



**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**

# **Definire la biodiversità del suolo: difficile, ma non impossibile**

**Anna Benedetti,**

**Stefano Mocali, Letizia Pompili,  
Alba Silvia Mellina**



*Consiglio per la Ricerca e la  
Sperimentazione in Agricoltura –  
Centro per lo Studio delle  
Relazioni tra Pianta e Suolo*



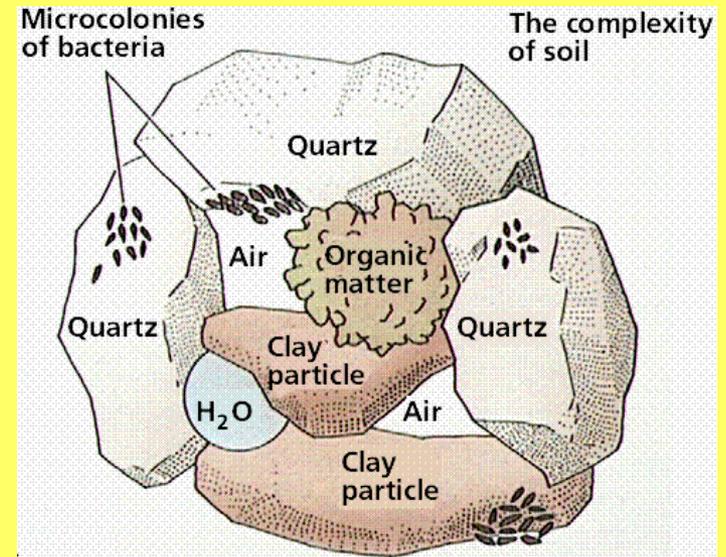
# Perché è così difficile definire e soprattutto misurare la diversità microbica del suolo?

- Definizione classica di biodiversità
- **ecosistemica, genetica e di specie** può essere applicata ai microrganismi solo in parte perché la diversità di specie non può essere applicata agli organismi che si riproducono per via asessuata come batteri e virus, quindi ci si limita a definire:
- ***Richness*** (numero degli organismi appartenenti ai diversi taxa)
- ***Evenness*** (distribuzione all'interno dei taxa)

# MICROORGANISMI 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.



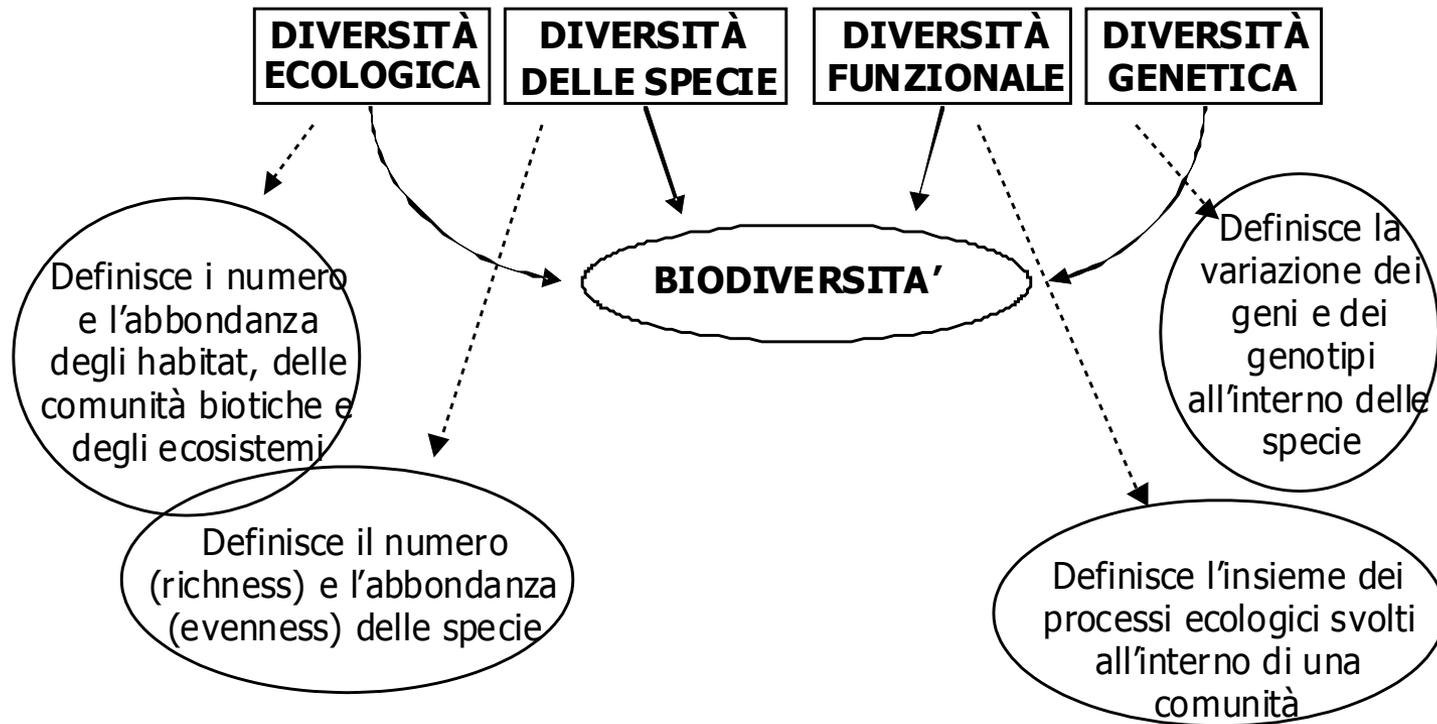
# Microrganismi del suolo

- Batteri
- Archea
- Funghi
- Lieviti
- Microalghe (microflora)
- Protozoi (microfauna)

*(Metting 1993)*

# LA BIODIVERSITÀ

La Biodiversità può essere analizzata approfondendo diversi livelli



# Come si studia la diversità microbica?

## METODI DI STUDIO DELLA DIVERSITA' MICROBICA

### METODI DI ANALISI DELLA DIVERSITÀ FUNZIONALE

#### METODI BIOCHIMICI

forniscono indicazioni sui processi metabolici della comunità microbica nel suo insieme:  
RESPIRAZIONE del suolo  
MINERALIZZAZIONE del CARBONIO e dell'AZOTO

#### METODI ECOFISIOLOGICI

forniscono informazioni di tipo ecologico e molecolare:  
BIOLOG (impronta metabolica) METODI ENZIMATICI

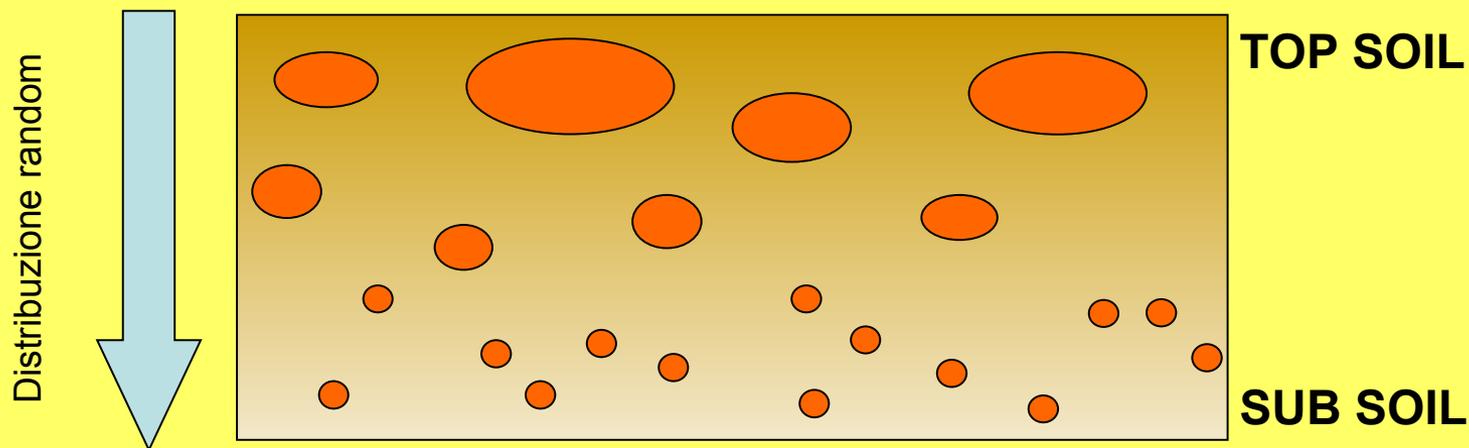
### METODI DI ANALISI DELLA DIVERSITÀ GENETICA

#### METODI MOLECOLARI

forniscono informazioni di tipo genetico (fingerprinting):  
ARDRA  
(*amplified ribosomal DNA restriction analysis*),  
DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) ecc.

# 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*)

# Limitazioni metodologiche e concettuali

- ***Metodologiche (campionamento)***

Di solito si studiano repliche di pochi grammi di suolo (1-5 g): questo approccio ha insiti alcuni problemi, il principale dei quali è data dall'ETEROGENEITÀ del suolo e dalla distribuzione spaziale dei microrganismi (Trevors, 1998) che tendono a concentrarsi in alcune zone dette “*hot spots*”. Anche la presenza di piante altera la distribuzione dei microrganismi, aumentandone il numero nella rizosfera rispetto al bulk.

- Occorrono degli approcci geostatistici!!

- C'è molta attenzione da parte del mondo scientifico!

# Limitazioni metodologiche e concettuali

## Concettuali:

- 1) carenza di informazioni tassonomiche
- 2) 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*)

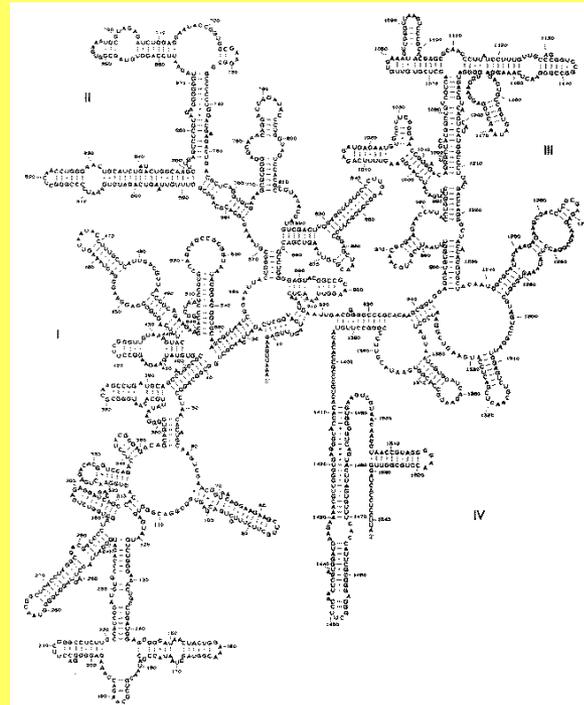
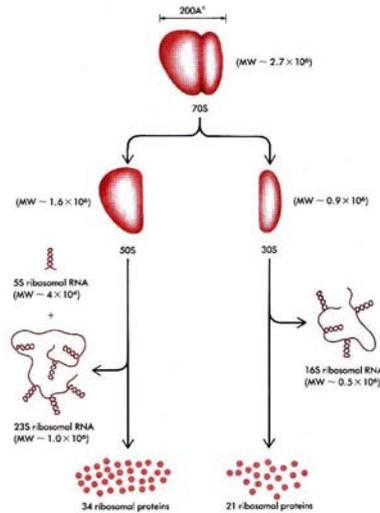
Si usano criteri filogenetici basati sulle sequenze geniche degli “*orologi molecolari*” per suddividere i batteri in gruppi detti TAXA:



Es) 16S rDNA

taxon				
dominio	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Archaea
phylum	Spirochaetes	Firmicutes	Proteobacteria	Euryarchaeota
classe	Spirochaetes	Bacilli	Gamma proteobacteria	Methanomicrobia
ordine	Spirochaetales	Bacillales	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>

# L'orologio molecolare 16S rDNA



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

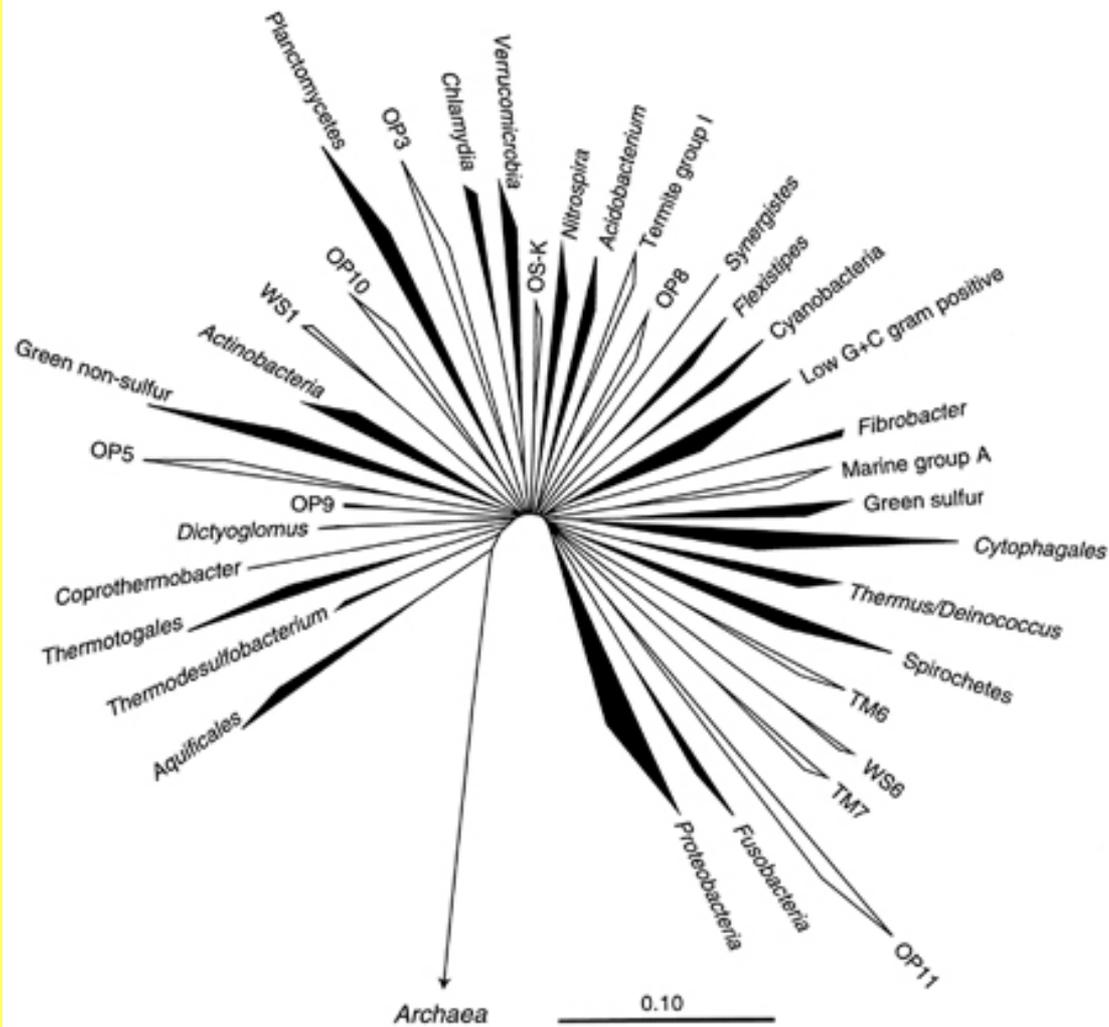
- regioni **CONSERVATE** universali, che hanno la stessa sequenza in tutti i batteri
- regioni **SEMICONSERVATE**, che hanno sequenza uguale tra batteri dello stesso taxon
- regioni **VARIABILI**, che hanno la stessa sequenza tra batteri appartenenti alla stessa specie

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

- 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)

# 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

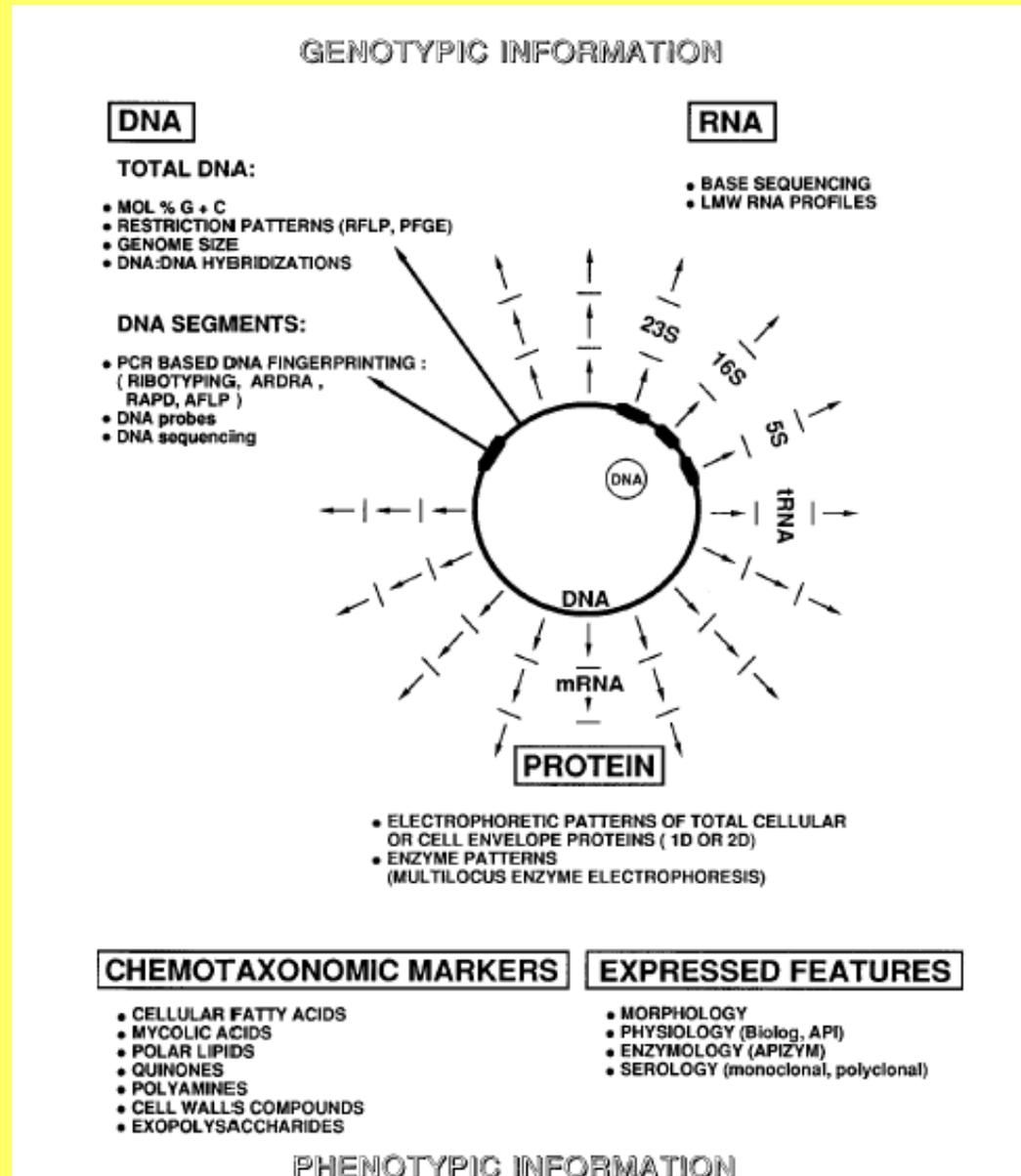
### 2) METODI di IDENTIFICAZIONE:

#### a) Fenotipici:

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

#### b) Genotipici

- Metodi molecolari



# 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!!**

# Quali i vantaggi dei metodi molecolari?

## **VANTAGGI:**

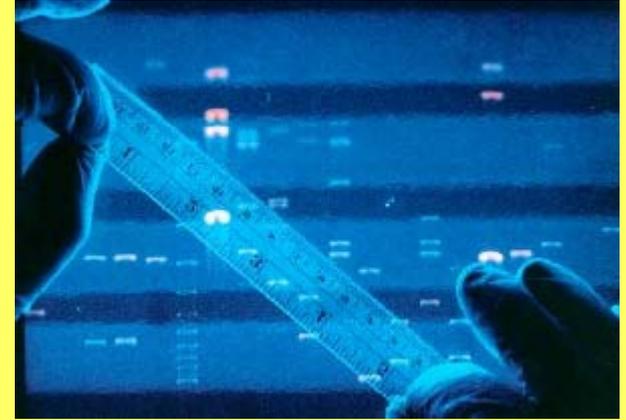
- a) Meno dell'1% dei batteri presenti nel suolo è coltivabile in laboratorio (Torsvik et al., 1990a)
- b) In 1g di suolo ci sono  $1 \times 10^6$  batteri di circa 4000 specie diverse (Torsvik et al., 1990b)

## **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 uso un metodo di lisi blando magari liso i Gram-negativi ma NON i Gram + !! Se uso un metodo troppo drastico liso 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
- Evenness: distribuzione delle specie
- Composizione: identificazione delle specie



## **È 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:

- 4) Non conosciamo quello che cerchiamo
- 5) 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
- 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 struttura  
microbica a  
livello  
intraspecifico

Nessuna  
informazione  
SU **richness e  
eveness**

Cambiamenti  
nella  
composizione  
tassonomica

Informazioni  
SU **richness e  
eveness**

# Quali metodi utilizzare?

- La tecnica che attualmente offre la migliore risoluzione filogenetica è la costruzione e il sequenziamento di “**librerie genomiche**” di geni rDNA! Tuttavia è molto scomodo (lungo e costoso) utilizzarla come tecnica di routine e per lo studio di numerosi campioni.
- Il compromesso migliore per efficienza/risoluzione è dunque offerto dall'analisi **T-RFLP** che recentemente riesce anche a classificare filogeneticamente i frammenti di DNA analizzati (*Marsh et al., 2000; Kent et al., 2003*). Inoltre il confronto tra profili T-RFLP permettono di valutare statisticamente i valori di richness e di evenness (*Blackwood et al., 2003*)

Tuttavia l'errore sistematico (BIAS) commesso durante l'amplificazione via PCR comporta numerosi problemi, soprattutto nella determinazione della richness di una popolazione microbica (*Kent and Triplett, 2002*).

