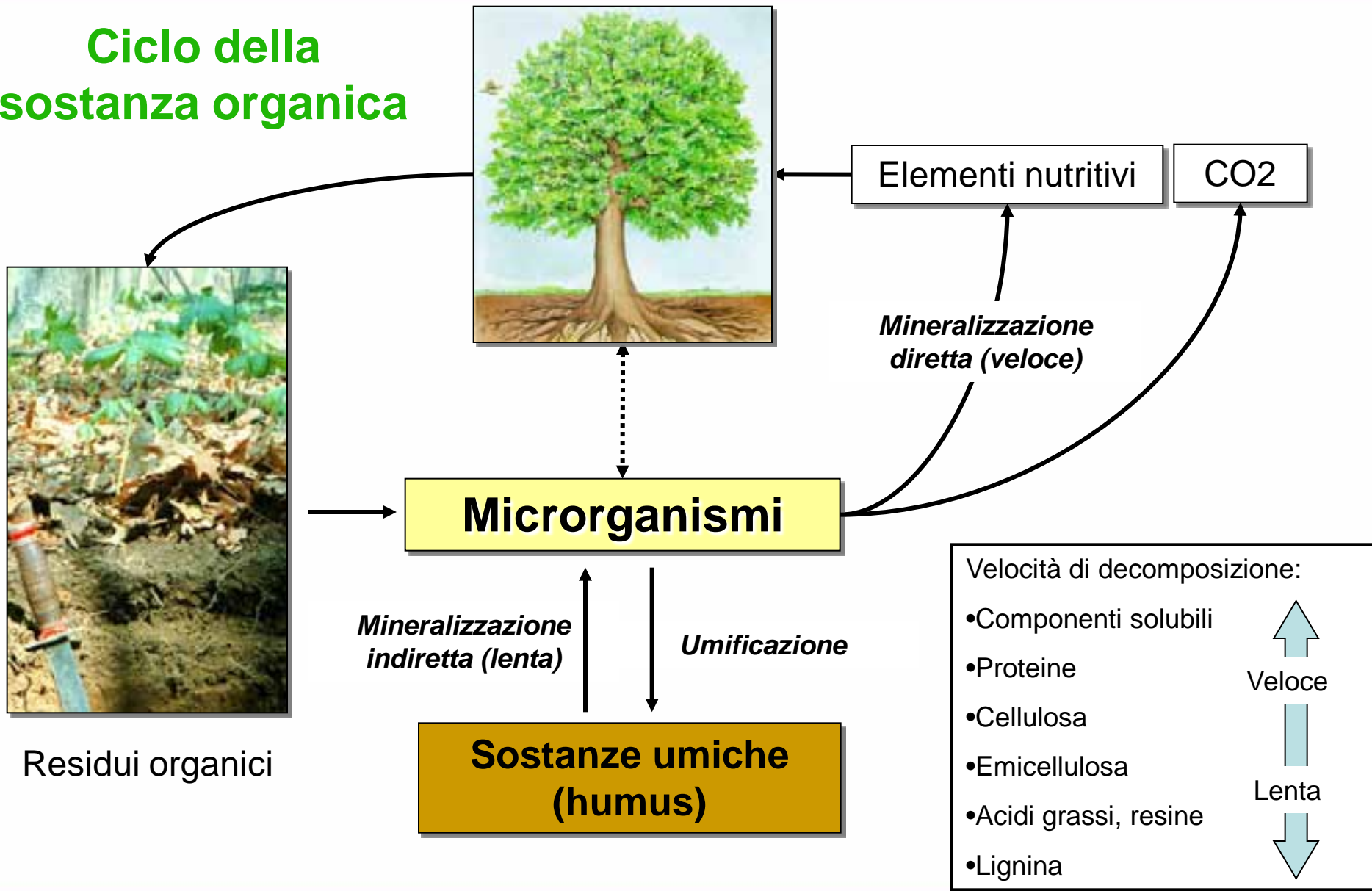
Mineralizzazione della sostanza organica

La **mineralizzazione** indica la conversione dei nutrienti da forme organiche a inorganiche; tale processo include numerose reazioni ed il passaggio a numerosi prodotti intermedi. L'intensità dei processi di mineralizzazione non è uniforme nel suolo: infatti è maggiormente evidente in prossimità delle radici (rizosfera) dove l'attività dei microrganismi, stimolati dagli essudati organici radicali, permette il rilascio di azoto, fosforo e zolfo. La mineralizzazione della sostanza organica è comunque influenzata da vari fattori:

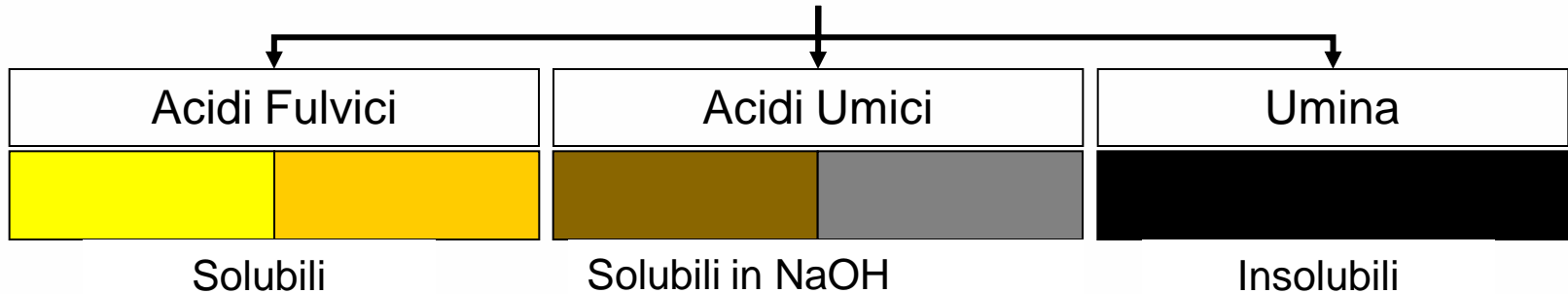
- *Temperatura*
- *Disponibilità di ossigeno e umidità*
- *pH*
- *Sostanze nutritive inorganiche*

La sostanza organica è la principale fonte di energia e di nutrienti per microrganismi del suolo e per l'attivazione dei loro processi vitali. Con la respirazione il carbonio organico ritorna nell'atmosfera, sotto forma di anidride carbonica. Attraverso il processo di umificazione il carbonio invece permane nel terreno, sotto forma di molecole umiche.

Ciclo della sostanza organica



Sostanze umiche del suolo



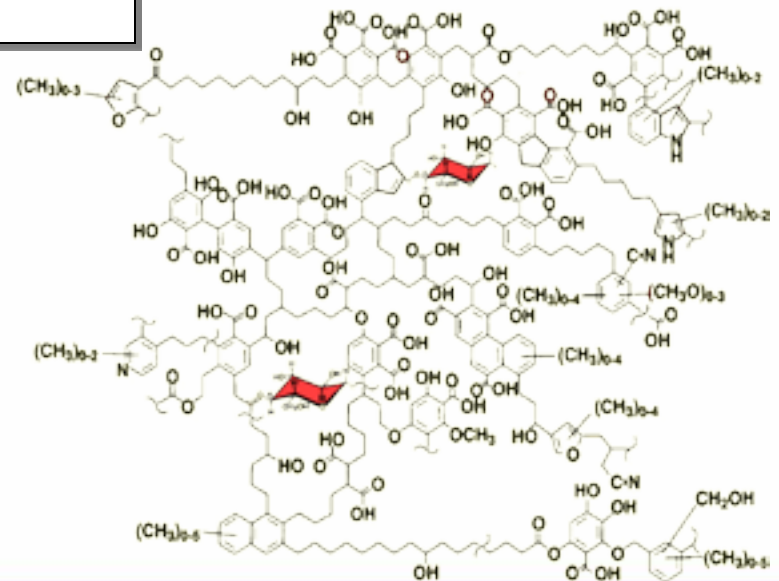
Insolubili in acido (pH<2)

-Grado di polimerizzazione
-Peso molecolare
-Contenuto in C
-Intensità del colore

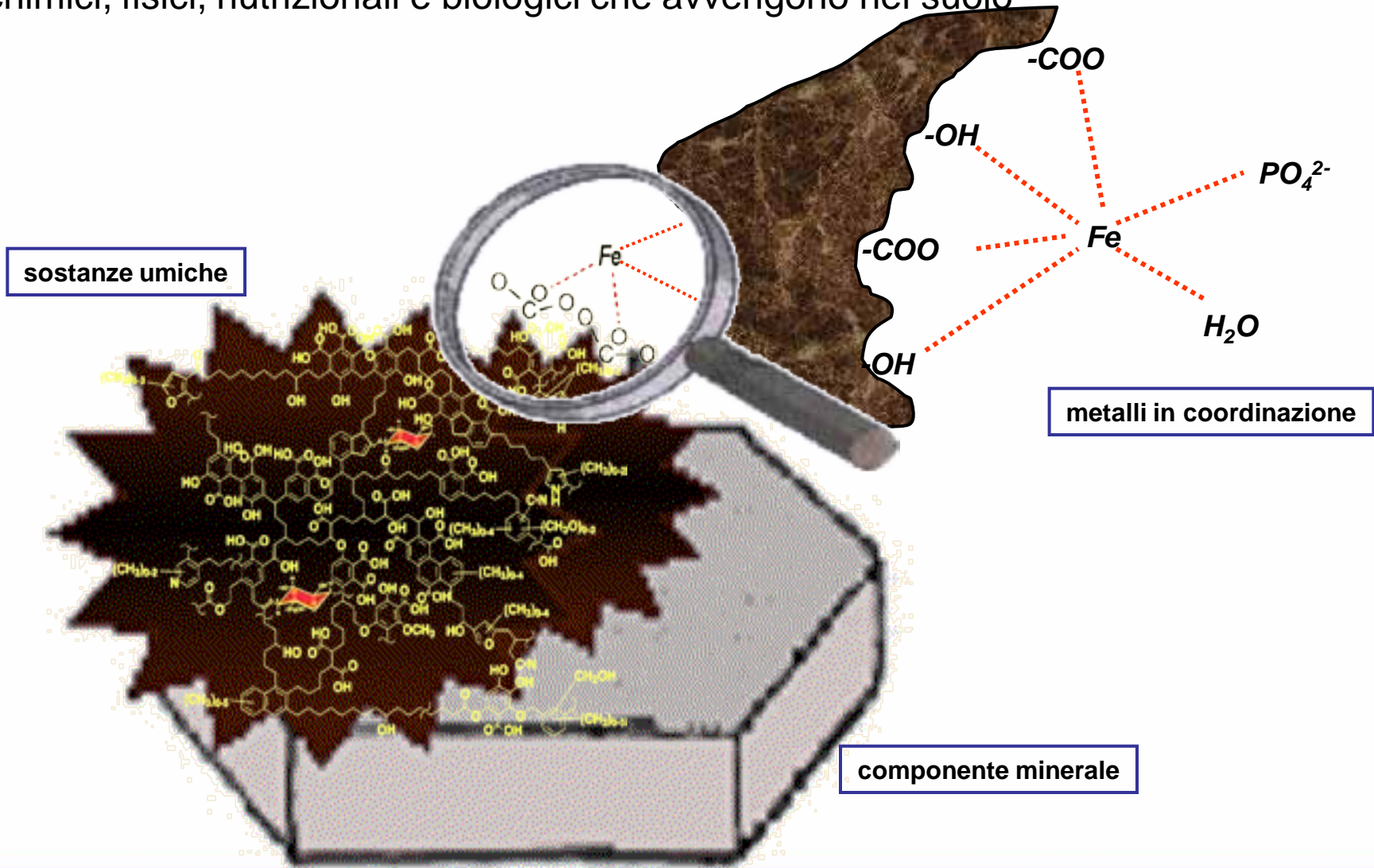
Sono sostanze formate da reazioni secondarie di sintesi e presentano alto peso molecolare di colore dal giallo al nero

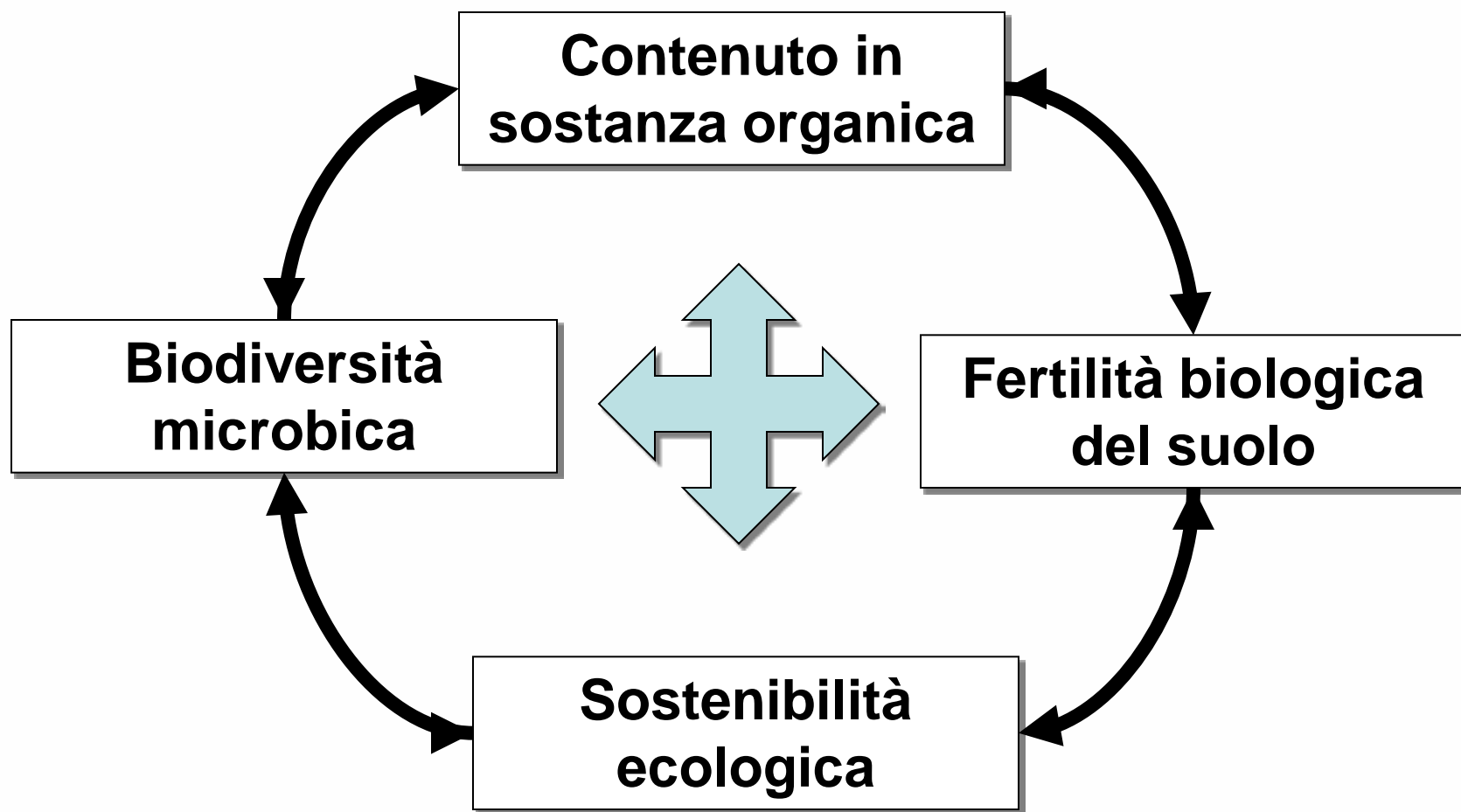
Contengono gruppi funzionali ricchi in O:

- COOH
- OH fenoli e enolici
- OH alcolici
- C=O chinonici



Le sostanze umiche formano aggregati con le componenti minerali (complessi organo-minerali) e rivestono un ruolo importante nello svolgimento dei processi chimici, fisici, nutrizionali e biologici che avvengono nel suolo





Protocollo operativo

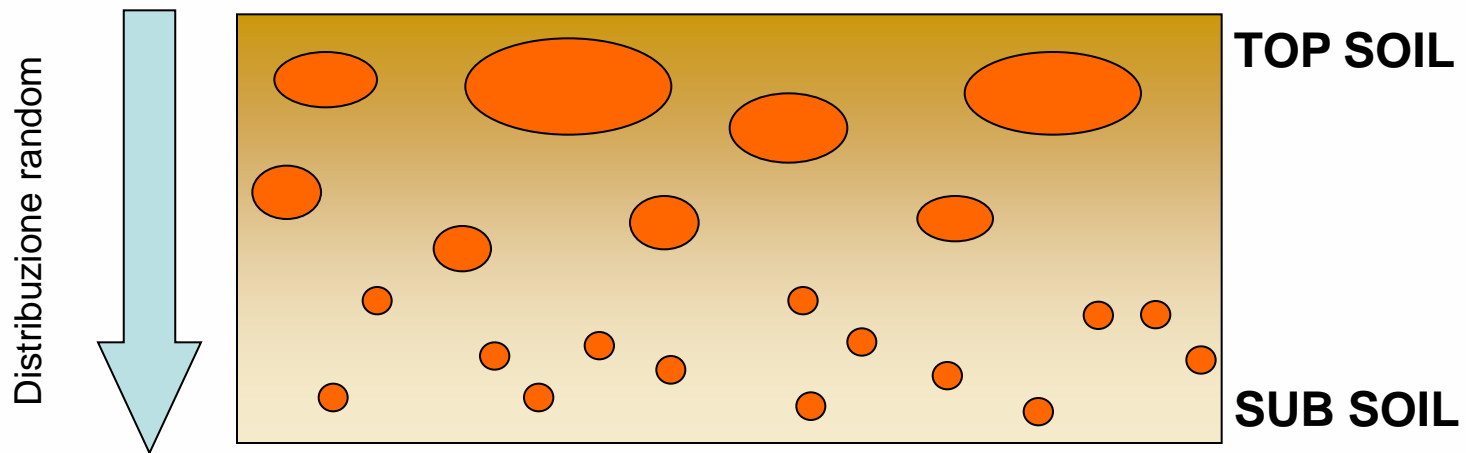
- Valutazione dell'omogeneità del territorio
- Campionamento
- Trattamento campione
- Analisi
- Trattamento dei risultati

Quali metodi utilizzare?

I	II	III	IV
Biomassa e carica microbica del suolo	Attività microbica del suolo	Diversità microbica nel suolo e struttura della comunità	Relazioni pianta-microrganismi
Tecniche di fumigazione con cloroformio -Respirazione indotta da substrato -ATP -Conte dirette	-Respirazione del suolo -Mineralizzazione dell'azoto -Nitrificazione -Incorporazione di timidina e leucina -Test ecotossicologici	-Metodi molecolari -Profili di utilizzo di substrati (CLPP) -Phospholipid Fatty Acids (PFLA) -Profilo di attività enzimatica	-Micorrize -Fissazione N ₂ -Capacità repressive -Microrganismi associativi

Distribuzione dei batteri nel suolo

- L'**80%** dei batteri del suolo vive nei micropori degli aggregati di suolo che, evidentemente, garantiscono condizioni più favorevoli alla crescita microbica (*Ranjard and Richaume, 2001*)
- Tendono a vivere in “**hot spots**” che si distribuiscono in modo random crescente via via che si procede in profondità nel bulk soil (*Nunan et al., 2002*)



- Tendono a vivere attaccati alle superfici: più piccole esse sono e maggiore è la diversità microbica e viceversa. Inoltre le dimensioni delle particelle hanno un impatto sulla diversità e la struttura delle comunità microbiche più evidente di quanto non facciano pH e sostanza organica (*Sessitsch et al., 2001*)

Studio della diversità microbica del suolo

Il problema n.1: meno dell'1% dei batteri presenti nel suolo sono coltivabili in vitro!

