

**PNBA – Piano Nazionale sulla biodiversità di interesse agrario**

**Gruppo Interministeriale Biodiversità Agraria  
(GIBA)**

**Gruppo di Lavoro Biodiversità Microbica**

**Coordinatore: Prof. Gianlugi Cardinali**

*Dipartimento Biologia Applicata- Microbiologia*

*Università degli Studi di Perugia*

**Componenti: Dott.ssa Anna Benedetti**

*CRA-Centro di Ricerca per lo studio*

*delle Relazioni tra Pianta e Suolo*

## **Indice**

<b>Presentazione</b>	4
<b>Introduzione</b>	4
<b>Capitolo I - Concetto di specie</b>	16
I.1 – Comparazione critica dei concetti di specie attualmente applicati o applicabili ai gruppi microbici di interesse agrario. Scelta del concetto più appropriato per gli scopi del Piano Nazionale sulla Biodiversità di Interesse Agrario	16
I.2 – Raccolta delle definizioni di carattere tassonomico, genetico filogenetico e microbiologico che siano importanti per gli studi di biodiversità microbica.	31
<b>Capitolo II – Marcatori</b>	38
II.1 – Raccolta dei possibili “marcatori pratici” applicabili nei rilevamenti di biodiversità da parte di personale non specializzato.	38
II.1.A Marcatori Preliminari	38
II.1.B Marcatori Obiettivi	45
II.2 – Suddivisione dei microrganismi in macro-gruppi omogenei	53
II.3 – Definizione dei marcatori fenotipici applicabili nei rilevamenti di biodiversità microbica.	56
II .4 – Definizione dei marcatori molecolari	61
<b>Capitolo III - Metodologie (Protocolli standard)</b>	63
III.1 - Individuazione di protocolli standard per il prelievo e l’isolamento	63
III.1.1. SISTEMI DI PRELIEVO	66
III.1.2. SISTEMI DI MANTENIMENTO PRELIMNARE DEL CAMPIONE	76
III.1.3 SISTEMI DI ISOLAMENTO E CONTA VITALE	77
III.1.4 SISTEMI DI MANTENIMENTO DELLE COLTURE ISOLATE	86
III.2 - Individuazione di protocolli standard di identificazione per macro-gruppi microbici	89
III.2.1. IDENTIFICAZIONE POLIFASICA MORFO-FISIOLOGICA	89
III.2.2 IDENTIFICAZIONE MONOFASICA MOLECOLARE	91
III.3 - Individuazione di protocolli standard di caratterizzazione dei raggruppamenti sub specifici	93

III.3.1 A CARATTERIZZAZIONE FISIOLOGICA	93
III.3.2 B CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE	94
<b>Capitolo IV</b>	99
Linee guida per la conservazione dei microrganismi	
IV.1 Analisi critica dei sistemi di conservazione microbica	99
IV.2 Ottimizzazione dei protocolli di conservazione in collezione ( <i>ex situ</i> ), in factory e <i>in situ</i>	103
– Ottimizzazione dei protocolli di conservazione in collezione <i>in situ</i> ed <i>ex situ</i> dei microrganismi alimentari	103
– Ottimizzazione dei protocolli di conservazione in collezione <i>in situ</i> ed <i>ex situ</i> dei microrganismi del suolo	105
- Conservazione dei microrganismi del suolo on farm	106
<b>Capitolo V - Definizione di rischio di estinzione e di erosione genetica</b>	111
V.1 Analisi bibliografica del rischio di fenomeni di estinzione, erosione e sostituzione	111
V.2 Sistemi di valutazione del rischio di estinzione, erosione e sostituzione	116
<b>Conclusioni</b>	131
<b>Capitolo VI – Esempi pratici</b>	136
VI.1 Caratterizzazione di lieviti di alimenti tipici	136
VI.2 Erosione microbica – fumigazione con bromuro di metile	149
VI.3 Erosione microbica – monocoltura di tabacco	164

## **Presentazione**

### **Linee guida per la conservazione della biodiversità microbica di interesse agrario**

Il presente documento ha come obiettivo principale quello di fornire linee guida alla conservazione della biodiversità microbica di interesse agrario per i due comparti principali inerenti gli alimenti e la fertilità del suolo.

Il presente documento, su decisione del GIBA verterà unicamente sui microrganismi utili escludendo completamente tutti gli aspetti fitosanitari e patologici per i quali verranno elaborate linee guida separate e costituiranno oggetto di lavoro futuro.

Si tratta di un documento di rigore scientifico, ma operativo, per consentire agli addetti del settore di predisporre azioni sul territorio volte alla conservazione delle risorse genetiche microbiche. In campo agrario la conservazione delle risorse genetiche microbiche investe aspetti fondamentali nella conservazione della fertilità del suolo senza la quale nulla potrebbe essere coltivato e conservato. La fertilità del suolo rappresenta il nodo centrale della conservazione della biodiversità e della vita dell'intero pianeta.

Conservare i microrganismi di rilievo alimentare significa proteggere i prodotti tipici nazionali e tutta la tradizione enogastronomica italiana.

Nel documento si forniscono strumenti operativi gerarchici quali marcatori morfologici o marcatori pratici, fenotipici e molecolari. Vengono forniti protocolli operativi per la conservazione in situ ed in factory, nonché per il campionamento e la conservazione ex situ .

Il documento infine presenta dei casi studio quale esempio applicativo dei protocolli suggeriti.

## **Introduzione**

### **Conservazione delle risorse genetiche microbiche di interesse agrario**

La CBD descrive la biodiversità agricola come “le componenti della diversità biologica relative al cibo e all'agricoltura e tutte le componenti della diversità biologica che costituiscono gli ecosistemi agricoli, anche chiamati agroecosistemi. Le varietà e la variabilità degli animali, delle piante e dei microrganismi a livello genetico, di specie e di ecosistema, necessari a mantenere le funzioni chiave degli agroecosistemi, la loro struttura ed i loro processi”.

Nel caso dei microrganismi di interesse agrario essi svolgono un ruolo chiave sia nella produzione di cibo (fertilità del suolo, nutrizione delle colture, biocontrollo, biofertilizzazione) che nei riguardi della conservazione delle derrate alimentari (tossine e patogeni), che nella produzione di alimenti trasformati (latte e formaggi, vino, olio, ecc), pertanto la loro presenza e la loro biodiversità è funzionale al sostentamento degli organismi viventi sulla terra.

Ai microrganismi del suolo è deputata la conservazione dei servizi ecosistemici che si svolgono nel suolo (Bunning and Jimenez, 2003). Tra i principali troviamo:

- ☐ Decomposizione e ciclo della sostanza organica ad opera dei decompositori primari. Batteri, funghi ed attinomiceti.
- ☐ Regolazione della disponibilità degli elementi nutritivi e loro asportazione da parte delle colture, imputabile a funghi micorrizici, attinomiceti, batteri azoto fissatori, batteri che mineralizzano l'azoto, ecc.

- ☐ Controllo dei patogeni e difesa. Tra cui possiamo ricordare quali biopesticidi i Batteri (*Bacillus thuringensis*, *Pseudomonas fluorescens*, ecc.) funghi (*Tricoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, ecc.)
- ☐ Mantenimento della struttura del suolo e regolazione dei processi idrologici
- ☐ Scambi gassosi e sequestro del carbonio
- ☐ Disinquinamento
- ☐ Sviluppo delle piante

I microrganismi, rispetto ad altri organismi viventi presentano dei vantaggi molto importanti nel mantenimento dei diversi servizi ecosistemici in cui vengono ad essere coinvolti riconducibile proprio alla loro biodiversità e precisamente: **Abilità** (funzione) Ciascun organismo ha una o più di una abilità

a svolgere una o più di una funzione, **Interazione** molti organismi hanno la capacità di influenzare direttamente o indirettamente l'azione di altri organismi (più complesso risulterà il network più adattabilità svilupperà il sistema e maggiormente resiliente a pressioni esterne), **Ridondanza** in termini ecologici la ridondanza è una proprietà importantissima che consente la conservazione della funzione e l'adattabilità a pressioni esterne.

E' stato anche attribuito un valore economico di diversi servizi ecosistemici garantiti dal biota suolo (Pimentel et al. 1997), di cui se ne forniscono solo alcuni esempi:

Attività	Biodiversità del suolo coinvolta	Beneficio economico mondiale (miliardi /\$/a)
Riciclo rifiuti	Batteri, funghi, attinomiceti	760
Formazione di suolo	Microrganismi, vermi, mes.	25
Azotofissazione	Organismi diazotrofici	90
Biorecupero inquinanti	Microrganismi	121
Biotecnologie	Microrganismi	6
Difesa	Microrganismi	160

La **Strategia nazionale per la biodiversità** (7 ottobre 2010) pone tre obiettivi principali per la conservazione della biodiversità il **primo** dei quali è massimizzare la salvaguardia e il recupero

della biodiversità e dei servizi ecosistemici al fine di garantire il ruolo chiave per la vita sulla Terra e il benessere umano. Il **secondo** vuole favorire l'adattamento delle specie e degli ecosistemi naturali e semi-naturali ai cambiamenti climatici e adottare le opportune misure di mitigazione, mentre il **terzo** integrare la conservazione della biodiversità nelle politiche economiche e di settore.

### **La biodiversità microbica**

Nello studio della diversità biologica (biodiversità) le teorie ecologiche sono sempre state sviluppate essenzialmente per gli ecosistemi presenti sulla superficie del suolo, trascurando per lungo tempo tutte quelle forme di vita che sono presenti all'interno di esso, in particolare i microrganismi, e che rappresentano una enorme quantità di "vita invisibile" di fondamentale importanza per l'intera vita sulla terra (Wardle and Giller, 1996). Infatti la microflora rappresenta la parte più rilevante della biomassa del suolo, ed è quella che maggiormente influisce sulle sue proprietà biologiche, regolando tutti i processi biochimici che ne determinano le proprietà nutrizionali (Bloem et al., 2003). Le diverse specie di microrganismi presenti nel suolo hanno, infatti, ruoli prioritari nelle trasformazioni dell'energia e nei processi biogeochimici, intervenendo nella decomposizione del materiale organico attraverso processi biodegradativi e nel riciclo di elementi essenziali quali carbonio, fosforo, azoto ed altri; in tal modo portano a termine specifiche reazioni di ossido-riduzione che permettono agli elementi di rendersi così disponibili in forme utilizzabili soprattutto dalle piante (Alexander, 1977).

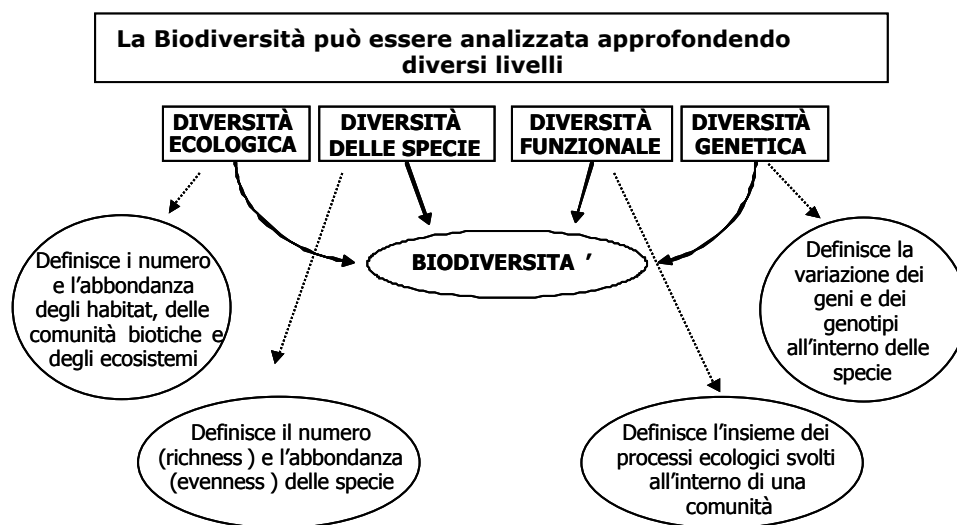
Il numero dei microrganismi presenti nel suolo e le relative biomasse variano enormemente sia all'interno di suoli differenti che in relazione alle specie vegetali e agli altri organismi presenti. La diversità dei microrganismi all'interno di un ecosistema è quindi un elemento chiave anche per il mantenimento in uno stato qualitativamente salutare del suolo agrario (Borneman, 1996).

Perché è così difficile definire e soprattutto "misurare" la diversità microbica del suolo? Perché nonostante le comunità microbiche del suolo siano il punto focale di molte funzioni, in passato - prima della diffusione delle moderne biotecnologie - è stato difficile definire il concetto di "diversità" per i microrganismi e attribuire alle diverse popolazioni microbiche la corrispondente funzione? I motivi sono molteplici, basti pensare alla definizione classica di diversità biologica e la sua suddivisione in diversità "ecosistemica, di specie e genetica" attribuita ad animali e piante; essa può essere estesa anche ai microrganismi del suolo, ad eccezione però della definizione di diversità di specie in quanto non applicabile ad organismi che si riproducono per via asessuata come batteri e virus. La diversità microbica è quindi comunemente definita in termini di richness, ovvero il numero degli individui appartenenti a diversi "gruppi" detti taxa, e di evenness cioè alla loro distribuzione all'interno dei taxa stessi (Atlas e Bartha 1998).

Inoltre lo studio dei microrganismi richiede necessariamente strumenti e metodologie differenti rispetto a quelli utilizzati per lo studio degli organismi superiori. E' infatti relativamente semplice contare e catalogare piante ed animali sulla base di parametri facilmente identificabili senza bisogno di utilizzare alcuna strumentazione. Ben più complicato diventa invece osservare e catalogare migliaia di organismi che, nonostante il loro elevatissimo numero, non si vedono a occhio nudo (le dimensioni medie di un batterio sono infatti di circa un milionesimo di metro) e il loro studio richiede l'utilizzo di strumenti e tecnologie sofisticate. Con tali strumenti è stato possibile stimare la presenza di circa un miliardo di batteri per grammo di suolo, suddivisi in svariate migliaia di taxa differenti (Torsvik et al., 1990), ma la maggior parte di questi microrganismi rimane ancora sconosciuto. Utilizzando tecniche di microscopia, infatti, è stato dimostrato che solo l'1% del

numero totale delle cellule batteriche presenti in campioni di suolo può essere coltivato sui terreni di coltura di laboratorio e successivamente caratterizzato (Torsvik et al., 1996), lasciando quindi ancora aperta la grande sfida di mettere in relazione la funzione con l'individuo.

I microrganismi presenti nel suolo si possono comunque suddividere in batteri, archea, funghi, lieviti, microalghe (microflora) e protozoi (microfauna) (Metting, 1993). L'insieme delle cellule di uno stesso tipo, che siano batteriche o meno, che risiedono in un singolo habitat formano una popolazione e insiemi di popolazioni interagiscono per formare una comunità (Boyd, 1992). Le comunità microbiche interagiscono con le comunità di macro-organismi e con l'ambiente definendo un ecosistema. La composizione delle comunità (cioè l'insieme delle specie microbiche presenti in un dato ambiente) può variare nel tempo in conseguenza dei cambiamenti che si verificano nel microambiente o per azione dei microrganismi che ne fanno parte (o di quelli che vi vengono immessi) e/o a causa di variazioni climatiche, topologiche, biochimiche e antropologiche. Inoltre molti microrganismi possono mantenere la medesima composizione all'interno di una comunità, ma modificare alcuni processi metabolici con conseguenze a livello funzionale ed ecologico. Ecco che si deve parlare anche di "diversità funzionale" dei microrganismi del suolo (Figura 1). Questa visione comporta anche una correlazione degli individui alla loro funzione, associando lo studio della singola cellula con quelli genomici e proteomici del suolo. Ai microrganismi del suolo vengono perciò applicate anche le più moderne teorie evoluzionistiche che correlano la variabilità e le capacità adattative che consentono al patrimonio genetico delle singole specie di evolversi progressivamente e quindi sopravvivere ai cambiamenti che possono intervenire nell'ambiente (Ohtonen et al., 1997).



**Figura 1** – Differenti aspetti della biodiversità

La biodiversità dei microrganismi del suolo, in virtù della varietà dei processi chimico-metabolici coinvolti, ha perciò un ruolo importante nel mantenere gli ecosistemi naturali in uno stato funzionalmente efficiente. L'equilibrio che si instaura nell'ecosistema microbico del suolo, dovuto alla stabilizzazione delle interrelazioni funzionali tra i vari microrganismi, si riflette positivamente sulle piante e, conseguentemente, sulla comunità animale sovrastante. L'agricoltura intensiva ad

esempio, basata sulle monocolture e l'utilizzo di pesticidi ed erbicidi, può influire sulla biodiversità del suolo ed in particolare sulla biodiversità dell'ecosistema rizosferico (intorno alle radici delle piante), alterando gli equilibri strutturali della comunità microbica presenti e la composizione delle varie popolazioni che compongono tale comunità (Bolton et al., 1985; Doran, 1980; Ramsay et al., 1986).

La composizione e la struttura delle comunità microbiche nel suolo dipendono, oltre che dalle interazioni tra le singole specie presenti, anche – e soprattutto - dalla natura chimico-fisica del terreno. Infatti, la struttura fisica del suolo, l'umidità, il pH, la temperatura e i nutrienti presenti, influenzano la vita microbica e selezionano gli organismi più adatti (Garbeva et al., 2004). E' stato osservato che le dimensioni delle particelle di suolo 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). La composizione del suolo rappresenta quindi uno dei principali fattori che influenzano significativamente la comunità microbica a livello sia interspecifico sia intraspecifico (McCaig et al., 2001; Girvan et al., 2003), agendo sia sulla densità microbica che sulla struttura della comunità microbica rizosferica (Chiarini et al., 1998) ed è responsabile della diversità fenotipica di popolazioni rizobatteriche (Latour et al., 1996). I cambiamenti nella composizione microbica del suolo sono quindi il punto cruciale del mantenimento delle funzioni vitali del suolo. Nannipieri e collaboratori in una recente review hanno evidenziato le relazioni esistenti tra diversità microbica e funzioni del suolo (Nannipieri et al., 2003).

A livello di landscape la diversità può essere descritta con differenti gradi di risoluzione. Whittaker (1972) propone di distinguere la diversità delle specie in funzione dei diversi habitat ( $\alpha$ -diversità), la distribuzione lungo gradienti di habitat ( $\beta$ -diversità), come gli orizzonti di un profilo di suolo, e la ricchezza di specie in un determinato habitat ( $\gamma$ -diversità). Questo tipo di catalogazione può essere applicato anche alla diversità microbica del suolo

Comunque il "soil biota", termine praticamente in traducibile che sta ad indicare l'intera comunità microbica vivente nel suolo e che esprime le funzioni vitali del suolo quasi a rappresentarlo come un unico organismo vivente, è caratterizzato anche da una significativa diversità spaziale con macroscopiche differenze tra suolo rizosferico e non rizosferico, tra macropori e micropori, tra diversi orizzonti lungo il profilo, ecc. Inoltre convivono e si sovrappongono nel suolo una serie di microhabitat come ad esempio la rizosfera, il rizopiano, la residuosfera, ecc. ciascuno dei quali può essere studiato e caratterizzato come una entità a se stante, ma al contempo è parte integrante della diversità microbica globale che caratterizza il "soil biota".