**Si tratta di tecniche molto potenti e, soprattutto se affiancate con quelle tradizionali, possono fornire importantissime informazioni sulla struttura, l'ecologia e la funzione delle comunità microbiche.**

# 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:

- 2) Fornendo una ridondanza specifica per la stessa via metabolica/enzimatica
- 3) 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*).

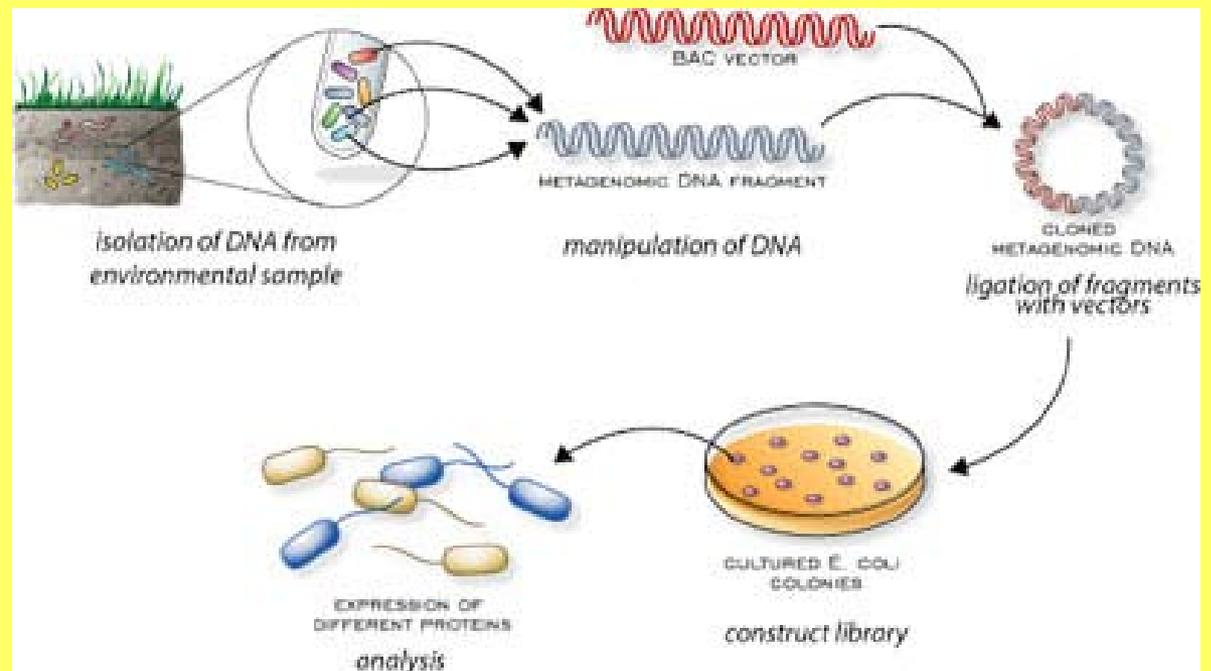
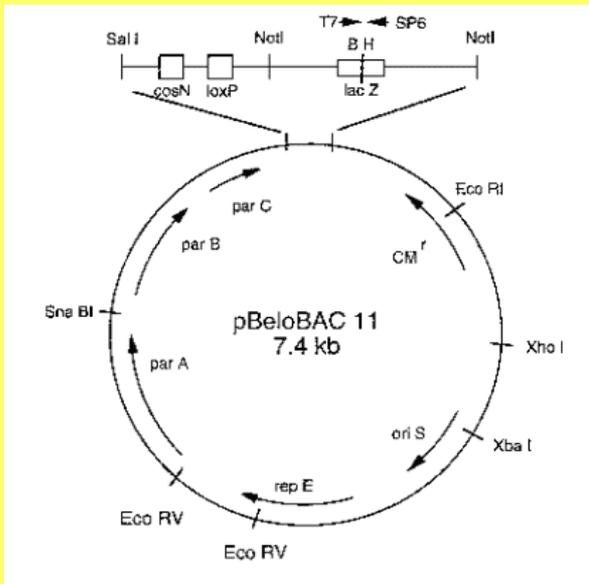
Metodi più recenti come il CLPP (*Community Level Physiological Profile*) hanno offerto vantaggi ma mostrato anche alcuni limiti legati fondamentalmente alla "coltivabilità" dei microrganismi (*Garland and Mills, 1990; Campbell, 2003*).

# Nuovi sfide: la METAGENOMICA

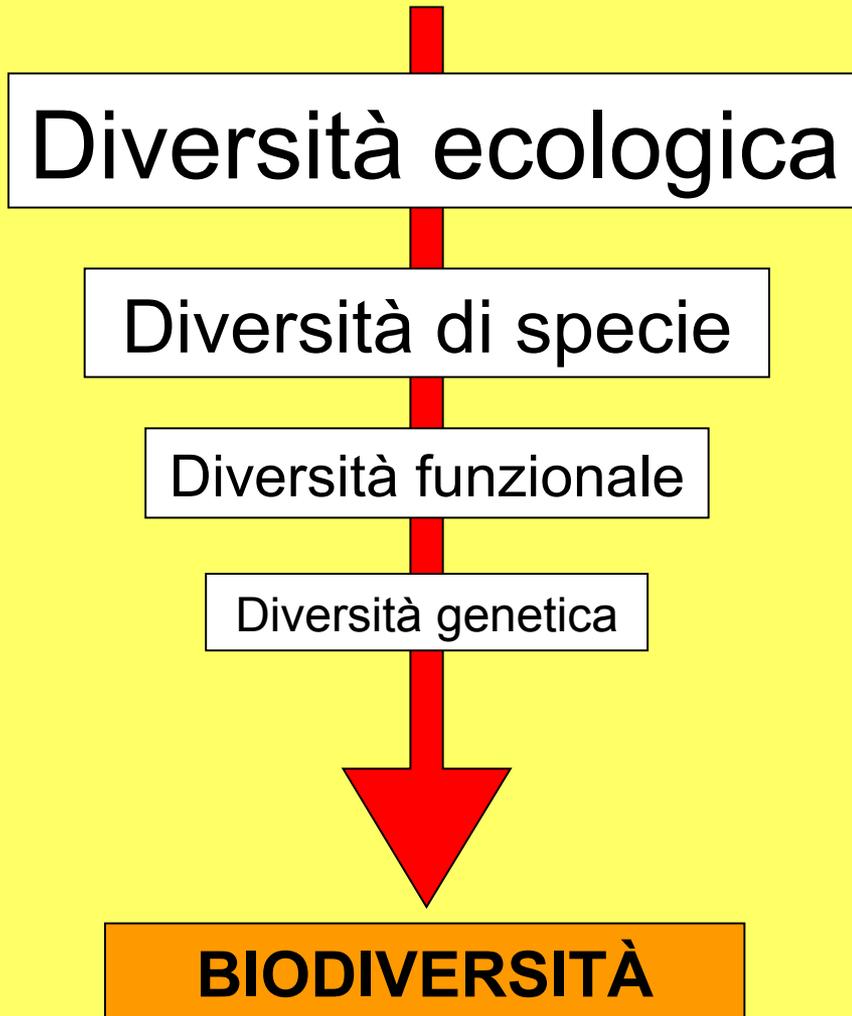
**METAGENOMICA:** lo studio dell'insieme di tutti i genomi degli organismi presenti in natura (Rondon *et al.*, 2000)

Si costruiscono delle librerie genomiche mediante l'uso dei:

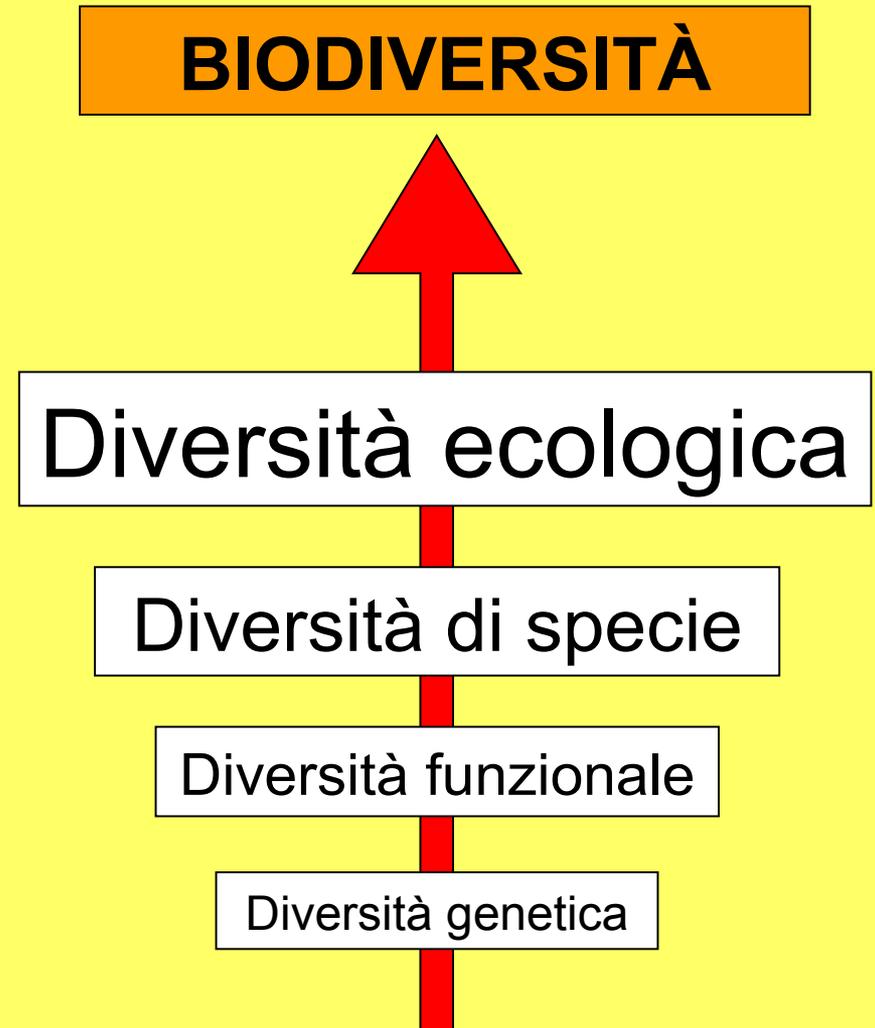
**BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*):** vettori stabili in grado di contenere ed esprimere grandi frammenti di DNA (>100kb) in *E. Coli* (Rondon *et al.*, 1999).