Sono disponibili numerosi metodi indipendenti dalla “coltivabilità” microbica che permettono di esplorare anche microrganismi numericamente o ecologicamente importanti ma NON coltivabili:



Es) **Riassociazione DNA-DNA** (ha mostrato che le dimensioni del genoma delle comunità microbiche sono pari a 6.000-10.000 genomi di *E.Coli* in suoli naturali e a 300-1.500 genomi in suoli agrari o contaminati da metalli pesanti (*Torsvik et al., 1998; Øvreas, 2000*).

Con i metodi “coltivabili” tradizionali si riescono ad individuare meno di 40 genomi!!

Limitazioni metodologiche e concettuali

- 1) Campionamento
- 2) Carenza di informazioni tassonomiche
- 3) Concetto di “specie batterica” (Torsvik et al., 1998)

Specie: “categoria sistematica che comprende una o più popolazioni di individui con elevato numero di caratteri simili, in grado di accoppiarsi tra loro e di dare una prole feconda.”

OTU (operational taxonomic unit)

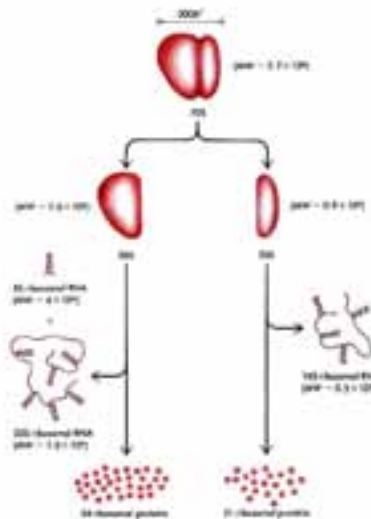
Si usano criteri filogenetici basati sulle sequenze geniche degli “*orologi molecolari*” per suddividere i batteri in gruppi detti TAXA:

Es) 16S rDNA

taxon				
dominio	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Archaea
phylum	Spirochaetes	Firmicutes	Proteobacteria	Euryarchaeota
classe	Spirochaetes	Bacilli	Gamma proteobacteria	Methanomicrobia
ordine	Spirochaetales	Bacilliales	Enterobacteriales	Methanosarcinales
famiglia	Spirochaetaceae	Bacillaceae	Enterobacteriaceae	Meythanosarcinaceae
genere	<i>Spirochaeta</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Metanosaeta</i>
specie	<i>plicatilis</i>	<i>subtilis</i>	<i>coli</i>	<i>concilii</i>

Regno
Divisione
Classe
Ordine
Famiglia
Genere
Specie
Ceppo

L'orologio molecolare 16S rDNA



- Gene lungo ca 1542 nt, dopo la trascrizione assume una particolare struttura secondaria
- Codifica per la subunità piccola del ribosoma procariota (negli eucarioti 18S rRNA)
- È l'orologio molecolare più usato per studiare la filogenesi ed identificare i batteri
- Deve assumere una determinata struttura tridimensionale per assolvere la sua funzione, quindi ha un basso tasso di mutazione (la maggior parte delle mutazioni producono ribosomi non funzionanti e non vengono trasmesse alla progenie)



Nella sequenza del gene 16S rRNA si riconoscono diverse regioni:

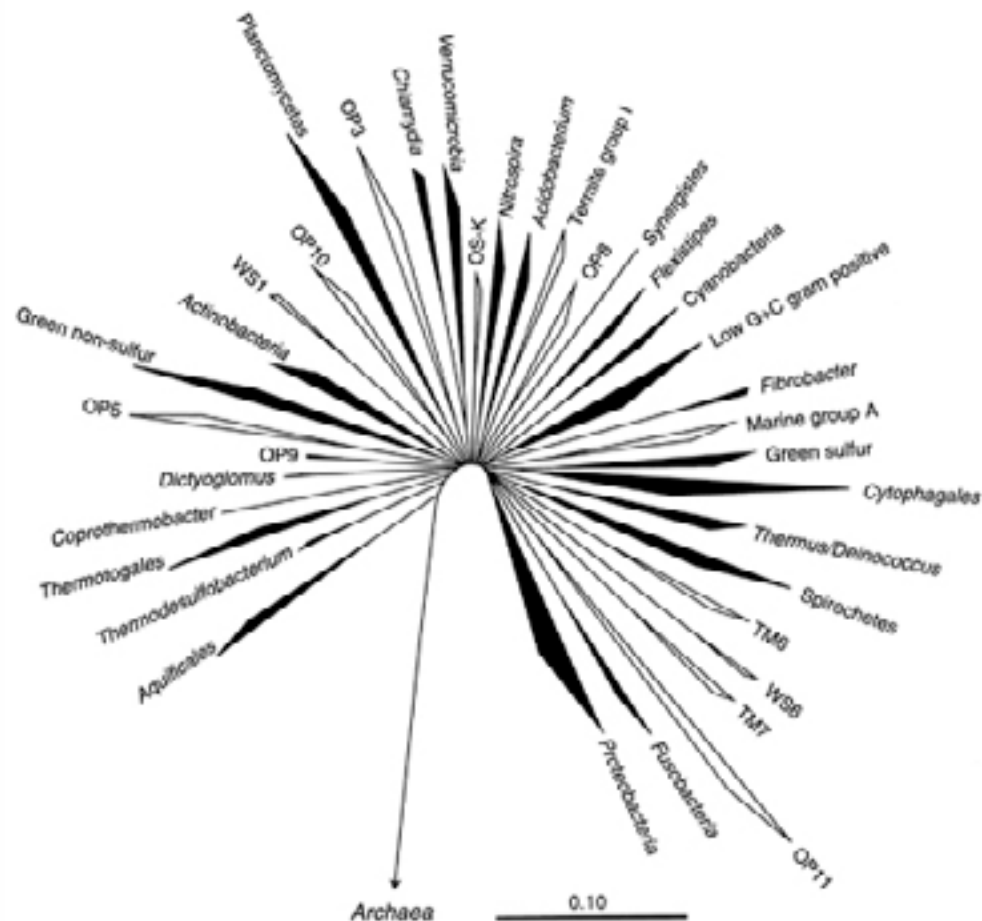
- regioni **CONSERVATE** universali, che hanno la stessa sequenza in tutti i batteri
- regioni **SEMICONSERVATE**, che hanno sequenza uguale tra batteri dello stesso taxon
- regioni **VARIABILI**, che hanno la stessa sequenza tra batteri appartenenti alla stessa specie

Confrontando la sequenza di questo gene di diversi batteri è possibile:

- Quantificarne la **DISTANZA FILOGENETICA**: determinare a che punto dell'evoluzione 2 organismi si sono differenziati
- Determinare la diversità tra gli organismi
- Identificare un batterio: se 2 organismi hanno 16S rRNA con più del 97% delle basi omologhe, appartengono alla stessa specie

Stackebrandt and Goebel, (1994)

The Bacterial Domain



From Hugenholtz *et al.*, J Bacteriology 180:4765-4774

I metodi utilizzati nella tassonomia batterica

Come si studiano?

1) METODI di ISOLAMENTO:

- Striscio su piastra
- Diluizione all'estinzione

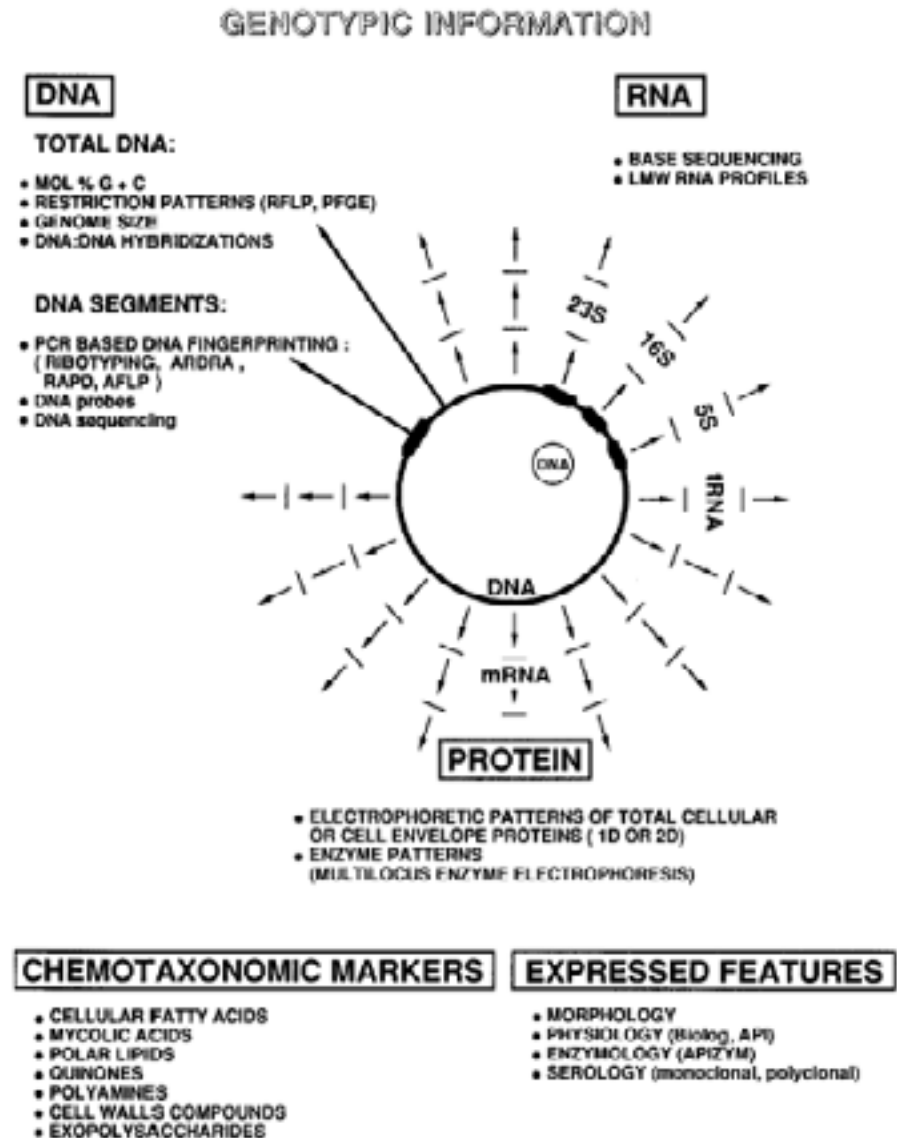
2) METODI di IDENTIFICAZIONE:

a) Fenotipici:

- Morfologia delle colonie
- Colorazione di Gram
- Attività enzimatiche
- Profilo ecofisiologico (Biolog)

b) Genotipici

- Metodi molecolari



PHENOTYPIC INFORMATION

Quali i vantaggi dei metodi molecolari?

VANTAGGI:

- a) Meno dell'1% dei batteri presenti nel suolo è coltivabile in laboratorio (Torsvik et al., 1990a)
- b) In 1g di suolo ci sono 1×10^6 batteri di circa 4000 specie diverse (Torsvik et al., 1990b)

SVANTAGGI:

- a) **Estrazione del DNA/RNA:** l'efficienza di lisi cellulare è variabile (Prosser, 2002). Poiché molti batteri vivono all'interno degli aggregati di suolo (+ protetti), se si utilizza un metodo di lisi blando magari liso i Gram-negativi ma NON i Gram +!! Se uso un metodo troppo drastico lisi entrambi ma danneggio il DNA/RNA (Wintzingerode et al., 1997)
- b) **Scarsa ripetibilità:** metodi diversi hanno rese diverse. Inoltre nel suolo molte sostanze interferiscono o inibiscono la PCR (es. acidi umici), pertanto il DNA (o RNA) deve essere purificato con conseguente bias.
- c) **Ambiguità tassonomiche:** molti gruppi microbici (in particolare funghi micorrizici) hanno un assetto genetico polimorfico ed è possibile trovare regioni ITS o geni 5,8S molto variabili all'interno di una singola spora (Redecker et al., 1999; Dodd et al., 2000)

Come si misura la diversità genetica?

- Richness: numero di specie presenti
- Eveness: distribuzione delle specie
- Composizione: identificazione delle specie



E' IMPOSSIBILE misurare la biodiversità del suolo!

Quella che solitamente viene studiata non è la diversità assoluta, bensì la diversità RELATIVA di comunità microbiche sottoposte a gradienti di stress o di qualsiasi altro tipo di disturbo biotico o abiotico.

Perché? Per 2 motivi:

- 1) Non conosciamo quello che cerchiamo
- 2) Non sappiamo quale sia l'affidabilità e l'efficienza dei metodi disponibili

Metodi molecolari: quali utilizzare?

1) Librerie genomiche dei geni rRNA

2) Sequenziamento dei geni rRNA

3) Microscopici

4) Riassociazione DNA-DNA in combinazione con il contenuto in GC

Cambiamenti nella
struttura microbica
a livello
intraspecifico

Nessuna
informazione su
richness e eveness

5) Fingerprint:

- DGGE/TGGE (Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

- ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

- SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism)

- ARISA (Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

- T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)

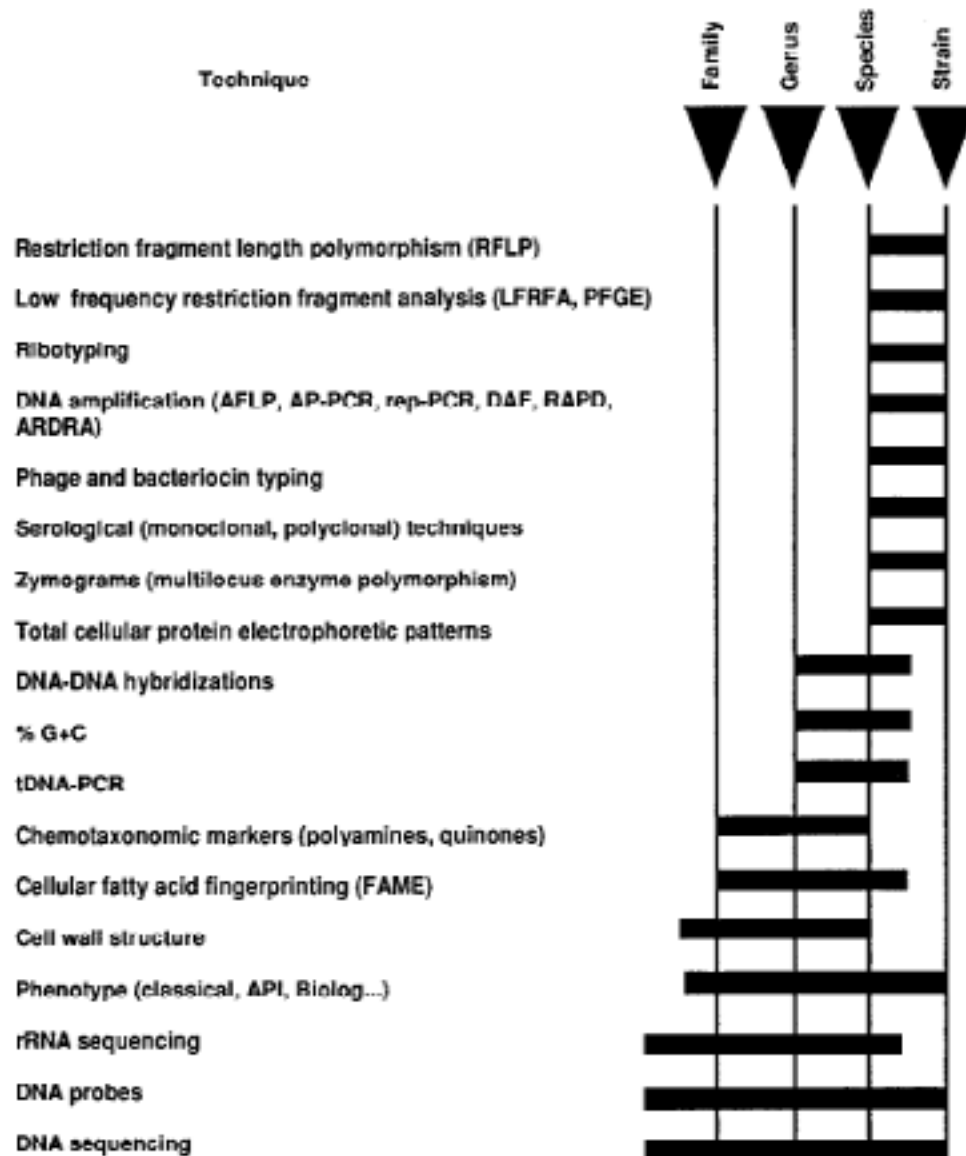
- PLFA (Phospho-Lipid Fatty Acid)

Cambiamenti nella
composizione
tassonomica

Informazioni su
richness e eveness

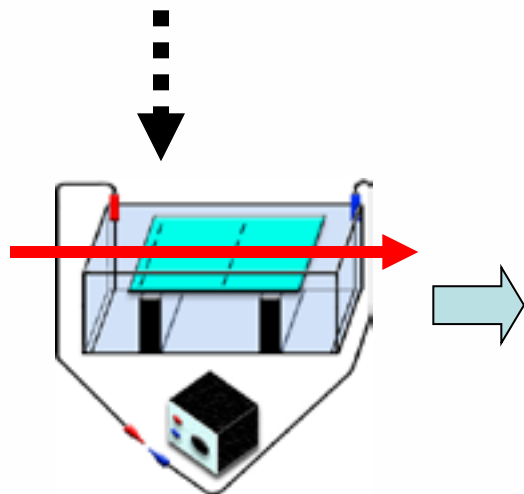


Il livello di risoluzione dei metodi molecolari

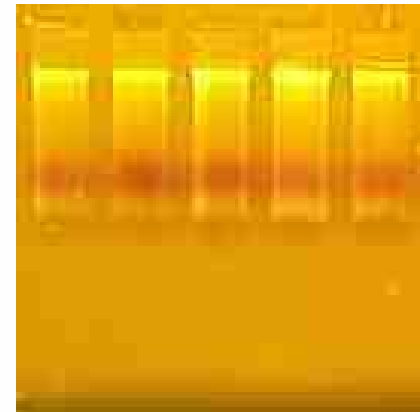


Elettroforesi su gel di agarosio

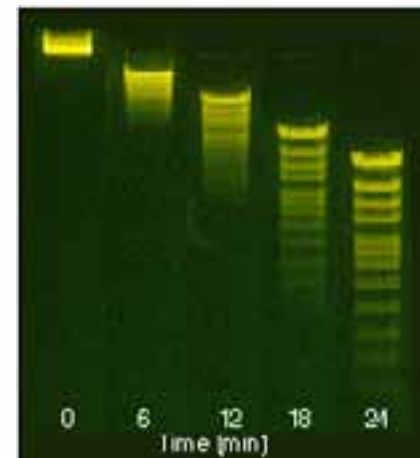
Caricamento
del DNA



DNA genomico



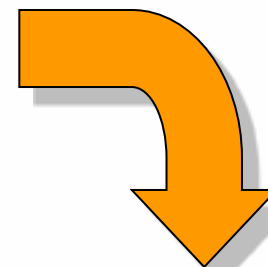
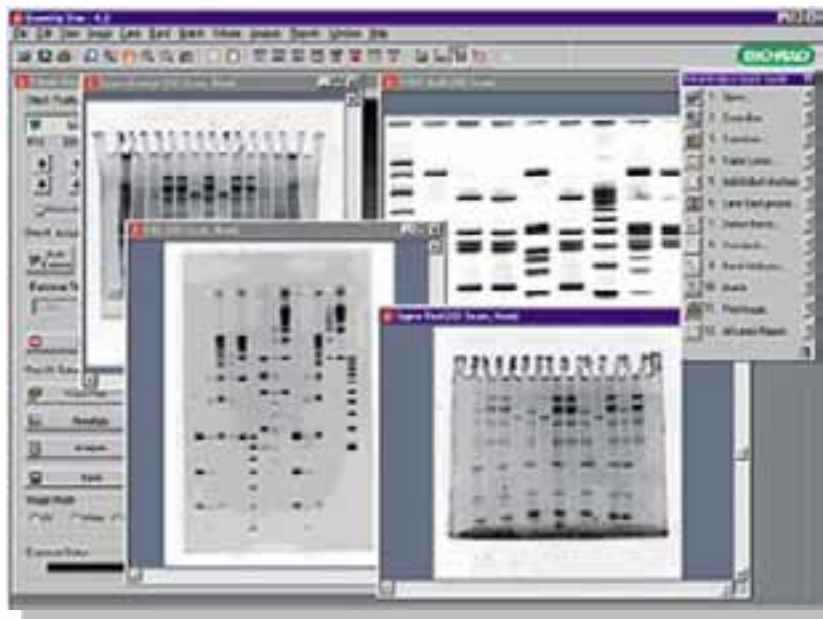
Rottura enzimatica
del DNA