Numerosi sono i fattori noti che possono interagire con il biota come ad esempio condizioni di eterogeneità spaziale e temporale (trattenuta d'acqua, presenza di nutrienti, aggregazione, composizione granulometrica, ecc.), nonché fattori negativi di stress o positivi che vanno direttamente ad interagire con il potenziamento della stabilità, resilienza e resistenza agli stress ed in ultima analisi con la produttività delle specie vegetali. Tuttavia è stato osservato che la diversità microbica del suolo dipende essenzialmente da fattori diversi rispetto a quelli che influenzano la diversità degli eucarioti superiori. Inoltre da tale studio, condotto su 98 suoli diversi provenienti da tutto il mondo, emerge che il parametro che influenza maggiormente la diversità del suolo è il pH (Fierer and Jackson, 2006).

Nonostante i fattori ambientali e la tipologia di suolo influenzino la diversità microbica del suolo (Girvan et al., 2003), spesso è la tipologia di pratica agricola utilizzata o il tipo di trattamento



applicato che possono determinare rilevanti alterazioni della biodiversità (Gomez et al., 2006) con conseguenze che talvolta sono difficili – se non impossibili – da recuperare (Mocali et al., 2007).

### **Diversità biologica e stabilità ecosistemica**

Intorno agli anni '50 si è sviluppata la teoria secondo la quale i concetti di diversità biologica e stabilità ecosistemica sono direttamente relazionate per cui la fluttuazione delle popolazioni fornisce una misura della stabilità dell'ecosistema. MacArthur ha ipotizzato che la stabilità di una comunità microbica dipende sempre dalle reti trofiche del sistema piuttosto che da fenomeni di autoregolazione da parte di certe specie. Secondo questa ipotesi in un ecosistema dotato di numerose vie metaboliche ed energetiche l'alterazione di una specie determina un effetto minore sulle altre specie presenti di quanto potrebbe causare la medesima alterazione a carico di una specie di un ecosistema dotato di una scarsa rete energetica. Tuttavia ancora oggi, a distanza di cinquant'anni, ancora non si dispone di evidenze sperimentali a riguardo.

Sulla base del modello proposto da MacArthur sono nate numerose teorie ecologiche per spiegare la relazione tra la biodiversità e la stabilità o la produttività di un suolo (Lynch et al., 2004). Una di queste è la “ipotesi dell'eterogeneità delle risorse” (Resource heterogeneity hypothesis – RHH) proposta da Tilman (1982): essa parte dal presupposto che un suolo uniformemente arido avrà una bassa biodiversità. All'aumentare della fertilità del suolo, aumenteranno anche la distribuzione e la diversità delle risorse nutrizionali determinando, di conseguenza, un incremento della biodiversità e della produttività. Ad un certo punto però la tendenza si inverte e ad una elevata fertilità del suolo corrisponde un abbattimento della eterogeneità delle risorse e quindi della biodiversità. Questo fenomeno è dovuto al fatto che, all'aumentare della fertilità, il suolo si avvicina sempre di più ad un plateau di nutrienti che saranno uniformemente distribuiti su tutto il suolo, selezionando così quei microrganismi che meglio si adattano a quelle condizioni.

Alla luce di quanto detto finora, molti autori ritengono quasi più importante la distribuzione della biodiversità nel suolo piuttosto che una sua semplice “misura” (Curtis and Sloan, 2005). Ad esempio Gans e collaboratori (2005) ritengono che sia più utile avere una mappa “grezza” della diversità microbica totale del suolo anziché una descrizione dettagliata di una piccola parte di essa, allo stesso modo in cui un esploratore troverebbe più utile una mappa di una regione, anche se semplice ed approssimativa, piuttosto che la descrizione dettagliata di un picco.

Quanto detto deve far riflettere su quali siano le problematiche legate allo studio della diversità microbica del suolo e alla sua distribuzione.

### **Diversità microbica del suolo e agricoltura: Biodiversità e Agrobiodiversità**

Il terreno naturale è un sistema ecologico aperto, che riceve e perde energia. Le modificazioni energetiche a cui va incontro sono determinate dalla nutrizione e dalla respirazione delle popolazioni microbiche, dal trasferimento e circolazione ciclica degli elementi, dalla sintesi e degradazione della sostanza organica.

Si può affermare che l'equilibrio del suolo naturale, cioè non coltivato, è governato da quattro parametri: bioenergetica, trasformazioni cicliche, umificazione e pedogenesi, strettamente connessi l'uno con l'altro in modo da mantenere in equilibrio ecologico il terreno con l'ambiente.

Lo sfruttamento agricolo modifica questi rapporti, le pratiche agronomiche ad esempio accelerano le trasformazioni cicliche. Questa maggiore dinamicità fa sì che il terreno agrario abbia rispetto al terreno naturale un minor grado di stabilità. Una delle funzioni più importanti dei microrganismi è

appunto quella di presiedere alle trasformazioni a carico degli elementi nutritivi in modo da mantenere un equilibrio di scambio tra suolo e pianta, contribuendo così allo stato di fertilità dei terreni.

I processi del metabolismo del suolo, intesi come trasformazioni di materiali ed energetiche, sono fondamentalmente connessi al turnover microbico sotto l'azione di fattori limitanti sia abiotici<sup>TM</sup> che di coazione biologica. Secondo i criteri dell'agricoltura sostenibile infatti lo scopo principale verte nel raggiungere la massima produttività consentita dalle condizioni edafiche, mantenendo elevato non solo il livello della fertilità chimica, ma anche quello della fertilità biologica.

La fertilità biologica unitamente alla fertilità chimica ed a quella fisica costituisce la fertilità agronomica o integrale dalla quale dipende la produttività. La fertilità tuttavia non è sinonimo di produttività in quanto la prima dipende dal terreno mentre la seconda sia dal terreno che dalla pianta. Inoltre le basi biologiche della produttività riferite ad un terreno naturale non coincidono con quelle della produttività agronomica in quanto quest'ultima rappresenta un livello produttivo superiore a quello naturale.

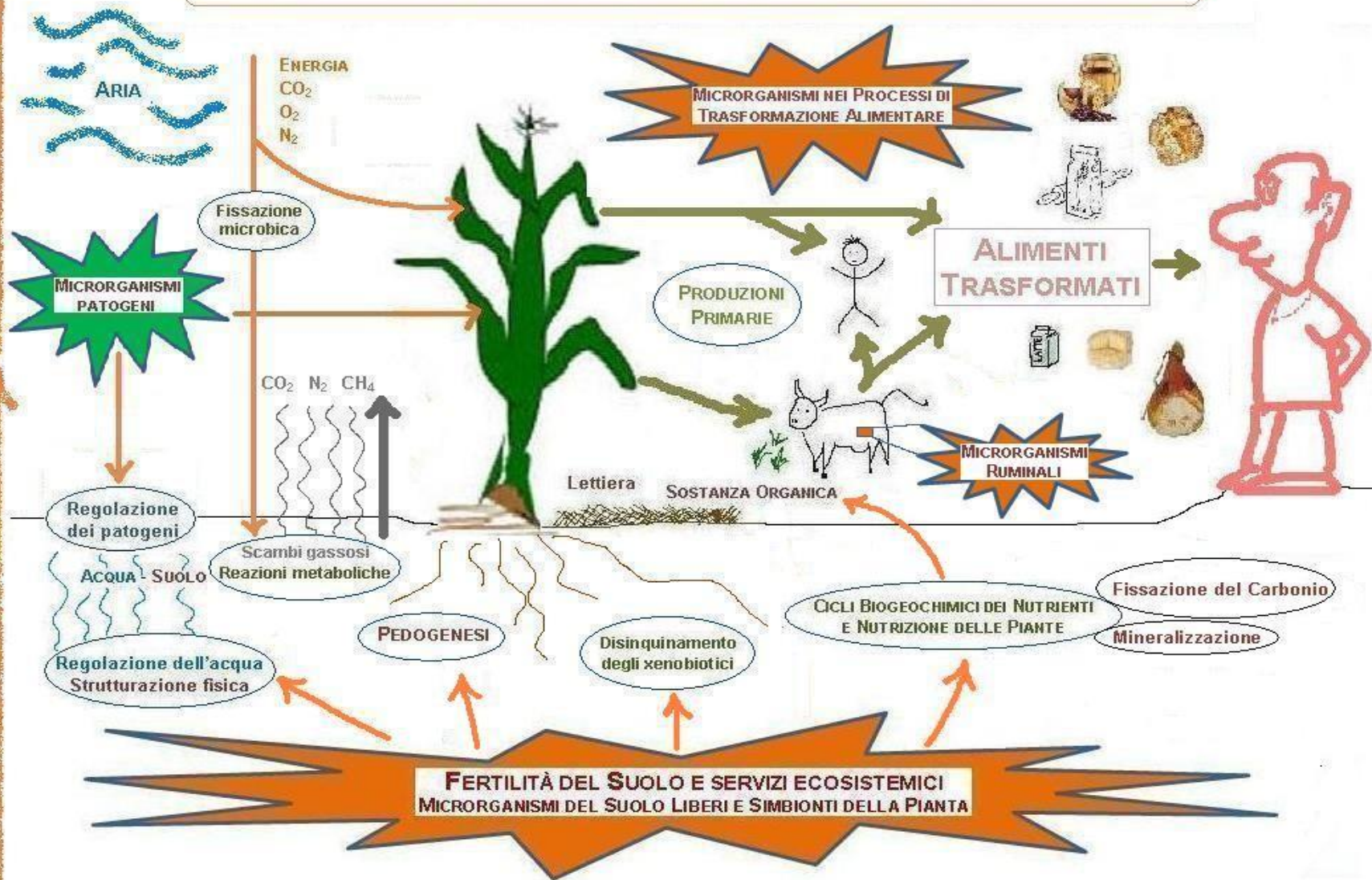
Appare di fondamentale importanza nella scelta di una metodologia di analisi per la valutazione della biodiversità del suolo stabilire i confini entro cui ci si deve muovere definire quindi cosa si intende per biodiversità e cosa per agrobiodiversità.

Nel caso della biodiversità microbica legata alla produzione di alimenti le osservazioni che sono state riportate sopra per i microrganismi del suolo non sono molto dissimili, fatta eccezione nel fatto che il substrato su cui vengono a svilupparsi le comunità microbiche è in sostanza molto più semplice del suolo e funge da substrato colturale, anche se, soprattutto nel caso di processi di trasformazioni quali la produzione di formaggi o di vino è possibile incorrere in problematiche simili alla non coltivabilità e coltivabilità dei microrganismi del suolo.

Per gli alimenti lo studio della biodiversità microbica dovrà essere svolto alimento per alimento e non potrà mai essere derivato per categorie di alimenti e questo ovviamente provoca una oggettiva difficoltà legata alla mole di lavoro di caratterizzazione che si dovrà affrontare nell'esame di un determinato prodotto legato ad un determinato territorio.

Nella figura 1 viene descritta l'importanza dei microrganismi e quindi della conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche microbiche per le produzioni agro-alimentari. Dallo schema si evince l'importanza di una conservazione di tipo "ecosistemico", ossia integrato tra risorse genetiche vegetali, animali e microbiche. Non può esserci produzione vegetale o animale senza il sostegno delle produzioni da parte della fertilità del suolo e quindi del ruolo fondamentale svolto dai microrganismi

## RISORSE GENETICHE MICROBICHE E SOSTENIBILITÀ DELLE PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI



## **Quadro normativo di riferimento internazionale e nazionale per la conservazione delle risorse genetiche microbiche**

Il documento principale di riferimento a livello nazionale, per promuovere azioni rivolte alla conservazione delle risorse genetiche microbiche è la Strategia Nazionale per la Biodiversità che si colloca nell'ambito degli impegni assunti dall'Italia con la ratifica della Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD, Rio de Janeiro 1992) avvenuta con la Legge n. 124 del 14 febbraio 1994.

I tre obiettivi principali della Convenzione sono:

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

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

La Strategia Nazionale per la Biodiversità (PDF 2,8 MB), rappresenta uno strumento di grande importanza per garantire, negli anni a venire, una reale integrazione tra gli obiettivi di sviluppo del Paese e la tutela del suo inestimabile patrimonio di biodiversità.

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

Altri documenti importanti nella tutela delle risorse genetiche sono derivati da:

2001 Consiglio dell'Unione Europea di Gothenburg dove si ribadisce con forza la necessità di intraprendere azioni concrete per arrestare la perdita di biodiversità entro l'anno 2010 e tale impegno è stato successivamente condiviso e rafforzato dal Summit mondiale per lo Sviluppo Sostenibile (Johannesburg, 2002) con l'adozione di un Piano contenente azioni mirate ad una significativa riduzione della perdita di biodiversità entro l'anno 2010 (Obiettivo 2010).

2004 Messaggio di Malahide nel corso della Conferenza degli Stakeholder "La Biodiversità e l'Unione Europea – nel quale l'Unione Mondiale per la Conservazione della Natura (IUCN) ha ufficialmente lanciato l'iniziativa mediatica Countdown 2010 con lo scopo di sensibilizzare le amministrazioni pubbliche e la società civile per il raggiungimento dell'Obiettivo 2010.

Nell'aprile 2009, l'Italia ha ospitato a Siracusa il G8 Ambiente con una sessione dedicata alla Biodiversità post 2010, nel corso della quale è stata condivisa dai Ministri dell'ambiente la Carta di Siracusa sulla Biodiversità, interamente imperniata sul tema della conservazione della biodiversità nell'ambito delle future politiche nazionali. In questa occasione l'Italia è diventata promotrice di una visione della biodiversità consapevolmente inserita nell'ambito delle future decisioni e attività dei Governi.

A livello europeo altro documento importante di riferimento per la conservazione delle risorse microbiche del suolo è la Comunicazione della Commissione del 22 settembre 2006: "Strategia tematica per la protezione del suolo" [COM(2006) 231 def. - Non pubblicata nella Gazzetta ufficiale].

Proposta di direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2006, che definisce un quadro per la protezione del suolo e modifica la direttiva 2004/35/CE.

Tra le diverse emergenze da contrastare per conservare le funzioni del suolo una di queste riguarda la perdita di sostanza organica e biodiversità del suolo.

### **Collezioni di microrganismi di riferimento nazionale ed internazionale**

Nei capitoli a seguire verrà dedicato ampio spazio alle tecniche di conservazione dei microrganismi in laboratorio.

Quando si parla di conservazione di risorse genetiche microbiche il primo pensiero che emerge sono le collezioni di microrganismi per fornire materiale biologico autentico e certificato per applicazioni soprattutto di tipo biotecnologico.

Esistono nel mondo collezioni di microrganismi importantissime quali ad esempio WFCC World Federation for Culture Collection fondata nel 1963 dall'Internazional Union of Biological Sciences (IUBS) all'interno della quale è possibile reperire la WDCM, World Data Centre for Micro-organisms, ove sono registrate 508 collezioni per 66 paesi (<http://wdcm.nig.ac.jp/hpcc.html>). Di queste oltre il 44% corrisponde a Collezioni Europee. In Europa abbiamo la ECCO, European Culture Collection Organization, fondata nel 1982 con 65 soci e con oltre 57 collezioni che possiedono più di 350.000 accessioni.

Poi si può ricordare l'ATCC, American Type Culture Collection, (<http://lgcpromochem-atcc.com>) che conserva principalmente microrganismi di interesse alimentare.

Vanno ancora ricordate:

- BCCM-LMG, Belgium Coordinated Collections of Micro-organisms (<http://bccm.belspo.be/lmg.htm>);
- DSMZ, the German National Resource Centre for Biological Material (<http://www.dsmz.de>);
- UKNCC, the UK National Culture Collection (<http://www.ukncc.co.uk>);
- NCIMB, National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria in Scotland (<http://www.ncimb.co.uk/index.php>);
- AMF, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, the Global Bank (BEG) (<http://www.kent.ac.uk/bio/beg/englishgenearchivecontent.htm>)

Questo network vuole portare un servizio alla comunità scientifica nel reperire informazioni utili alla ricerca su questo importante gruppo di funghi.

A livello nazionale esiste la "Collezione Nazionale di Microrganismi di interesse Agrario ed Agroindustriale - COL.MIA", facilmente consultabile sul sito del CRA-PAV sulle pagine dedicate alla collezione stessa.

Le pagine di questo sito raccolgono tutta l'esperienza di ricercatori italiani impegnati nello studio di microrganismi, appartenenti a vari generi di Batteri, Funghi, Lieviti e Virus di importanza fitopatologica ed agro-industriale.

Nella Collezione sono impegnate 9 Istituzioni scientifiche appartenenti al Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), ognuna delle quali è specializzata nello studio di un particolare e specifico raggruppamento.

La Collezione è stata voluta e finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

Le informazioni sui microrganismi sono:

- Nome del genere, specie, autore e numero di accesso.
- Substrati di crescita e metodo di conservazione.
- Area di origine, anno di isolamento e nome del depositario.
- Numero di accesso ad altre collezioni.
- Dati biologici, chimici e fisiologici.
- Riferimenti a pubblicazioni in cui i singoli isolati sono citati.

Tutti i microrganismi sono studiati, conservati e distribuiti, su richiesta, da ciascuna delle 9 Istituzione scientif

Microrganismi di interesse agro-industriale ed alimentare

- CRA-ENO -Centro di Ricerca per l'Enologia
- CRA-FLC -Centro di Ricerca per le produzioni foraggere e lattiero-casearie
- CRA-OLI -Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia

Microrganismi entomo-fitopatogeni

- CRA-ABP -Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia
- CRA-CAT -Centro di Ricerca per le Colture alternative al Tabacco
- CRA-PAV -Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale

Microrganismi utili del suolo

- CRA-ABP -Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia
- CRA-CIN -Centro di Ricerca per le Colture Industriali
- CRA-RPS -Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo.

Rispetto a fornire un elenco esaustivo di tutte le collezioni esistenti a livello nazionale è opportuno richiamare l'attenzione sul fatto che non tutte le collezioni di microrganismi conservate in laboratorio presentano lo stesso standard di qualità che viene determinato da:

esperienza del personale addetto alla costituzione e conservazione di una collezione;

protezione del materiale da conservare affinché non subisca alterazioni;

minimizzazione del rischio di contaminazione genetica, che trattandosi di microrganismi può essere rapido e devastante;

disponibilità di equipaggiamento specifico e controllato.

Moltissime delle collezioni in uso sono collezioni cosiddette “di lavoro”, collezioni cioè che forniscono quotidianamente il materiale vivente per scopo di studi, quindi quotidianamente subiscono manipolazioni.