*Approccio Top-down*



*Approccio Bottom-up*



**PROGRAMMA DI MONITORAGGIO DELLA FERTILITÀ  
BIOLOGICA E DELLA DIVERSITÀ MICROBICA DEI SUOLI  
DEL LAZIO (2004 - 2006)**

**Letizia Pompili, Alba Silvia Mellina, Luigi Nisini, Stefano Mocali, Anna Benedetti**

***CRA – Centro di ricerca per lo studio delle relazioni tra pianta e suolo, Roma***

# **Il programma di monitoraggio**

**L.R. 01 Marzo 2000, n. 15**

**Tutela delle risorse genetiche autoctone di interesse agrario**

**congiuntamente con ARSIAL**

**(Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura del  
Lazio)**

**monitoraggio della fertilità biologica su 100 siti distribuiti sul territorio  
regionale scelti sulla base dell'importanza locale di colture arboree ed  
erbacee**

**“...per favorire, promuovere e salvaguardare gli agroecosistemi e le  
produzioni di qualità e tutelare le risorse genetiche autoctone di interesse  
agrario...” (art.1)**

# Il piano di monitoraggio



Superficie in ha delle singole province del Lazio investita a coltivazioni erbacee, legnose e foraggere (dati ISTAT aggiornati al 12 Gennaio 2005)

Tipicità delle colture presenti sul territorio laziale, in base alla provincia di appartenenza (Registri ARSIAL)

Coltura	Rieti		Roma		Frosinone		Latina		Viterbo		Totale siti per coltura
	Sup. (ha)	<u>N. siti</u>	Sup. (ha)	<u>N. siti</u>	Sup. (ha)	<u>N. siti</u>	Sup. (ha)	<u>N. siti</u>	Sup. (ha)	<u>N. siti</u>	
Vite	2645	<b>3</b>	14279	<b>5</b>	5604	<b>4</b>	6439	<b>4</b>	5183	<b>4</b>	<b>20</b>
Olivo	12071	<b>3</b>	23966	<b>5</b>	18000	<b>4</b>	12900	<b>3</b>	21040	<b>5</b>	<b>20</b>
Foraggere	66500	<b>5</b>	62400	<b>5</b>	70300	<b>5</b>	29900	<b>3</b>	5800	<b>2</b>	<b>20</b>
Frutta fresca	619	<b>1</b> (Ciliegio) <b>1</b> (Castagno)	6428	<b>4</b> (Ciliegio)			7072	<b>4</b> (Kiwi)	18571	<b>5</b> (Castagno) <b>5</b> (Nocciolo)	<b>20</b>
Erbacee	12510	<b>5</b> (Farro)	6833	<b>4</b> (Carciofo)	355 1127	<b>2</b> (Cannellino) <b>2</b> (Peperone)	8299	<b>4</b> (Carciofo)	3469	<b>3</b> (Carciofo)	<b>20</b>
<b>Totale siti per provincia</b>	<b><u>18</u></b>		<b><u>23</u></b>		<b><u>17</u></b>		<b><u>18</u></b>		<b><u>24</u></b>		<b>Totale siti 100</b>

## Lazio



## Parametri biochimici e di attività della biomassa microbica dei suoli usati per il monitoraggio

Corg – stima della concentrazione di Carbonio Organico Totale, (Springer & Klee, 1954)

Respirazione basale del Terreno – misura dell'evoluzione di C-CO<sub>2</sub> dal suolo stimata a 28 giorni (condizioni di campo) (Isermeyer, 1952)

Carbonio microbico – stima quantitativa del Carbonio della biomassa microbica, C<sub>mic</sub>, attraverso fumigazione con cloroformio per avere lisi cellulare e successiva estrazione (Vance et al., 1987)

Quoziente metabolico – qCO<sub>2</sub> (Anderson & Domsch, 1993)

Attività di respirazione specifica della biomassa microbica

Quoziente di mineralizzazione – qM (Dommergues, 1960)  
misura dell'attività totale di mineralizzazione della frazione più labile della sostanza organica da parte della biomassa microbica

## Indice di Fertilità del Suolo basato sui Parametri Biochimici

I parametri biochimici scelti sono quelli generalmente utilizzati per l'analisi e lo studio della qualità del suolo.

<u>Parametri utilizzati</u>	<u>Abbreviazione</u>	<u>Unità di misura</u>
Carbonio Organico Totale	C <sub>org</sub>	%
Respirazione basale	C <sub>bas</sub>	ppm
Carbonio microbico	C <sub>mic</sub>	ppm
Quoziente metabolico	qCO <sub>2</sub>	(10 <sup>-2</sup> ) h <sup>-1</sup>
Quoziente di mineralizzazione	qM	%

Per ciascuno dei parametri sono stati stabiliti 5 range di valori a ciascuno dei quali viene assegnato il punteggio del range a cui appartiene.

<u>Parametri utilizzati</u>	<u>Punteggio</u>				
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
Carbonio Organico Totale	<1	1 – 1,5	1,5 – 2	2 – 3	>3
Respirazione basale	<5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	>20
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

La somma algebrica dei punteggi per ciascun parametro da origine ad una scala di fertilità biologica riportata nella tabella sottostante.

$$\sum_{i=1}^N \text{Punteggio}$$

Classe di Fertilità	I	II	III	IV	V
	stanchezza allarme	stress preallarme	media	buona	alta
<b>Punteggio</b>	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25

## ESEMPIO

Ammettiamo che un suolo presenti dei risultati come di seguito riportati.

<b>S.O.</b>	<b>Cbas</b>	<b>Ccum</b>	<b>C-mic</b>	<b>q(CO<sub>2</sub>)</b>	<b>qM</b>
1,32	7,68	205,5	111,8	0,286	2,691

Possiamo associare a ciascun parametro i seguenti punteggi.

<u>Parametri analizzati</u>	<u>Punteggi assegnati</u>
Carbonio Organico Totale	2
Respirazione basale	2
Carbonio microbico	2
Quoziente metabolico	3
Quoziente di mineralizzazione	3
<b>TOTALE</b>	<b>12</b>

Il risultato ottenuto permette di assegnare a questo terreno una classe di fertilità **MEDIA**.

## Frosinone

17 siti

5 foraggiere,

4 vigneti,

4 oliveti,

2 fagiolo cannellino

2 peperone

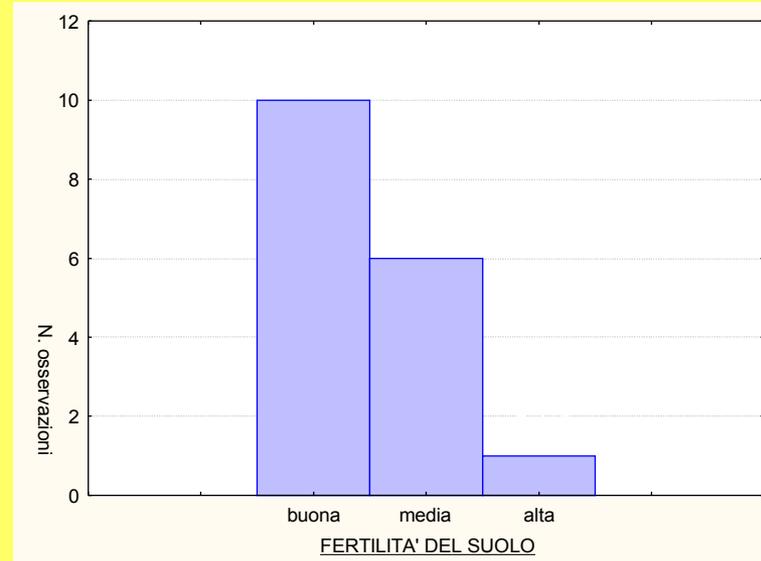
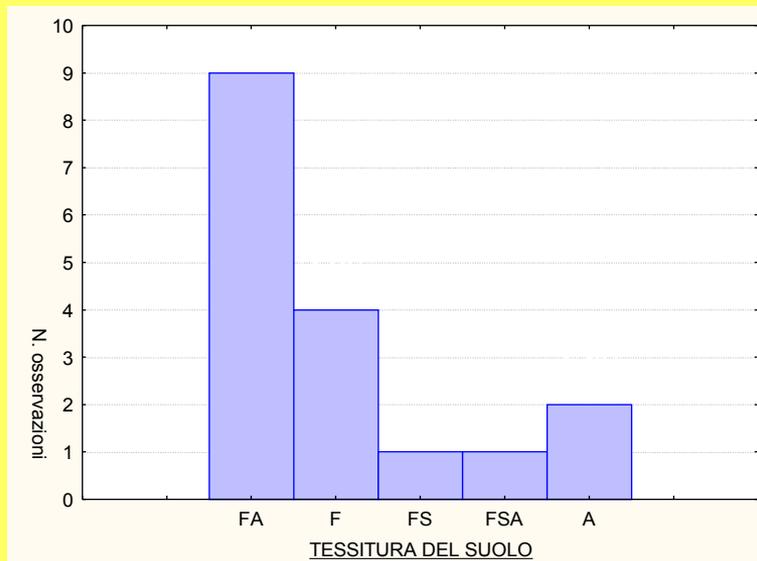
calcare totale variabile da assente, a tracce, a poco o mediamente calcareo

il pH è risultato per tutti tendenzialmente alcalino

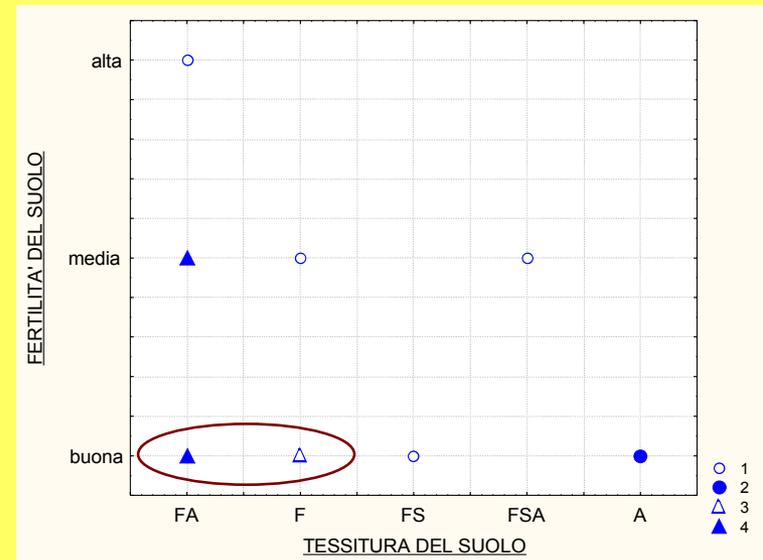
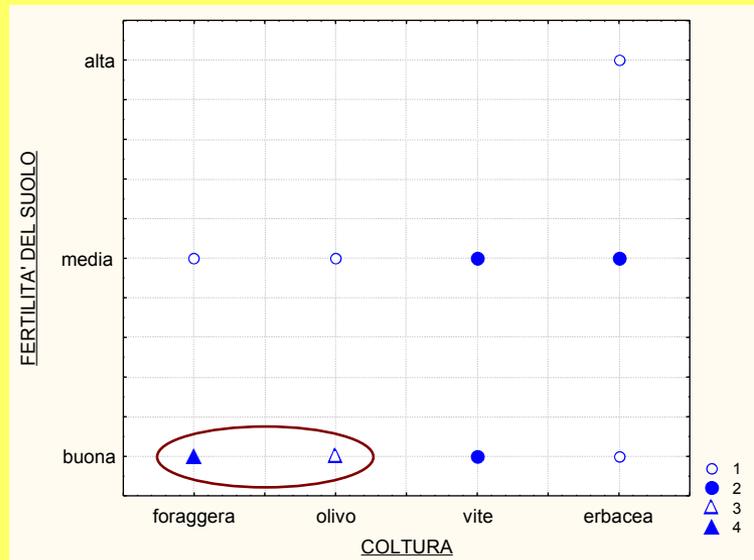
il contenuto in SO elevato

Vite e Olivo presentano ridotta attività microbica

Foraggio e Vite presentano condizioni stressanti per le popolazioni microbiche



## Frosinone



**Una fertilità biologica buona corrisponde alle colture a foraggio e olivo ed a suoli a tessitura franco-argillosa e franca.**