Tecniche di fingerprint

Basati sulla PCR:

- 1) DGGE/TGGE
- 2) T-RFLP
- 3) ARDRA
- 4) SSCP
- 5) ARISA



Two kinds of fingerprints

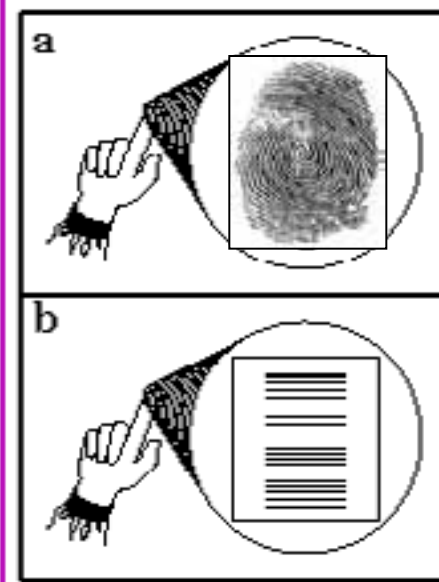


Figure 1.
a) Conventional fingerprint
b) DNA fingerprint

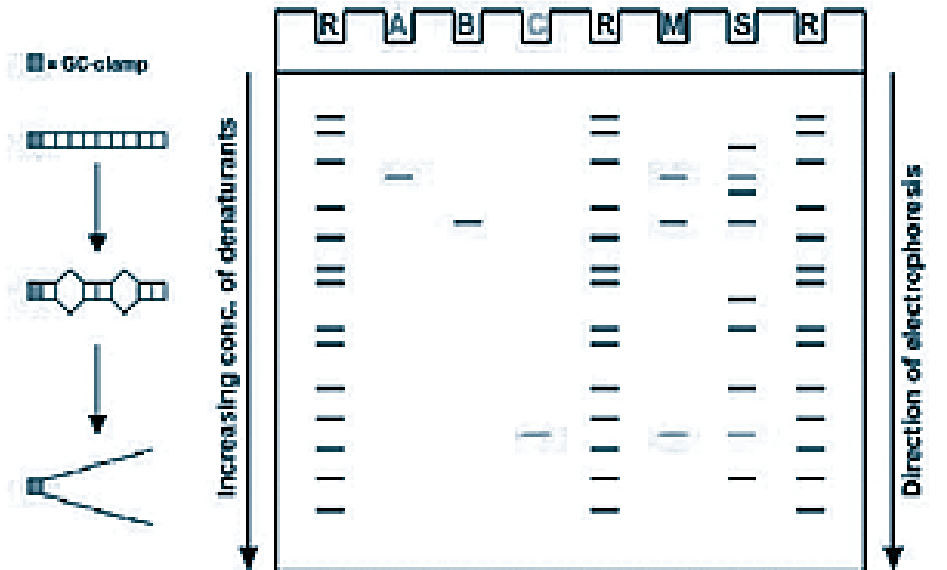
Non basati sulla PCR:

- 1) PLFA
- 2) SDS-PAGE

DGGE/TGGE (Denaturing/Temperature gradient gel electrophoresis)

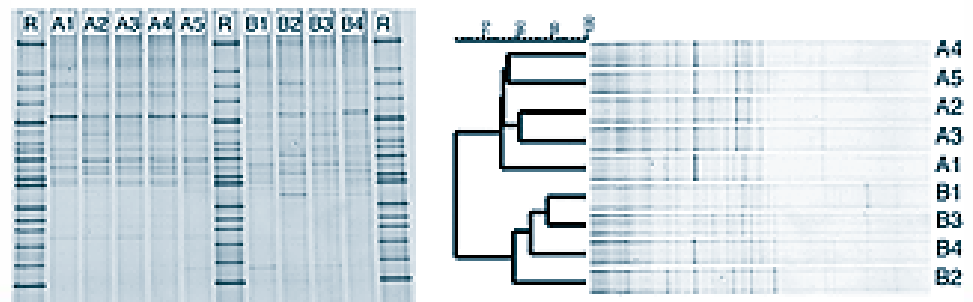
La DGGE si basa sulla separazione di frammenti di DNA amplificati via PCR (con un primer con GC-clamp in 5') parzialmente denaturati con la stessa lunghezza ma con una differente sequenza mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide contenente un gradiente lineare di agenti denaturanti di tipo chimico (urea e di formamide). Rispetto alle altre tecniche molecolari basate sul fingerprinting degli acidi nucleici, la tecnica DGGE offre il vantaggio di fornire una analisi qualitativa (richness) e semiquantitativa (evenness) della comunità microbica.

(Muyzer *et al.*, 1993)

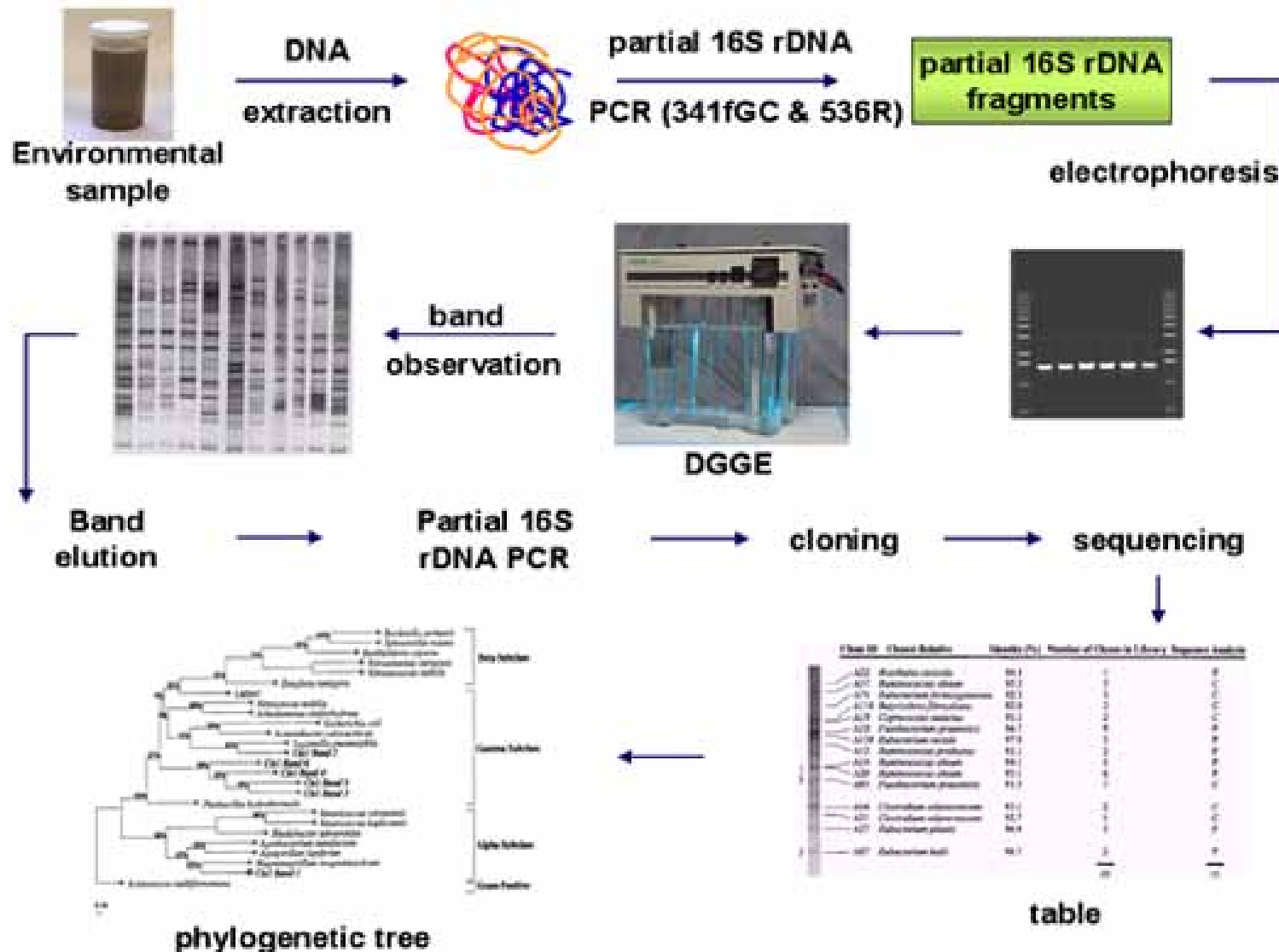


R = Reference pattern, A = Organism 1, B = Organism 2, C = Organism 3, M = Mix of organisms 1, 2 and 3, S = unknown sample

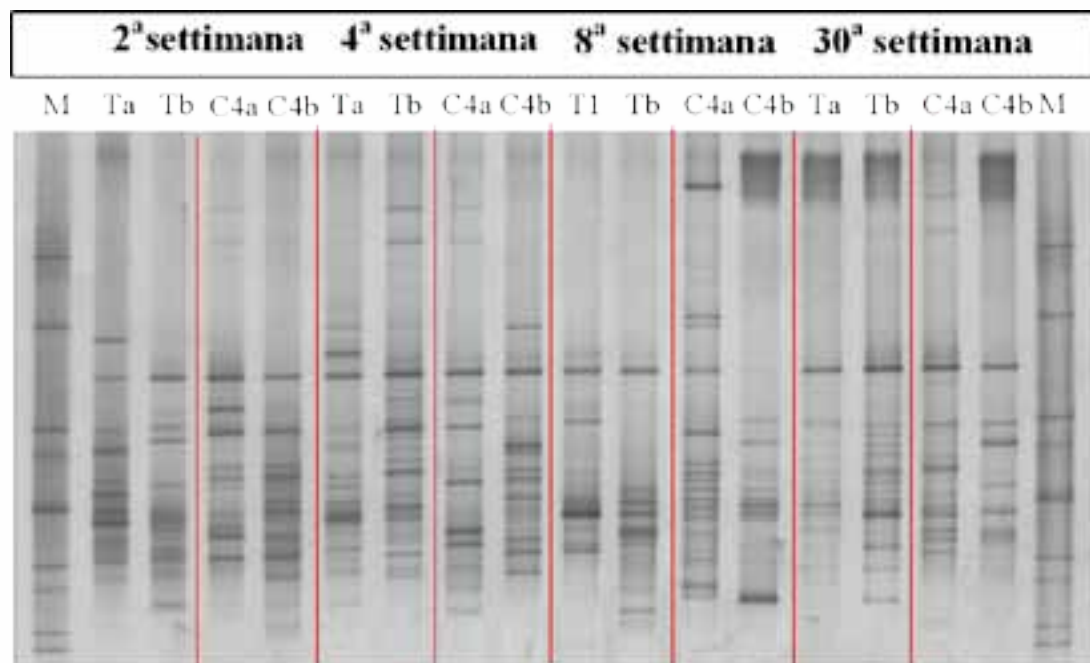
A. Inverted DGGE gel → B. Clustering (numerical analysis)



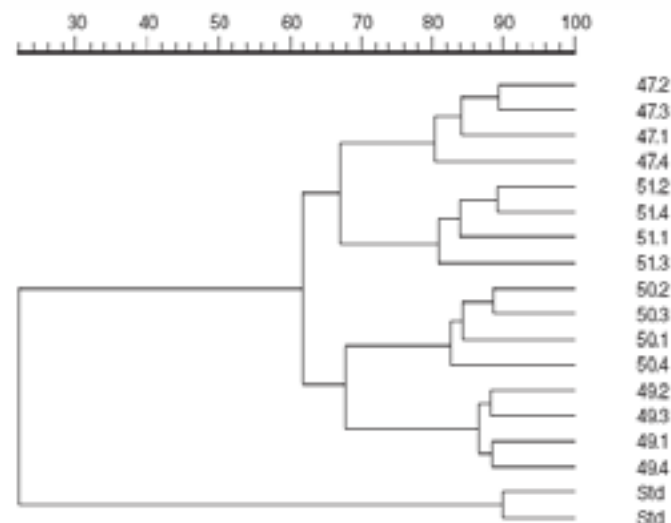
DGGE/TGGE (Denaturing/Temperature gradient gel electrophoresis)



Caso studio



Mocali et al., 2002



Utilizzando il profilo di fingerprint di ogni campione, vengono determinate le somiglianze genetiche delle popolazioni sulla base della presenza/assenza di bande e dell'intensità di ciascuna banda in campioni diversi mediante l'uso di software (GelCompare II). Si ottiene una matrice che contiene valori di somiglianza che viene utilizzata per costruire il dendrogramma della cluster analysis secondo la UPGMA (unweighted-pair group method).

Gerarchie di indicatori

Non esistono veri e propri indici, intesi nel senso comune del termine, ma dei parametri che, se ben integrati, riescono a fornire indicazioni precise sul grado di fertilità biologica del suolo e sulla biodiversità ad essa associata. La caratterizzazione della diversità microbica di un suolo, e della sua biodiversità in genere, va perciò costruita per livelli di approssimazione.

Le analisi da condurre sono state suddivise in 4 livelli, sulla base del grado di approfondimento dell'informazione cercata:

I° livello	Analisi chimico-fisiche e biologiche di base
II° livello	Estrazione e analisi fingerprinting del DNA totale dal suolo
III° livello	Caratterizzazione tassonomica del singolo microrganismo
IV° livello	Monitoraggio spazio-temporale

Indicatori di I° livello

Il **primo livello** di conoscenza dovrà basarsi sulla caratterizzazione di base del suolo in termini fisici, chimici e biologici. In quest'ultimo caso sarà molto utile definire in primo luogo la fertilità biologica del suolo come parametro routinario, veloce e sintetico. Dovranno essere determinati parametri quali la tessitura, il pH, la capacità idrica di campo, il contenuto in N totale, C organico totale e sostanza organica.

Sarà, inoltre, indispensabile determinare la respirazione microbica e il suo contenuto in biomassa totale. In questo modo sarà possibile determinare un indice di fertilità biologica (IBF), direttamente correlato con il grado di biodiversità e sostenibilità del suolo.

Indicatori I° livello selezionati

- Caratterizzazione chimico-fisica di base
- C organico totale (TOC)
- Respirazione microbica (C_{bas} , C_0)
- Biomassa microbica (C_{mic})
- Quoziente metabolico (qCO_2)
- Quoziente di mineralizzazione (qM)
- **Indice sintetico di fertilità biologica (IBF)**

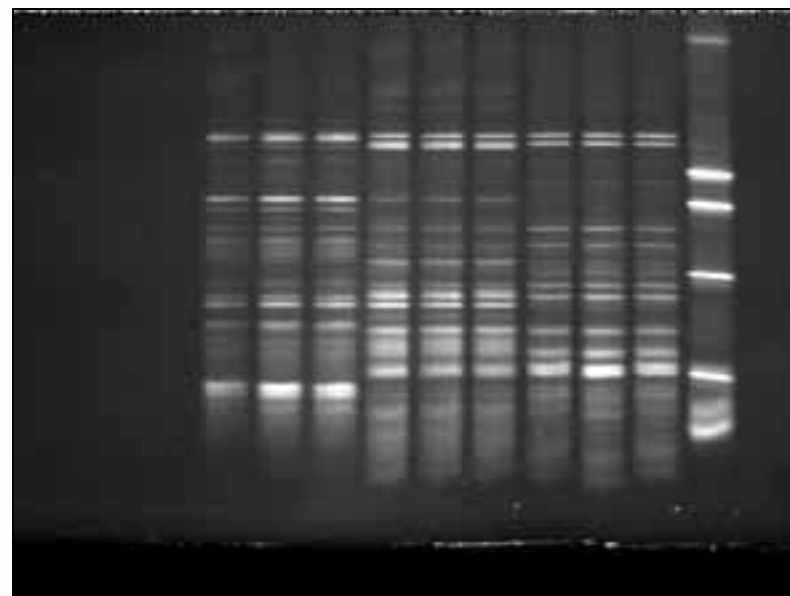
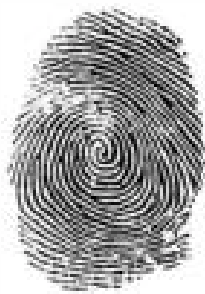
Indicatori di II° livello

Se necessario sarà poi consigliabile procedere, per il **secondo livello** di approfondimento, alla caratterizzazione della diversità genetica, ma anche in questo caso sarà fondamentale disporre di dati complessivi ottenuti secondo procedure standardizzate da correlare con le caratteristiche ambientali, gestionali ed evolutive del sito in esame. Si procede con l'estrazione degli acidi nucleici (in particolare il DNA) dal suolo e si prosegue con le opportune tecniche molecolari di *fingerprinting* come, ad esempio, l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) o la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Indicatori di II° livello selezionati

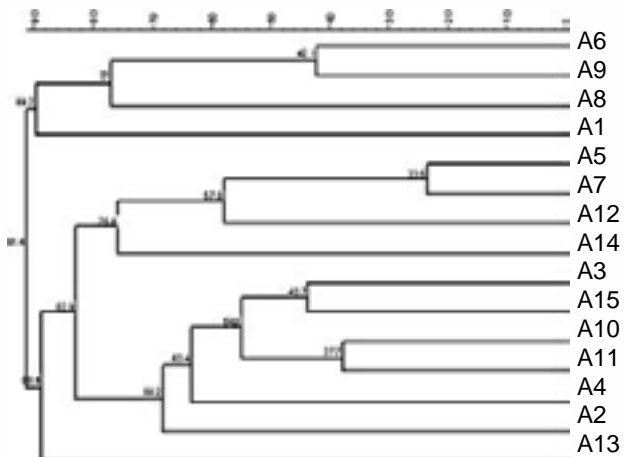
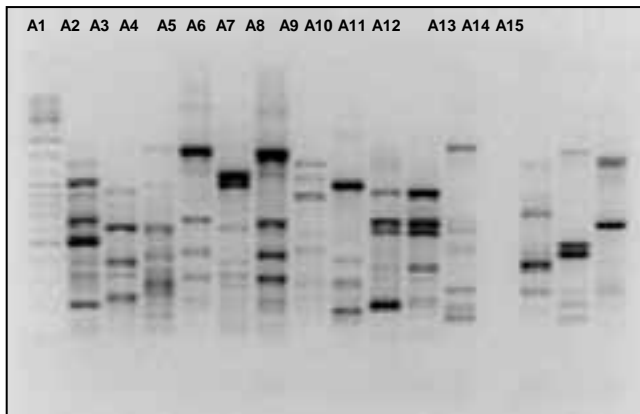
Metodi molecolari:

- Estrazione del DNA totale al suolo
- ARDRA (coltivabili)
- DGGE (non coltivabili)

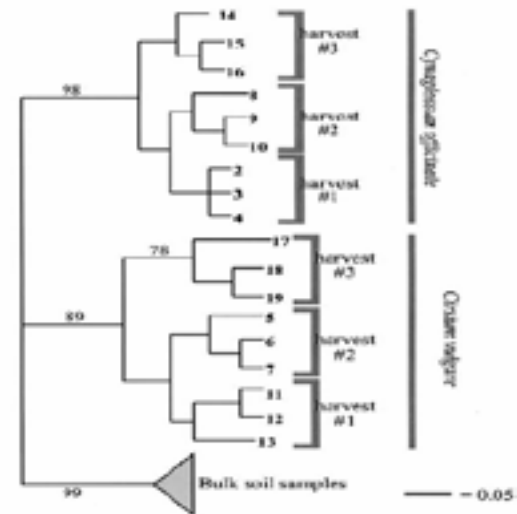
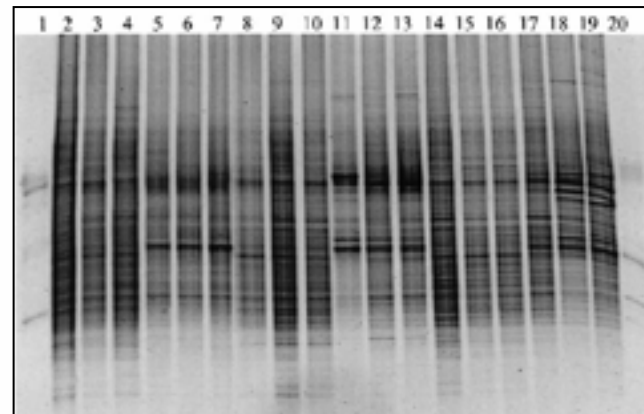


Indicatori di II° livello

Analisi ARDRA

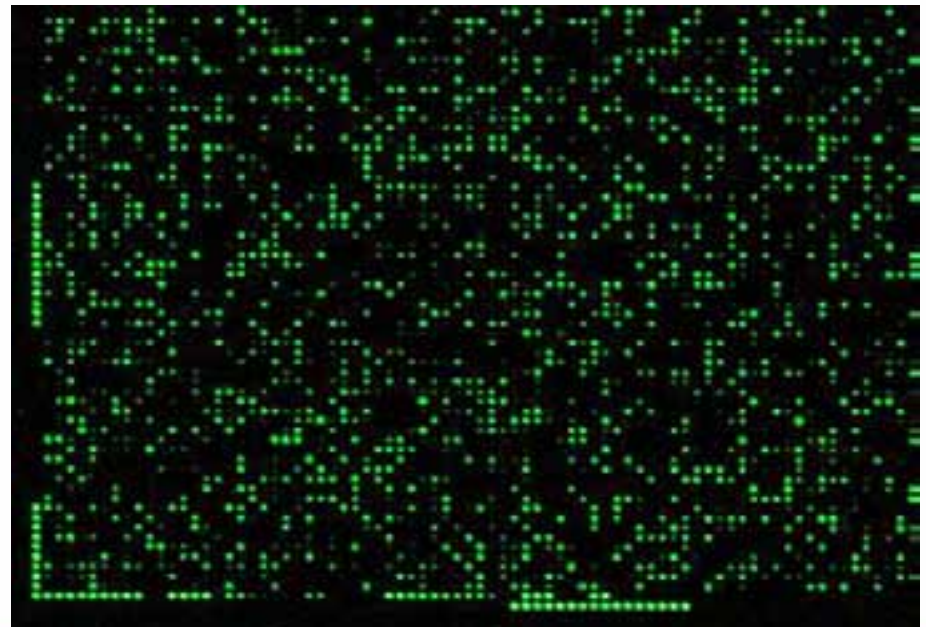
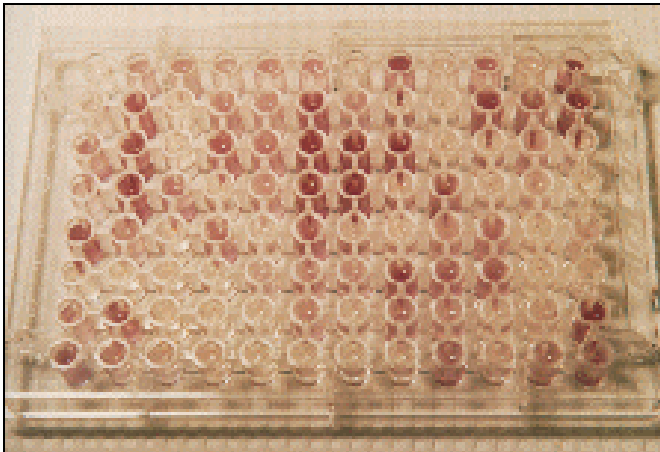


Analisi DGGE



Indicatori III° livello selezionati

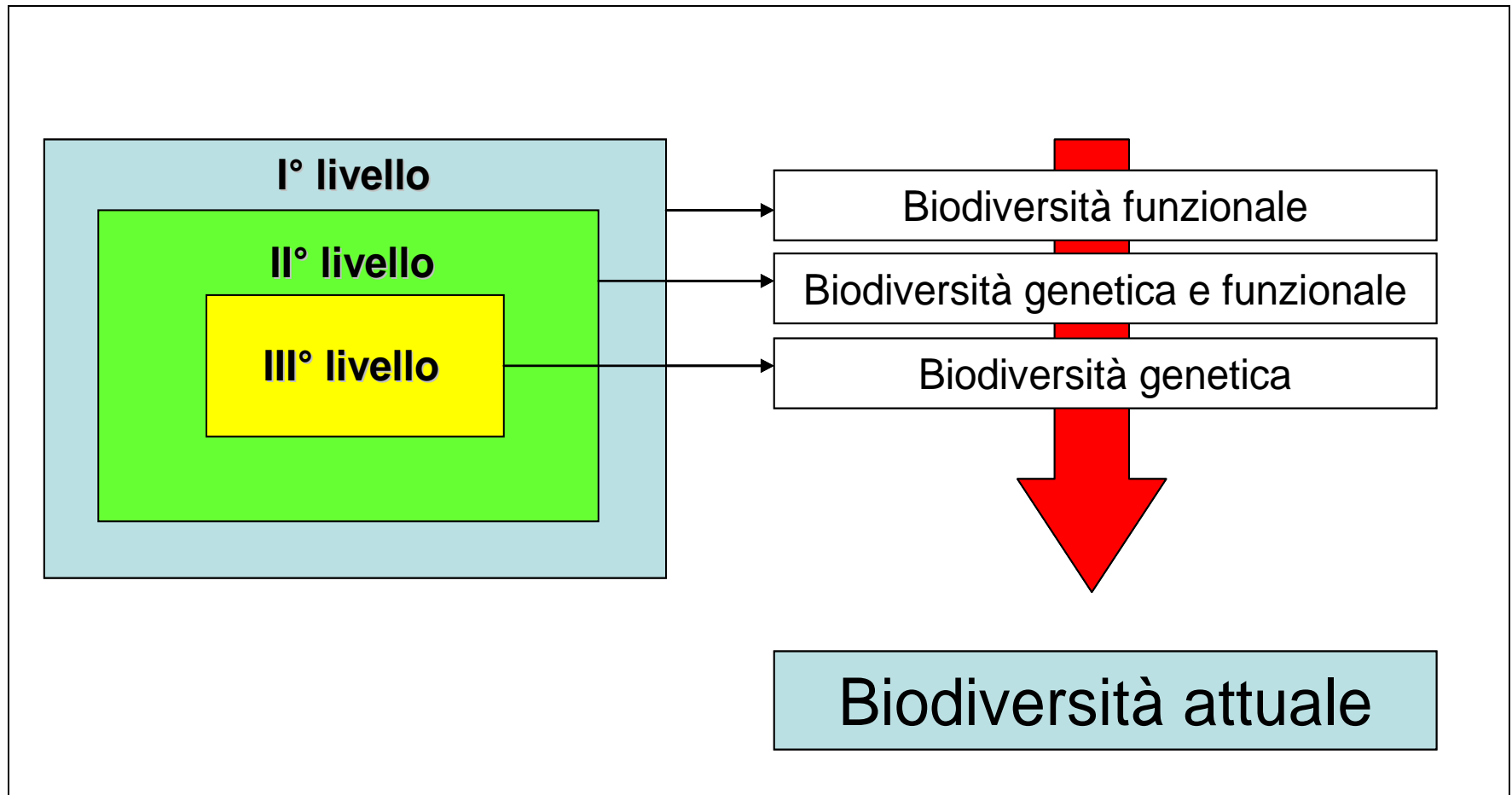
- Biolog
- Sequenziamento DNA
- Microarray



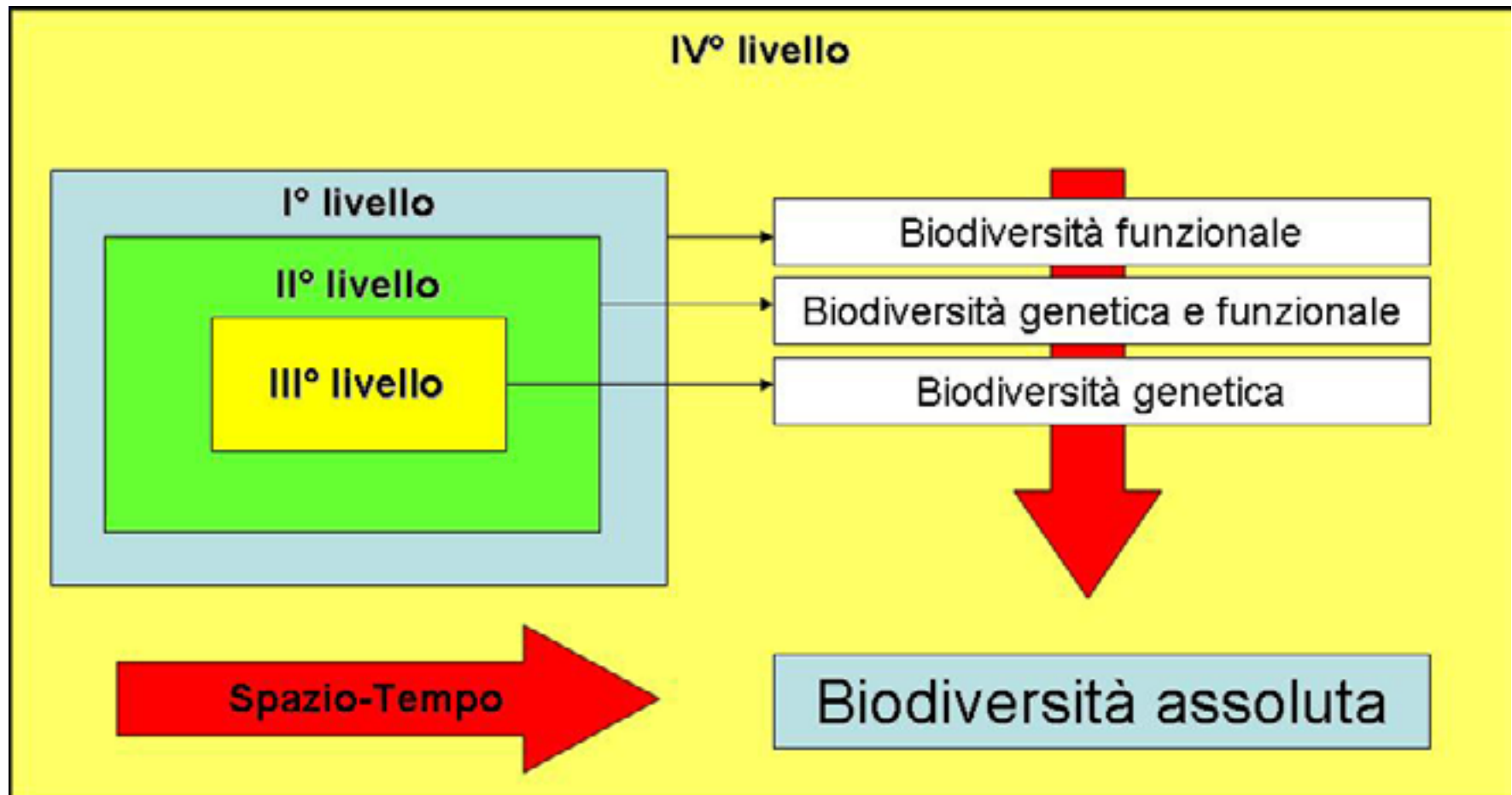
Indicatori IV° livello

Infine nel **quarto livello** di intervento si passerà dalla definizione di “*diversità attuale*”, che corrisponde all’osservazione analitica del momento, alla definizione di “*diversità assoluta*”, intendendo con questa, la dotazione in termini sia di ricchezza che di abbondanza di specie con le relative funzioni di un determinato sito costante nel tempo. Sarà questa la biodiversità di quel suolo. A tale definizione si giungerà solo nel tempo dopo un lungo periodo di monitoraggio spazio-temporale conseguito con l’applicazione delle procedure sopraelencate.

Biodiversità attuale ed assoluta



Biodiversità attuale ed assoluta



Indicatori più utilizzati

- Indicatori di I° livello:

- 1) Caratterizzazione chimico-fisica di base
- 2) Respirazione microbica
- 3) Determinazione della biomassa microbica
- 4) Calcolo dei quozienti microbici e del IBF

- Indicatori di II° livello:

- 1) Metodi molecolari

Si ricorda che per ciascun indicatore, in realtà, non esistono valori ottimali validi per TUTTI i suoli ma possono variare molto in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche naturali del suolo, delle condizioni pedo-climatiche del sito, dalla gestione colturale dell'azienda, ecc. Per questo è fondamentale utilizzare la scheda di campagna e contestualizzare caso per caso i dati ottenuti

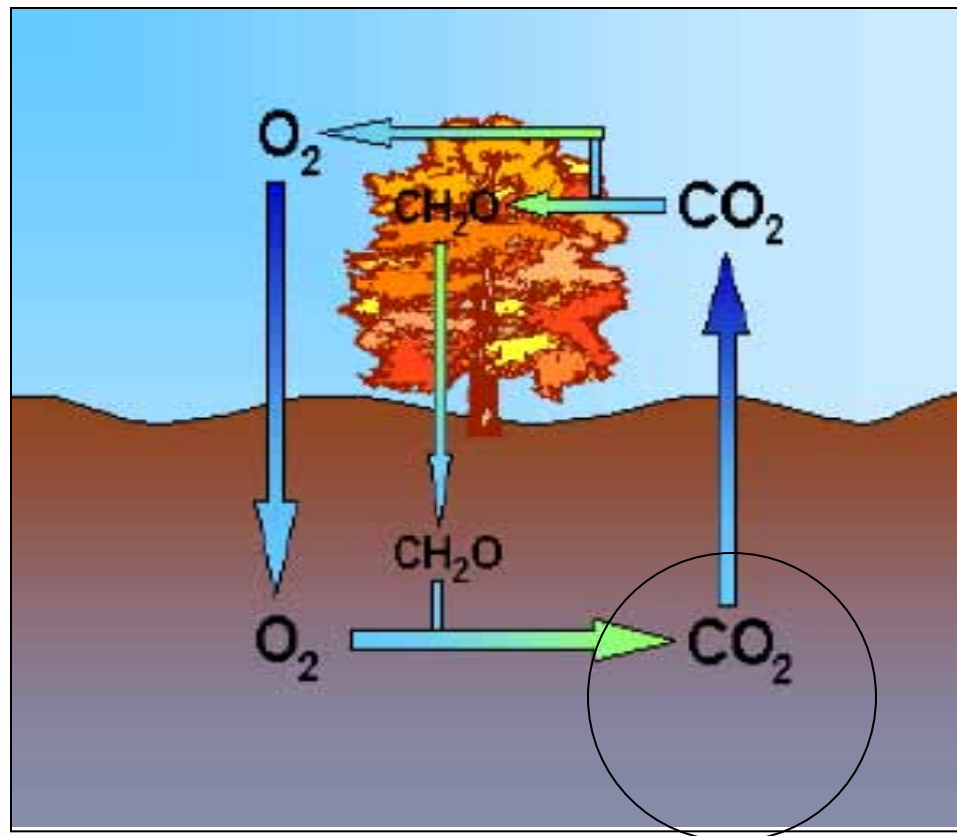
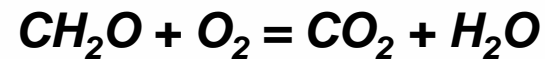
Respirazione microbica

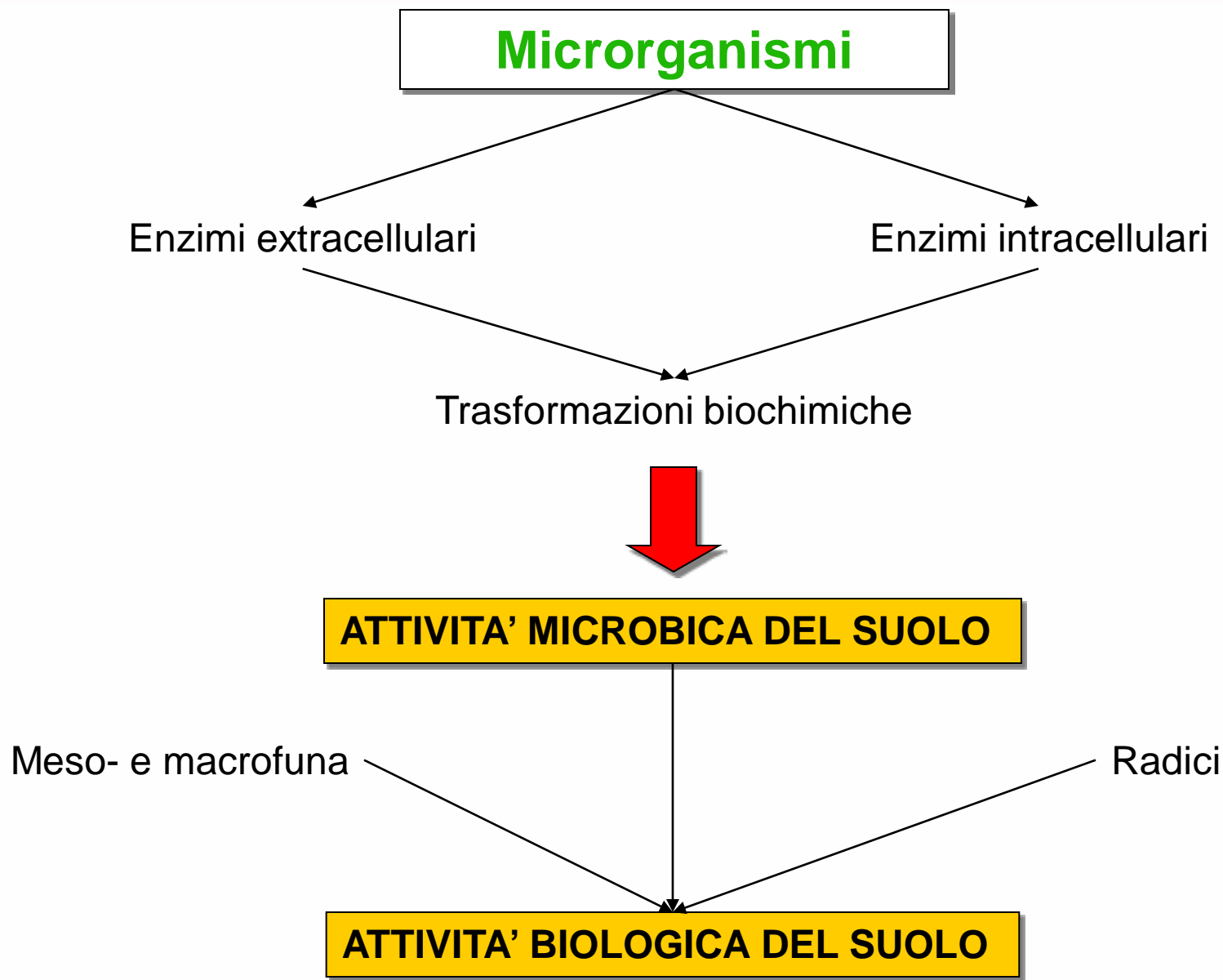
1. Il processo più strettamente associato alla “vita”. La respirazione sia aerobica che anaerobica, produce energia a partire da composti organici ed inorganici ridotti che fungono da donatori primari di elettroni mentre composti ossidati servono da accettori terminali di elettroni. L'energia contenuta nei composti ridotti si sposta attraverso una catena di reazioni redox a cascata facenti parte di importanti vie metaboliche quali la glicolisi, il ciclo di Krebs e la catena di trasporto degli elettroni.
2. La respirazione può essere anche definita come il consumo di O_2 o il rilascio di CO_2 da parte di entità viventi e metabolizzanti (*J. P. Anderson 1982*). Nell'ecosistema suolo però è frequente la produzione abiotica di CO_2 (rilascio dai carbonati) e la respirazione in ambienti anaerobici che usa come accettori di e^- NO_3^- o SO_4^{2-} .
3. Si definisce “respirazione basale” la respirazione determinata in assenza di un substrato organico aggiunto. La respirazione basale si origina dal turnover della sostanza organica nativa e riflette sia la quantità che la qualità delle fonti di carbonio disponibili.