Diverso è il caso delle collezioni certificate a standard, prodotte per conservare in condizioni standard e secondo protocolli internazionali concordati isolati viventi per scambio e trasferimento certificato.

A livello nazionale questo tipo di verifica è stato sicuramente effettuata nell'ambito della collezione Col.Mi.A. nella quale sono stati iscritti unicamente i microrganismi isolati, caratterizzati e conservati secondo quanto richiesto per una potenziale iscrizione della Collezione al Circuito ECCO.

## **I microrganismi del suolo**

Nel caso dei microrganismi del suolo, questo aspetto verrà ampiamente dibattuto nei capitoli a seguire, derivando da una matrice così complessa gli isolati di microrganismi mantenuti in coltura pura molto spesso perdono le loro caratteristiche, dettate proprio dalle infinite interrelazioni che i microrganismi del suolo vengono continuamente ad avere nel loro ambiente naturale che quindi fanno escludere da una collezione in laboratorio molti organismi isolati purché nella reale impossibilità di mantenerli uguali a se stessi nel tempo.

## **Core collection**

L'esempio fornito dai differenti centri di conservazione di collezioni microbiche del mondo sicuramente pone l'accento sull'importanza di costituire a livello nazionale una core collection basata su un numero ristretto e molto significativo di microrganismi selezionati e controllati a valenza nazionale. Mantenere una collezione è molto oneroso e limitare le ridondanze a livello nazionale potrebbe ottimizzare le risorse, lasciando invece ampio spazio alle collezioni di lavoro, dalle quali salvare in core collection unicamente pochi isolati. Nel caso del suolo poi molto potrebbe essere effettuato in situ mediante il monitoraggio temporale e l'iscrizione in GenBank delle diverse sequenze geniche.

## Capitolo I – Concetto di specie

In questo capitolo si tratterà dei problemi teorici e pratici per la definizione della specie che è unanimemente considerata l'unità basilare della biodiversità. I vari concetti di specie saranno comparati in maniera critica. La scelta di un particolare criterio sarà presentata con le opportune motivazioni teoriche e pratiche, soprattutto intese a permettere di studiare la biodiversità in maniera rapida, accurata e, possibilmente, svincolabile dalla capacità di coltivare i microrganismi in laboratorio.

### **I.1 – Comparazione critica dei concetti di specie attualmente applicati o applicabili ai gruppi microbici di interesse agrario. Scelta del concetto più appropriato per gli scopi del Piano Nazionale sulla Biodiversità di Interesse Agrario.**

#### **Premessa sul concetto di specie**

Perché parlare del concetto di specie in una trattazione manualistica tecnica? Tutta una serie di difficoltà, tipiche della filogenesi e della tassonomia microbica, rendono necessario un inquadramento sintetico che consenta agli operatori del settore di farsi un'idea generale e di capire perché, pur con molte limitazioni, sia stato scelto un particolare criterio di identificazione di specie e il suo relativo protocollo.

Questa parte risulterà suddivisa nei seguenti sottocapitoli:

- A. Importanza funzionale del Concetto di Specie
  - A.1 Una sintesi del dibattito sul Concetto di Specie: come la teoria incide sulla pratica
- B. Il Concetto di Specie Microbica
- C. Analisi schematica dei problemi connessi al Concetto di Specie Microbica
- D. La definizione della specie Microbica nella valutazione della biodiversità

#### **A. Importanza funzionale del Concetto di Specie**

La definizione del concetto di specie è uno degli argomenti più dibattuti di tutta la biologia. Attualmente esistono oltre venti definizioni basate su criteri e concezioni affatto diverse. La scelta di una definizione comporta differenze sostanziali nella suddivisione e catalogazione della Biodiversità e impone strumenti analitici e statistici o filogenetici diversi a seconda dei criteri di specie adottata.

Questa breve panoramica critica sul concetto di specie e sulla sua definizione è strumentale al resto delle attività per la conservazione e la valorizzazione della biodiversità microbica di interesse agrario per diverse ragioni:

- i. La biodiversità viene definita in base al numero delle specie e quindi la specie è a buon diritto considerata l'unità base della biodiversità (Claridge et al., 1997).
- ii. I rischi di estinzione sono normalmente associati alle specie e non ai loro componenti, per questo è fondamentale definire correttamente o, perlomeno in maniera condivisa, un concetto di specie che permetta di capire se erosione ed estinzione riguardino raggruppamenti specifici o sub-specifici.
- iii. La definizione di specie implica concetti, quali quello evolutivo, che debbono essere il più possibile coerenti con le attuali conoscenze biologiche e generali.
- iv. Nel caso di microrganismi la definizione di specie è spesso associata ad una tecnica o ad una strategia per l'identificazione. Rapidità, riproducibilità ed economicità di tali procedure



sono critiche per rispondere alla duplice necessità di poter identificare accuratamente e, al tempo stesso, di poter effettuare molte identificazioni nei tempi disponibili.

- v. Particolarmente importante per la microbiologia è la possibilità che il concetto di specie e la corrispondente tecnica analitica possano permettere l'identificazione anche di organismi vitali ma non colturali (VNC). Il fatto che la biodiversità isolata venga stimata fra l'1% ed il 10% fa pensare che la maggior parte della biodiversità sia appunto non coltivabile secondo le attuali procedure di laboratorio. Da qui la necessità che la tecnica di identificazione, coerente con il concetto di specie, sia applicabile anche al DNA di specie i cui ceppi risultino (VNC).

Da quanto sopra elencato risulta chiaro che il **concetto di specie microbica** da impiegare deve essere il frutto di una scelta ponderata e motivata notevolmente condivisa dalla comunità scientifica, facilmente applicabile e comprensibile per gli operatori e il più aderente possibile alle attuali conoscenze biologiche.

Il problema del concetto di specie microbiologica nasce dal fatto che il concetto di specie più diffuso e condiviso è il così detto **concetto biologico di specie** (CBS) che si basa sulla sessualità come unico sistema di riproduzione. Di fatto la stragrande maggioranza dei microrganismi conosciuti non sono in questa condizione per cui si impone la ricerca di un altro concetto di specie, diverso da quello impiegato per animali e piante.

BOX n. 1

#### **A.1 Una sintesi del dibattito sul Concetto di Specie: come la teoria incide sulla pratica**

I biologi e i filosofi che dibattono sull'esistenza della specie afferiscono a due scuole di pensiero. Alcuni credono che la categoria di specie non esista, altri pensano invece che la comprensione dei processi biologici porterà ad una definizione di specie come categoria reale. Al di là dei differenti approcci e tentativi di definire la specie nella sua essenza, ci sono tuttavia diverse ragioni di ordine pragmatico per continuare ad utilizzare il termine, secondo la strategia già adottata da Darwin 150 anni fa (Ereshefsky, 2009).

Il dibattito sulla natura della specie biologica ha molti aspetti. Gli scettici sostengono che la specie come categoria non esista (Ereshefsky, 2009; Hendry et al., 2000; Pleijel & Rouse, 2000; Fisher, 2006). Molti di questi sostengono anche che il termine "specie" debba essere eliminato dalla biologia. I difensori della categoria di specie rispondono che con l'acquisizione di nuove conoscenze si avrà l'unificazione del termine in senso biologico e filosofico (De Queiroz, 2007; Mayden, 2002; Pigliucci, 2003; Lee, 2003; Wilson et al., 2009; Pigliucci & Kaplan, 2006). Questo approccio è tutt'altro che nuovo dal momento che Darwin impiegò una strategia simile per risolvere il problema della specie 150 anni fa. Darwin arrivò alla soluzione che il concetto di specie come categoria non esista in natura ma, nonostante lo scetticismo circa la definizione, non bisogna essere scettici sull'esistenza di quei *taxa* che i biologi chiamano "specie". In realtà si tratta di una soluzione di compromesso che caratterizza quasi tutti i discorsi relativi al concetto di specie microbica.

La rapida espansione della teoria filogenetica ha avuto forti ripercussioni sul lavoro di sistematici e tassonomi con ricadute in tutti gli ambiti della biologia. Dato che le specie

occupano un ruolo importantissimo in tutti gli aspetti della biologia in generale e della sistematica filogenetica in particolare, è di critica importanza che il concetto di specie sia compatibile con i progressi della teoria filogenetica. A questo proposito scientifico si affianca quello della maggior consapevolezza riguardo alle estinzioni di specie in atto e quelle potenziali future, e al bisogno di tecnologie e metodologie per la conservazione della biodiversità (Wilson, 1985; Wilson, 1999). Per questo scopo persino il punto iniziale dell'indagine sulla crisi della biodiversità, come quante specie e quanti organismi vivano sul pianeta o comparare la diversità relativa tra due *taxa* o due aree, appare difficile a causa di un mancato consenso relativo alla definizione di specie. I biologi, specialmente i sistematici, hanno dibattuto sul concetto di specie da lungo tempo, specialmente nel XIX secolo. Il dibattito si è poi intensificato con l'avvento della cosiddetta "Sintesi Moderna" tra gli anni '30 e '40 del XX secolo, per subire un'accelerazione fra gli anni '60 e '80 con l'ascesa della cladistica o sistematica filogenetica. Il dibattito ha assunto diverse sfumature. Alcuni sistematici hanno avuto interesse a discriminare le variazioni tassonomiche discrete rilevate in natura senza occuparsi dei processi alla base dell'origine di tale variazione. Tuttavia, grazie ai lavori dei sopra citati, chiamati alfa-tassonomisti, si è cominciato ad avere maggior coscienza della diversità naturale. Nei primi decenni del XX secolo i sistematici europei cominciarono ad essere sempre più interessati ai meccanismi di origine della variazione tassonomica. Questi studiosi, perlopiù zoologi dei vertebrati interessati a mammiferi e uccelli, notarono subito che ai loro sforzi era di impedimento il concetto di specie, e promossero un concetto di specie **politipico** che in seguito evolvette nel più noto **concetto biologico di specie**. All'interno del *framework* del concetto di specie politipica, la storia evolutiva della specie venne inquadrata primariamente nel processo di dinamiche di popolazioni **allopatriche**. Gli alfa-tassonomisti e coloro che applicavano il concetto politipico di specie dibatterono fino agli anni '60, quando emerse la **fenetica numerica** (o **tassonomia numerica**). Anche i proponenti della nuova filosofia non raggiunsero un chiaro concetto di specie, interessati a realizzare diagrammi ramificati, per loro la specie era un **OTU** (*Operational Taxonomic Unit*), identificato come il più piccolo *cluster* discreto di organismi. La tassonomia numerica perse d'importanza quando sempre più sistematici adottarono la sistematica filogenetica o cladistica. I **cladisti**, sempre interessati a produrre diagrammi ramificati, introdussero una struttura più formale per esaminare la storia della vita, fino ad avvicinarsi al concetto biologico di specie, come si comincia a delineare nell'opera di Hennig (Hennig, 1966). Il dibattito si incentrò quindi sulla difficoltà di trovare un concetto comune di specie attraverso l'intera storia sistematica. Ad esempio, alcuni notavano come la variazione all'interno di alcuni gruppi di organismi fosse ripartita in maniera diversa che in altri. Inoltre, gli organismi a riproduzione asessuata non potevano essere trattati in una visione comune di specie insieme a quelli a riproduzione sessuata. Infine, ornitologi e mammologi adottarono il concetto biologico di specie a differenza degli zoologi degli invertebrati, per necessità costretti ad applicare il concetto di specie a *pattern* di variazioni discrete. I botanici si trovarono nel mezzo, non adottando talvolta il concetto biologico di specie. La visione derivante dall'adozione di criteri specifici per ogni gruppo di sistematici, ognuno riguardante caratteristiche peculiari degli organismi studiati, portò ad una visione pluralista del concetto di specie. I sistematici hanno anche differito sul concetto di specie come unità evolutiva, come prodotto dell'evoluzione o sul concetto di specie incipiente. Alcuni avvertirono quindi l'esigenza di individuare i concetti per una definizione

comune di specie, come unità naturale.

La distinzione tra la specie intesa come *taxon* e la specie intesa come categoria è centrale nell'ottica di Darwin. I *taxa* di specie sono gruppi di organismi. La categoria di specie contiene tutti i *taxa* di specie, ciò nonostante, non è un mero insieme di tutti i *taxa* di specie. La soluzione di Darwin si basa sulla distinzione tra il *taxon* di specie e la categoria di specie. Darwin credeva che quei *taxa* chiamati specie dai naturalisti esistessero, ma dubitava dell'esistenza della specie come categoria. In una lettera all'amico Joseph Hooker, Darwin scrive:

“È veramente divertente vedere quali idee differenti siano rilevanti nella mente di diversi naturalisti quando parlano di specie; per alcuni, la somiglianza è tutto e la discendenza ha poco peso - per alcuni, la somiglianza sembra non avere importanza, ed è la Creazione l'idea regnante - per alcuni, la sterilità è un test infallibile, per altri non vale un centesimo. Tutto questo ha origine, io credo, dal cercare di definire l'indefinibile.” (December 24, 1856) (Darwin, 1959 - pubblicato postumo).

In questa lettera, Darwin evidenzia il problema della specie osservando come i biologi offrano diverse definizioni di “specie”. La diagnosi di Darwin al problema è che i biologi stanno cercando di definire “l'indefinibile”. Darwin dubitava infatti della distinzione tra specie e varietà e non usa mai il termine “speciazione” né “L'origine delle specie”. Per Darwin, l'origine delle varietà delle specie è dovuta alla selezione divergente. Egli scrive inoltre che:

“Dalla prima alba della vita tutti gli esseri organizzati rassomigliano gli uni agli altri secondo gradi discendenti, per cui possono classificarsi in gruppi subordinati ad altri gruppi. Questa classificazione evidentemente non è arbitraria, come quella dei gruppi di stelle nelle costellazioni.” (Cap. 13) (Darwin, 1859).

Per Darwin il termine “specie” non ha un significato teoretico, ma occorre continuare ad usarlo per ragioni pragmatiche. In effetti la ragione principale per cui egli scrive L'origine delle specie è di convincere i biologi della sua teoria della selezione naturale (Ereshefsky, 1992).

Un articolo recente sulle definizioni di specie riporta 24 differenti concetti del termine impiegati in biologia (Hey, 2001). Spesso essi vengono utilizzati pragmaticamente dai biologi a seconda del campo di ricerca di interesse.

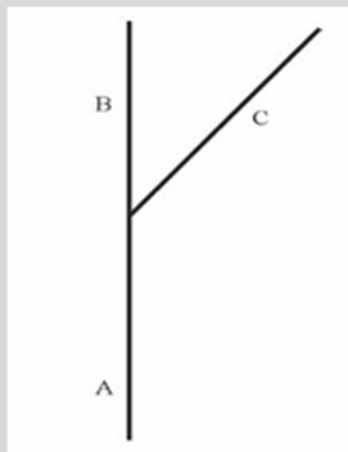
Una delle definizioni più potenti è fornita dal “**concetto biologico di specie (CBS)**”, sviluppato da Ernst Mayr, secondo il quale “Le specie sono gruppi di popolazioni ibridanti riproduttivamente isolate.” (Mayr, 1970).

Un altro esempio fondamentale è rappresentato dall'approccio **filogenetico** proposto dai cladisti. Il fondatore della teoria filogenetica o cladistica, Willi Hennig, suggerì che le classificazioni biologiche dovessero rappresentare tutte le ramificazioni dell'albero della vita. La specie è un insieme di individui che si differenziano fino a formare due nuove specie. Essa risulta differenziabile in quanto risultato di una speciazione. Più tecnicamente, Hennig suggerì che tutti i *taxa* dovessero essere **monofiletici**: i *taxa* monofiletici consistano di tutti e soltanto i discendenti di un ancestore comune (Hennig, 1966).

Nessuno dei due concetti, quello dell'interincrocio (CBS) e quello filogenetico, risolvono interamente da soli il problema della definizione di specie; allo stesso tempo, nessuno dei due deve essere escluso perché evidenzia aspetti importanti del mondo organico. L'approccio degli ibridanti richiede che gli organismi di una specie scambino geni attraverso l'incrocio. Gli

organismi asessuali non scambiano geni attraverso questo tipo di riproduzione, ma si riproducono attraverso altre modalità, quali la fissione binaria e la gemmazione. Così, linee di **organismi asessuali** non formano specie secondo l'approccio dell'interincrocio. Se si torna al metodo filogenetico, le interpretazioni per gli organismi asessuali sono differenti. Quello che è importante per l'approccio filogenetico è che la linea di organismi sia monofiletica, non come gli organismi della stessa linea filetica si riproducono. La specie filogenetica consiste di organismi asessuali mantenuti coesi da processi diversi dall'interincrocio, come un'omeostasi genetica. Così, la prima discrepanza tra l'approccio dell'interincrocio e quello filogenetico è che molti organismi formano specie filogenetiche ma non specie ibridanti. Questa non è una piccola differenza, perché gli organismi asessuali superano di gran lunga il numero di quelli sessuali nel mondo (Hull, 1990).

Un'altra discrepanza concerne un tipo di specie chiamata “specie ancestrale”. Una forma comunemente riconosciuta di speciazione avviene quando una popolazione viene isolata dal resto della specie. Questa popolazione isolata va incontro a una “rivoluzione genetica” e diventa una nuova specie. La specie parentale, quella ancestrale, rimane intatta. Mentre l'approccio dell'interincrocio consente l'esistenza della specie ancestrale, quello filogenetico no. Secondo l'approccio dell'interincrocio, quando avviene una speciazione, ci sono due specie: C, che è la nuova specie; e A+B, che è la specie ancestrale. L'approccio filogenetico invece nega che ci siano due specie in alcuni casi. Una specie infatti deve essere monofiletica e contenere tutti e soltanto i discendenti di un antenore comune. La specie ancestrale A+B non è monofiletica: alcuni dei discendenti di A non sono in A+B. Così, non ci sarebbero due specie, ma o una specie soltanto o tre specie: quella unica contenente A, B e C; o le tre specie A, che si è estinta, la specie B e la specie C che ancora esistono (Fig. 1)



**Fig. 1** Secondo l'approccio dell'interincrocio: A+B è una specie e C è un'altra specie. Secondo la teoria filogenetica: A, B e C sono sottospecie o tutte specie distinte (Ereshefsky, 1992).

Negli ultimi 20 anni, biologi e filosofi hanno proposto varie argomentazioni per salvare il concetto della categoria di specie. In sua difesa Ghiselin e Eldredge sostengono la possibilità che si riservi il termine “specie” per gli organismi sessuali, in quanto gruppi di organismi ibridanti (Ghiselin, 1997; Eldredge, 1985). Futuyma sottolinea invece l'importanza dello sforzo di indagare sia le linee di organismi sessuali che asessuali per non limitare la tassonomia alla sola classificazione dei primi. Del resto, le differenze nelle modalità riproduttive fra i due gruppi hanno i loro vantaggi. Gli organismi sessuali si adattano più facilmente ai cambiamenti ambientali grazie alla ricombinazione, mentre quelli asessuali prosperano negli ambienti stabili quanto in quelli in cui è difficile incontrare un individuo cospecifico (Futuyma, 2006). L'evoluzione di una

specie asessuale, che consiste di linee filetiche separate, è un sottoprodotto dell'evoluzione entro quelle linee. Similmente, l'evoluzione di una specie sessuale che consiste di popolazioni geograficamente isolate è un sottoprodotto dell'evoluzione entro quelle popolazioni (Ereshefsky, 1992).