## Viterbo

23 siti

5 oliveti,

4 vigneti,

10 arboree (5 castagno + 5  
nociolo),

2 carciofo,

2 foraggiere

suoli non calcarei

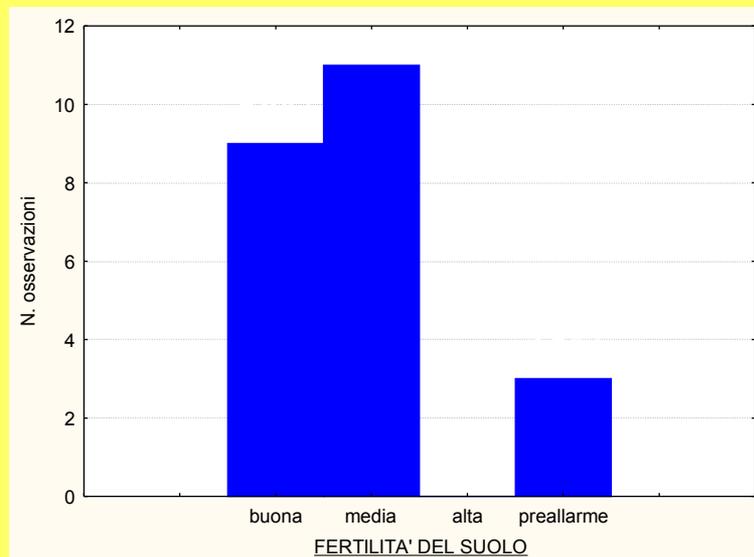
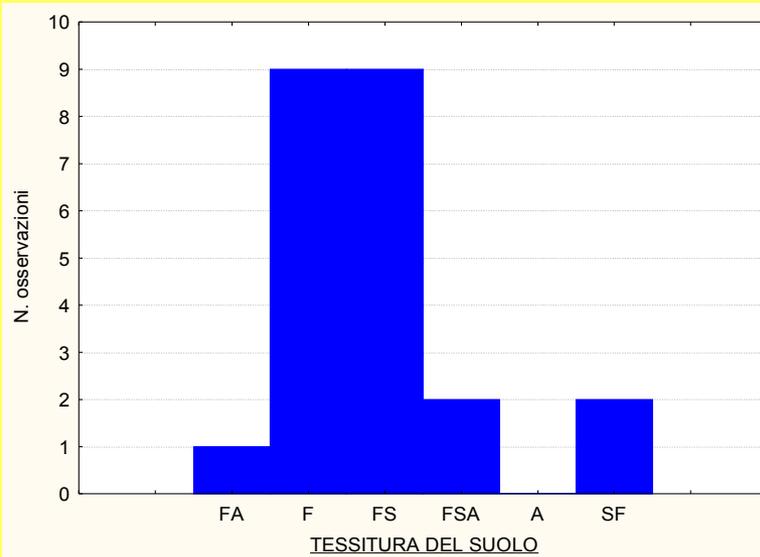
valori di pH da sub-acido a sub-alcalino

contenuto in SO mediamente elevato

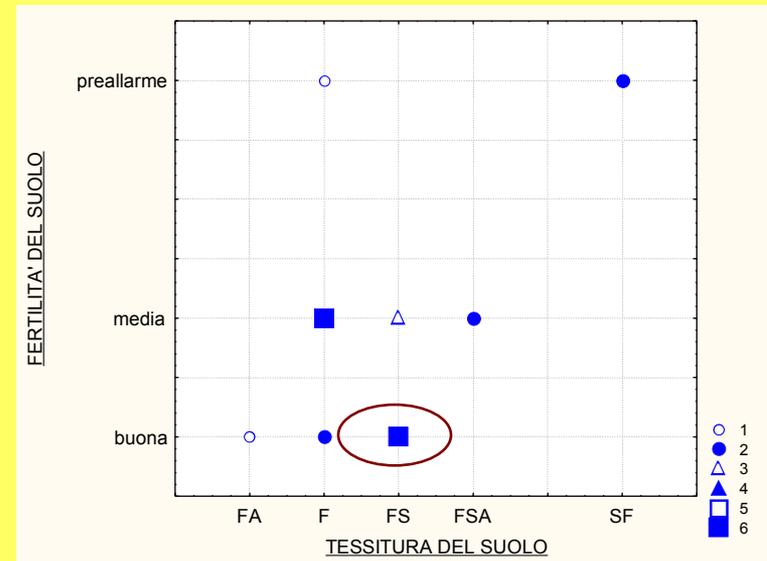
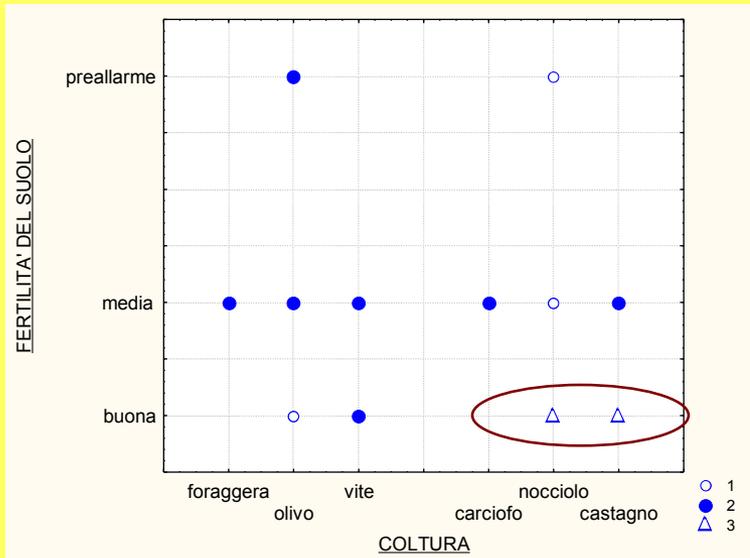
I siti a carciofo presentano ridotta attività  
microbica

alcuni siti a castagno, nociolo e vite hanno una  
spiccata attività microbica rispetto agli altri

Alcuni siti che ospitano Nociolo presentano  
condizioni stressanti per le popolazioni  
microbiche



## Viterbo



**Una fertilità biologica buona corrisponde alle colture di nocciolo e castagno ed a suoli a tessitura franco-sabbiosa. Al contrario suoli a tessitura sabbioso-franca presentano una fertilità biologica allo stato di preallarme.**

## Rieti

18 siti

5 foraggiere,

5 farro,

3 vigneti,

3 oliveti,

2 frutteti (1 castagno  
+ 1 ciliegio)

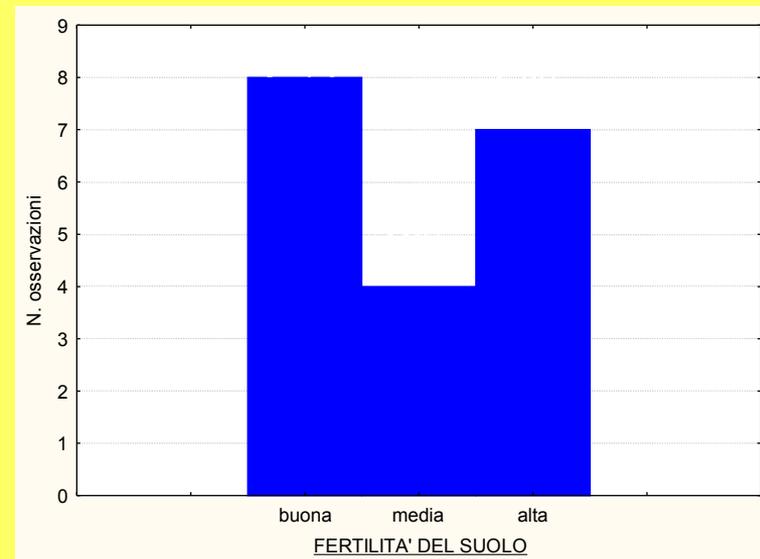
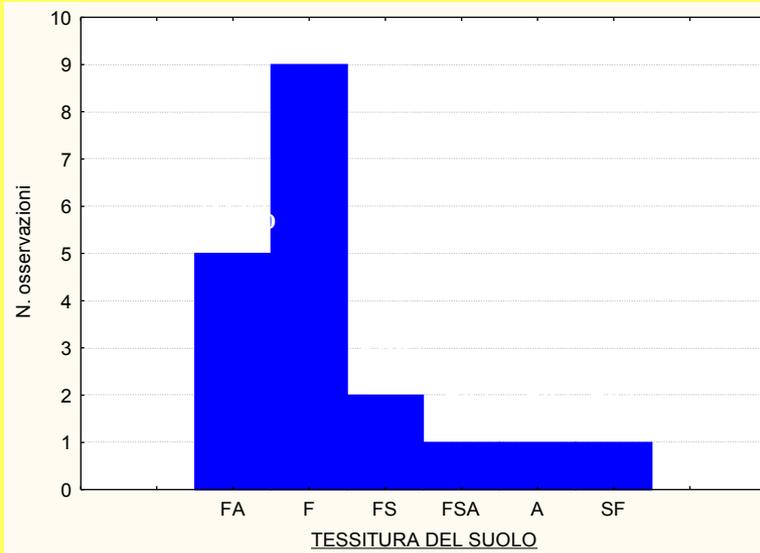
calcare assente in alcuni casi e in quantità media in altri

valori di pH da tendenzialmente acido a tendenzialmente alcalino.

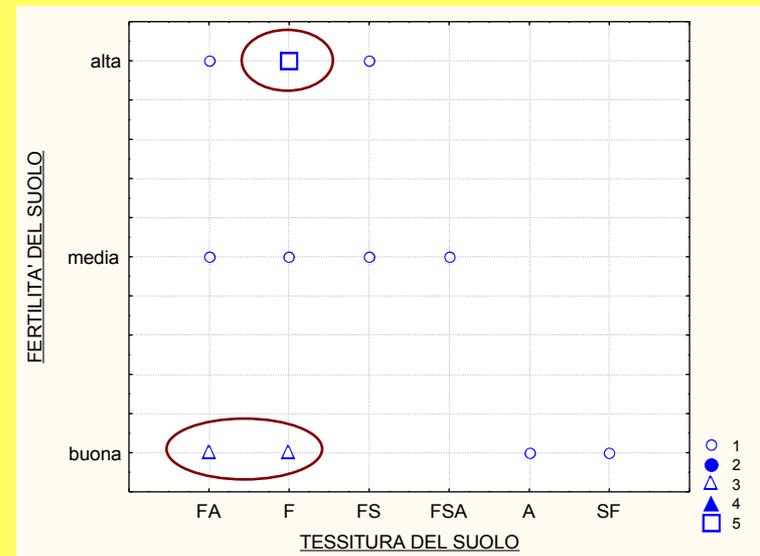
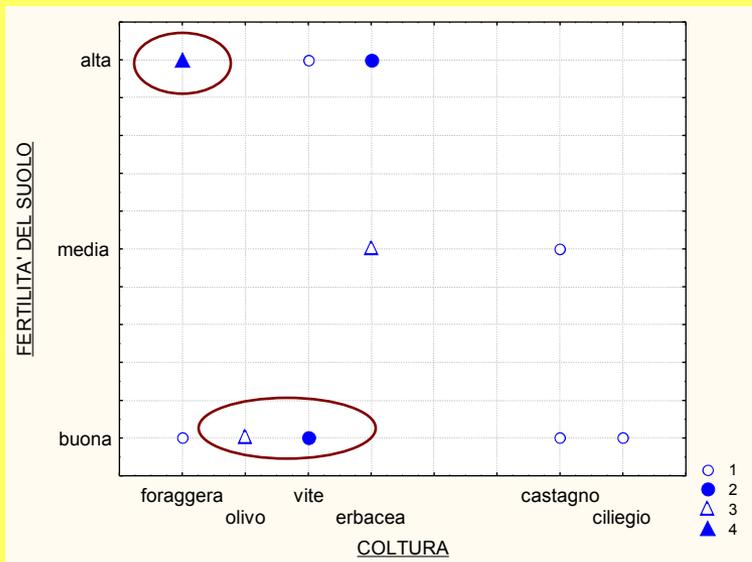
contenuto in SO elevato per tutti i siti