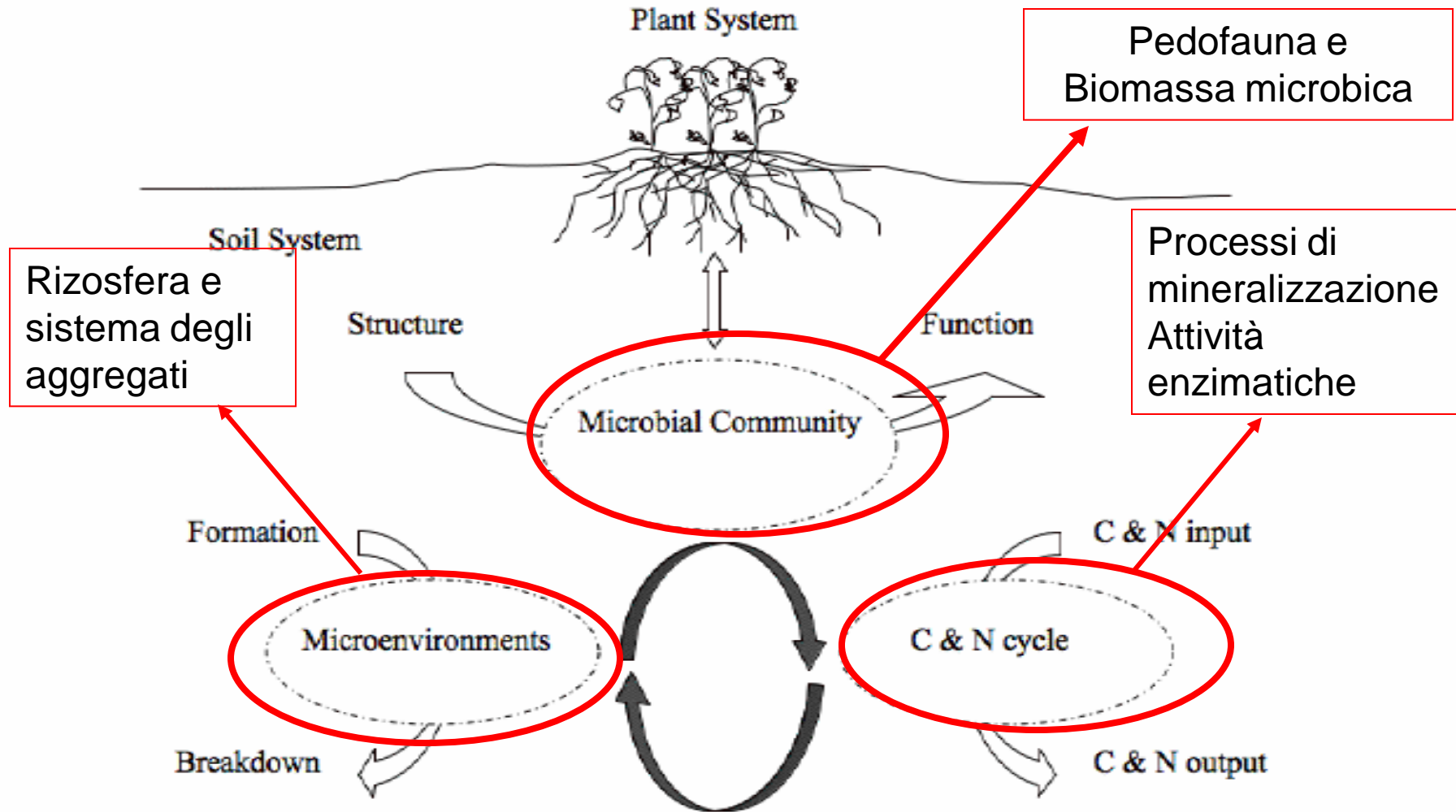
Indica pertanto il potenziale dei microrganismi del suolo di degradare la sostanza organica nelle condizioni ambientali stabilite.

Respirazione del suolo

Microrganismi + radici + fauna
consumano O_2 e producono CO_2







Importanza della stima della respirazione del suolo:

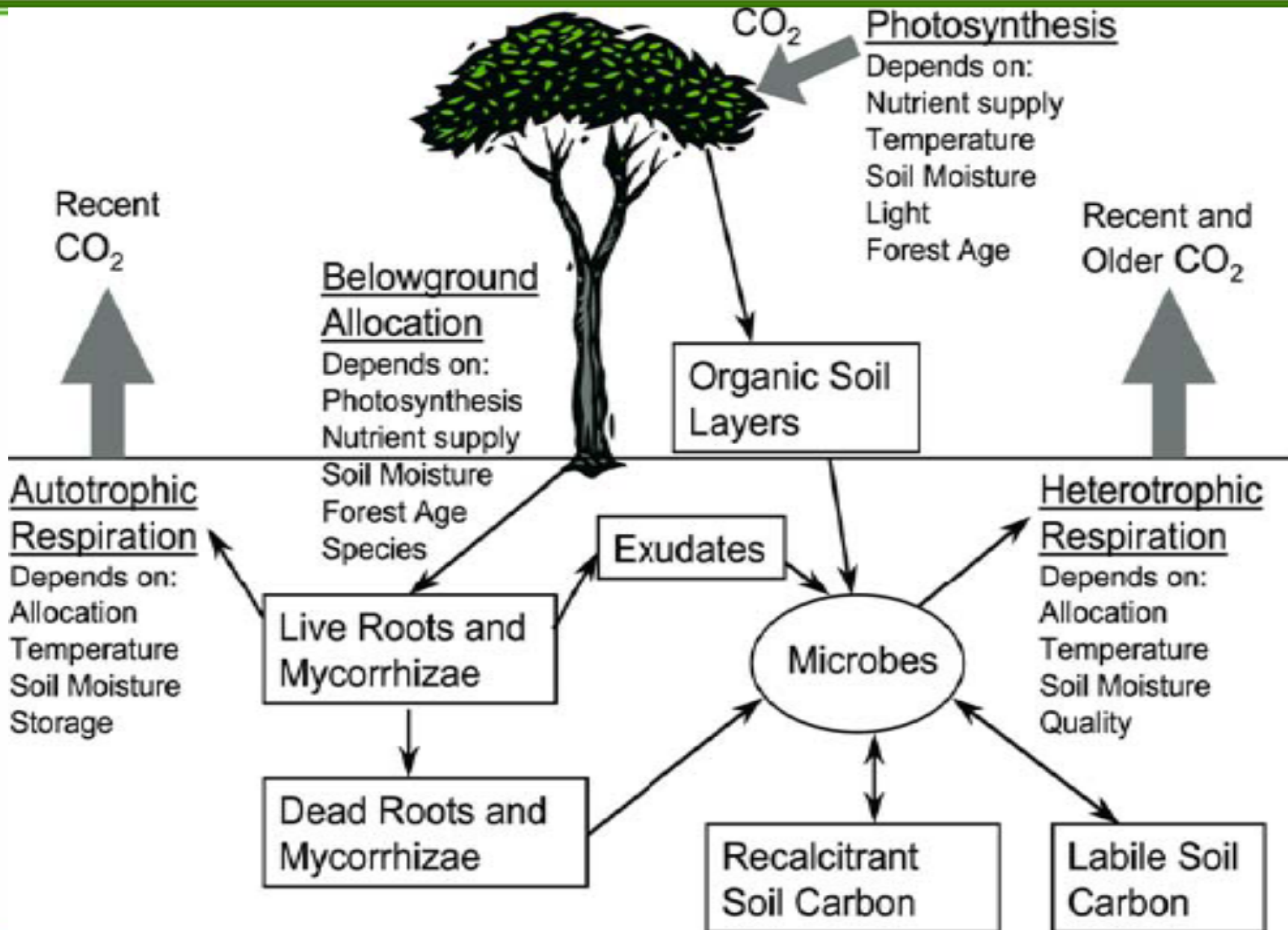
1. Evidenziare il ruolo del suolo nel contribuire all'aumento della [CO₂] atmosferica e della temperatura media globale
2. Stimare il flusso di C tra pedosfera e atmosfera
3. Valutare in che modo i diversi usi del suolo contribuiscono alle emissioni di CO₂
4. Determinare l'attività biologica di un suolo e quindi valutare la capacità di rifornire le piante di elementi nutritivi (la mineralizzazione della sostanza organica libera nutrienti in forma inorganica).
5. Approfondire le conoscenze sulla attività metabolica della microflora e sua diversità funzionale.

**Approccio di studio
ecologico-ecosistemico**

**Approccio di studio
biochimico-microbiologico
ed ecofisiologico**

Fonti biogeniche di CO₂ dal suolo (Kuzyakov, 2006)

1. Decomposizione microbica della sostanza organica in suolo non rizosferico spesso identificata come “respirazione basale”
2. Decomposizione microbica della sostanza organica indotta dalla presenza di prodotti radicali o residui vegetali (*priming effect*)
3. Decomposizione microbica di residui vegetali in disfacimento
4. Decomposizione microbica delle rizodeposizioni rilasciate dalle radici vive spesso identificata come “respirazione rizomicrobica”
5. Respirazione radicale



Metodi analitici



Condizioni reali

- Fluttuazioni di umidità e temperatura
- Struttura del suolo integra
- Distribuzione disomogenea substrati
- Utile per la stima dei flussi di C.
- Risultato espresso per unità di superficie

Condizioni potenziali

- Umidità e temperatura costanti ed ottimali
- Struttura del suolo distrutta
- Distribuzione omogenea substrati
- Utile per valutare l'attività microbica, discriminare tra gruppi di organismi diversi, testare diversi substrati
- Risultati per unità di peso o volume

Respirazione del suolo – Misura in laboratorio

(Alef, 1995; Grego et al., 2004)



Suolo +
NaOH 1N

NaOH 1N

Incubazione a 25°C
per 24 h (fino a 30
giorni)



Titolazione della
NaOH residua
con HCl 0.1N



Respirazione del suolo – modello cinetico

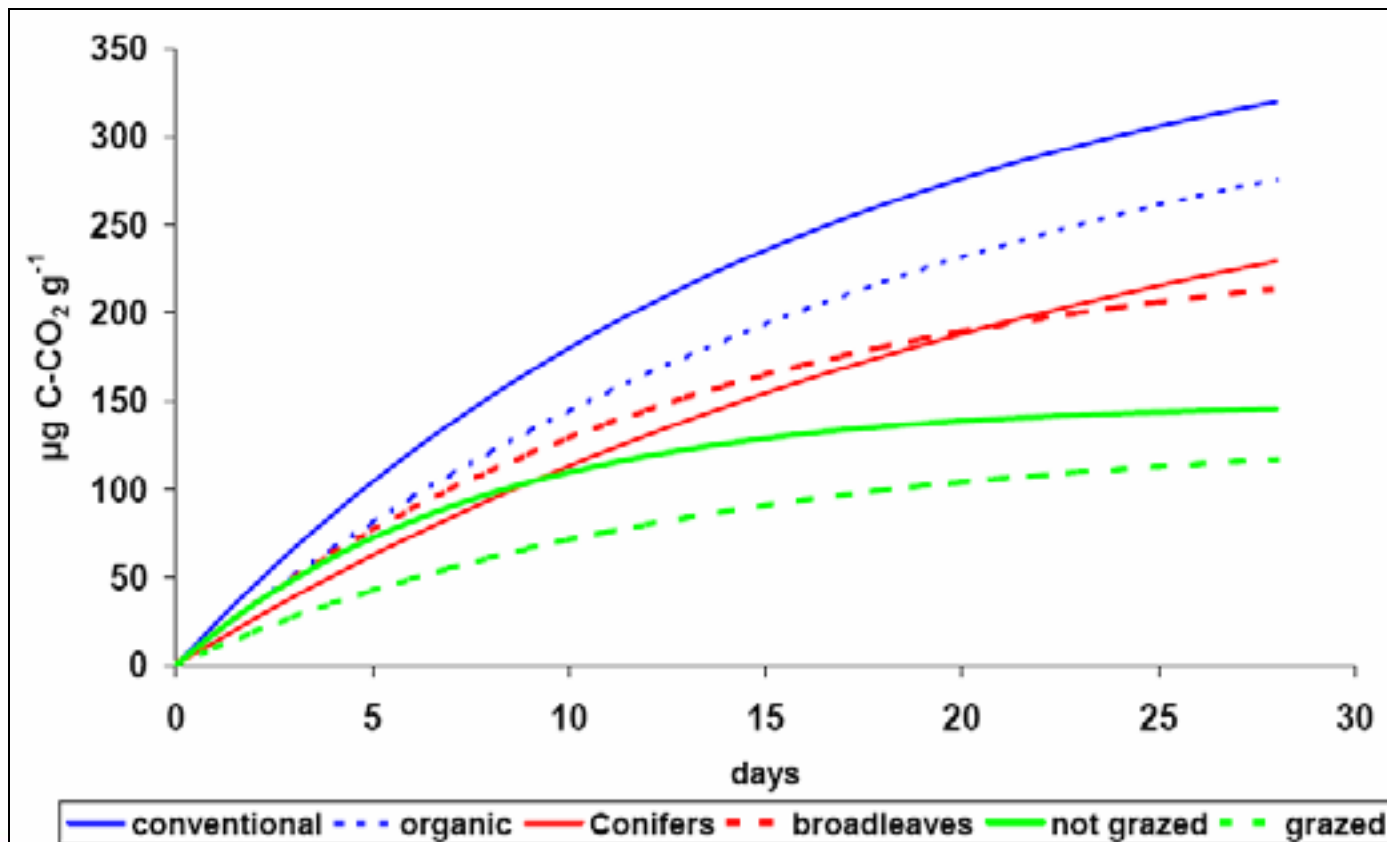
(Riffaldi et al., 1996)

$$C_m = C_0 (1 - e^{-kt})$$

C_m = C mineralizzato in 28 gg

C_0 = C potenzialmente mineralizzabile

K = tasso di crescita



Biomassa microbica

DEFINIZIONE: “Componente vivente della sostanza organica ad esclusione della macrofauna e delle radici (dim.< 5000 μm^3) 1-5% (w/w) del C organico totale” (*Jenkinson & Ladd, 1981*)

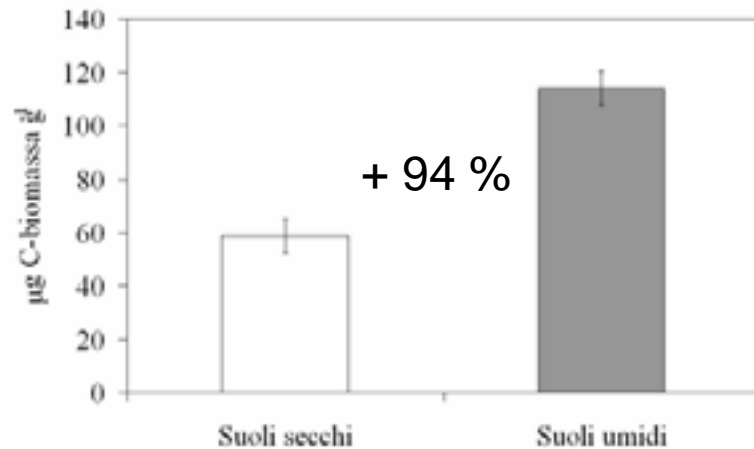
I metodi classici per quantificare la biomassa microbica (microscopia diretta e a contrasto di fase, conta su piastra, ecc.) in genere forniscono stime non attendibili (1-10% del totale con la conta su piastra, nessuna discriminazione tra microrganismi vivi e morti, laboriosità, tempi lunghi e soggettività con la conta diretta). Di qui si è imposta la necessità di ricercare metodi più riproducibili e di più facile uso per una stima attendibile della biomassa microbica.

METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA MICROBICA

Metodi	Informazioni	Bibliografia
FE	Dimensioni della biomassa microbica e rapporto degli elementi (C/N, C/P, C/S).	<i>Vance et al., 1987</i>
SIR	Contenuto di biomassa microbica attiva (misura indiretta).	<i>Anderson and Domsch, 1978</i>
FI	Contenuto di C-biomassa microbica	<i>Jenkinson and Powlson, 1976</i>
ATP	Stima della biomassa microbica attiva	<i>Jenkinson and Oades, 1979</i>
PLFA	Biomassa totale e composizione della comunità microbica	<i>Hill et al., 1993, Zelles and Alef, 1995</i>
Ergosterolo	Contenuto della biomassa funginea	<i>West et al., 1987</i>
Tecniche molecolari	Dimensioni della biomassa diversità microbica mediante l'estrazione dal suolo di DNA e RNA.	<i>Reviewed by Nannipieri et al. 2003</i>
Piastre e conte dirette	Diversità microbica della cellule colturali.	<i>Macura, 1974, Bakken, 1997</i>

Effetto dell'umidità sull'efficacia della fumigazione del suolo

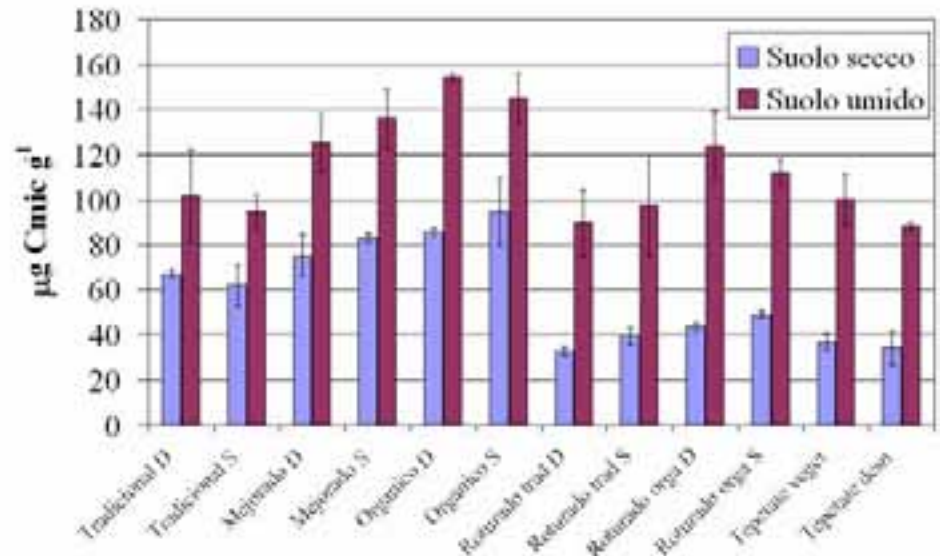
Il metodo originale di Vance et al., (1987) prevede una pre-incubazione per 10 giorni alla temperatura di 25°C e al 60% della capacità di ritenzione idrica.