Mishler fornisce dati relativi alle predizioni circa la discontinuità delle specie sessuali rispetto a quelle asessuali usando un'analisi cladistica del genere di muschio *Tortula*, un clade entro il quale è possibile un ampio spettro di sessualità, dalla riproduzione sessuale frequente alla totale asessualità. Si potrebbe predire che le specie sessuali debbano essere più variabili di quelle asessuali entro popolazioni (a causa delle ricombinazioni) e meno variabili fra popolazioni (a causa dell'effetto di omogeneizzazione del flusso genico). Tuttavia, le misure della discontinuità di specie, sia cladistiche che **fenetiche**, non hanno mostrato una particolare correlazione con le modalità di riproduzione. Mishler conclude che processi diversi dal flusso genico possono essere responsabili della formazione e del mantenimento delle specie anche nei gruppi sessuali (Mishler, 1990). Per una trattazione più approfondita si rimanda alla letteratura relativa agli equilibri punteggiati secondo Stephen Jay Gould e Niles Eldredge.

## B. Il concetto di specie microbica

Le problematiche relative ai differenti significati dati al termine di “specie” in biologia affliggono in modo ancora più grave la microbiologia. Alcuni microbiologi rimangono ottimisti e credono che ulteriori ricerche porteranno ad una definizione realistica di specie (Dykhuizen & Green, 1991; Lan & Reeves, 2001; Cohan, 2002) altri sono più pessimisti e adottano un approccio nominalista (Rosselló-Mora & Amann, 2001; Stackebrandt, 2006a); altri ancora ritengono che la ricerca debba essere abbandonata e suggeriscono di cominciare a pensare ad altre categorie di unità evolutive (Baptiste & Boucher, 2009; Doolittle & Zhaxybayeva, 2009). Gli attuali approcci per definire la specie microbica afferiscono a quattro gruppi: ricombinante, ecologico, filogenetico e nominalista.

Seguendo il **concetto biologico di specie** (Mayr, 1970), Dykhuizen e Green pensano che così come gli eucarioti formino *pool* di geni, lo stesso facciano i procarioti. Studiando la composizione genetica di metapopolazioni di *E. coli* per i quali la ricombinazione ha luogo mediante trasferimento genico orizzontale, essi sostengono che un plausibile concetto di specie per i procarioti possa basarsi su gruppi di organismi che si riproducono mediante ricombinazione. Il concetto di specie ricombinante per i procarioti si discosta significativamente da quello biologico di specie (CBS). Il **CBS** asserisce che le specie condividano strettamente *pool* di geni (Dykhuizen & Green, 1991). Questo meccanismo riproduttivo promuove lo scambio genico entro la specie ed impedisce che avvenga fra le specie, preservando la coerenza e l'unità della specie. I procarioti che vanno incontro a ricombinazione mediante trasferimento genico orizzontale, trasformazione, coniugazione e trasduzione, sono lontani dal rappresentare un *pool* genico compatto (Paul, 1999). Il trasferimento genico orizzontale fra procarioti è estremamente diffuso e avviene in *taxa* anche molto distanti, persino fra famiglie e regni diversi (Xu, 2004; Gogarten & Townsend, 2005); esso impedisce perciò la delineazione dei confini fra specie non consentendo l'instaurarsi di barriere riproduttive come richiesto dal **CBS** (Doolittle & Papke, 2006). Un'altra differenza fra il **CBS** e il concetto di specie ricombinante è che la ricombinazione eucariotica avviene in tutto il genoma, mentre quella procariotica può essere limitata a parti di esso, generando una sorta di chimerismo genico (Nesba et al., 2005).

Un'altra definizione di specie microbica consiste nel concetto di specie ecologica (Cohan, 2002). L'idea si basa sul fatto che i batteri formano gruppi ecologicamente distinti. La selezione periodica mantiene la coerenza nella specie eliminando la diversità generata dalle mutazioni non indirizzate all'adattamento entro la nicchia. Qualora le mutazioni portassero adattamenti migliori al fenotipo, i geni implicati verrebbero fissati. È interessante osservare come la selezione periodica e la ricombinazione possano agire nello stesso gruppo gli organismi in modo che la specie ricombinante e quell'ecologica non siano sovrapponibili. Nel genere *Thermotoga*, alcuni gruppi di organismi formano specie singole in accordo con l'approccio ricombinante e specie multiple in accordo con quello ecologico. Così, un singolo gruppo di procarioti può appartenere contemporaneamente a specie differenti (Nesba et al., 2005).

Un terzo approccio usa dati genetici per determinare relazioni filogenetiche. In modo analogo ad altri concetti di specie filogenetica (*Phylogenetic Species Concept*), si assume che le specie procariotiche siano cladi (Rosselló-Mora & Amann, 2001; Stackebrandt, 2006). I microbiologi

usano vari tipi di dati genetici per ricostruire la filogenesi microbica e riconoscere le specie. Questi includono: rDNA, ibridazione DNA:DNA, *ANI* (*Average Nucleotide Identity*) e geni *core* e *house-keeping* (Rosselló-Mora & Amann, 2001; Stackebrandt, 2006; Nesba et al., 2005). A causa della frequenza del trasferimento genico laterale, differenti porzioni del genoma di un organismo avranno una diversa storia evolutiva. Conseguentemente, la classificazione dello stesso gruppo di organismi basata sulla filogenesi potrebbe variare, e la variazione dipende da quali *cluster* di geni sono stati scelti per l'analisi filogenetica. Il risultato è una molteplicità di alberi filogenetici in cui ogni albero riflette la filogenesi di un differente *cluster* genico (Doolittle & Baptiste, 2007; Franklin, 2007). I geni *house-keeping*, che presiedono a importanti funzioni quali la divisione cellulare e l'attività metabolica, sono più utili nel tentativo di identificare una specie microbica. Si suppone infatti che il trasferimento laterale di geni di questo tipo sia molto meno frequente di quello di geni ausiliari (Lan & Reeves, 2001). Le critiche verso questo approccio sono rivolte al fatto che i geni *house-keeping* rappresentano approssimativamente il 5% di un genoma e così non possono rappresentare correttamente la filogenesi di quel genoma (Doolittle & Baptiste, 2007). Geni *core* di un singolo genoma possono avere filogenesi diverse (Wertz et al., 2003).

Passiamo a considerare altre due tipologie di dati genetici: 16S rDNA (procarioti) o 26S rDNA (eucarioti) e ibridazione DNA:DNA. La soglia standard per identificare una specie usando il 16S rDNA è una similarità del 97,5% o superiore. Per i microrganismi eucarioti, ed in particolare i lieviti, si è stabilito che due ceppi con specifici debbano avere un'identità non inferiore al 99% nel dominio D1/D2 del rDNA lungo ca. 570 bp. Quando si usa l'ibridazione DNA:DNA, il valore di riassociazione per identificare una specie, dipendente dalla similarità di sequenza, è del 70% o superiore (Stackebrandt, 2006). Queste due diverse metodologie, tuttavia, possono dar luogo a conflitti nella classificazione degli stessi gruppi di organismi (Rosselló-Mora & Amann, 2001). I diversi risultati non rappresentano misure sbagliate, ma rappresentano la diversa filogenesi di diverse parti di un genoma (Doolittle & Baptiste, 2007; Franklin, 2007).

La confusione sulle modalità di classificazione dei microrganismi ha spinto alcuni microbiologi a considerare la specie microbica in modo unicamente nominalistico. Erko Stackebrandt, editore dell'*International Journal of Systematic Bacteriology* scrive:

*“La non esistenza della categoria oggettiva di specie è stata riconosciuta dai microbiologi per oltre vent'anni. I batteriologi, in particolare, seguono metodologie e accorgimenti per provare stabilità, riproducibilità, e coerenza in tassonomia; tuttavia, in ultima analisi, la definizione di specie rimane ancora soggettiva.”* (Stackebrandt, 2006).

Secondo i nominalisti, le definizioni di specie devono essere attribuite in maniera operativa. Uno di questi concetti è quello filo-fenetico. Una specie filo-fenetica è un *cluster* genomicamente e monofileticamente coerente di individui che mostrano un alto grado di similarità complessiva nel rispetto di caratteri molteplici e indipendenti, ed è diagnosticabile da proprietà fenotipiche discriminanti (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Ad ogni livello di identificazione di una specie filo-fenetica, i parametri sono scelti secondo considerazioni pragmatiche piuttosto che teoretiche. Ciò non significa che i *taxa* identificati da questo approccio non siano reali. Essi sono reali: i parametri scelti per identificare questi *taxa* sono empirici; è la categoria di specie ad essere intesa

in modo nominalistico.

Baptiste e Boucher propongono che la tassonomia microbica debba classificare le unità evolutive composite (*composite evolutionary units*): associazioni integrate di elementi replicativi di basso rango tenute coese da meccanismi biologici. Tali unità evolutive sono composite perché composte da geni filogeneticamente diversi. Inoltre, queste unità evolutive operano a diversi livelli di organizzazione. Alcune possono essere parti di organismi, altre rappresentare l'intero organismo, e altre essere costituite da intere comunità microbiche sintrofiche. Le unità evolutive composite non sono specie nel senso comune, poiché gli individui non sono necessariamente organismi, ma geni, gruppi di geni e comunità microbiche (Baptiste & Boucher, 2009).

### C. Analisi schematica dei problemi connessi al Concetto di Specie Microbica

Cercando di analizzare il problema della specie non si può non giungere alla conclusione che di fatto ci si trova dinanzi a molti problemi. Per semplificare noi ne proponiamo sei che paiono essere sostanzialmente esaustivi dei problemi in campo e che possono essere posti in un'ottica di "filiera logica" ripetibile, in modo da poter giungere ad una maggior conoscenza per approssimazioni successive seguendo un concetto operativo alla base della logica Bayesiana.

I problemi possono essere così delineati:

- i. **Problema ontologico.** Ossia, la specie esiste o è una mera categoria del pensiero? In altre parole: nominalismo o realismo?
- ii. **Problema evolutivo.** Ossia l'evoluzione riguarda i grandi salti della specie o interessa i singoli individui? In altri termini, l'evoluzione degli individui genera l'evoluzione delle specie oppure è una sorta di "vibrazione" che non implica cambi del gruppo chiamato specie?
- iii. **Problema semantico.** Ossia, come si definisce la specie? Si deve avere una definizione unica che vada dai microbi alle piante e agli animali più evoluti (ipotesi monistica) o si debbono avere tante definizioni quante sono i raggruppamenti di organismi?
- iv. **Problema classificativo.** Ogni classificazione è una teoria che tenta di spiegare la variabilità e la diversità organizzate osservabili e presenti in natura. Quale sistema di classificazione va adottato, uno gerarchico o uno numerico? Il primo assume che i vari caratteri abbiano importanze diverse e di tal fatta è la classificazione linneiana e tutte quelle da esse derivate. Si riconoscono facilmente dall'uso delle così dette chiavi dicotomiche che consistono in una serie di domande che ammettano solo due risposte, a seconda della risposta si passa ad un'altra domanda. Le prime domande sono deputate alla discriminazione fra grossi raggruppamenti, mentre le ultime discriminano a livello di specie affini o di sottospecie.
- v. **Problema tecnologico.** Si tratta di capire quali caratteri (o descrittori) vadano impiegati per classificare e poi per identificare gli individui nell'ambito della classificazione accettata. Si distinguono principalmente i caratteri in base alla loro natura. Una discriminazione ampiamente accettata discrimina i caratteri in : morfologici, fisiologici, molecolari e descrittori relativi alle resistenze. I morfologici e molecolari sono riscontrabili anche se l'individuo non è fisiologicamente attivo o è addirittura morto, per cui sono raggruppabili come descrittori "morfo-ontologici". I caratteri di resistenza e i caratteri fisiologici sono raggruppabili come "funzionali".
- vi. **Problema analitico.** La stessa analisi dei descrittori richiede tecniche ed approcci di statistica multivariata o di filogenesi che presentano un ampio margine di scelta a causa delle assunzioni



basilari che debbono essere accettate prima dell'analisi. Un esempio di tali assunzioni che regola la scelta fra dendrogrammi UPGMA o Neighbour Joining è se le variazioni sono assunte come regolari nel corso del tempo o no. Nel primo caso si è autorizzati ad impiegare l'algoritmo UPGMA. Molti studi hanno impiegato questo algoritmo senza una traccia di discussione per giustificare la scelta che è spesso molto discutibile. In studi multi centro si è poi evidenziato come la scelta dei pacchetti informatici condizioni pesantemente i risultati (Cardinali, et al., 2001).

E' possibile considerare che i sei problemi illustrati (Fig. 2) sono logicamente associabili. I primi tre sono di carattere molto generale e a tratti decisamente logici e filosofici. I secondi tre quesiti sono necessariamente differenziabili per i vari gruppi di organismi e hanno un' indole decisamente tecnica. Va poi rilevato che nel caso non si segua questa trafila ma si passi subito al problema tecnologico (pratica assolutamente comune) si finisce necessariamente per scadere in un nominalismo di comodo che neppure prende in considerazione le motivazioni di Ockham, Buffon, Lamarck e Darwin.

Già Darwin sottolineava come la natura presenti una straordinaria continuità nelle sue varie parti. D'altra parte la specie presuppone una rottura del *continuum* altrimenti mancherebbe di quella sia pur minima discriminabilità che la differenzia dalle altre specie. Il rapporto fra *continuum* e discontinuità è di fatti il problema più spinoso attorno al problema ontologico della specie (Wheeler and Meier, 2000). I tratti generali di questo problema si trovano anche in fisica in tutte quelle situazioni in cui si passa da uno status ad un altro, ad esempio come nel passaggio di un flusso da uno scorrimento ordinato alla turbolenza (Gleick, 1989).

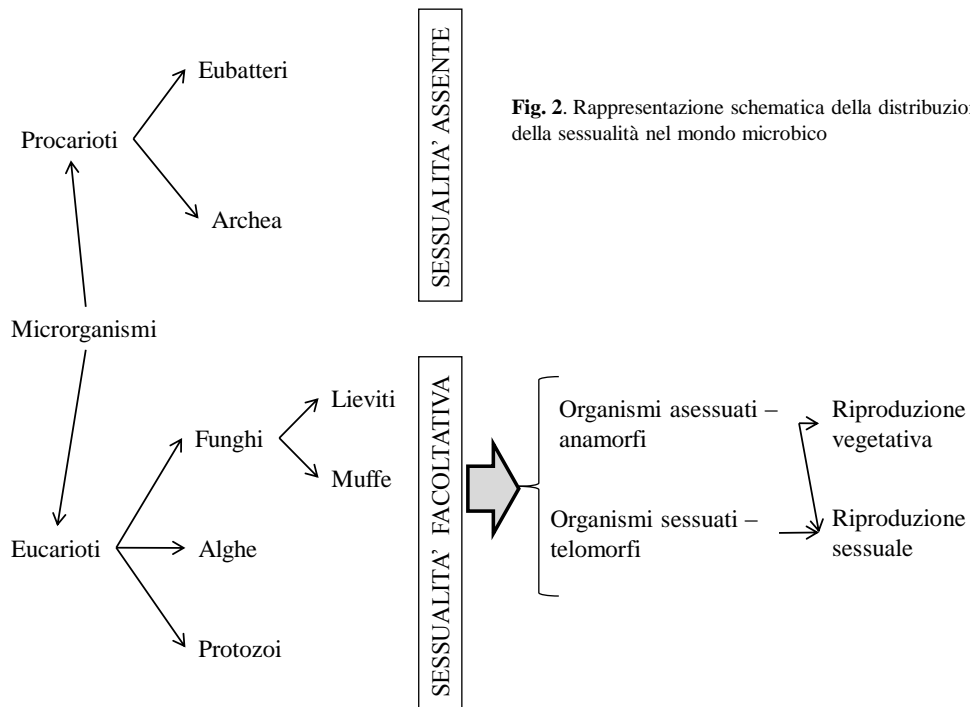
Diversi approcci sono stati considerati per risolvere il problema. Basilarmente si può negare l'esistenza delle specie (nominalismo) come di fatto sosteneva Darwin o ritenere che le specie esistano ed il *continuum* sia una conseguenza della vicinanza delle specie medesime, una specie di effetto ottico dovuto alla grande similarità di molte delle specie note.

Un approccio radicalmente diverso è quello fuzzy che prevede che ogni organismo faccia parte simultaneamente di più di una specie, solo che ha per ogni specie un'"intensità" diversa. La situazione è sostanzialmente delineata nella Fig. 3a in cui sono rappresentate tre specie molto prossime fra di loro. Ogni individuo ha una percentuale di appartenenza ad almeno due specie. Per ogni specie questo valore decresce dal centro alla periferia fino a raggiungere il valore del 50% in corrispondenza del quale un individuo appartiene ugualmente a due specie per cui può essere considerato un ibrido interspecifico o una situazione di biforcazione fra due specie. Uno degli effetti dell'applicazione di quest'approccio in un quadro è il "paradosso dell'aggregazione infinita" secondo il quale se le specie sono ravvicinate ed esistono individui che possano far parte indifferentemente di più di una specie, allora le due specie debbono essere considerate una sola. Così di grado in grado da diverse specie discrete si finisce con l'avere una sola mega- specie che contraddirebbe se stessa, infatti una sola specie implica necessariamente la mancanza della discriminabilità in specie diverse (Fig. 3b). Una trattazione più approfondita degli approcci basati sulle distanze relative fra individui e sul rapporto *continuum- discontinuum* può essere trovato in due lavori dedicati a queste tematiche (Cardinali, 2003; Antonielli, 2009).

#### **D. La definizione della specie Microbica nella valutazione della biodiversità**

La Biodiversità microbica agraria include procarioti ed eucarioti e questi sia sessuati facoltativi che asessuati come mostrato nella Fig.2.

Da questa schematizzazione risulta che tutti i procarioti sono asessuati e che gli eucarioti possono riprodursi sia in modo sia sessuato che asessuato. Questa semplice constatazione conduce all'osservazione che la sessualità non può rappresentare una barriera riproduttiva con tre conseguenze principali:



- i. Varianti di una specie possono riprodursi tranquillamente per via sessuale e non sono sottoposti a restrizioni per via di barriere pre- o post-coniugative
- ii. Eventualmente la sessualità può avvenire anche fra ceppi di specie affini, geneticamente non troppo lontane. Il fatto che esista capacità riproduttiva (coniugazione illegittima) fra membri riconosciuti di specie (ed ora anche di generi) diversi è la dimostrazione di questo fenomeno (Marinoni & al. 1999).
- iii. La sessualità non delimita un gruppo ristretto di organismi interfertili (vedi punto ii.) ed inoltre non limita l'ampiezza della specie che si amplia arricchendosi con forme profondamente variate (vedi punto i.)