Castagno, Ciliegio e Olivo presentano una ridotta attività microbica

Ciliegio, Castagno e di alcune erbacee presentano una scarsa popolazione microbica in condizioni stressanti



## Rieti



**La fertilità biologica migliore si riscontra per colture del tipo olivo, vite e foraggiere, corrispondente a suoli con tessitura franco-argillosa e franca.**

## Roma 23 siti

5 vigneti,

5 oliveti,

5 foraggiere,

4 carciofo,

4 frutteti (ciliegio)

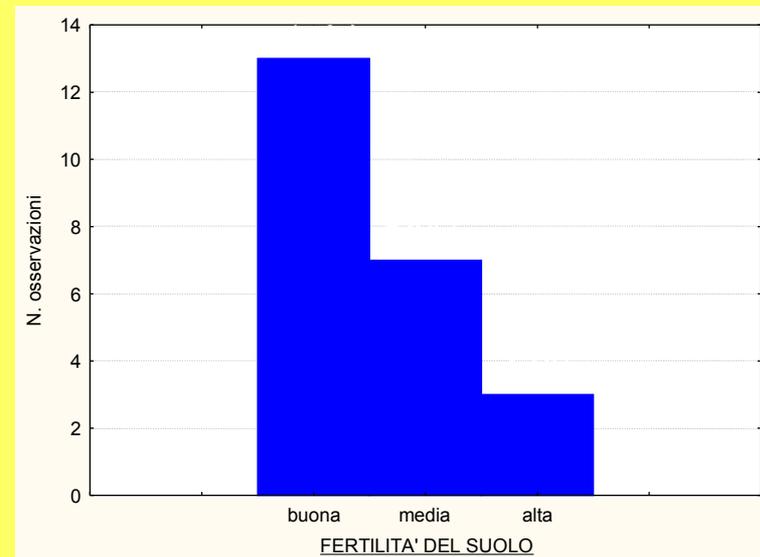
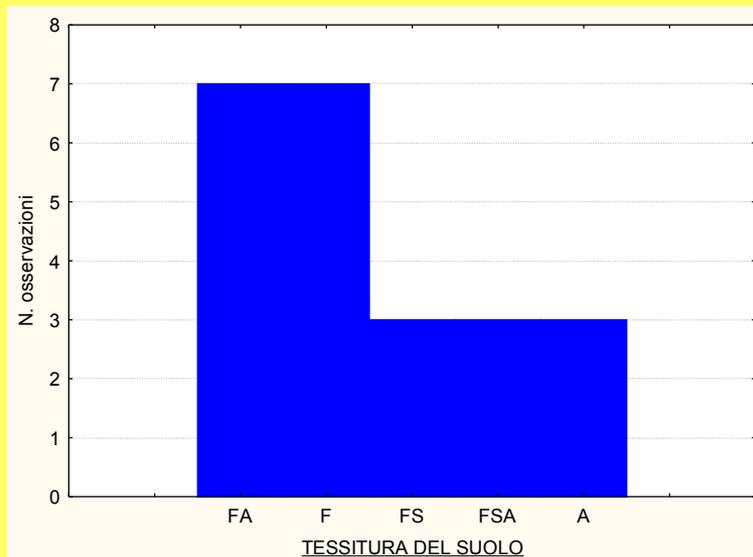
Suoli scarsamente o non calcarei

valori di pH da tendenzialmente neutro a leggermente alcalino

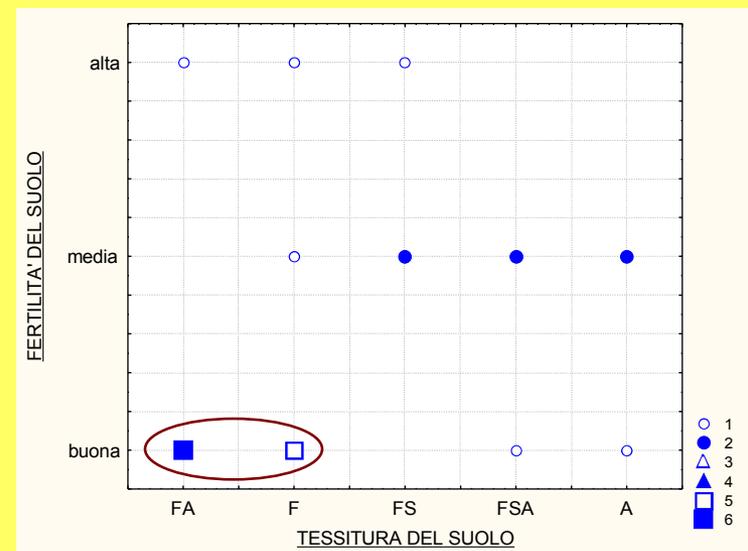
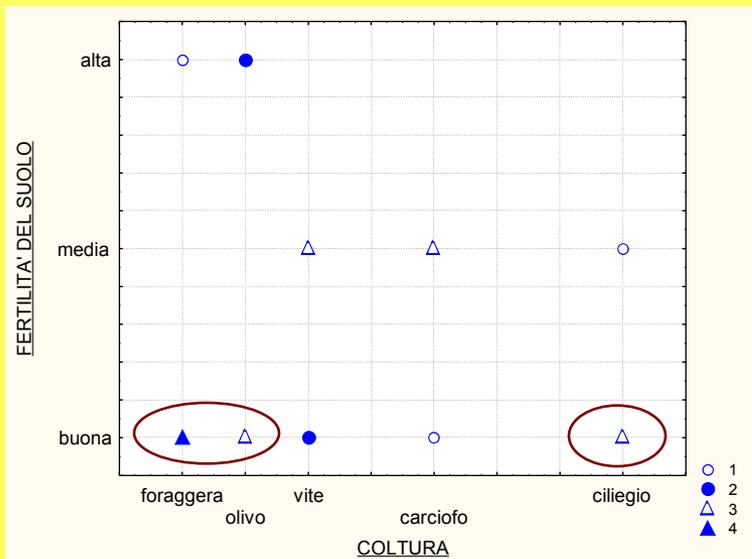
contenuto in SO mediamente elevato con alcune eccezioni

Vite, Carciofo e Ciliegio presentano ridotta attività microbica

Vite e Carciofo mostrano una possibile situazione di stress per la popolazione microbica



## Roma



**I suoli a tessitura franco-argillosa e franca, anche in questo caso presentano una buona fertilità biologica.**

**Dal punto di vista delle colture, sembrano anche in questo caso favoriti l'olivo e le foraggere oltre che il ciliegio.**

## Latina

18 siti

4 vigneti,

4 frutteti (actinidia),

4 carciofo,

3 oliveti,

3 foraggiere

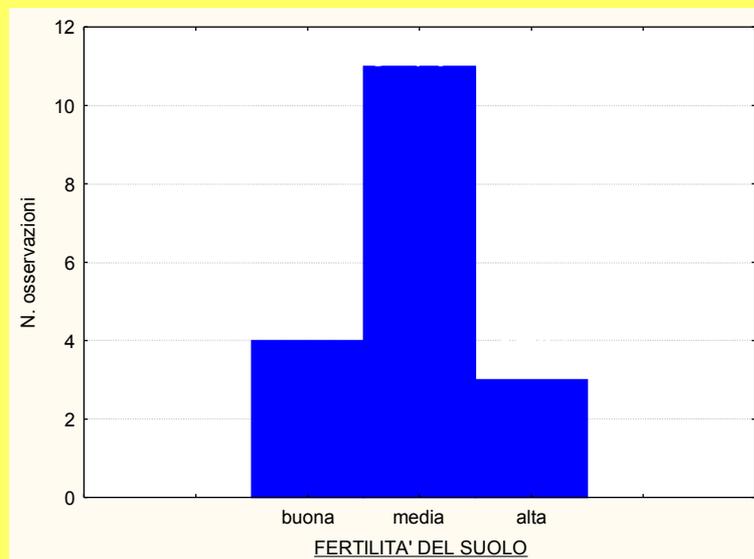
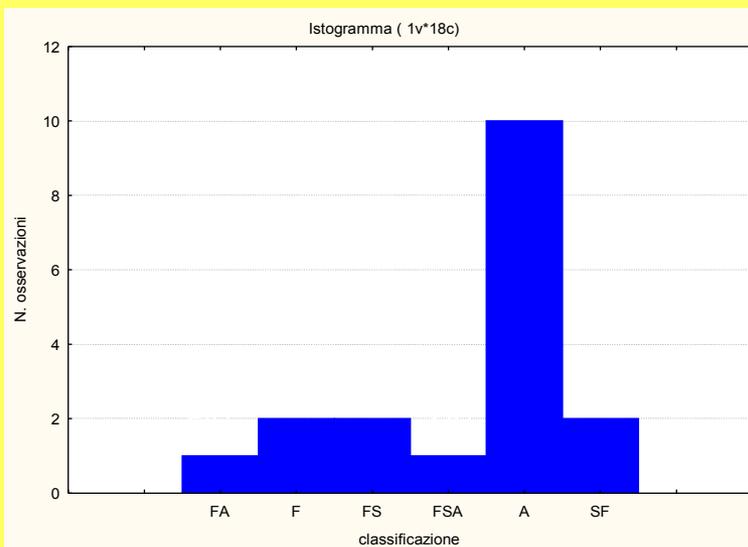
calcare assente nella maggior parte dei suoli  
gli altri sono scarsamente o mediamente calcarei

valori di pH compresi da neutro a leggermente  
alcalino unica eccezione un fortemente acido