I suoli umidi sono stati portati al 60% della capacità di ritenzione idrica e lasciati condizionare a temperatura di 25°C per 24 ore. I suoli secchi sono stati essiccati all'aria.

La prova è stata condotta su 2 repliche di 12 suoli diversi.

La pre-incubazione permette di evidenziare maggiormente eventuali differenze dovute ai trattamenti applicati ai suoli.



FUMIGAZIONE

Strumentazione:

1. Camera termostabile
2. Cappa chimica aspirante
3. Pompa rotante da vuoto
4. Apparecchiatura per la stima della capacità di campo

Materiali e Vetreria:

1. Essiccatore
2. Beakers da 100 ml
3. Grasso al silicone
4. Palline antiebollizione
5. Carta bibula

Reagenti:

1. CH_3Cl stabilizzato con 2-amino-butene. Il cloroformio uccide gran parte della popolazione microbica ed è facile da rimuovere.



La fumigazione è eseguita su una quantità di suolo di 20 g. L'incubazione o l'estrazione è eseguita sia sui suoli fumigati che sui controlli (non fumigati) impiegati in ugual quantità (20 g)

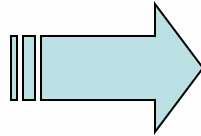
FUMIGAZIONE - ESTRAZIONE (FE)

(C-Biomassa: Vance et al., 1987)



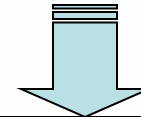
Fumigazione per 20 h con CHCl_3

1



Estrazione del C dai suoli fumigati e di controllo con K_2SO_4 0.5 M (1:4 w:v) in agitazione per 1 h e filtrazione

2



$$\text{C-biomassa} = E_c \times 2,64$$

2,64 = fattore di proporzionalità

$$E_c = C(F) - C(NF)$$

In questo caso il fattore di proporzionalità può essere influenzato dalla tessitura che stabilisce le interazioni del C-biomassa con la fase solida del suolo e ne condiziona l'efficacia di estrazione.



Ossidazione del C organico con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e titolazione potenziometrica con FeSO_4

3

Quozienti microbici

- Quoziente metabolico (qCO_2)

$$qCO_2 = \frac{C_{bas} / C_{mic}}{24} \cdot 100$$

$$0,2 < qCO_2 < 0,3$$

- Quoziente di mineralizzazione (qM)

$$qM = \frac{C_{cum}}{TOC} \cdot 100$$

$$2 < qM < 3$$

Calcolo dell'IBF

	Punteggio				
<u>Parametri utilizzati</u>	1	2	3	4	5
Sostanza organica	<1	1 – 1,5	1,5 – 2	2 – 3	>3
Respirazione basale	<5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	>20
Respirazione cumulativa	<100	100 – 250	250 – 400	400 – 600	>600
Carbonio microbico	<100	100 – 200	200 – 300	300 – 400	>400
Quoziente metabolico	>0,4	0,3 – 0,4	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	<0,1
Quoziente di mineralizzazione	<1	1 – 2	2 – 3	3 – 4	>4

Classe di Fertilità	I	II	III	IV	V
	stanchezza allarme	stress preallarme	media	buona	alta
Punteggio	0-6	6-12	12-18	18-24	24-30



NEWS FEATURE

NAT1001/WH439/26 January 2006



G. MATTHEW SALAMAY

DISCOVERY IN THE DIRT

Soil microbes are notoriously hard to culture, so how can we make the ground yield its secrets? **Virginia Gewin** finds that genetic sequencing — of samples not species — may be the answer.

Nuovi frontiere: GENOMICA

La **genomica** è una branca della biologia molecolare che si occupa dello studio del genoma degli organismi viventi. In particolare si occupa della struttura, contenuto, funzione ed evoluzione del genoma. È una scienza che si basa sulla bioinformatica per l'elaborazione e la visualizzazione dell'enorme quantità di dati che produce.

- 424 genomi batterici sequenziati
- 33 genomi di Archea sequenziati
- 25 genomi eucariotici sequenziati (320 in corso!)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Cosa ne facciamo di tali informazioni?

La diversità microbica



“Riuscire a comprendere la correlazione tra la struttura delle comunità microbiche e la loro funzione è la grande sfida del nuovo decennio!”

James Tiedje (2006)

Di solito si ritiene che la diversità presente attualmente nelle comunità microbiche del suolo rappresenti il risultato della naturale evoluzione che procede da quasi 4 miliardi di anni e che consista in :

- Nuove vie metaboliche
- Adattamenti morfologici (es. spore, filamenti, motilità, ecc.)
- Tolleranza e adattamento alle condizioni ambientali (es. siccità, pH, temperatura, Sali, ecc.)
- Cinetiche di crescita (strategie r e K)

Chi fa cosa?

In realtà la diversificazione microbica comprende anche tutta una serie di altre variabili, altrettanto importanti ma molto più difficili da studiare:

Es)

- Cinetiche enzimatiche (es. K_m , V_{max} , K_i)
- Regolazione genica (trasduzione del segnale, tempo di risposta, specificità, ecc)
- Ridondanza genica (geni ortologhi, geni paraloghi, isoenzimi)

La **ridondanza funzionale** in una comunità microbica consente di diminuire la funzionalità ecosistemica in due modi:

- 1) Fornendo una ridondanza specifica per la stessa via metabolica/enzimatica
- 2) Fornendo una via metabolica alternativa per lo stesso risultato metabolico/enzimatico

Nel caso di improvvise perturbazioni ambientali, la diversità genetica garantisce molteplici alternative funzionali in grado di farvi fronte.

Diversità genetica e funzionale

La ridondanza funzionale delle comunità microbiche può essere determinata solo dopo aver determinato (approssimativamente) il numero di popolazioni microbiche presenti in 1 g di suolo. Dall'analisi del genoma della comunità microbica presente in 1 g di suolo, risultano esserci geni responsabili di differenti processi e di 10^5 – 10^6 diverse funzioni uniche!! (*Roberts et al., 2004*).

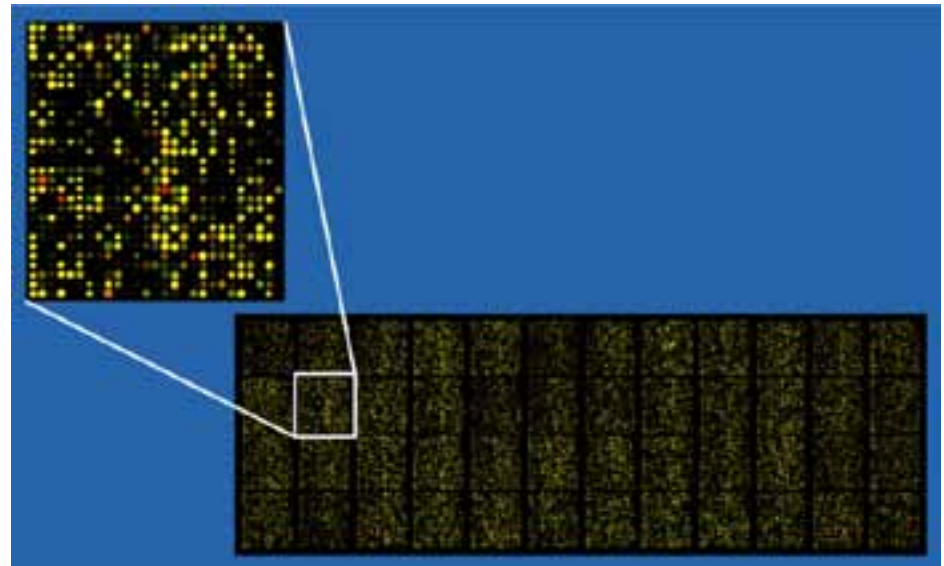
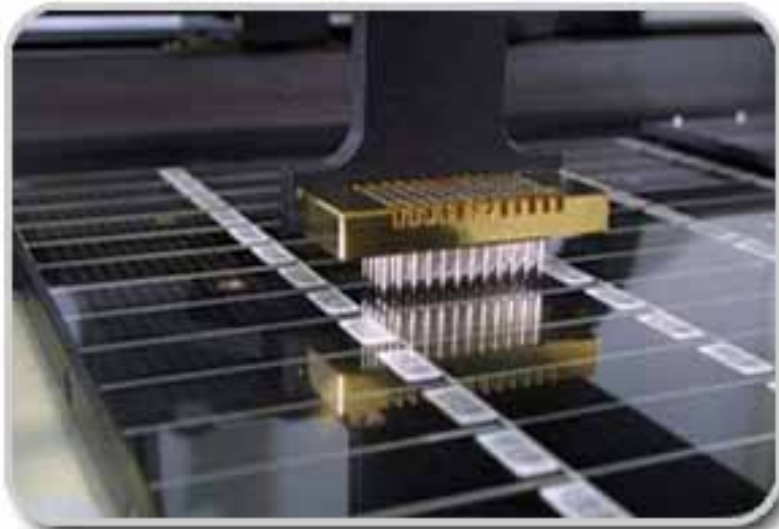
In compenso se ne riescono a misurare solo 500 !!!

La maggior parte dei metodi standard utilizzati per lo studio dei principali processi microbici del suolo, sono stati messi a punto decenni or sono ed hanno riguardato in particolare i cicli biogeochimici del carbonio, dell'azoto, del fosforo e dello zolfo (Weaver et al., 1994).

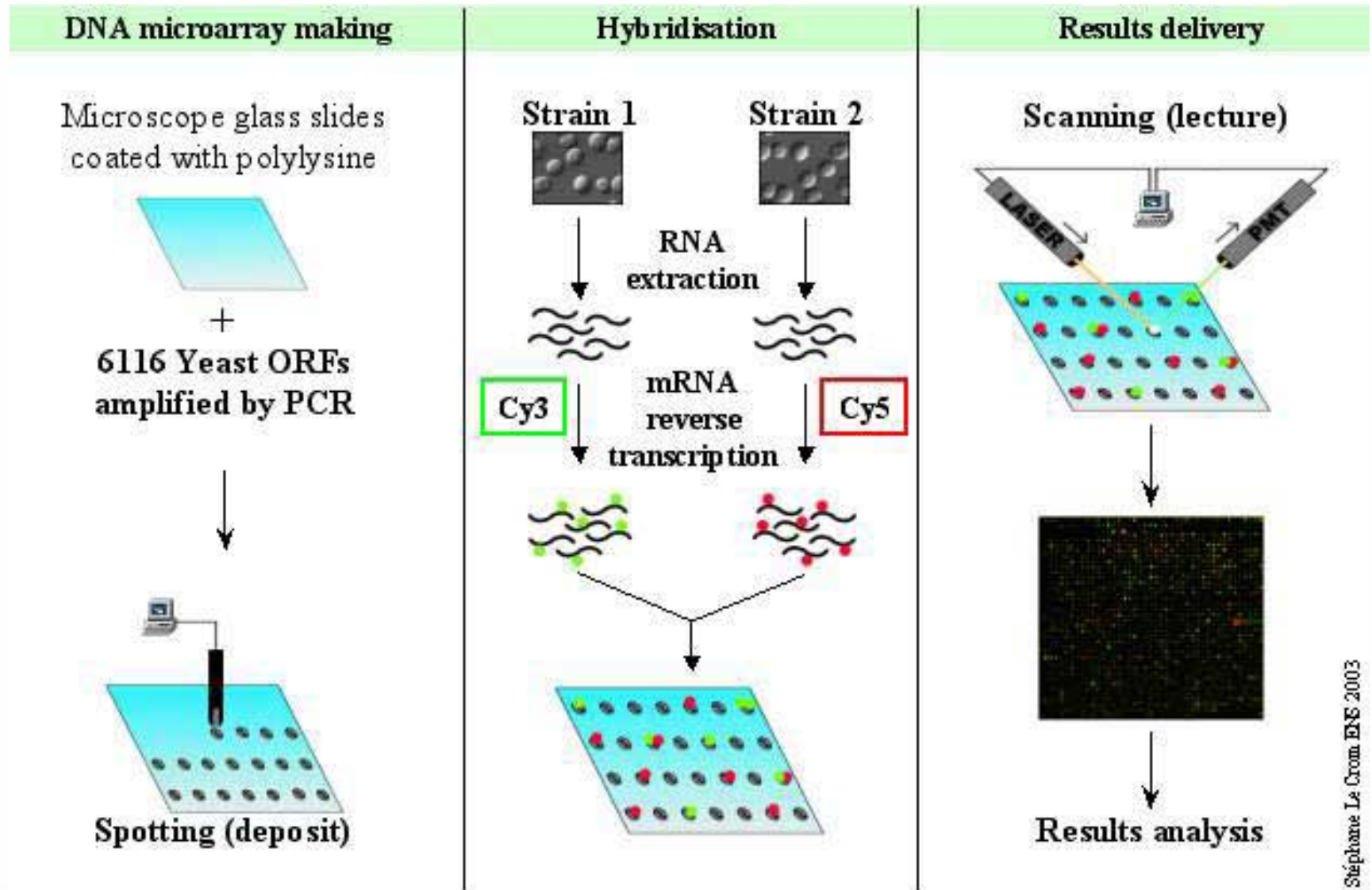
Metodi più recenti come il CLPP (Community Level Physiological Profile) hanno offerto vantaggi ma mostrato anche alcuni limiti legati fondamentalmente alla “coltivabilità” dei microrganismi (Garland and Mills, 1990; Campbell, 2003).

Nuovi approcci: i microarray

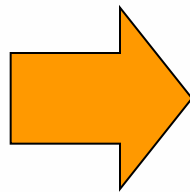
Un **DNA microarray** è costituito da una collezione di microscopiche sonde di DNA attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica, o chip siliconici formanti un array (comunemente detto CHIP). Tali array sono usati per la esaminare il profilo d'espressione di un gene o per identificare la presenza di un gene o di una breve sequenza in miscela di migliaia (spesso anche tutto il patrimonio genetico di un individuo umano o non). I **microarray** sfruttano una tecnica di ibridazione inversa, consiste cioè nel fissare tutti i probe su un supporto e nel marcare invece l'acido nucleico target. È una tecnica che è stata sviluppata negli anni '90, oggi permette l'analisi dell'espressione genica monitorando in una sola volta gli RNA prodotti da migliaia di geni



Nuovi approcci: i microarray



Nuovi approcci: i microchip a DNA



I microarrays e la diversità microbica

Ci sono 3 tipi di microarrays:

- 1) **POA** (*Phylogenetic oligonucleotide array*): detti anche “phylochips”, sono costituiti da sonde di sequenze derivate da geni rRNA, servono per l’analisi filogenetica delle comunità microbiche (*Loy et al., 2002*).
- 2) **FGA** (*Functional gene array*): costituiti da sonde di sequenze derivate da geni codificanti per proteine chiave coinvolte in processi metabolici. Sono utili per monitorare lo stato fisiologico e funzionale delle comunità microbiche (*Wu et al., 2001*)
- 3) **CGA** (*Community genome array*): costituiti dall’intero genoma (o comunque un grande frammento di DNA) isolato da una coltura pura o da una libreria genomica. Sono utili per effettuare la scoperta di nuovi geni (*Cho and Tiedje, 2001*)



APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2002, p. 2535–2541
0099-2240/02/\$04.00+0 DOI: 10.1128/AEM.68.5.2535–2541.2002

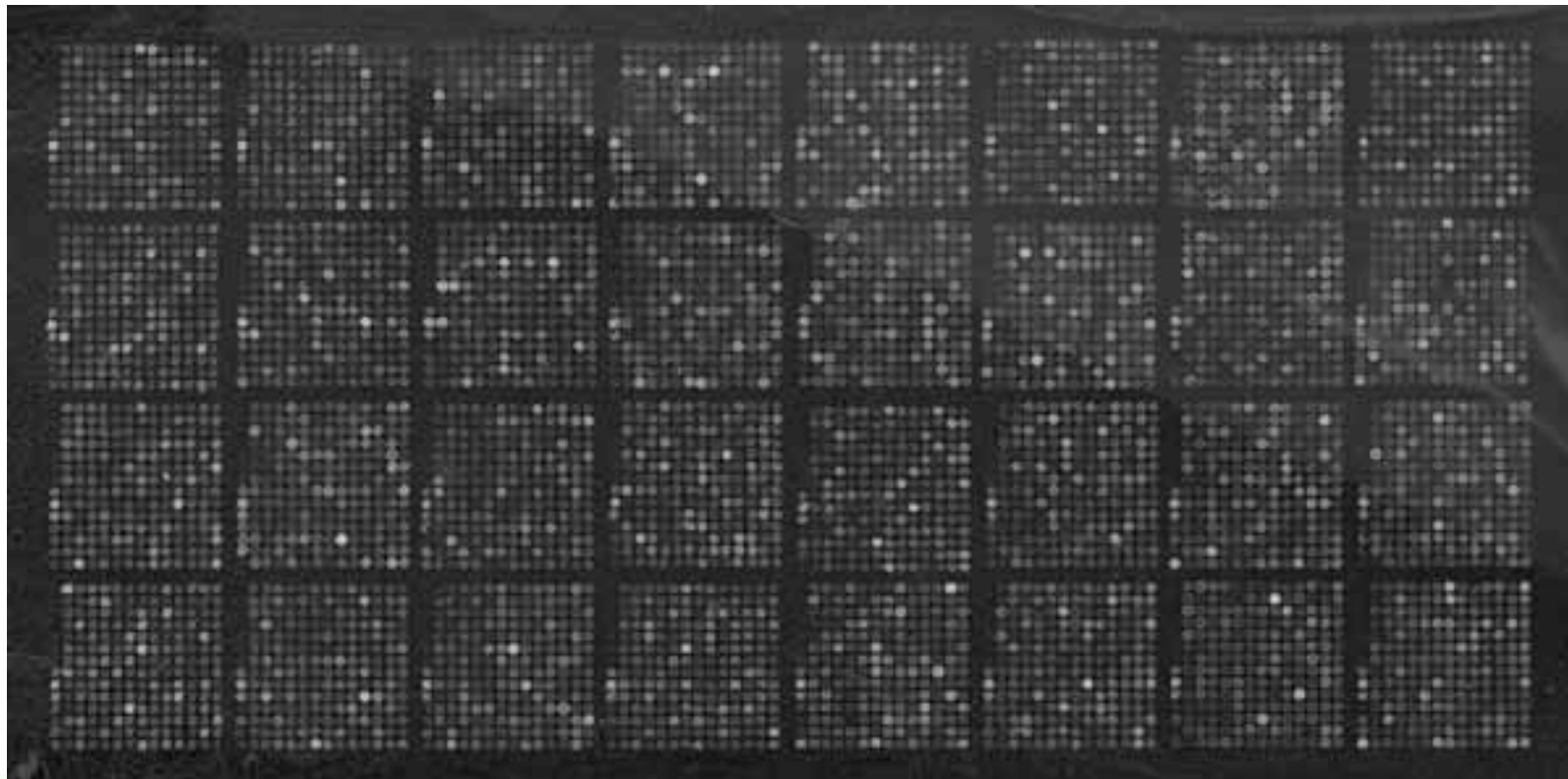
Vol. 68, No. 5

High-Density Microarray of Small-Subunit Ribosomal DNA Probes

Kenneth H. Wilson,¹ Wendy J. Wilson,² Jennifer L. Radosevich,² Todd Z. DeSantis,²
Vijay S. Viswanathan,² Thomas A. Kuczmarski,² and Gary L. Andersen^{2*}