Nel complesso questa situazione preclude l'impiego universale del Concetto Biologico di Specie ed impone di ricorrere a concetti basati sulla distanza relativa fra ceppi e ceppi-tipo per i quali sono necessarie scelte fondamentali quali i tipi di caratteri e l'entità della distanza che determina l'assenza di con-specificità. Qualunque risposta venga data a queste due domande è

necessariamente arbitraria e sostituibile da altre conclusioni ugualmente supportate dalla letteratura scientifica. I suddetti problemi vengono complicati dalla necessità di distinguere i criteri di specificità nei grandi raggruppamenti di microbi che vanno quindi definiti a priori.

Queste osservazioni inducono ad accettare un concetto adeguato alternativo al Concetto Biologico di Specie con le seguenti caratteristiche:

- iv. Operatività (deve essere facile da impiegare e possibilmente poco costoso)
- v. Automazione (l'identificazione deve essere automatizzabile o comunque applicabile su vasta scala)
- vi. Condivisone da parte della comunità scientifica
- vii. Stabilità dei descrittori impiegati
- viii. Revisionabilità (qualsiasi aggiustamento del concetto dovrebbe permettere una ricatalogazione quasi automatica degli organismi).

Al momento attuale un largo consenso si è coagulato attorno ad una definizione nominalista che si basa sulla similarità delle sequenze di specifici domini del DNA codificanti per il RNA ribosomale. Si tratta quindi di un sistema che sacrifica alla praticità le più profonde ragioni che hanno spinto e spingono tuttora molti studiosi ad esaminare l'aspetto fondamentale della natura della specie sia dal punto di vista teorico che pratico. Prima di esaminare i vantaggi di questa scelta è opportuno definire perché possa essere considerata in qualche modo accettabile anche dal punto di vista scientifico. Infatti la discussione sulla specie è in questo momento impaniata in un circolo vizioso che si può sintetizzare come segue: non esiste un sistema naturale condiviso per definire la specie, dunque abbiamo difficoltà a descrivere e catalogare le specie, con una ridotta conoscenza della biodiversità non riusciamo a capire a fondo se esistano effettivamente soluzioni di continuità fra le entità tassonomiche o se piuttosto la diversità microbica sia un sostanziale *continuum*, in assenza di questa conoscenza non è possibile risolvere il problema ontologico (esiste la specie microbica?) e non possiamo giungere ad un sistema naturale condiviso e da qui si ricomincia.

Risulta quindi chiaro che accettare un sistema nominalistico di classificazione ed identificazione presenta vantaggi pratici, che illustreremo in seguito, ma soprattutto è un passaggio obbligato per raggiungere una massa critica di conoscenze che ci permetta di capire se esista o no un *discontinuum* fra le entità microbiche e quindi se esistano le categorie e le strutture delle specie microbiche. D'altra parte un aspetto fondamentale della biodiversità microbica è la nostra scarsissima conoscenza di essa stimata dai più fra l'1% e il 5%. In queste condizioni non è neppure possibile accertare se eventuali casi di *discontinuum* non nascano dal mancato campionamento di alcune specie. In altre parole le discontinuità potrebbero essere dovute al semplice fatto che manca all'appello la maggior parte delle OTU microbiche. Tutto questo senza negare l'ovvia discontinuità fra i macrogruppi microbici riportati nella Figura 2.

Vediamo dunque quali siano i vantaggi del sistema nominalista che definisce la specie sostanzialmente (ed in certi casi unicamente) sulla base delle distanze genetiche calcolate dalle divergenze del DNA codificante per il RNA ribosomale ed attribuisce l'identificazione in base ad una soglia di differenza predefinita per procarioti (2,5%) ed eucarioti (1%).

### **1. Il sistema è applicabile universalmente sia pure con i dovuti adattamenti ai macrogruppi microbici.**

Il sistema si basa su un'amplificazione PCR mediante coppie di primer universali e sul successivo sequenziamento dell'**amplicone**. Tali coppie sono definite per macrogruppi quali:

funghi, archea, eubatteri etc. Questo significa che una sola amplificazione *in vitro* (**PCR**) non fornisce il DNA di tutti i microrganismi, ma solo di un macrogruppo. E' però sufficiente effettuare in parallelo poche amplificazioni per avere una risposta che copra tutti i macrogruppi attualmente noti di microrganismi.

## **2. Il sistema funziona con specie coltivabili e con VNC**

Proprio perché il sistema si basa sull'amplificazione del DNA, esso è applicabile anche a situazioni (p.e. un suolo agrario, un cibo etc.) in cui si estragga DNA **meta genomico**, ossia costituito dal genoma di molte specie, da amplificare poi con le coppie di primer universali. Il fatto che venga amplificato il DNA, ossia una molecola di grande stabilità nel tempo, presenta il vantaggio di includere ogni specie che sia o che sia stata presente e che sia viva o morta nell'ambiente analizzato. Naturalmente questo sistema sarebbe problematico nel caso si vogliano definire le specie viventi in un dato habitat. Questo problema è risolvibile con due sistemi:

- i. Assumere che le specie non viventi nell'ambiente studiato siano minoritarie per cui la loro presenza sarà scarsamente rilevabile
- ii. Ricorrere all'estrazione del RNA metabolomico. Dal momento che l'RNA è molto meno stabile del DNA, l'amplificazione dopo retro trascrizione del RNA garantisce di rilevare solo le specie viventi.

Va sottolineata la differenza fra una specie vivente in un dato ambiente naturale o industriale dal concetto di specie coltivabile in laboratorio. Infatti, le varie specie microbiche tipiche di un ambiente crescono, si moltiplicano e muoiono in esso, per cui possiamo trovarle allo stato vitale o morte. Viceversa, certe specie non crescono in laboratorio, pur essendo vive e vitali nel proprio ambiente, per le intrinseche limitazioni tipiche delle pratiche laboratori quali l'isolamento delle cellule da altre con cui possono intrattenere simbiosi o proto-commensalismi, l'inevitabile selettività dei terreni e delle condizioni di coltura o altre ancora da determinare.

## **3. Il sistema è rapido, automatizzabile, relativamente poco costoso e permette di essere usato massicciamente.**

Il sistema prevede operazioni routinariamente effettuate in parallelo su molti campioni quali l'amplificazione PCR, la purificazione degli ampliconi ed il sequenziamento. Anche senza l'introduzione, ormai imminente, di sistemi robotizzati o semiautomatici è attualmente possibile processare quotidianamente decine o centinaia di campioni a seconda delle caratteristiche organizzative del laboratorio. Il sequenziamento è stato per lungo tempo il collo di bottiglia del processo per i costi relativamente alti che sono soggetti ad un costante calo dovuto al perfezionamento delle tecnologie impiegate.

## **4. Il sistema permette la costruzione di database pubblici facilmente consultabili**

Il sistema in questione prevede l'ottenimento di una sequenza nucleotidica da comparare con tutte le altre sequenze disponibili. Tale comparazione può essere effettuata in tempi ragionevolmente brevi stante la disponibilità di database pubblici di sequenze che vengano costantemente aggiornati. Di seguito vengono elencati gli indirizzi di alcuni siti web con i più efficaci e popolari database impiegati al momento attuale. Con un buon collegamento alla rete Internet è possibile ottenere nel giro di pochi secondi la comparazione (hit list) della propria sequenza con le sequenze corrispondenti degli organismi più simili. In caso di similarità uguale o inferiore alla soglia minima di differenza si concluderà che il ceppo in esame

appartiene alla specie con maggior similarità indicata nella hit-list. In caso di differenze superiori (>1% per gli eucarioti e >2.5% per i procarioti) è legittimo avviare una procedura per verificare che il eppo appartenga ad una nuova specie da studiare e descrivere secondo i canoni dei codici internazionali.

Siti web per l'identificazione della specie in base alla similarità di sequenza:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/>

<http://www.arb-silva.de/>

<http://rdp.cme.msu.edu/>

## 5. Il sistema si basa su descrittori stabili

Una delle principali ragioni per il rDNA è stato scelto per studi tassonomici e filogenetici per la sua variabilità particolarmente bassa nel corso dell'evoluzione. Questa caratteristica permette di realizzare studi di filogenesi su larga scala e di discriminare fra specie con una minima variabilità fra i ceppi. Nel tempo la variabilità potrebbe essere ridotta anche per via della presenza di parecchie decine di sequenze "in tandem" sul cui modello mutazionale esistono diverse teorie (Nei and Rooney, 2005). Nel complesso la sequenza di rDNA è notevolmente stabile. Sistemi per definire relazioni filogeneticamente più fini sono normalmente basati su sequenze a più alta mutabilità, quali gli ITS (de Rojas, et al., 2007; Frealle, et al., 2007).

Va inoltre ricordato che nel breve periodo (al quale sono interessati i ricercatori di biodiversità agraria) la stabilità dei descrittori basati sul DNA deriva sostanzialmente dalla mancata influenza delle condizioni ambientali e sperimentali per lo meno per quanto riguarda la sequenza. Viceversa, i caratteri fisiologici sono estremamente sensibili alle condizioni ambientali e sperimentali e trovano una particolare applicazione quando si voglia verificare la **biodiversità funzionale**, piuttosto che la **biodiversità molecolare**. La differenza sta nel fatto che la biodiversità assoluta misura il numero di specie o di tipi diversi, quella fisiologica stabilisce le differenze funzionali e fisiologiche. Le due biodiversità possono non coincidere in quanto ceppi identici dal punto di vista molecolare possono essere diversi per quanto riguarda la fisiologia. In altri casi simili comportamenti fisiologici possono essere riscontrati in ceppi diversi dal punto di vista molecolare. Questa sfasatura è dovuta sostanzialmente all'indipendenza fra descrittori fisiologici e molecolari per cui le variazioni dei primi non permettono di predire quelle degli altri e viceversa.

## 6. Il sistema può essere facilmente ri-direzionato

La disponibilità di ampi database permette al momento di identificare le specie secondo i criteri sopra menzionati. Nel caso cambino i criteri di identificazione, per esempio a livello di sogli di distanza o altri aspetti analoghi, un lavoro bioinformatico di grande mole, ma relativamente semplice permetterebbe ridefinire e rinominare le specie secondo i nuovi criteri. Tale plasticità è invece assente con sistema tutt'ora in uso quali la riassociazione DNA:DNA che produce soltanto serie di dati relazionali fra ceppi, sulla base dei quali nessun'altra conclusione può essere tratta.

## 7. Il sistema è ampiamente condiviso dalla comunità scientifica

Dalla sua proposizione, il sistema di identificazione basato sul rDNA ha guadagnato consensi in tutta la comunità scientifica ed è divenuto pressoché universale, pur con tutte le limitazioni

sopra descritte.

**8. Il sistema permette stime rapide della biodiversità.**

Le caratteristiche sopra descritte indicano che il sistema a rDNA permette di identificare rapidamente e con costi contenuti rilevanti quantità di ceppi. Questo fatto aiuta nello sciogliere un annoso dilemma microbiologico sul numero di ceppi da isolare e studiare. Infatti è sempre stato ovvio che grandi numeri di isolati sono necessari per comprendere le complesse dinamiche della biodiversità microbica, ma metodi di identificazioni lenti e costosi finivano per limitare fortemente il numero di ceppi studiati.

## **I.2 – Raccolta delle definizioni di carattere tassonomico, genetico filogenetico e microbiologico che siano importanti per gli studi di biodiversità microbica.**

### **Premessa**

La biodiversità è il coacervo della diversità fra specie e della variabilità entro le specie. Per le limitazioni sopra elencate del concetto e della pratica relativamente alla specie microbica i due aspetti tendono talvolta ad essere confusi. La sezione che segue assume che le specie vengano definite come illustrato nel capitolo precedente e che tutte le attività di descrizione successiva vengano effettuate all'interno di gruppi che, almeno nominalmente, appartengano alla stessa specie. Viene quindi prodotta una raccolta ragionata di definizioni di carattere tassonomico che servirà al confronto critico di termini analoghi con significati non necessariamente identici impiegati dai biologi vegetali ed animali.

### **Codici Internazionali di nomenclatura**

Vale la pena ricordare che la nomenclatura batterica è regolata dal Codice di Nomenclatura Batteriologica, mentre i funghi e le alghe sottostanno al Codice di Nomenclatura Botanica. Questi codici possono essere consultati presso gli indirizzi web sotto riportati.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=icnb&part=A184>

<http://www.ibot.sav.sk/karolx/kod/0000Viennatitle.htm>

<http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>

**Agroecosistema** - S'intende l'insieme delle piante e degli animali introdotte o modificate dall'attività umana.

**Alimento (o cibo)** - Ogni sostanza (liquida o solida) che viene assimilata da un organismo vivente, all'interno del quale svolge una o più delle seguenti funzioni: fornire energia all'organismo; fungere da materiale per la formazione dei tessuti biologici; catalizzare le reazioni chimiche che hanno luogo all'interno dell'organismo.

**Alimento trasformato** - La trasformazione agroalimentare è un processo tecnologico ed economico che crea un valore aggiunto ad un prodotto agricolo consentendone l'utilizzazione in forma e condizioni differenti rispetto a quelle originarie al momento della raccolta.

**Anamorfo** – Nei funghi l'anamorfo è la forma che non presenta ciclo sessuale

**Biodisponibilità** - La possibilità di una sostanza organica e inorganica di essere mineralizzata dai microrganismi presenti in un determinato ambiente.

**Biodiversità assoluta** - la dotazione in termini sia di ricchezza che di abbondanza di specie con le relative funzioni di un determinato sito, che si mantenga costante nel tempo.

**Biodiversità attuale**: biodiversità definita dall'osservazione analitica del momento.

**Bioindicatori** - Segnali naturali che ci permettono di riconoscere il deteriorarsi degli equilibri naturali.

**Biomassa** - Termine generico che indica tutta la materia organica sia di natura vegetale che animale presente, ad esempio, in un ecosistema. E' un indice della capacità produttiva di un particolare ambiente biologico. Normalmente viene espressa in peso (secco) per unità di superficie o in unità di energia (J/m). Ovviamente l'unità di misura cambia a seconda dell'oggetto in esame. La biomassa di una popolazione di insetti, ad esempio, verrà calcolata in g/m, mentre quella di una comunità erbacea presente in un prato in kg/m e quella di un bosco in t/ha. In campo energetico la biomassa indica la quantità di materiale organico che può essere utilizzata per produrre energia per combustione o tramite fermentazione. Le biomasse utili ai fini della produzione di energia includono il legno, liquami e feci animali, residui agricoli, forestali e della carta. Il concetto di biomassa è strettamente collegato a quello di "produttività" che indica la produzione di biomassa per unità di tempo ed è un parametro funzionale utile allo studio della qualità ambientale e all'evoluzione dello stato di un ecosistema.

**Biomassa microbica** – Indica l'insieme della popolazione microbica (batteri, funghi, attinomiceti, alghe, lieviti).

**Biota** - Vita animale e vegetale caratterizzante una regione. Si usa anche per indicare collettivamente la flora e la fauna. Nel caso del suolo indica l'ambiente suolo nel suo insieme funzionale, assimilandolo ad un "superorganismo" vivente dotato di un'abilità intrinseca di controllare il proprio metabolismo ed i processi biochimici tanto da mantenere costanti le condizioni ambientali favorevoli alla vita

**Catena trofica** - Insieme di processi per cui in natura i residui di una forma di vita diventano alimenti per altre forme di vita successive o parallele. Esempio: il bruco mangia la foglia, l'uccello insettivoro mangia il bruco, il falco mangia l'uccello insettivoro.

**Ceppo** – Il ceppo è un insieme di cellule microbiche derivanti da una stessa cellula madre per esclusiva riproduzione vegetativa. A differenza della coltura pura, il ceppo riceve una denominazione che lo identifica. Per certi versi si potrebbe dire che il ceppo è "l'individuo" della microbiologia, nel senso che il ceppo sta alla specie microbica come l'organismo individuale sta alla specie di macro-organismi. Va considerato che in senso stretto ed in biologia l' "individuo" è l'entità unitaria, minima che, se frammentata, perde la sua funzione. Nel caso del ceppo, lo smembramento anche in singole cellule, non altera la funzionalità biologica, da questo punto di vista il ceppo non è considerabile un individuo. D'altra parte lo smembramento del ceppo produce copie identiche (propagazione asessuata microbica) indistinguibili, per cui non corrisponde logicamente allo smembramento degli organi pluricellulari. Da quest'altro punto di vista si può considerare che il ceppo sia l'individuo della microbiologia.

Dal punto di vista pratico, la specie microbica è formata da diversi ceppi.



**Ciclo** - Dal greco *kyklos* (=cerchio). Corrisponde al succedersi regolare di una serie di fenomeni che si ripetono senza interruzione e con periodico ritorno al punto di partenza. c. biologico – riciclo di alcuni elementi chimici dagli esseri viventi (bio) al mondo inanimato (geo) terrestre e all'atmosfera. Esiste un ciclo del carbonio, dell'azoto, dell'ossigeno, del fosforo, ciascuno con le sue particolarità.

**Clone** – Sinonimo di ceppo.

**Colonia** – Una colonia è un insieme di cellule microbiche derivanti da una stessa cellula madre per esclusiva riproduzione vegetativa, raggruppate in maniera discreta e distinta da altre colonie. Si tratta quindi di un ceppo raggruppato nello spazio, normalmente sulla superficie di piastre di terreno microbico solidificabile. Nella prassi da una colonia deriva un ceppo.

**Coltura pura** – Rappresenta la messa in coltura di un ceppo.

**Coltura mista** – La coltura mista è una coltura microbica costituita da più ceppi. Nel caso di microrganismi sessuati, una coltura mista deriva dai prodotti meiotici (e quindi sessuali) di un ceppo o addirittura di una colonia.

**Coltura monosporale** – E' una coltura la cui cellula madre è una spora, ossia una cellula aploide derivante da meiosi.

**Coltura polisporale ricombinante** – E' una particolare coltura mista composta dalle colture sporali derivanti dalla scorificazione di cellule appartenenti allo stesso ceppo.

**Decompositori** - Termine usato in ecologia; indica quegli organismi, quasi tutti microrganismi eterotrofi che decompongono le sostanze organiche contenute nei resti di animali e vegetali morti in sostanze inorganiche. Questo processo si definisce mineralizzazione e porta all'immissione di atomi sotto forma inorganica, nell'aria, nell'acqua e nel terreno chiudendo il ciclo della materia. Sono decompositori essenzialmente i batteri e i funghi.