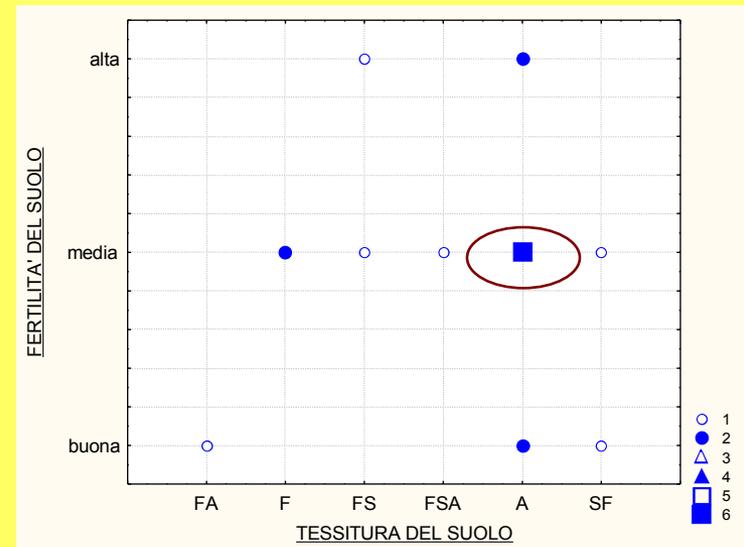
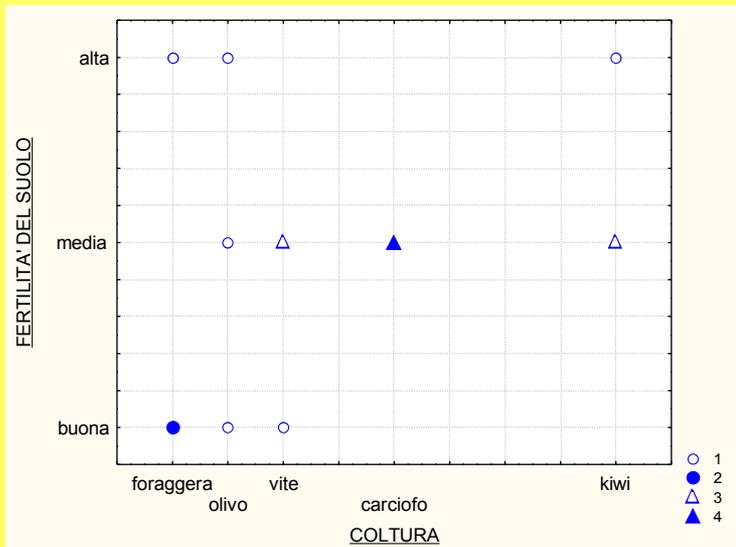
contenuto in SO mediamente elevato

Vite e Carciofo presentano una ridotta attività  
microbica

Un campione di olivo e due campioni di kiwi  
mostrano uno stato di stress metabolico



## Latina



**Non si osserva una netta preponderanza di colture corrispondenti a una buona fertilità biologica, ma a valore medio, corrispondenti a tessiture per la maggior parte di tipo argilloso.**

27 campioni di suolo  
fingerprinting molecolare tramite tecnica DGGE.

## PROCEDIMENTO

- estrazione del DNA genomico da 0,5 g della matrice suolo
- corsa elettroforetica su gel di agarosio
- verifica della resa estrattiva
- reazione a catena della DNA polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction) su frammento del gene 16s rDNA batterico usando primers specifici per la comunità eubatterica (regione V6-V8)
- corsa elettroforetica su gel di agarosio
- verifica della avvenuta amplificazione
- analisi mediante elettroforesi su gel a gradiente denaturante chiamata DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

I frammenti analizzati hanno la stessa lunghezza ma variano per la composizione della successione nucleotidica. Con la tecnica DGGE i 16s rDNA parzialmente denaturati generano una impronta molecolare chiamata “fingerprinting”.

Le “impronte” generate

analizzate con il software Gel Compare II in

Richness = numero di bande visibili (numero di specie batteriche presenti)

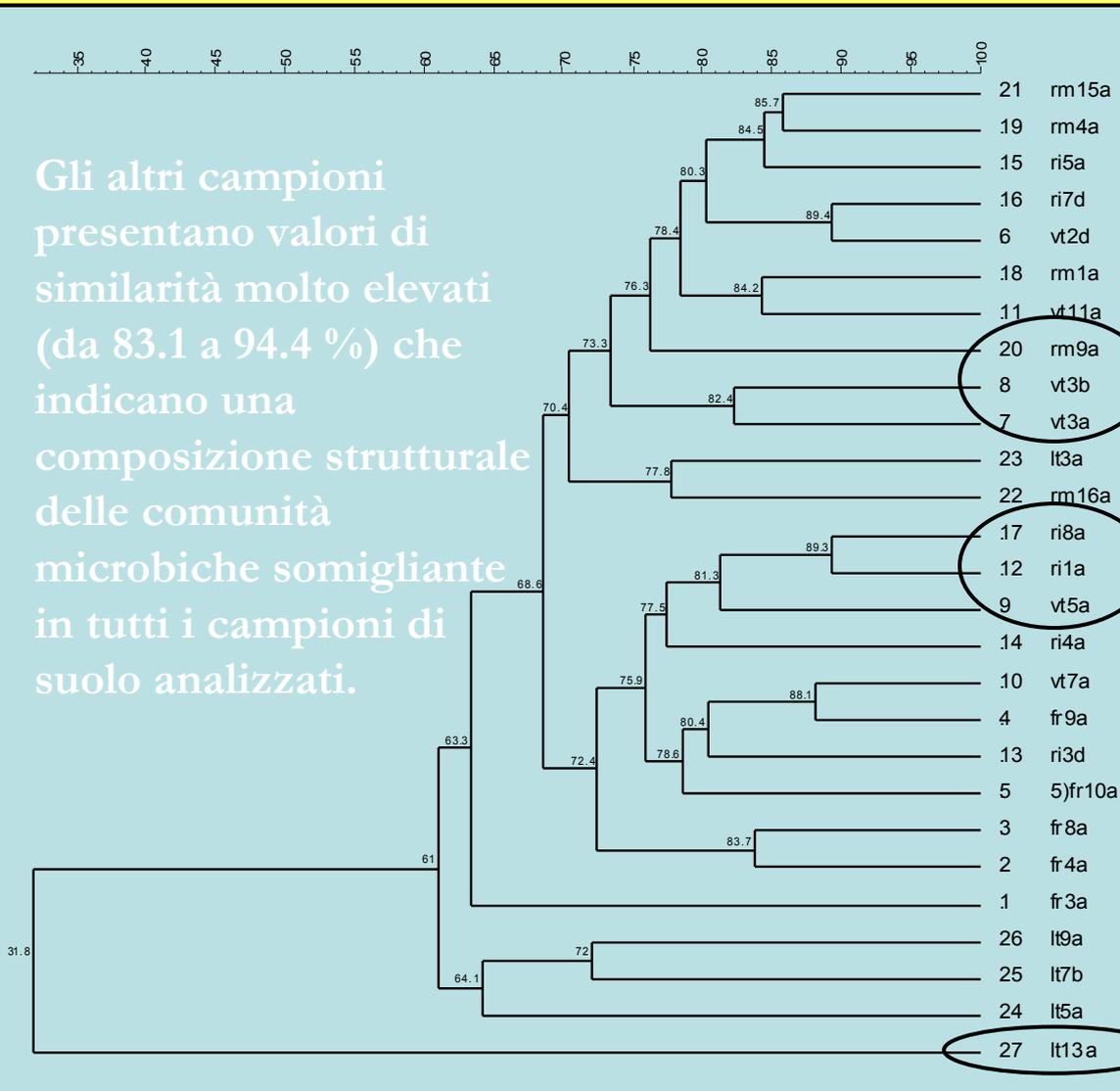
Evenness = intensità delle bande o distribuzione relativa delle singole specie

## Risultato

dendrogramma che raggruppa i differenti campioni analizzati sulla base dei livelli di similarità della comunità batterica

Dice (Td 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [D.0%-100.0%]  
 DGGE Regione Lazio 2007

Gli altri campioni presentano valori di similarità molto elevati (da 83.1 a 94.4 %) che indicano una composizione strutturale delle comunità microbiche somigliante in tutti i campioni di suolo analizzati.



carciofo Il tipo di coltura incide sulla tipologia della comunità batterica maggiormente rispetto alla diversità geografica

castagno

Tale campione si caratterizza per avere il più alto contenuto in sostanza organica ed il più basso valore di pH. Dall'analisi cluster, esso risulta avere valori di similarità assai bassi, mentre la DGGE mostra una comunità batterica atipica e carente di specie batteriche

I suoli del Lazio possono essere definiti in una condizione medio-buona di fertilità biologica. Sono state riscontrate punte di alta fertilità biologica. Inoltre sono presenti tre casi in condizione di “preallarme” nella provincia di Viterbo. Si tratta di suoli a tessitura sabbioso-franca che in qualche modo fanno attendere il risultato ottenuto, ma si consiglia comunque un approfondimento mirato.

La buona fertilità biologica dei suoli del Lazio è dovuta in massima parte (37%) alle colture di foraggiere, olivo e vite. Le altre colture determinano una fertilità biologica variabile in funzione di altri parametri in gioco, quali pH, tessitura del suolo e dunque quantità di argilla % presente.

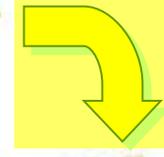
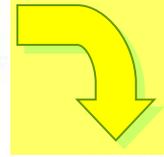
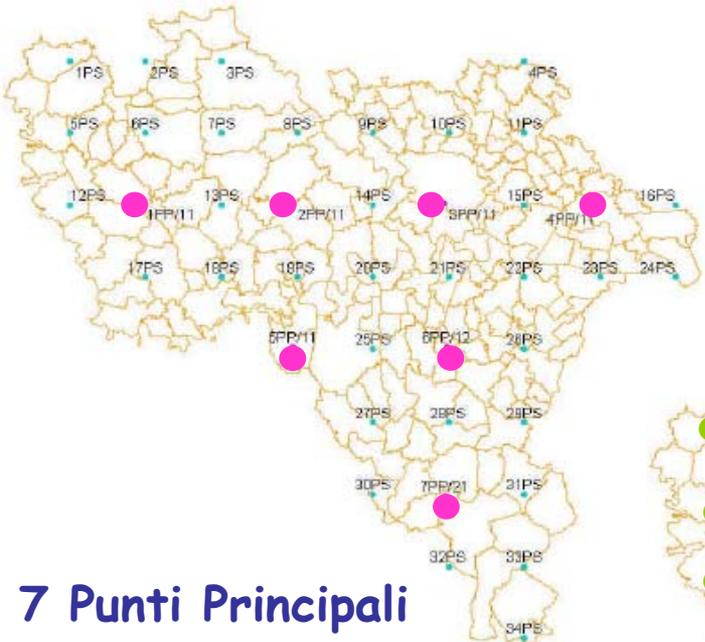
L'analisi molecolare delle comunità eubatteriche evidenzia la presenza di comunità batteriche somiglianti indipendentemente dalla provincia considerata, dalla coltura presente e dal tipo di suolo.