Veterans Affairs Medical Center and Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710,¹ and Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, California 94550²

Received 26 September 2001/Accepted 2 January 2002

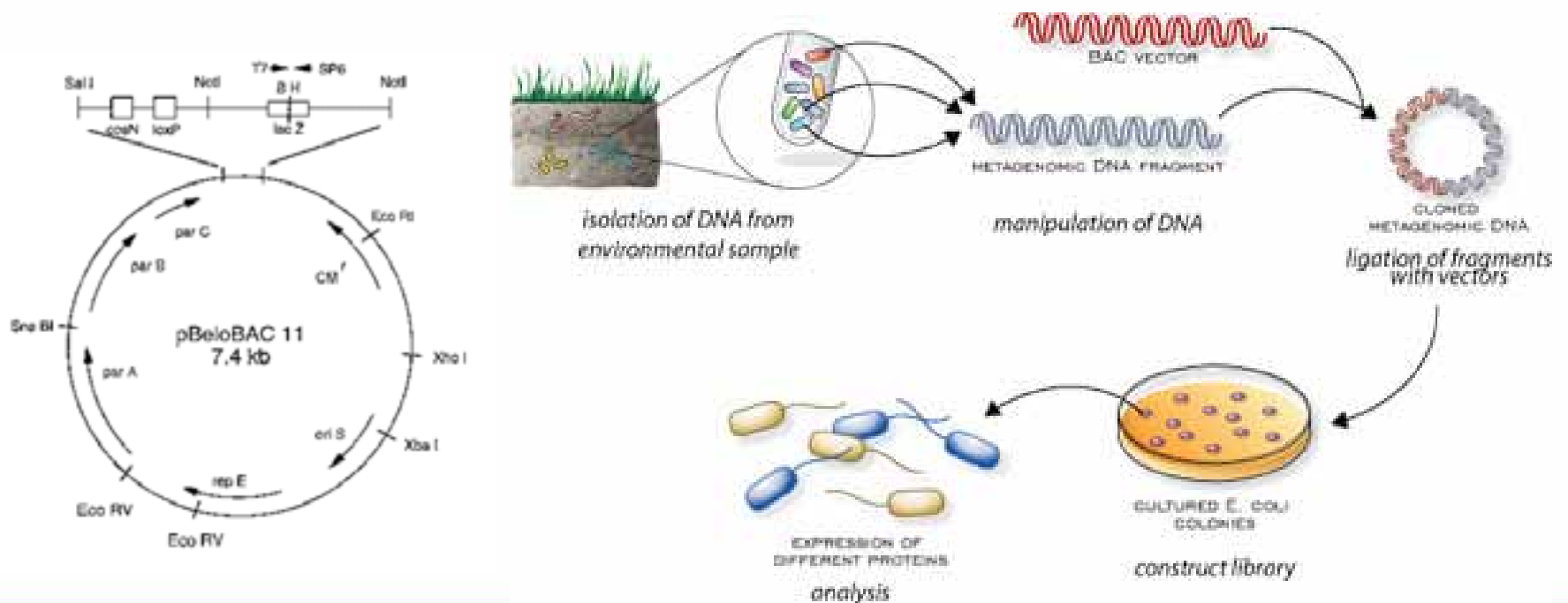


Nuovi sfide: la METAGENOMICA

METAGENOMICA: lo studio dell'insieme di tutti i genomi degli organismi presenti in natura (Rondon et al., 2000)

Si costruiscono delle librerie genomiche mediante l'uso dei:

BAC (Bacterial Artificial Chromosomes): vettori stabili in grado di contenere ed esprimere grandi frammenti di DNA (>100kb) in *E. Coli* (Rondon et al, 1999).





APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2000, p. 2541-2547
0099-2240/00/\$04.00+0
Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

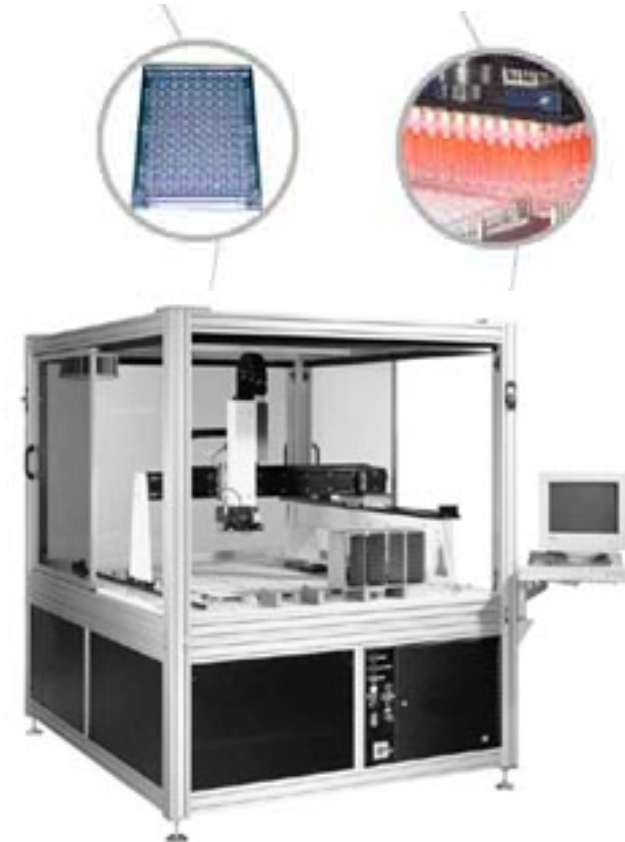
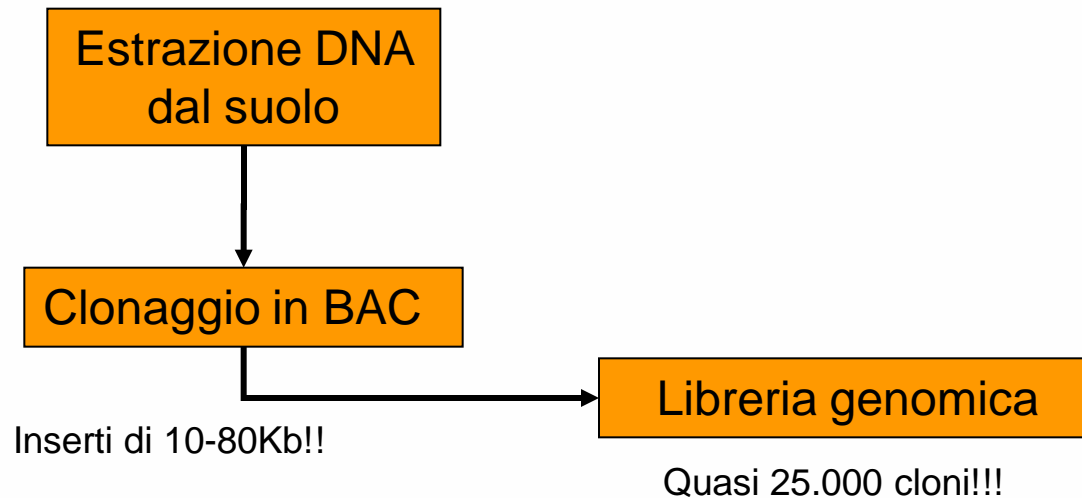
Vol. 66, No. 6

Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms

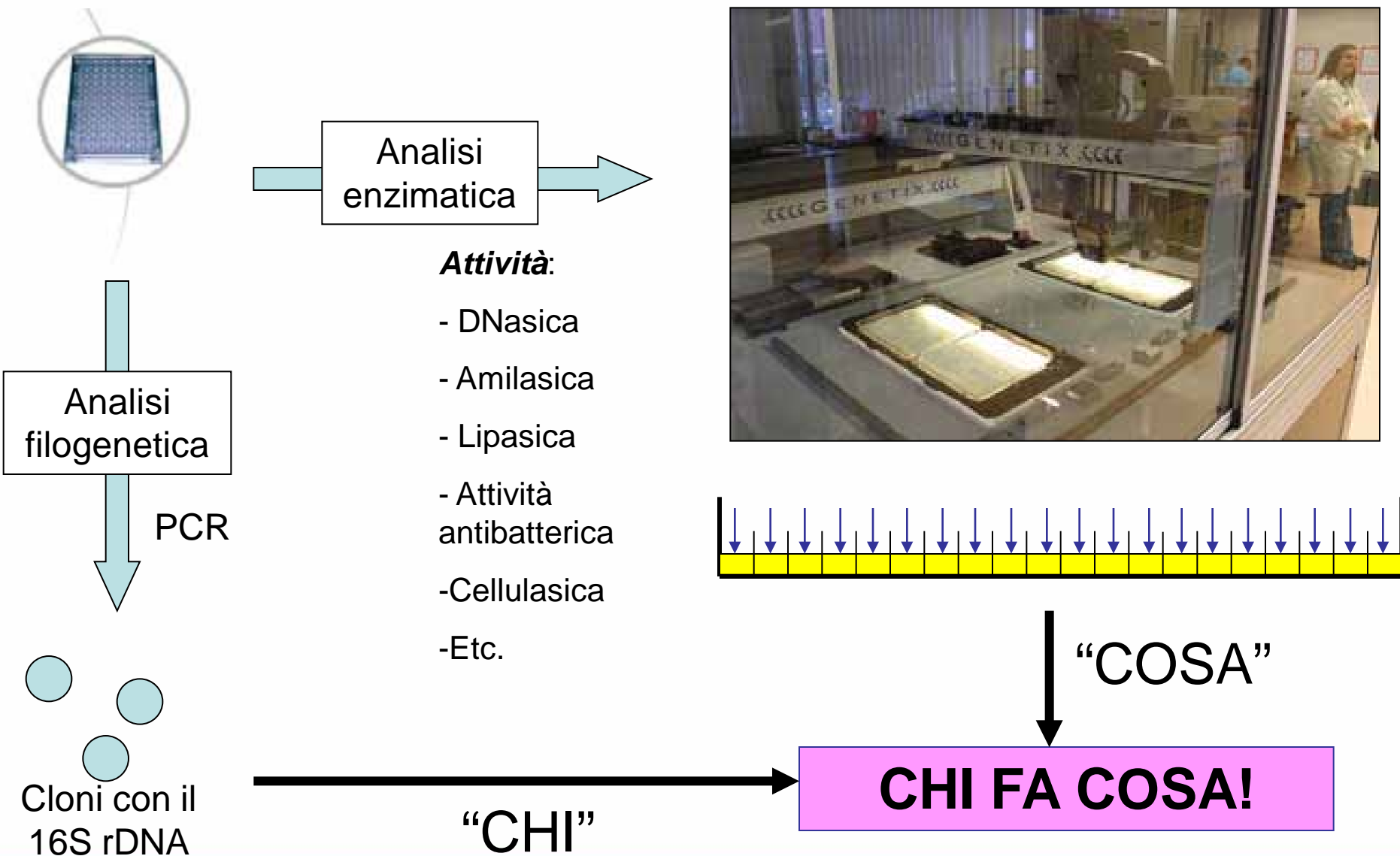
MICHELLE R. RONDON,¹ PAUL R. AUGUST,² ALAN D. BETTERMANN,¹ SEAN F. BRADY,³
TRUDY H. GROSSMAN,² MARK R. LILES,¹ KARA A. LOIACONO,² BERKLEY A. LYNCH,²
IAN A. MACNEIL,² CHARLES MINOR,² CHOI LAI TIONG,² MICHAEL GILMAN,²
MARCIA S. OSBURN,² JON CLARDY,³ JO HANDELSMAN,^{1*}
AND ROBERT M. GOODMAN¹

*Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin¹;
ARIAD Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Massachusetts²; and Department of Chemistry
and Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, New York³*

Received 29 November 1999/Accepted 23 March 2000



La metagenomica del suolo





APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 2003, p. 4927–4934
0099-2240/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.69.8.4927–4934.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 69, No. 8

Metagenomic Profiling: Microarray Analysis of an Environmental Genomic Library

Jonathan L. Sebat,^{1†} Frederick S. Colwell,² and Ronald L. Crawford^{1*}

Environmental Research Institute, University of Idaho, Moscow, Idaho 83844-1052,¹ and Idaho National Engineering and Environmental Laboratory, Idaho Falls, Idaho 83415²

Received 3 March 2003/Accepted 30 May 2003

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 2004, p. 2452–2463
0099-2240/04/\$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.70.4.2452–2463.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 70, No. 4

Genetically Modified Bacterial Strains and Novel Bacterial Artificial Chromosome Shuttle Vectors for Constructing Environmental Libraries and Detecting Heterologous Natural Products in Multiple Expression Hosts

Asuncion Martinez,^{*} Steven J. Kolvek, Choi Lai Tiong Yip, Joern Hopke, Kara A. Brown,[†]
Ian A. MacNeil,[†] and Marcia S. Osburne[†]

Cambridge Genomics Center, Aventis Pharmaceuticals Inc., Cambridge, Massachusetts 02139

Received 17 September 2003/Accepted 3 January 2004



APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 2005, p. 6319–6324
0099-2240/05/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.71.10.6319–6324.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 71, No. 10

Genome-Directed Isolation of the Key Nitrogen Fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an Acidophilic Microbial Community

Gene W. Tyson,^{1*} Ian Lo,¹ Brett J. Baker,² Eric E. Allen,¹ Philip Hugenholtz,^{1†}
and Jillian F. Banfield^{1,2}

Department of Environmental Science, Policy, and Management,¹ and Department of Earth and Planetary Sciences,² University of California, Berkeley, California 94720

Received 7 December 2004/Accepted 10 May 2005

Shotgun Sequencing



Venter et al. (2001): The sequence of human genome. *Science* 291, 1304



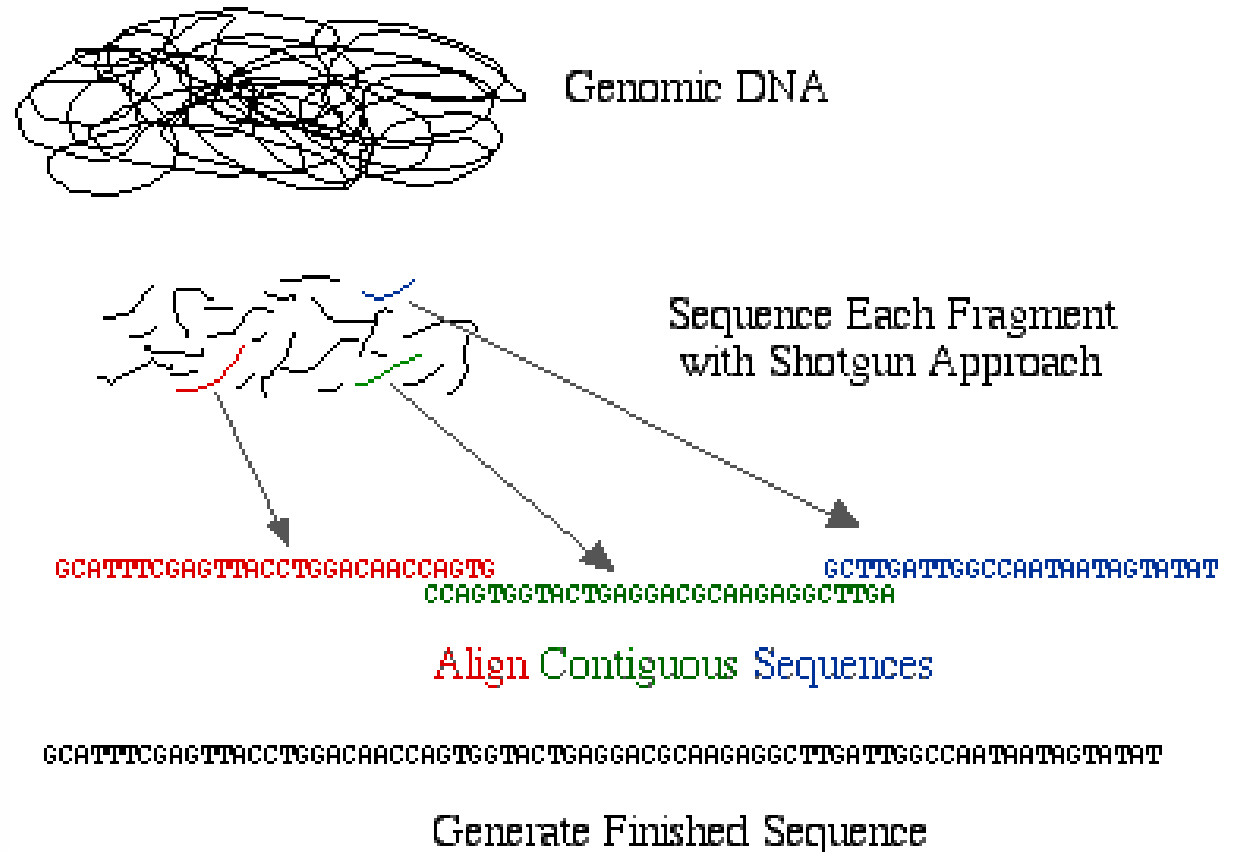
Shotgun sequencing è un metodo utilizzato in genetica per sequenziare lunghi frammenti di DNA. Poiché il metodo “tradizionale” di sequenziamento del DNA può essere applicato solamente per sequenze di lunghezza limitata, è necessario suddividere le sequenze più lunghe prima di sequenziarle e quindi *riassemblarle* per ottenere la sequenza completa.

Nello shotgun sequencing, il DNA viene frammentato in modo random in piccoli frammenti, che vengono sequenziati mediante il metodo di Sanger per ottenere i *reads*. Una sovrapposizione multipla dei reads del DNA viene ottenuto facendo diversi rounds di queste frammentazioni e sequenziamenti. Ci sono dei software che utilizzano le sequenze sovrapposte di differenti reads per assemblarli in un'unica sequenza.