**Denitrificazione** - Processo di riduzione dei nitrati ad azoto elementare (che si libera in forma gassosa) ad opera di batteri facoltativi in grado di utilizzare, in condizioni anossiche, l'ossigeno contenuto in questi composti.

**Diversità di specie** – Corrisponde al numero delle specie di individui presenti nel suolo, tenendo conto che il termine “specie” non si può applicare a quei microrganismi che si riproducono per via assessuale (es. virus e batteri).

**Diversità ecosistemica** – Definisce il numero e l'abbondanza degli habitat, delle comunità biotiche e degli ecosistemi all'interno dei quali vivono e si evolvono i diversi organismi.

**Diversità genetica** – Designa la variazione dei geni e dei genotipi all'interno della specie. Essa corrisponde alla totalità dell'informazione genetica contenuta nei geni di tutti i microrganismi che popolano il suolo.

**Diversità funzionale** – Espressione del grado di variabilità dei processi metabolici che garantiscono la fertilità e la sostenibilità di un suolo, nonché della sua stabilità ecologica.

**Diversità microbica** – Rappresenta l'espressione del grado di variabilità tra gli individui che popolano il suolo stesso. E' definita dall'insieme delle specie microbiche, dal loro materiale genetico, e dagli ecosistemi di cui esse fanno parte. Essa è definita dalla diversità ecosistemica, della specie, genetica e funzionale.

**Fertilità del suolo** – Attitudine del suolo a produrre.

**Fertilità integrale del suolo** – Rappresenta l'insieme delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche

**Fertilità biologica** – Definisce l'attività dei microrganismi di un suolo dai quali dipendono tutti gli equilibri dei cicli dei principali elementi nutritivi per le piante quali azoto, fosforo, ecc..

**Filiera** (agro-alimentare, industriale, tecnologica) - In senso lato, si intende l'insieme articolato (anche detto 'rete' o 'sistema') che comprende le principali attività (ed i loro principali flussi materiali e informativi), le tecnologie, le risorse e le organizzazioni che concorrono alla creazione, trasformazione, distribuzione, commercializzazione e fornitura di un prodotto finito; in senso più stretto, si intende l'insieme delle aziende che concorrono alla catena di fornitura di un dato prodotto.

**Funzioni del suolo** – Nel presente documento vengono definite funzioni del suolo i servizi ecosistemici garantiti dal biota suolo ad esempio nitrificazione, mineralizzazione della sostanza organica, desertificazione, fissazione dell'azoto, ecc..

**Genere** - Il genere rappresenta un insieme **monofiletico** di specie, ovvero un gruppo di specie che derivino da uno stesso progenitore comune. Il nome generico è il primo dei due epiteti obbligatori nella nomenclatura binaria. Formalmente deve essere scritto in corsivo e con l'iniziale maiuscola (e.g. *Saccharomyces*). Il genere microbico è spesso soggetto a grandi alterazioni nominali (es. il genere *Saccharomyces* scisso in *Kazachstania* e *Saccharomyces*) a causa del fatto che raramente esistono caratteri morfo-funzionali fondamentali e comuni fra le specie del genere, come ad esempio la struttura del fiore nella botanica sistematica.

**Humus** - E' quella parte della sostanza organica del suolo che deriva da complesse azioni di trasformazioni a carico dei residui di origine vegetale e animale. Tale processo si completa con la sintesi di molecole organiche a diverso grado di complessità di natura colloidale che in laboratorio è possibile isolare anche in funzione del differente peso molecolare. Queste sono classicamente rappresentate dagli acidi umici, dagli acidi fulvici e dalla umina che insieme costituiscono le sostanze umiche.

**Indicatore** – È un qualsiasi parametro che provvede alla rappresentazione sintetica di un fenomeno complesso. Un indicatore ambientale deriva da una osservazione o misurazione di una variabile ambientale.

Secondo OCSE, 1993: parametro o valore derivato da un parametro dal quale è possibile ricavare informazioni circa lo stato di un fenomeno, ambiente, area con un significato estendibile anche al di fuori di un fenomeno, ambiente, area, perché direttamente correlato al valore del parametro (OCSE, 1993)

**Indice** – Insieme di parametri o indicatori aggregati o pesati (OCSE, 1993)

**Indice di diversità** - Indice esprime il grado di eterogeneità di una comunità di organismi (Biocenosi) mediante accertamento statistico della situazione reale esistente fra le due situazioni teoriche estreme: (a) tutti gli individui della comunità appartengono alla medesima specie, (b) ogni individuo della comunità appartiene ad una specie diversa. Fra queste due estremità si possono trovare tutte le gradazioni intermedie.

**Innesto** – Ceppo selezionato per svolgere al meglio attività microbiologico-industriali

**Innesto misto** – Innesto composto da più ceppi o anche da più specie

**Livello trofico** - In natura, il livello trofico corrisponde ad ogni anello della catena alimentare, mediante il quale l'energia (intesa come nutrimento) fluisce attraverso un ecosistema, trasferendosi da un organismo all'altro, a partire dal mondo vegetale, per arrivare ai carnivori di grosse dimensioni. Passando da un livello trofico a quello successivo, la quantità disponibile di energia decresce. Infatti, ad ogni passaggio, una piccola parte dell'energia viene utilizzata dagli organismi per compiere i processi vitali e una gran parte viene eliminata come rifiuto.

**Monitoraggio** – La determinazione sistematica di un set di variabili o indici caratteristici aventi lo scopo di evidenziare attraverso analisi periodiche cambiamenti nel tempo. Possiamo distinguere un monitoraggio nello spazio, un monitoraggio nel tempo e uno nello spazio e nel tempo (APAT).

**Parametro** – Proprietà che si misura o si osserva (OCSE, 1993).

**Parametro ambientale** - Grandezza convenzionale che misura il valore assunto da una data variabile ambientale (ad esempio, la concentrazione di ossigeno nell'acqua, la sua percentuale di saturazione, il livello sonoro espresso in decibel, il traffico orario, ecc.). Insieme delle caratteristiche fisiche, chimiche e del substrato, che determinano la fisionomia di un determinato ambiente o biotopo, creando specifici riflessi per l'instaurarsi delle biocenosi.

**Patina** - Insieme di cellule ricoprenti una superficie

**PCR** - Tecnica di biologia molecolare utilizzata per amplificare in breve tempo tratti specifici di DNA, purché se ne conosca, almeno in parte, la sequenza. Si avvale di cicli di denaturazione, riassociazione con l'innescò e di estensione per amplificare di oltre 10<sup>6</sup> volte il numero di copie

della sequenza di DNA bersaglio. Questa tecnica ha un grande numero di applicazioni in campi diversi, dalla ricerca alla diagnostica alla medicina legale.

**Qualità del suolo** – La capacità del suolo di interagire con l'ecosistema per mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale, e promuovere la salute animale e vegetale.

**Siero Innesto** - Il siero innesto è il prodotto della fermentazione del siero ottenuto dalla lavorazione del giorno precedente

**Sierotipo** – insieme di microrganismi dello stesso tipo (generico) in base alle caratteristiche serologiche, ovvero microbi con identici anticorpi di superficie. Il sierotipo è un caso particolare di tipo generico.

**Sostanza organica** – E' il parametro chiave per la qualità fisica, chimica e biologica del suolo. Influenza fortemente la struttura del suolo stesso, supportando la formazione degli aggregati e della porosità. Contribuisce all'accumulo di nutrienti, a supportare la frazione di scambio cationica del suolo e contiene la maggior parte degli elementi nutritivi disponibili che, per mineralizzazione, vengono ad essere resi disponibili per gli organismi viventi.

**Sottospecie** – In un numero piuttosto limitato di casi è ancora invalso l'uso di suddividere le specie in due o più sottospecie sulla base di uno o pochi caratteri. L'uso è invalso (Paccagnini, et al., 2009), ma non incoraggiato, come sancito dalla REGOLA 5d del Codice di Batteriologia.

**Specie** – Per il significato si rimanda alla sezione precedente. La specie è designata da un sistema binario consistente di un nome generico seguito da un epiteto specifico (es. *Saccharomyces* epiteto generico *cerevisiae* epiteto specifico). L'epiteto specifico a scritto in corsivo minuscolo. Da solo l'epiteto specifico non è sufficiente a definire la specie che deve essere tassativamente indicata con entrambi gli epiteti o (dopo la prima citazione in un testo) con l'iniziale del genere seguita dall'epiteto specifico (es. *S. cerevisiae*).

**Stabilità ecosistemica** – Rappresenta la fluttuazione interna ad un insieme di organismi viventi che popolano lo stesso habitat al fine di garantire la funzionalità dell'ecosistema stesso.

**Starter** - Inglese per **Innesto**

**Suolo** - La parte più superficiale della crosta terrestre in cui le radici delle piante penetrano e trovano nutrimento e sostegno. E' composto da una fase solida (minerale ed organica), una fase liquida, una gassosa e da organismi viventi. Il limite superiore del suolo è rappresentato dall'atmosfera, dalle acque superficiali e dalla vegetazione (vivente o non ancora in decomposizione). Il limite inferiore è rappresentato dalla roccia madre o dalle acque profonde.

E' una risorsa essenziale e non rinnovabile la cui degradazione può essere estremamente rapida mentre i suoi processi di formazione e di rigenerazione estremamente lenti. E' un sistema molto dinamico le cui capacità rappresentano un servizio vitale per le attività umane e la sopravvivenza degli ecosistemi.

**Taxon** – (pl. Taxa) Il taxon è un gruppo tassonomico di qualsiasi livello (Art. 1.1 Cod. Nom. Botanica)

**Telomorfo** - funghi l'anamorfo è la forma che presenta ciclo sessuale. La compresenza di anamorfi e telomorfi, ossia di forme asessuate o sessuate (dette anche perfette) nella stessa specie viene definita con nomi diversi; per esempio il lievito *Debaryomyces hansenii* è il telomorfo della specie *Candida famata*. Da quando 1854 il microbiologo De Bary si rese conto del fenomeno in due specie chiamate *Eurotium herbarium* (telomorfo) e *Aspergillus glaucum* (anamorfo) si è posto il problema della nomenclatura di organismi identici, salvo per la presenza del ciclo sessuale. Dal 1905 Il Codice di Nomenclatura Botanica ha permesso per i funghi la doppia nomenclatura, tuttora stabilita dall'Art. 59.

**Tipo (generico)** – La parola “tipo” viene usata in maniera generica per indicare un profilo di descrittori comune ad un gruppo di ceppi. In questo caso i ceppi dello stesso “tipo” risultano indistinguibili, almeno limitatamente ai descrittori considerati per definire il tipo.

**Tipo – Tipo per la nomenclatura.** Si tratta dell'organismo rappresentante il taxon, secondo il Codice di nomenclatura Botanica “**nomenclatural type**. The element to which the name of a taxon is permanently attached (Art. 7.2).” Il ceppo tipo è quello che rappresenta una specie, la specie tipo è quella rappresentante del genere e così via. Il tipo di nomenclatura è un elemento essenziale della tassonomia, anche se al momento non sono stati effettuati studi approfonditi sull'effettiva rappresentatività dei tipi. Si tratta quindi di un aspetto fondamentale della tassonomia, soprattutto dal punto di vista nominalistico.

**Tossicità** - Per tossicità di una sostanza si intende la sua capacità di provocare effetti dannosi sugli organismi viventi, alterandone il corretto funzionamento cellulare. Ogni sostanza è virtualmente tossica in funzione della dose; diviene tossica quando raggiunge una certa concentrazione nell'organismo e nel suo sito di azione. La tossicità di una sostanza è strettamente legata alla sua possibilità di assorbimento, trasporto, metabolismo ed escrezione nell'organismo vivente. Si parla di tossicità acuta quando la dose è elevata e l'effetto si manifesta in tempi brevi (minuti, ore o giorni); la quantità che causa l'effetto tossico dipende dal tipo di sostanza. La tossicità cronica è causata da una esposizione a piccole dosi prolungata nel tempo. La dose tossica, in questo caso, viene raggiunta perché la sostanza si accumula nell'organismo.

**Varietà** – La varietà è sinonimo di sottospecie nel Codice di Batteriologia (REGOLA 5d), il suo uso è parimente sconsigliato anche se esistono casi diffusi quali la specie *Debaryomyces hansenii* che risulta suddivisa nelle due varietà *hansenii* e *fabryi* a seconda della capacità di crescere a 37°C.

## Capitolo II – Marcatori

In questo capitolo saranno presentati possibili marcatori, utilizzabili per descrivere la biodiversità microbica di interesse agrario e alimentare. Tali marcatori saranno presentati secondo il criterio “dal più semplice al più complesso” in modo da fornire un quadro il più completo possibile e tale da permettere analisi sequenziali (ovvero via via più complesse) della diversità microbica.

### II.1 – Raccolta dei possibili “marcatori pratici” applicabili nei rilevamenti di biodiversità da parte di personale non specializzato.

La raccolta di questi marcatori dovrebbe consentire a personale operativo nei vari settori agrario, ambientale ed alimentare di effettuare con sistemi rapidi e semplici una stima preliminare del livello di variabilità e diversità presenti in modo da indirizzare analisi, raccolte di campioni ed operazioni di salvaguardia o di valorizzazione.

Viene qui di seguito elencata una serie di marcatori pratici a seconda degli ambiti applicativi.

Per comodità espositiva viene riportata di seguito una classificazione di massima dei marcatori di cui i primi due tipi, preliminari ed obiettivi) saranno trattati in questo capitolo mentre i marcatori laboratoriali saranno esaminati in II.3 e II.4.

- A. **Marcatori preliminari** (es. Prodotto tipico, DOP etc, condizione colturale particolare, rotazioni tradizionali non comuni etc)
- B. **Marcatori obiettivi** (es. Prodotto tipico con caratteristiche peculiari, condizione ambientale non comune etc)
- C. **Marcatori laboratoriali.** sono tutti i marcatori rilevabili solo con accurate analisi in laboratorio e sono a loro volta distinti in:
  - i. Marcatori macro e micro morfologici (forma dimensione etc della colonia o della cellula)
  - ii. Marcatori fisiologici (assimilazioni, fermentazioni, resistenze a condizioni stressanti etc.)
  - iii. Marcatori Molecolari distinti in Marcatori per la definizione di specie e marcatori utili alla caratterizzazione.

Viene qui di seguito elencata una serie di marcatori pratici (preliminari e obiettivi) e discussi separatamente a seconda degli ambiti applicativi.

#### A. Marcatori preliminari

I marcatori preliminari sono quelli che consentono di individuare un sito o situazione potenzialmente interessante per la caratterizzazione e successiva conservazione della biodiversità di interesse agrario

##### a. Microbiologia alimentare

1. **Presenza di marchi** (DOC, DOP, IGT etc.) La presenza di marchi di qualità e/o di tipicità è un buon indice preliminare per ritenere che una qualche forma di variabilità o di diversità microbica. Tale marcatore è assolutamente preliminare ed indicativo. Per esempio in una zona Di Origine Controllata (VQPRD) è molto probabile che i vini vengano fermentati con starter

industriali e che quindi in parecchie cantine venga a mancare una qualsiasi forma di biodiversità autoctona. La presenza di un marchio è quindi un parametro importante, ma non necessario, né tantomeno sufficiente per garantire la presenza di biodiversità isolabile.

**2. Differenziazione geografica.** Indipendentemente dai marchi, i vari prodotti, soprattutto tipici, sono caratterizzati dalla località di produzione. In taluni casi si ha addirittura la stessa denominazione in areali significativamente differenti. Per esempio, il Pecorino di Norcia viene prodotto anche in zone limitrofe con piccole, ma significative differenze tecnologiche e di materie prime (vedi in seguito), ma soprattutto in situazioni per cui la biodiversità microbica risulta segregata e quindi differenziata da una zona all'altra. La distanza geografica non è necessariamente proporzionale alla distanza genetica. Dal punto di vista della biodiversità microbica la distanza geografica non va intesa solamente come distanza geometrica, ma anche come presenza di situazioni naturali ed antropizzate che limitino lo scambio microbico. Da questo punto di vista una catena montuosa divide due valli adiacenti molto più della distanza calcolata in pianta. Anche questo descrittore ha carattere puramente presuntivo, anche se risulta molto indicativo. Per maggiori dettagli consultare il caso studio sulla biodiversità blastomicetica dei formaggi Pecorino.

**3. Onomastica** I nomi dei prodotti agroalimentari vanno considerati con estrema attenzione in quanto derivano da stratificazioni successive storiche e culturali che possono generare diverse situazioni:

- i. Stessa denominazione, ma prodotti diversi. E' il caso delle vernacce, nome che raccoglie vini bianchi secchi flor (Vernaccia di Oristano), vini bianchi secchi (vernaccia di San Gimignano), semifermentati rossi (Vernaccia di Cannara) e spumanti rossi (Vernaccia di Serrapetrona).
- ii. Denominazione diversa, ma prodotti simili. E' il caso di vini omonimi con vitigni identici, ma denominati in maniera diversa in luoghi differenti. In questo caso la nomenclatura potrebbe far supporre una differenza che effettivamente non è riscontrata a livello delle materie prime (vedi sotto).
- iii. Denominazione mancante. In molti casi non è stata richiesta o concessa alcuna denominazione tipica e i prodotti vengono commercializzati con nomi generici. E' tipico il caso dei formaggi "Pecorino" identificati dalla zona di produzione, ma che in moltissimi casi non presentano identificazioni aggiuntive. Un altro caso è quello dei vari "pane fermentato in maniera naturale" ottenuti da **paste acide** affatto diverse anche se raramente esiste una differenziazione di denominazione.

In generale l'onomastica e la denominazione sono un aiuto, ma richiedono un'attenta disamina e ricostruzione per capire che tipo di differenza biologica sia da attendersi dai prodotti alimentari in base al loro nome.

**4. Tecnologia.** La tecnologia produttiva è uno degli aspetti fondamentali nel condizionamento della biodiversità. In linea generale impianti e tecnologie innovative hanno scelto l'uso di starter industriali, annullando o riducendo drasticamente la biodiversità residente, soprattutto autoctona. D'altra parte tecniche diverse selezionano diversamente la biodiversità microbica,

come per esempio le temperature di riscaldamento del latte nell'industria casearia, l'uso dell'anidride solforosa o pratiche di filtrazione dei mosti nell'industria enologica e così via. Soprattutto nelle piccole produzioni tipiche, la tecnologia è ben correlabile con il territorio e quindi con la distanza geografica.