# Progetto BIO-BIO Biodiversity-Bioindication to evaluate soil health

Coordinato da R.M. Cenci JRC Ispra

- Tre diverse aree a differente gestione agronomica:
- Biologico
- Fertilizzazione mediante letamazione
- Fertilizzazione mediante applicazione di fanghi
- Batteri, funghi, amebe, protozoi
- Collemboli
- Vermi

# Campionamento



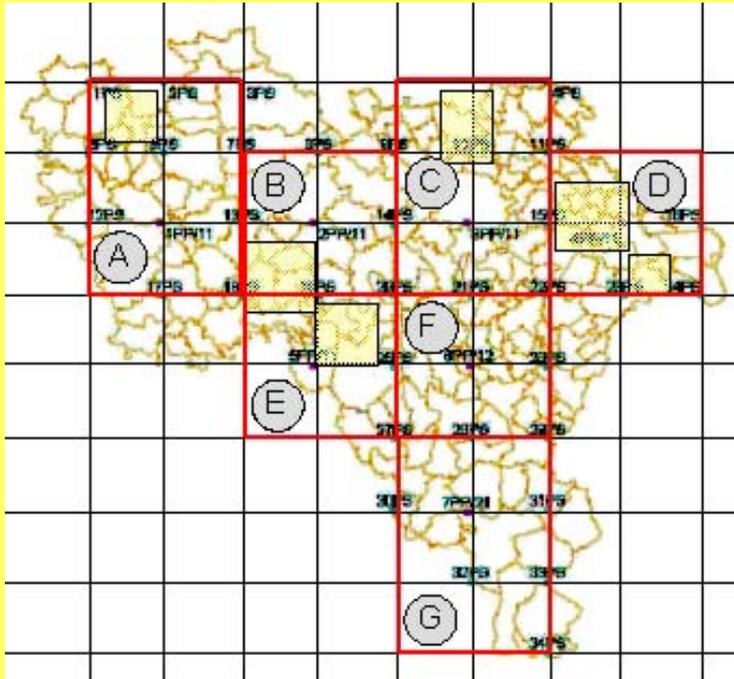
7 Punti Principali

34 Punti Secondari

116 Punti Terziari

Il suolo della Provincia di Pavia -

# Elaborazione dei risultati



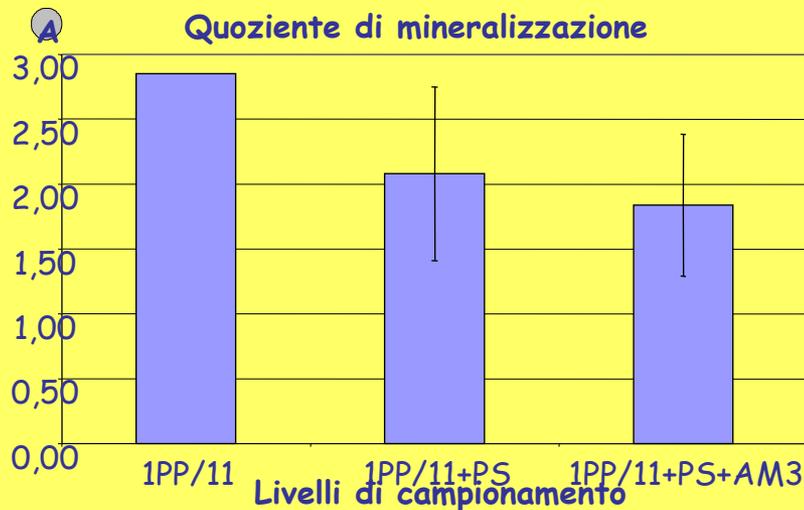
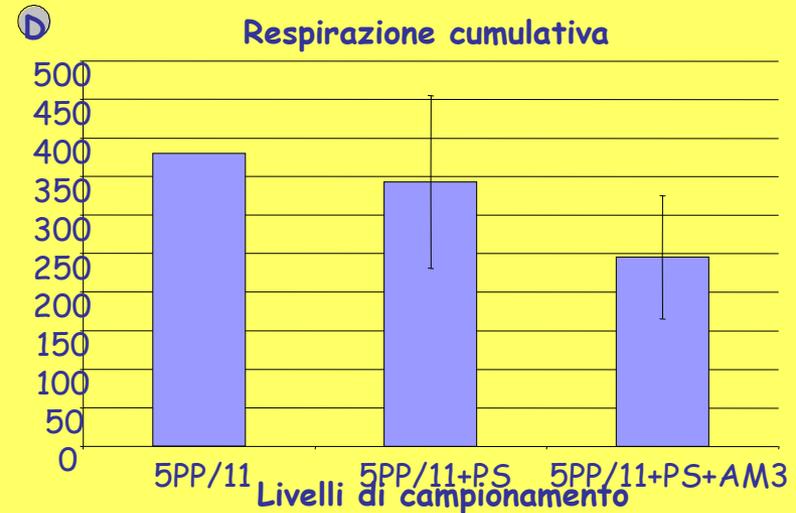
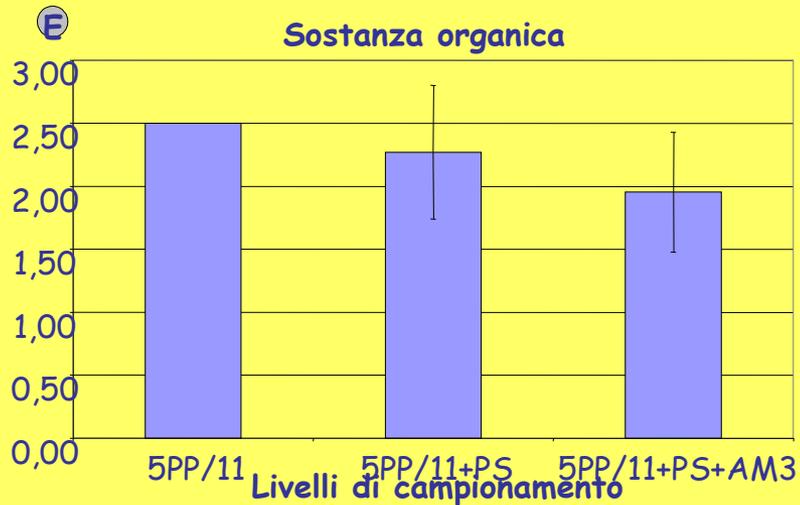
Al variare del livello di campionamento, le informazioni relative alla fertilità biologica rappresentate dall'insieme dei parametri selezionati, subiscono delle variazioni.

L'area è stata suddivisa in 7 sottoinsiemi aventi come centro i singoli punti principali (PP).

Per ciascuna sottoarea è stato stimato il valore medio e la deviazione standard sui tre livelli di campionamento:

- ) considerando i singoli valori dei punti principali (PP);
- ) considerando i valori dei punti principali e secondari (PP + PS);
- ) considerando i valori dei punti principali, secondari e terziari (PP + PS + PT).

# Elaborazione dei risultati



L'elaborazione statistica mette in evidenza l'importanza delle modalità di campionamento nello studio della fertilità biologica del suolo. La valutazione di fertilità biologica "buona" ottenuta dalle determinazioni relative ai punti principali, può rivelarsi una fertilità biologica di livello "medio", considerando l'insieme dei punti secondari e terziari.

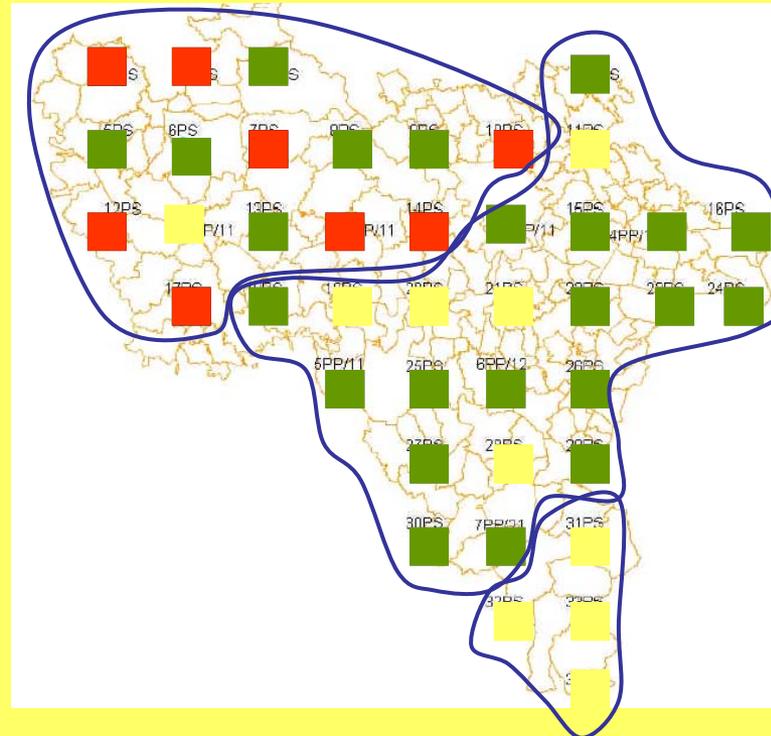
Il principale ostacolo che si incontra quando si affronta questo tipo di determinazioni, relativamente ai parametri biologici, è l'elevata variabilità del dato anche muovendosi solo di pochi cm in campo.

L'applicazione di metodologie di campionamento così dettagliate permettono, perciò, una maggiore accuratezza della valutazione di fertilità biologica.

# Conclusioni

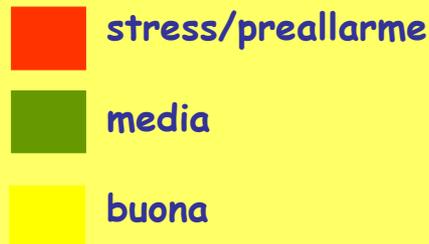
Si delineano tre zone ben distinte

Zona nord/occidentale - situazione di stress del comparto biologico del suolo.



Zona centrale -  
fertilità  
biologica media

Fertilità Biologica



Zona della punta più  
meridionale -  
fertilità biologica  
buona

# PROGETTO FINALIZZATO MiPAAF

*“Collezioni di microrganismi utili all’agricoltura”*

**“COLMIA”**

**Microrganismi**

Alimenti

Fitopatogeni

Suolo

# Cosa abbiamo già in collezione

---

- Funghi 45 (+67 da inserire e 133 da inserire dopo verifica)
- Batteri 5 + 51
- Rizobi (730 da inserire)

# Prospettive

---

- Implementazione e mantenimento delle collezioni esistenti
- Raccordo con altre collezioni di microrganismi del suolo appartenenti ad altre istituzioni
- Messa a punto di una metodologia standardizzata per la conservazione del DNA del suolo (banca metagenomica)
- Raccordo con le collezioni di germoplasma vegetale ed attivazione di collezioni di microrganismi del suolo “*in-situ*”
- Messa a punto di una metodologia standardizzata per la collezione di microrganismi del suolo “*in-situ*”

# Spendibilità dei risultati

---

- Iniziative di sostegno alla stesura della Direttiva Europea sulla conservazione del suolo che prevede tra le diverse priorità, il monitoraggio, la conservazione ed il ripristino della biodiversità del suolo

# Spendibilità dei risultati

EUROPEAN  
COMMISSION 

## Environment fact sheet:

# soil protection — a new policy for the EU



- Soil is a key, largely non-renewable and very complex natural resource and yet it is increasingly damaged by certain human practices.
- EU law does not address all the threats in a comprehensive way and not all Member States have specific legislation on soil protection.
- The European Commission has launched a global cross-EU strategy to deal with all aspects of soil protection, while taking into account the variety of situations in each country.
- Adopting the soil strategy is the first stage in the development of a proper soil policy in the European Union.

Iniziativa di sostegno alla stesura della Direttiva Europea sulla conservazione del suolo che prevede tra le diverse priorità, il monitoraggio, la conservazione ed il ripristino della biodiversità del suolo

*Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the protection of soil and amending Directive 2004/35/EC.*

# Soil protection directive: biodiversity

- Pilot areas should be created, in which
- Improve methodologies for the definition of soil biodiversity at 4 different levels.

## Hierarchical level to evaluate microbial diversity of soil

1. Characterization of soil. Biological fertility evaluation (BFI)
2. General Genetic characterization of soil (Total DNA) to correlate to environment, management, etc.
3. Single organism and specific function
4. “Actual” microbial diversity definition to compare with “Specific” microbial diversity

**Grazie per l'attenzione**