Shotgun Sequencing

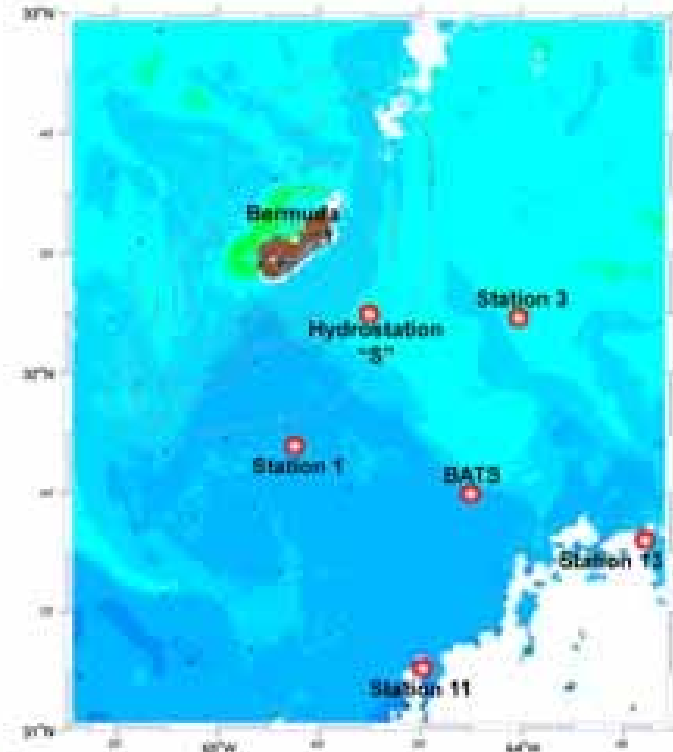
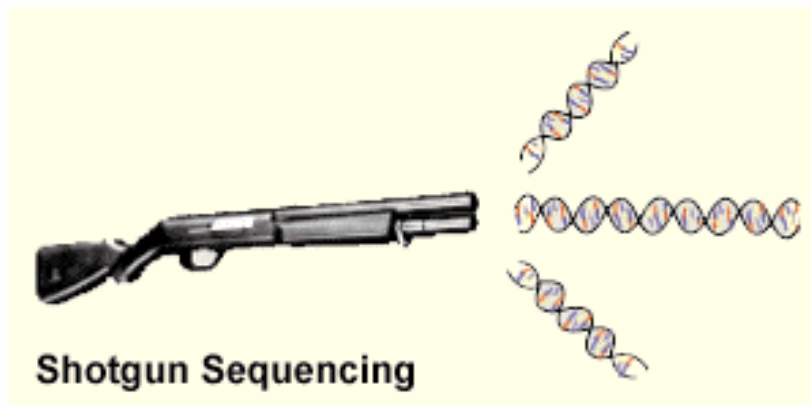
Whole Genome Shotgun Sequencing Method



Venter et al 2004, Science 304:66-74

Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea

J. Craig Venter,^{1*} Karin Remington,¹ John F. Heidelberg,³
Aaron L. Halpern,² Doug Rusch,² Jonathan A. Eisen,³
Dongying Wu,³ Ian Paulsen,³ Karen E. Nelson,³ William Nelson,³
Derrick E. Fouts,³ Samuel Levy,² Anthony H. Knap,⁶
Michael W. Lomas,⁶ Ken Nealson,⁵ Owen White,³
Jeremy Peterson,³ Jeff Hoffman,¹ Rachel Parsons,⁶
Holly Baden-Tillson,¹ Cynthia Pfannkoch,¹ Yu-Hui Rogers,⁴
Hamilton O. Smith¹



Some numbers from the Venter et al. study

- From 200L of filtered sea water, 1.66 million sequence reads were derived.
- 246 mbp were assembled into 64,398 scaffolds ranging from 826 bp to 2.6 Mbp
- 170 mbp of miniscaffolds and unpaired reads
- 1.2 million protein-coding genes (10X more than previously in protein database)
- 69,901 conserved open reading frames with no assignable function
- 60,000 16S sequences, 148 of which are at least 3% different from previously known sequence

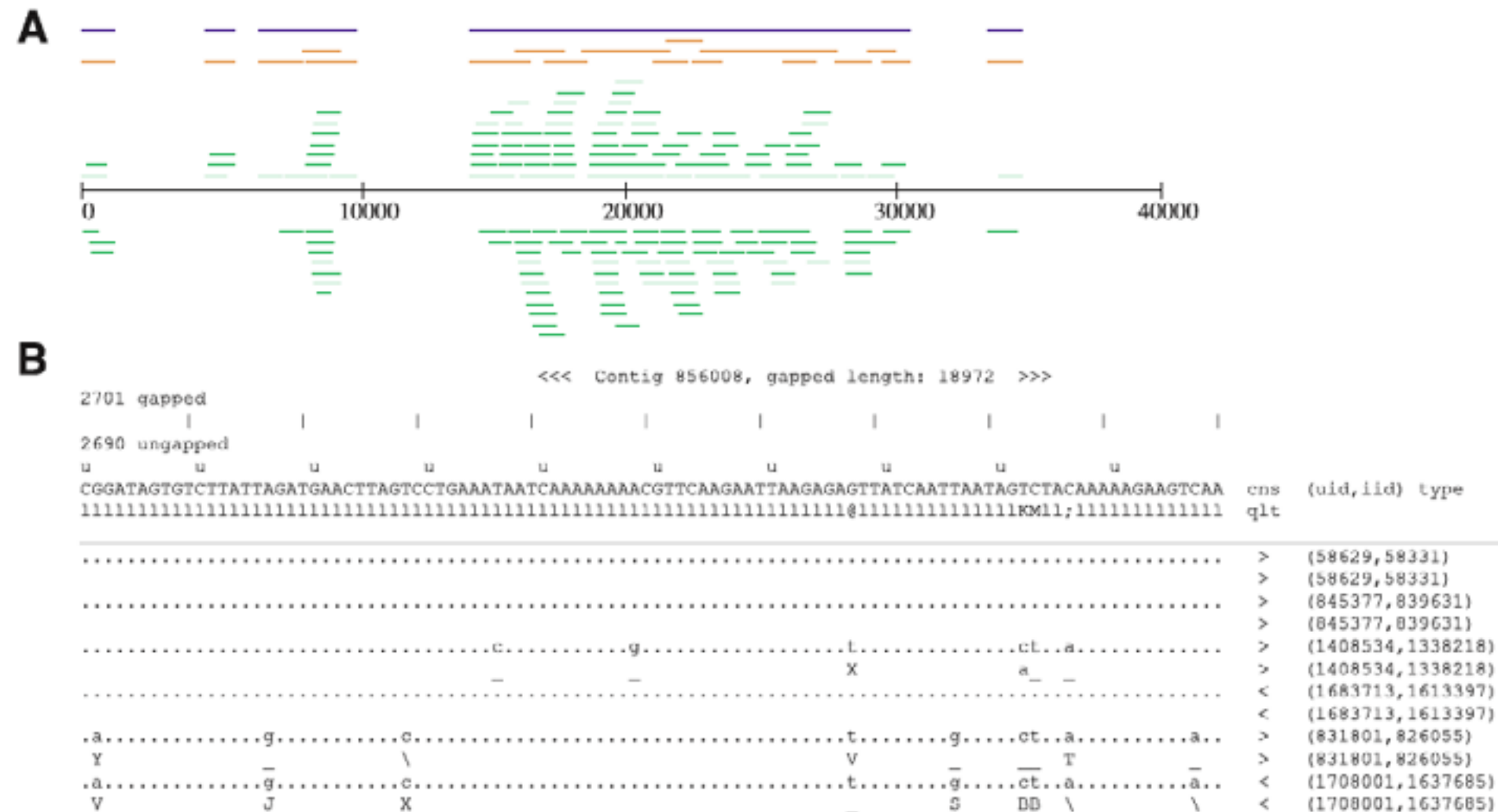


Summary of genes found in the Sargasso sea survey

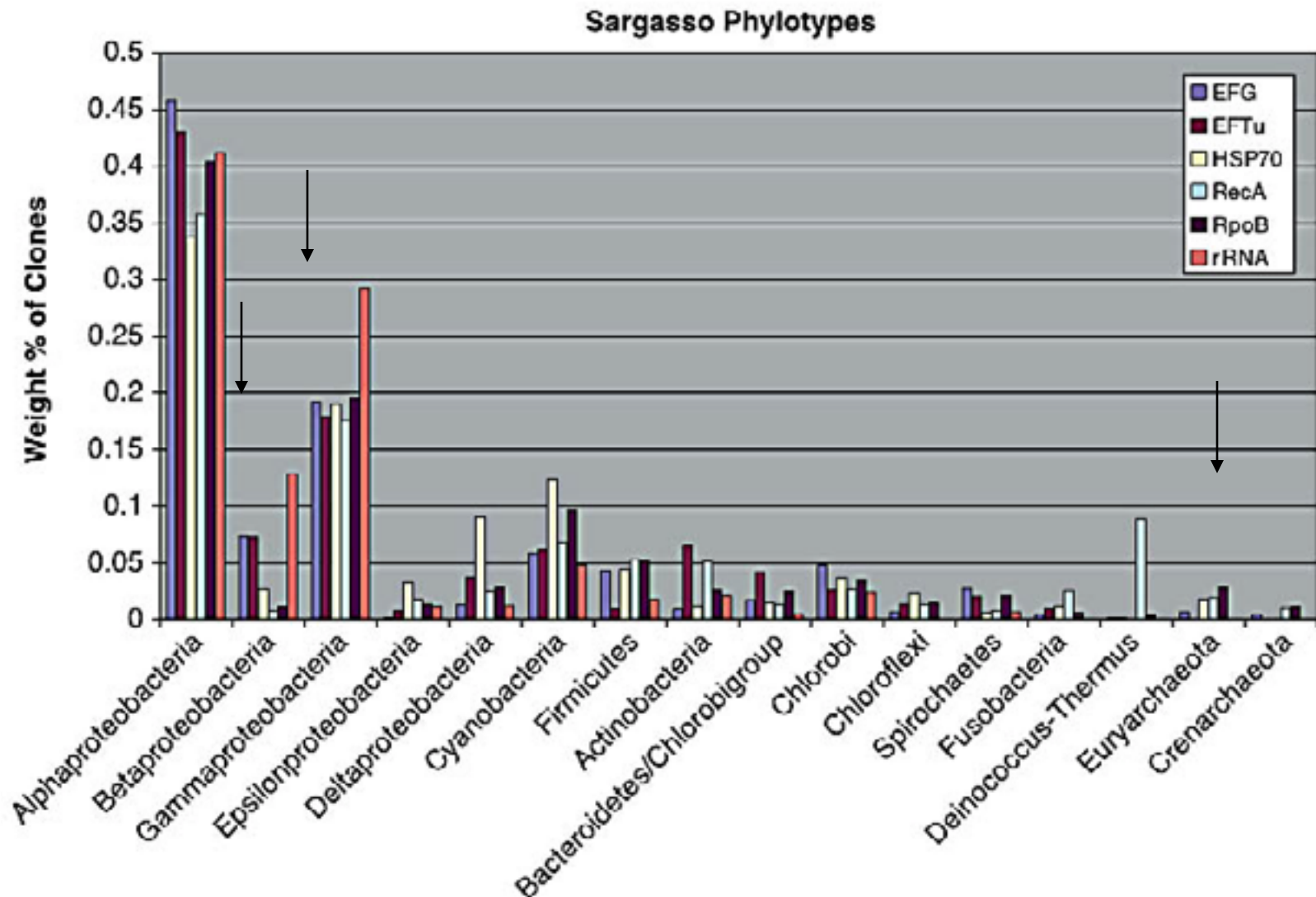


TIGR role category	Total genes
Amino acid biosynthesis	37,118
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	25,905
Cell envelope	27,883
Cellular processes	17,260
Central intermediary metabolism	13,639
DNA metabolism	25,346
Energy metabolism	69,718
Fatty acid and phospholipid metabolism	18,558
Mobile and extrachromosomal element functions	1,061
Protein fate	28,768
Protein synthesis	48,012
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	19,912
Regulatory functions	8,392
Signal transduction	4,817
Transcription	12,756
Transport and binding proteins	49,185
Unknown function	38,067
Miscellaneous	1,864
Conserved hypothetical	794,061
Total number of roles assigned	1,242,230
Total number of genes	1,214,207

Venter et al. 2004 evidence the composite genome represents a population



Estimates of abundance of major groups based on different gene families





Lavori interessanti

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2005, p. 5544–5550
0099-2240/05/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.71.9.5544–5550.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 71, No. 9

Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples†

Heath E. O'Brien,^{1*} Jeri Lynn Parrent,¹ Jason A. Jackson,¹ Jean-Marc Moncalvo,²
and Rytas Vilgalys¹

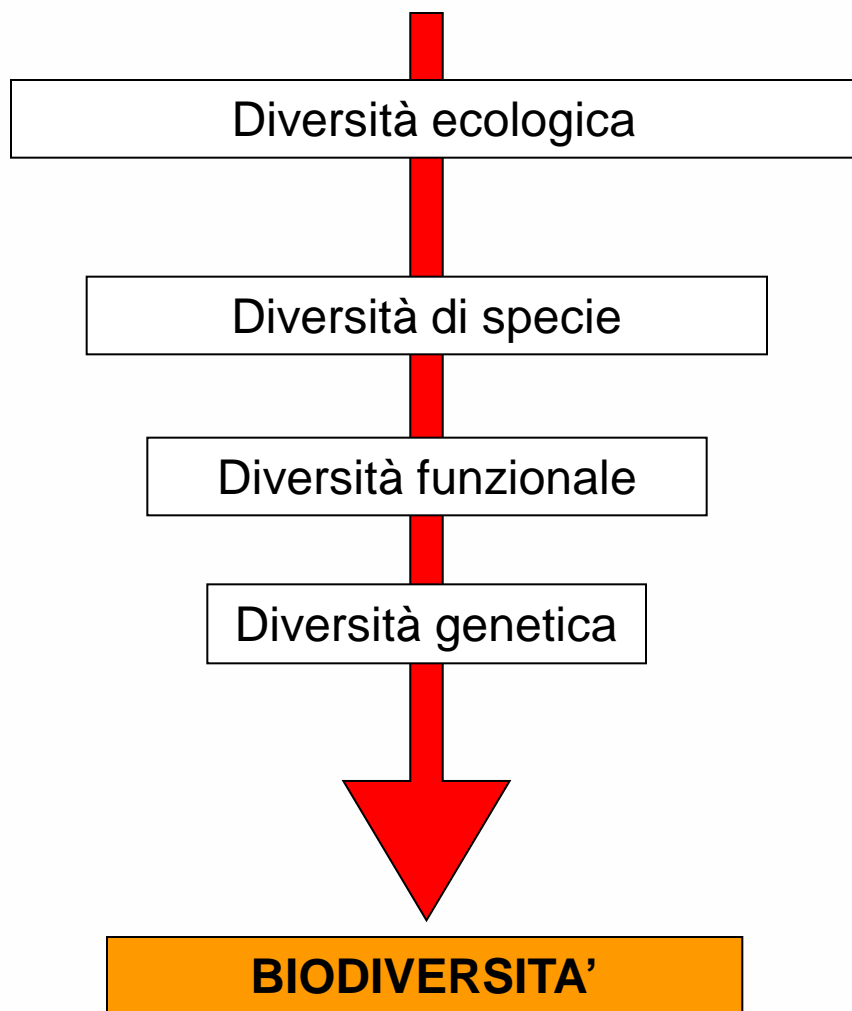
*Department of Biology, Duke University, Durham, North Carolina 27708,¹ and Centre for Biodiversity
and Conservation Biology, Royal Ontario Museum, and Department of Botany,
University of Toronto, Toronto, Canada²*

Received 10 November 2004/Accepted 15 April 2005

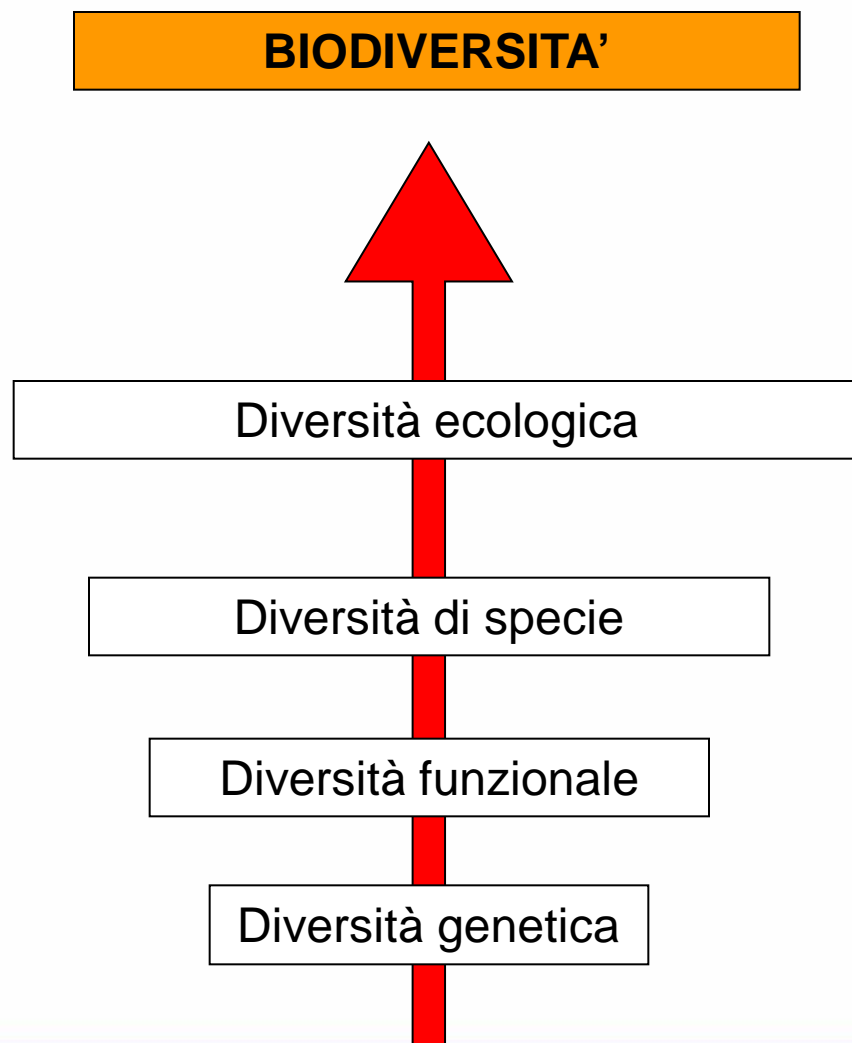
- S. Leininger et al., (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442: 806-809.

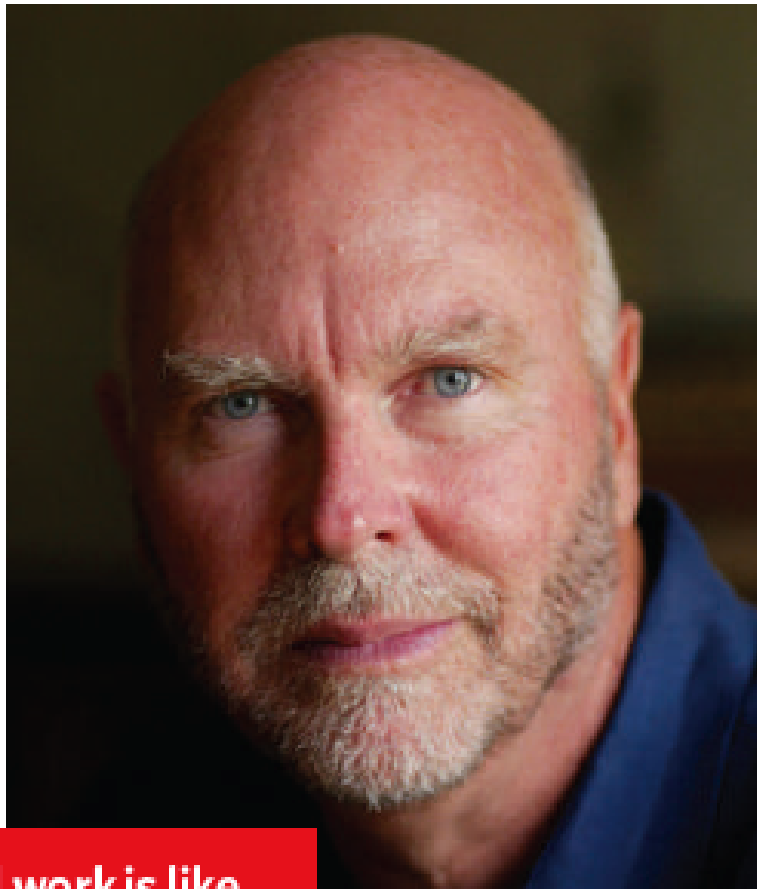
Conclusioni

Approccio Top-down



Approccio Bottom-up





**"The soil work is like
trying to assemble
40,000 human genomes
simultaneously."
— Craig Venter**