5. **Sistema produttivo.** Molti alimenti sono prodotti con sistemi convenzionali, biologici, biodinamici etc. Non è ancora chiaro, ma si sta studiando quanto sia l'effettivo impatto sulla biodiversità di queste differenti modalità produttive. E' comunque preferibile campionare la biodiversità da aziende con sistemi produttivi diversi, là dove se ne presenti l'occasione.
6. **Densità e dimensione dei produttori.** La dimensione dei produttori, il loro numero e la loro dispersione sul territorio sono parametri fondamentali in quanto, molto spesso, la biodiversità microbica in campo alimentare è conservata da piccoli produttori familiari che hanno mantenuto produzioni tipiche su scala ridotta. Viceversa, la scala industriale è spesso associata all'uso di starter selezionati a diffusione ampia o globale con evidenti riduzioni sul livello di biodiversità microbica.
7. **Disponibilità di impianti naif.** Come esposto in diversi punti precedenti, uno dei maggiori rischi di erosione della biodiversità è legato all'uso di starter industriali. La ricerca di biodiversità microbica non può quindi prescindere da ricercare impianti naif, ovvero mai interessati all'uso di tali starter. Il ricercatore di biodiversità dovrà curare in maniera particolare l'anamnesi relativamente a questo aspetto prima di pianificare un campionamento, infatti non è infrequente che esista una ritrosia a dichiarare l'avvenuto uso di starter. E' anche possibile che lo starter sia avvenuto senza la piena comprensione dell'operatore, specie a causa di preparati commerciali contenenti anche lo starter. Anche se può apparire banale, questa fase di anamnesi richiede che venga usato il giusto vocabolario, infatti pochi produttori comprenderanno il termine "starter", altri con la parola lievito intendono l'organismo fungino, altri un mix batterico per la panificazione etc., viceversa in certi luoghi il lievito (*sensu biologico*) viene denominato "fermento". E' quindi indispensabile dedicare una grande cura a questi particolari apparentemente insignificanti. Impianti non del tutto naif possono essere tuttavia interessanti, a patto che si sia in grado di discernere fra la biodiversità autoctona e gli eventuali starter impiegati.
8. **Disponibilità di impianti dismessi.** Gli impianti dismessi, vecchie cantine, caseifici salumifici etc. possono essere una sorgente di biodiversità, in quanto le massicce quantità di microbi adese alle superfici possono in certi casi mantenere livelli sufficienti di vitalità da consentire l'isolamento. In passato è stato possibile, per esempio, isolare lieviti *S. cerevisiae* simili da pavimenti in terra battuta di cantine dismesse da oltre 70 anni (Cardinali Pers. Com.).
9. **Materie prime.** Le materie prime di origine influenzano la microflora degli alimenti principalmente in due maniere: trasportando microrganismi ambientali e selezionando il microbiota in base alla composizione della materia prima stessa. Il primo caso è esemplificabile nelle uve che portano sulla propria superficie tutta una serie di batteri e funghi i quali possono influenzare la prima parte della fermentazione. Casi simili possono riscontrarsi



per tutte le materie prime che non vengano sterilizzate o impoverite della carica microbica prima della trasformazione. Il secondo effetto della materia prima sta nella selezione che compie a carico dei microrganismi. Per esempio, un mosto d'uva molto zuccherino permetterà di selezionare per ceppi di *S. cerevisiae* con elevato potere fermentativo

**10. Periodi produttivi.** Alimenti analoghi vengono prodotti in stagioni o periodi dell'anno diversi. E' il caso di formaggi prodotti nel corso dell'anno con tipi di latte diversi a causa del diverso status fisiologico e produttivo di mucche o pecore. E' anche il caso dei "vinsanti" prodotti in epoche successive alla vendemmia ordinaria, ma comunque diverse da zona a zona. La diversità dell'epoca produttiva può condizionare la variabilità e la diversità microbica direttamente (es. temperatura) o indirettamente per via delle differenze delle materie prime.

**11. Conservazione e invecchiamenti.** Nel corso dell'invecchiamento o della semplice conservazione si instaurano dinamiche delle popolazioni batteriche abbastanza note per alcune bevande o alimenti, ma non ben esplorate per tanti altri. E' comunque noto che il profilo microbico cambia significativamente col tempo trascorso dalla produzione. Un caso tipico è quello dei lieviti della polpa di formaggio che aumentano nelle prime due o tre settimane per poi calare nei mesi successivi.

**12. Posizionamento entro il prodotto.** La biodiversità cambia in maniera molto marcata a seconda della zona del prodotto analizzata. In certi casi si hanno variazioni anche nello spessore dello stesso frutto. Sicuramente esistono grandi variazioni fra polpa e crosta dei formaggi. In campo enologico esistono differenze fra la biodiversità recuperabile non tanto fra le varie parti del prodotto, che essendo liquido assicura una certa omogeneizzazione, ma fra i vari materiali e strumenti che sono venuti a contatto con mosto o vino in fase produttiva.

## **b. Microbiologia ambientale.**

Nel presente manuale verranno unicamente descritti i marcatori a livello del suolo perchè direttamente correlati con le popolazioni microbiche. Nel caso dei microrganismi del suolo è difficile, se non impossibile fornire dei marcatori morfologici sui microrganismi stessi a livello di campo sia per le dimensioni dei microrganismi stessi che non possono essere visti ad occhio nudo, che per il fatto che è molto difficile il loro isolamento e la loro coltivazione, pertanto a livello di osservazione di pieno campo verranno definiti nel caso del suolo "marcatori morfologici" tutto ciò che può essere osservato ad occhio nudo correlabile alla vita del suolo ed alle funzioni dei microrganismi, ma non si tratterà mai di microrganismi veri e propri.

Sono marcatori morfologici preliminari a livello del suolo tutti i marcatori riportati nella matrice. Di seguito se ne fornisce una descrizione sintetica.

**1. Tessitura:** Tra i fattori limitanti lo sviluppo e la crescita delle comunità microbiche del suolo troviamo la temperatura e l'umidità del suolo. La tessitura definita, indipendentemente dalla natura chimica e mineralogica delle differenti componenti, come la composizione granulometrica del suolo, espressione in percentuale dei rapporti tra particelle grossolane in

frazioni a diametro comprese tra 2 e 0,2 mm (sabbia), 0,2 – 0,02 mm (limo) e 0,02 a 0,002 mm (argilla), caratterizza il comportamento del suolo in termini di trattenimento dell'acqua e quindi della sua umidità, compensazione del calore e di contenuto in ossigeno. Terreni ricchi in sabbia perderanno più facilmente umidità e compenseranno più difficilmente temperature elevate, viceversa saranno terreni nei quali si avrà una aereazione abbondante. Terreni argillosi o limosi, tratterranno acqua, con probabile carenza di ossigeno. Terreni con una percentuale equilibrata tra le tre diverse frazioni granulometriche saranno quelli che ospiteranno meglio le comunità microbiche, quindi saranno tendenzialmente quelli ad avere una biodiversità più elevata.

2. **Colore:** Dal colore del suolo si può facilmente dedurre la composizione chimica predominante nel suolo stesso. Terreni molto scuri (marrone scuro, bruno scuro) saranno terreni particolarmente ricchi in sostanza organica. E' noto che la sostanza organica è la principale fonte di nutrimento per la popolazione microbica del suolo e quindi suoli particolarmente ricchi in sostanza organica saranno presumibilmente ricchi in biodiversità microbica. Un colore chiaro invece denuncia poca presenza in sostanza organica e quindi poca presenza di microrganismi, oppure una bassa biodiversità per la presenza di popolazioni specializzate ed adattate a vivere in un ambiente con una differenziazione trofica ridotta. Suoli rossi saranno caratterizzati dalla presenza di sesquiossidi di ferro e quindi vedranno anch'essi una specializzazione della popolazione microbica, perché non tutti i microrganismi si adattano bene a concentrazioni di ferro elevate, anzi in alcuni casi possono essere addirittura lesive.
3. **Coltura:** la coltura è un elemento chiave nella comprensione della dinamica della biodiversità del suolo. Sono note le strette relazioni che sussistono a livello rizosferico tra pianta e microrganismi del suolo. Più è complesso l'ecosistema vegetale del soprassuolo è più complessa sarà la biodiversità del suolo. I prati polifitici sono quelli che mostrano la maggiore complessità e ricchezza nelle popolazioni microbiche del suolo. Monocolture tendono a semplificare la biodiversità del suolo attraverso una eccessiva specializzazione della popolazione microbica. Sarà pertanto fondamentale capire quale tipo di gestione agronomica interessa il suolo per individuare le eventuali catene trofiche che si innescano a livello del suolo, la presenza di leguminose e quindi simbiosi, quali specie sono micorriziche o no e così via.
4. **Lavorazioni:** è importante conoscere il tipo di lavorazione che si effettua perché strettamente correlata alla struttura del terreno ed al suo contenuto in sostanza organica. Lavorazioni troppo profonde portano ad una diluizione della sostanza organica, ad una aereazione forzata e quindi in determinati periodi dell'anno anche alla mineralizzazione della sostanza organica stessa. Terreni asfittici, non lavorati possono compromettere comunque la vita microbica orientando la colonizzazione verso un prevalere di popolazioni anaerobiche sulle aerobiche.
5. **Ambiente:** Le zone climatiche sono esse stesse guida verso una individuazione di determinati gruppi fisiologici piuttosto che altri. Non vi sono a tutt'oggi studi sistematici relativi al medesimo gruppo fisiologico ed alla sua caratterizzazione genetica e molecolare nei confronti di un possibile adattamento a zone climatiche diverse. Si conoscono microrganismi adattati a vivere a temperature bassissime ad esempio sotto il demafrost oppure altri adattati a vivere nelle pozze di acqua termale, ma ancora oggi non vi sono studi sistematici che li pongano a confronto.

6. **Fertilizzazioni:** la sostanza organica di per sé è fonte di nutrimento per i microrganismi e quanto più è stabile, tanto più contribuisce al mantenimento di una ricca e abbondante comunità microbica del suolo. Anche l'apporto di nutrienti in forma minerale contribuisce alla nutrizione microbica. E' noto però che i concimi minerali provocano quello che comunemente viene definito come "priming effect" cioè un innalzamento del numero della popolazione microbica, per lo più molto specializzata, che divora la componente minerale per poi andare a mineralizzare la sostanza organica endogena, pertanto nel lungo periodo le concimazioni organiche portano ad un innalzamento della biodiversità del suolo, mentre le concimazioni minerali ad un impoverimento.
7. **Produttività delle colture:** alta produttività è sinonimo di un buon stato di fertilità del suolo e quindi di una buona biodiversità. Ovviamente questo marcatore deve essere correlato al tipo di coltura per essere esaustivo.
8. **Tecnica colturale:** la monocoltura è pratica non conservativa, quanto più sarà vario ed articolato il disegno produttivo, tanto più sarà ricca ed abbondante la biodiversità del suolo. Rotazioni, successioni, alternanza tra colture più e meno esigenti, fertilizzazione verde ed altre tecniche conservative costituiranno un elemento fondamentale nella conservazione della biodiversità della popolazione microbica del suolo.
9. **Presenza di funghi macroscopici:** una ricca presenza di funghi macroscopici è sicuramente correlata ad una buona qualità ambientale. Avere una presenza importante di funghi macroscopici significa avere una presenza importante di ife fungine e di funghi microscopici. Significa avere una buona fertilità del suolo e ricchezza in biodiversità del suolo. Recentemente sono apparsi in letteratura articoli scientifici che correlano questo tipo di osservazione alla biodiversità del suolo. A livello nazionale questo sarebbe il primo esperimento in tale senso e costituirebbe un'importante acquisizione.
10. **Presenza di piante spontanee ed infestanti:** anche in questo caso la ricchezza del soprassuolo corrisponde ad una ricchezza del sottosuolo. E' importante vedere il sistema con un approccio ecosistemico. I prati costituiscono il riferimento principale a livello microbiologico della complessità della comunità microbica potenziale di un determinato suolo in un determinato ambiente.
11. **Presenza di lombrichi ed altri vermi:** terreni fertili sono popolati da un gran numero di lombrichi che oltre a svolgere un importante ruolo nel mantenimento della fertilità del suolo possono fornire una osservazione derivata sullo stato di salute del suolo stesso, sono degli ottimi e riconosciuti indicatori biologici. Là dove ci sono molti lombrichi ci sarà anche una ricca popolazione e biodiversità microbica. Anche in questo caso a livello internazionale sono riportati degli studi in tal senso. A livello nazionale esiste un solo esempio di correlazione tra popolazioni di lombrichi e vermi e fertilità biologica del suolo condotto in uno studio pilota sul suolo della provincia di Pavia coordinato dal JRC dell'U.E. in cui il CRA-RPS ha curato gli aspetti relativi alla biodiversità microbica. Raccogliere informazioni in tal senso sarebbe un esempio di grande valore nazionale.
12. **Presenza di insetti o mesofauna in genere:** molte catene trofiche passano attraverso l'osservazione degli insetti e della mesofauna. I carabidi del suolo sono ad esempio degli ottimi bioindicatori. Esistono studi nei quali vengono correlate dimensioni e specie di carabidi alla qualità ambientale. Anche in questo caso sarebbe interessantissimo correlare tra loro indicatori macroscopici quali i carabidi o insetti, facilmente catturabili, con la biodiversità microbica del

suolo, non catturabile e non osservabile. Sempre nell'esperimento condotto nella provincia di Pavia questo approccio si è rivelato molto promettente ed a livello di comunità europea i carabidi sono stati proposti come indicatori di biodiversità del suolo. In Italia non si hanno correlazioni in tal senso. Osservazioni raccolte in questo modo costituirebbero la base per osservazioni a livello di territorio italiano di grande valore.

## **B. Marcatori obiettivi**

Sono marcatori obiettivi tutti quei parametri che consentono di evidenziare uno stato o caratteristiche che leghino un prodotto od un ambiente a dei processi metabolici microbici essenziali perché si determinino risultati univoci e caratteristici (ad esempio: qualità del prodotto alimentare, fertilità del suolo)

### **a. Microbiologia alimentare**

- 1. Stato sanitario del prodotto.** Alimenti che presentino evidenti alterazioni di tipo patologico (es. malattie dei vini, ammuffimento o infradiciamento di frutta e verdura, gonfiatura e ammuffimenti eccessivi di formaggi, degradazioni putrefattive dei salumi etc.) difficilmente offriranno un quadro fedele della situazione del microbiota nel prodotto sano. Può essere comunque interessante campionare la biodiversità dei microrganismi responsabili del danneggiamento per poter definire poi strategie e materiali per contenerli. Nel caso si vogliano isolare microrganismi dannosi è importante distinguere fra gli agenti eziologici del danneggiamento e i microrganismi che hanno instaurato la loro crescita sul prodotto danneggiato. In questi casi conviene seguire la procedura del postulato di Koch per cui l'agente eziologico deve essere isolato, classificato e re inoculato in un prodotto/alimento sano per verificare che poi che vengano riprodotte le condizioni di danneggiamento.
- 2. Caratteristiche organolettiche.** Una delle ragioni principali della microbiologia enologica è l'isolamento di microrganismi che producano alimenti organoletticamente validi. Per questo è importante non prescindere da una valutazione di sapore, aroma e quant'altro possa indicare che in effetti la trasformazione o la conservazione ha avuto buon esito
- 3. Conservabilità.** La conservabilità di un prodotto è molto spesso la ragione prima per cui è stata sviluppata una tecnologia di trasformazione alimentare. In questo senso il vino è la trasformazione conservabile del mosto d'uva, lo yogurt del latte etc. al di là di queste ragioni storiche, i vari prodotti possono mostrare conservabilità molto differenti a seconda dei microrganismi presenti o utilizzati nella trasformazione. E' un'osservazione molto diffusa che i pani di tipo industriale abbiano in genere minor resistenza all'ammuffimento di quelli ottenuti con paste acide e quindi con l'azione congiunta di batteri e lieviti.
- 4. Dimensione del prodotto.** Per le ragioni sopra esposte sul posizionamento del microbiota nel prodotto, va tenuta in considerazione anche la forma e soprattutto la dimensione degli alimenti. Formaggi apparentemente simili, ma preparati in forme di peso molto diverso possono contenere popolazioni diverse di microrganismi. D'altra parte è ovvio che alimenti grandi permetteranno meno scambi gassosi e di temperatura fra la parte interna e l'ambiente esterno, producendo in tal modo condizioni di selettività.

### **b. Microbiologia ambientale**

- 1. Fertilità del suolo:** stato generale della fertilità del suolo caratteristica per quel determinato sito di produzione o osservazione. Tale marcatore è determinabile con appropriati indicatori di carattere chimico o fisico o biologici riconducibili a precise grandezze.  
Conservare la biodiversità a livello del suolo è una pratica che non può prescindere dalle buone pratiche agronomiche e di coltivazione. E' chiaro che nel caso dei microrganismi del suolo

l'approccio di monitoraggio e valutazione deve necessariamente essere diverso rispetto agli organismi superiori vegetali ed animali. I microrganismi sono gli artefici principali del ciclo degli elementi nutritivi e della fertilità del suolo pertanto a livello di campo possono essere individuati dei marcatori obiettivi che vanno a correlarsi alle funzioni del suolo ed alla sua fertilità. Sono note pratiche agricole conservative o distruttive nei confronti della fertilità del suolo e della sua biodiversità ed è a questa che ci si deve riferire per una prima analisi di campo alla quale successivamente, se di interesse, dovranno essere affiancate misure di biodiversità. Possono essere considerati marcatori obiettivi a livello del suolo tutte quelle condizioni ambientali particolari che causano una specializzazione della popolazione microbica del suolo dovute a cause naturali endogene. Suoli salini (infiltrazione d'acqua di mare, irrigazione con acque anomale, sodicizzazione genetica, ecc), suoli con un elemento della fertilità predominante in concentrazioni tali da essere selettivo per la popolazione microbica del suolo (suoli ricchi in sesquiossidi di ferro ed alluminio, suolo limitrofi a escavazioni minerarie, serpentiniti, ecc.), vertisuoli (suoli geneticamente definiti con caratteristiche peculiari che comportano nel periodo siccitoso crepacciamenti molto profondi e quindi una migrazione della popolazione microbica anche ad elevate profondità in controtendenza a quanto comunemente ritenuto), ecc. Moltissimi marcatori obiettivi a livello del suolo potranno essere individuati dagli operatori. Tali marcatori potranno essere facilmente identificati nell'analisi della scheda di campagna. Infatti nelle note sarà cura di colui che andrà ad effettuare i campionamenti di annotare qualsiasi elemento possa essere ritenuto interessante. Ad esempio: zona termale, zona a pascolo, zona interessata da traffico veicolare, zona interessata da fruizione turistica, zona inserita in una riserva naturale, zona inclusa in area industriale, zona precedentemente interessata da bonifica, zona limitrofa a discarica, zona percorsa dal fuoco, tutti i distretti ecologici territoriali legati a prodotti tipici, ecc..

**Tab. 1. Tabella di riferimento per la valutazione della biodiversità del suolo mediante l'uso di Indicatori Macroscopici**

Tipo di indicatore	Indicatore Macroscopico				Biodiversità
<b>TESSITURA</b>	<b>Sabbia</b>	<b>Limo</b>	<b>Argilla</b>	<b>Franco</b>	<b>-</b>
	X			X	+
		X			+/-
			X		+
<b>COLORE</b>	<b>Bruno</b>	<b>Marrone</b>	<b>Bianco</b>		
	X				+
		X			+
			X		-
<b>COLTURA</b>	<b>Leguminosa</b>	<b>Graminacea</b>	<b>Prato</b>		
	X				+
		X			-
			X		+
<b>LAVORAZIONI</b>	<b>Non lav</b>	<b>Minima</b>	<b>Profonda</b>		
	X				+
		X			+
			X		-
<b>AMBIENTE</b>	<b>Umido</b>	<b>Temperato</b>	<b>Arido</b>		
	X				+
		X			+
			X		-
<b>FERTILIZZAZIONI</b>	<b>Organica</b>	<b>Minerale</b>	<b>Mista</b>		
	X				+
		X			-
			X		+
<b>PRODUTTIVITA' DELLE COLTURE</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
	X				+
		X			+
			X		-
<b>TECNICA CULTURALE</b>	<b>Monocoltura</b>	<b>Successione</b>			
	X				-
		X			+
<b>PRESENZA DI FUNGHI Macroscopici</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
	X				+
		X			+
			X		-
<b>PRESENZA DI PIANTE SPONTANEE ED INFESTANTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
	X				+
		X			+
			X		-
<b>PRESENZA DI LOMBRICHI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		

<b>ALTRI VERMI</b>				
	<b>X</b>			+
		<b>X</b>		+
			<b>X</b>	-
<b>PRESENZA DI INSETTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>	
	<b>X</b>			+
		<b>X</b>		+
			<b>X</b>	+



**Tab.2. Matrice Analitica che andrà compilata a cura dell'agricoltore custode (Indicatori Macroscopici)**

<b>Tipo di indicatore</b>	<b>Indicatore Macroscopico</b>				<b>Biodiversità</b>
<b>TESSITURA</b>	<b>Sabbia</b>	<b>Limo</b>	<b>Argilla</b>	<b>Franco</b>	
<b>COLORE</b>	<b>Bruno</b>	<b>Marrone</b>	<b>Bianco</b>		
<b>COLTURA</b>	<b>Leguminosa</b>	<b>Graminacea</b>	<b>Prato</b>		
<b>LAVORAZIONI</b>	<b>Non lav</b>	<b>Minima</b>	<b>Profonda</b>		
<b>AMBIENTE</b>	<b>Umido</b>	<b>Temperato</b>	<b>Arido</b>		
<b>FERTILIZZAZIONI</b>	<b>Organica</b>	<b>Minerale</b>	<b>Mista</b>		
<b>PRODUTTIVITA' DELLE COLTURE</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
<b>TECNICA CULTURALE</b>	<b>Monocoltura</b>		<b>Successione</b>		
<b>PRESENZA DI FUNGHI Macroscopici</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
<b>PRESENZA DI PIANTE SPONTANEE ED INFESTANTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
<b>PRESENZA DI LOMBRICHI E ALTRI VERMI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
<b>PRESENZA DI INSETTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		

**Tab. 3. Esempio di costruzione di una matrice e risultato analitico (Indicatori Macroscopici)**

<b>Tipo di indicatore</b>	<b>Indicatore Macroscopico</b>				<b>Biodiversità</b>
<b>TESSITURA</b>	<b>Sabbia</b>	<b>Limo</b>	<b>Argilla</b>	<b>Franco</b>	
	+				-
<b>COLORE</b>	<b>Bruno</b>	<b>Marrone</b>	<b>Bianco</b>		
			+		-
<b>COLTURA</b>	<b>Leguminosa</b>	<b>Graminacea</b>	<b>Prato</b>		
		+			-
<b>LAVORAZIONI</b>	<b>Non lav</b>	<b>Minima</b>	<b>Profonda</b>		
			+		-
<b>AMBIENTE</b>	<b>Umido</b>	<b>Temperato</b>	<b>Arido</b>		
			+		-
<b>FERTILIZZAZIONI</b>	<b>Organica</b>	<b>Minerale</b>	<b>Mista</b>		
		+			-
<b>PRODUTTIVITA' DELLE COLTURE</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
		+			-
<b>TECNICA COLTURALE</b>	<b>Monocoltura</b>		<b>Successione</b>		
	+				-
<b>PRESENZA DI FUNGHI Macroscopici</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
			+		-
<b>PRESENZA DI PIANTE SPONTANEE ED INFESTANTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
			+		-
<b>PRESENZA DI LOMBRICHI E ALTRI VERMI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
			+		-
<b>PRESENZA DI INSETTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
			+		-
<b>VALUTAZIONE</b>				<b>RISCHIO DI EROSIONE</b>	

**Tab. 4. Esempio di costruzione di una matrice e risultato analitico (Indicatori Macroscopici)**

<b>Tipo di indicatore</b>	<b>Indicatore Macroscopico</b>				<b>Biodiversità</b>
<b>TESSITURA</b>	<b>Sabbia</b>	<b>Limo</b>	<b>Argilla</b>	<b>Franco</b>	
			+		+
<b>COLORE</b>	<b>Bruno</b>	<b>Marrone</b>	<b>Bianco</b>		
		+			+
<b>COLTURA</b>	<b>Leguminosa</b>	<b>Graminacea</b>	<b>Prato</b>		
			+		+
<b>LAVORAZIONI</b>	<b>Non lav</b>	<b>Minima</b>	<b>Profonda</b>		
			+		-
<b>AMBIENTE</b>	<b>Umido</b>	<b>Temperato</b>	<b>Arido</b>		
		+			+
<b>FERTILIZZAZIONI</b>	<b>Organica</b>	<b>Minerale</b>	<b>Mista</b>		
			+		+
<b>PRODUTTIVITA' DELLE COLTURE</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
		+			+
<b>TECNICA COLTURALE</b>	<b>Monocoltura</b>		<b>Successione</b>		
			+		+
<b>PRESENZA DI FUNGHI Macroscopici</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
		+			+
<b>PRESENZA DI PIANTE SPONTANEE ED INFESTANTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
		+			+
<b>PRESENZA DI LOMBRICHI E ALTRI VERMI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
		+			+
<b>PRESENZA DI INSETTI</b>	<b>Alta</b>	<b>Media</b>	<b>Bassa</b>		
		+			+
<b>VALUTAZIONE</b>				<b>STABILE DA MONITORARE</b>	

**Tab. 5. Esempio di costruzione di una matrice e risultato analitico (Indicatori Macroscopici)**

Tipo di indicatore	Indicatore Macroscopico				Biodiversità
TESSITURA	Sabbia	Limo	Argilla	Franco	
			+		+
COLORE	Bruno	Marrone	Bianco		
	+				+
COLTURA	Leguminosa	Graminacea	Prato		
	+				+
LAVORAZIONI	Non lav	Minima	Profonda		
	+				+
AMBIENTE	Umido	Temperato	Arido		
		+			+
FERTILIZZAZIONI	Organica	Minerale	Mista		
	+				+
PRODUTTIVITA' DELLE COLTURE	Alta	Media	Bassa		
	+				+
TECNICA CULTURALE	Monocoltura		Successione		
			+		+
PRESENZA DI FUNGHI Macroscopici	Alta	Media	Bassa		
	+				+
PRESENZA DI PIANTE SPONTANEE ED INFESTANTI	Alta	Media	Bassa		
	+				+
PRESENZA DI LOMBRICHI E ALTRI VERMI	Alta	Media	Bassa		
	+				+
PRESENZA DI INSETTI	Alta	Media	Bassa		
	+				+
<b>VALUTAZIONE</b>					<b>OTTIMA</b>

## **II.2 – Suddivisione dei microrganismi in macro-gruppi omogenei**

La suddivisione in macrogruppi è essenziale in quanto ad essa è legata l'applicazione dei vari criteri di identificazione e caratterizzazione e la scelta dei descrittori di diversità e variabilità, descritti nei paragrafi II.3 e II.4. La suddivisione dovrà essere effettuata in modo da permettere un rapido orientamento anche a personale scientifico non particolarmente addestrato in tassonomia e filogenesi.

Per le finalità di questo manuale i microrganismi di particolare interesse agrario, ambientale ed alimentare afferiscono principalmente a:

1. Regno Funghi (lieviti e funghi filamentosi)
2. Super-regno Batteri.

Dal momento che la maggior parte della biodiversità microbica non è stata ancora rilevata, si fornisce qui un elenco, necessariamente non esaustivo, degli ambiti agrari, alimentari e ambientali più rilevanti per la salvaguardia e la valorizzazione della biodiversità, con le specie attualmente note di maggior interesse.

### **a. Microbiologia alimentare**

#### **1. VINO, MOSTI e BEVANDE FERMENTATE**

BATTERI: *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* sp.

LIEVITI: *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hanseniaspora uvarum*, genere *Hanseniaspora* genere *Kloeckera*, *Candida stellata*

#### **2. PANE E PRODOTTI DA FORNO**

Batteri:

Lieviti: *Saccharomyces cerevisiae*

#### **3. FORMAGGI E PRODOTTI CASEARI**

BATTERI

LIEVITI: *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*

FUNGHI FILAMENTOSI: *Penicillium roquefortii*

#### **4. FRUTTA, VERDURA E PRODOTTI VEGETALI**

BATTERI

LIEVITI: *Metschnikowia pulcherrima*, *M. fructicola*, *P. guilliermondii*, genere *Hanseniaspora* ,

#### **5. SALUMI E PRODOTTI CARNEI**

BATTERI

LIEVITI

## 6. PRODUZIONI MINORI

### BATTERI

LIEVITI *D. hansenii*, *K.lactis*,

### b. Microbiologia ambientale

Nel caso del suolo abbiamo una prelatenza di microrganismi non coltivabili (VNC), piuttosto che coltivabili (solo l'1% di tutti i microrganismi che svolgono le funzioni del suolo sono coltivabili), quindi riconoscibili ed ascrivibili a questo o quel taxon.

Nel suolo vivono batteri, funghi (con prevalenza di basidiomiceti), alghe, attinomiceti. E' possibile discriminare gli uni dagli altri solo a livello molecolare mediante sequenze tipiche. Comunemente vengono catalogati in base alle funzioni metaboliche che svolgono quali ad esempio: nitrificanti, ammonizzanti, solfo-riduttori, ammonioossidanti, ecc. e vengono quantificati in base a marcatori chimici e metabolici del processo da loro mediato (produzione di nitrato, di ammonio, ecc.) si tratta di gruppi misti ed ancora oggi non quantificabili completamente. Gli ambiti di ricerca possono essere suddivisi in due: suolo rizosferico e non rizosferico, definito scientificamente bulck. Infatti alcuni microrganismi sono simbionti obbligati come ad esempio i Rizobi equindi possono ritrovarsi unicamente sulla rizosfera, mentre la stragrande maggioranza vive libera nel suolo. Infine non si ritiene opportuno catalogare microrganismi esogeni, che possono arrivare al suolo con liappotrto di sostanza organica perché una volta raggiunto il suolo la popolazione endogena tenderà a neutralizzare l'esogena e dopo un breve periodo di adattamento resterà unicamente l'endogena.

Per quanto riguarda il suolo è stata effettuata in passato una classificazione dei microrganismi per "gruppi fisiologici" aggregando insieme organismi coltivabili che fossero coinvolti nei diversi cicli dei principali elementi nutritivi quali azoto, carbonio, zolfo e fosforo, individuando le differenti funzioni svolte: ammonizzazione, mineralizzazione, nitrificazione, ecc.. Di seguito si riportano unicamente a titolo d'esempio suddivisi tra suolo e rizosfera alcuni gruppi fisiologici.

Non si ritiene qui elencare pedissequamente tutti i diversi gruppi fisiologici perché non indispensabile nell'economia generale della stesura delle linee guida in quanto rappresentativi del solo 1% dell'intera popolazione microbica del suolo.

## 1. SUOLO

### Ciclo dell'azoto

Microrganismi azoto fissatori liberi (non simbionti): *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *Bacillus spp*, *Bejerinkia indica*, *B. laticogenes*, *B. mobilis*, *B. fluminensis*, *Clostridium butyricum*, *Cl. butylicum*; *Dexia spp.*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*.

Azotofissatori simbionti: *Anabaena*, *Aulosira*, *Nostoc*, *Phytomyxa japonica* *Rhizobium* *Leguminosarum*, *R. meliloti*.

### Microrganismi nitrificanti

- Nitrosanti: *Nitrosomanas oeuropea*, *N. oligocarbogenes*, *N. monocella*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*;
- Nitratanti: *Nitrobacter winogradskyi*, *N. agile*, *Nitrocystis*, *Bactoderma* e *Microderma*.

Microrganismi denitrificanti: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Thiobacillus denitrificans*.

### **Ciclo del carbonio**

Degradazione dell'amido *Bacillus macerans*, *B.cereus*, *B. subtilis*, *Clostridium butyricum*, *C. perfringens*; funghi e lieviti

Degradazione delle emicellulose: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sterptomyces*, *Clostridium*, *Achromobacter*;

Degradazione delle pectine: *Bacillus subtilis*, *Plectridium pectinovorum*, *Clostridium aurantium*.

Degradazione della cellulosa: *Vibrio*, *Cellvibrio* e *Cellfalcicula*, *Cellulomonas*;

Degradazione della chitina: *Streptomyces* sp, *Bacillus cereus*, *Cytophaga* sp. e *Arthrobacter*;

Degradazione della lignina: *Aspergillus*, *Chaetomiella*, *Alternariam* *Ormodendrum*.

### **Ciclo del zolfo**

Mineralizzazione dello zolfo: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*.

Ossidazione a riduzione dello zolfo minerale: *Thiobacillus thioparus*, *T. denitrificano*, *T. thioxidans*.

### **Metabolismo del fosforo**

*Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* e *Serratia carollera* var. *phosphatica*, *Azotobacter* *Nitrosomonas*, Funghi (prevalenza di *Basidiomycota*)

## **2. RIZOSFERA**

I Rizobi sono stati riportati nella sezione dedicata al ciclo dell'azoto.

Per quanto attiene i funghi micorrizici sono costituiti dalle ife fungine con prevalenza di glomas.

### **II.3 – Definizione dei marcatori fenotipici applicabili nei rilevamenti di biodiversità microbica.**

Si tratta dei primi marcatori impiegati nello studio della tassonomia microbica, possono essere classificati come segue:

#### **a. Marcatori Morfologici**

**A. Macromorfologici** (a livello visibile, es. colonie, patine etc).

**B. Micromorfologici** (attengono alla dimensione e forma delle cellule e degli aggregati di cellule osservati al microscopio)

#### **b. Marcatori Fisiologici**

**A. Assimilazioni e fermentazioni** di fonti di C e N

**B. Resistenze** a fattori fisici, chimici e biologici

Questi marcatori sono stati largamente, ma non completamente, soppiantati da alcuni marcatori molecolari, ma giuocano un ruolo essenziale nella determinazione della variabilità entro specie. E' importante raccogliere i marcatori importanti per i vari gruppi, anche in relazione ai loro costi (in termini economici e di tempo) rispetto ai benefici attesi.

### **Definizione dei marcatori fenotipici applicabili nei rilevamenti di biodiversità microbica.**

Questi marcatori sono stati largamente, ma non completamente, soppiantati da alcuni marcatori molecolari, ma giuocano un ruolo essenziale nella determinazione della variabilità entro specie. E' importante raccogliere i marcatori importanti per i vari gruppi, anche in relazione ai loro costi (in termini economici e di tempo) rispetto ai benefici attesi.

Si tratta dei primi marcatori impiegati nello studio della tassonomia microbica, possono essere classificati come segue:

#### **a. Marcatori Morfologici**

##### **A. Macromorfologici**

**1. Dimensioni della colonia** dopo un tempo predefinito di crescita su terreno standard per il gruppo oggetto di studio

**2. Forma della colonia.** Forma in pianta della colonia: circolare, ovoidale, triangolare, irregolare

**3. Elevazione della colonia.** Colonia piatta, elevata, a cappello di messicano, bombata

**4. Margini della colonia.** Lisci, lobati, filamentosi, irregolari

**5. Consistenza della colonia.** Pastosa, secca, filamentosa, granulosa, mucoide

**6. Colore della colonia.** Determinazione qualitativa o semiquantitativa (es. su scala da 1 a 5 con 1= chiara, 5= nero scuro)

**7. Uniformità della colonia.** Soprattutto nel caso delle colonie di muffe si hanno colorazioni concentriche diverse



## B. Micromorfologici

1. **Dimensioni della cellula.** Misurate come un singolo asse in caso di cellule sfericheggianti o come asse maggiore e asse minore per le altre forme
2. **Forma della cellula.** Sferica, ellittica, ovoidale, allungata, bastoncellare, curvata.
3. **Forma di riproduzione vegetativa.** Fissione trasversa, gemmazione.
4. **Aggregazioni cellulari** (Batteri, cocci). Diplococchi, tetradi (quattro cocci a formare una specie di quadrato), sarcine (otto cocci ai vertici di un cubo), stafilococchi (cocchi a formare una specie di grappolo), streptococchi (catenelle di cocci).
5. **Presenza di pseudo micelio.** Le cellule di lievito o di lievito simili posso non distaccarsi dopo la gemmazione e formare catenelle più o meno ramificate. Le congiunzioni fra cellule (collo) sono strozzate, a differenza che nel micelio.
6. **Presenza di micelio.** Il micelio è una serie di cellule tubuli formi più o meno ramificate. Le eventuali separazioni fra cellule sono dei setti trasversi a differenza delle strozzature dello pseudo micelio.
7. **Grado di ramificazione del micelio e dello pseudo micelio.** Miceli e pseudo miceli possono avere gradi diversi di ramificazione.
8. **Presenza di endospore.** Solo nei batteri. L'endospora è una struttura di mantenimento fortemente disidratata. Si posiziona in posizione centrale (genere *Bacillus*) o apicale (genere *Clostridium*) nella cellula che lo contiene e produce tipiche rigonfiature.
9. **Presenza di spore sessuali.** Le spore (in senso proprio) fungine sono il risultato della meiosi e sono aploidi. Possono essere distribuiti esternamente ad una struttura chiamata basidio (Basidiomiceti) o entro un sacchetto (Ascomiceti).
10. **Numero delle spore per asco/basidio.** Il numero delle spore e la disposizione sono spesso caratteristiche di specie. Ad esempio nel genere *Schizosaccharomyces octosporus* si hanno otto spore, mentre in *D. hansenii* se ne ha solamente una. Da due a quattro nel genere *Saccharomyces* e così via.

### b. Marcatori Fisiologici

#### A. Assimilazioni e fermentazioni di fonti di C e N

1. Le assimilazioni verificano la capacità di crescere in certe sorgenti di C o di N con metabolismo respiratorio. (In giallo in Tab.1)
  2. Le fermentazioni verificano la capacità di assimilare sorgenti di C con metabolismo fermentativo non necessariamente anaerobio. (In azzurro in Tab.1)
- I pannelli di sorgenti di C e N utilizzate sono parzialmente variabili a seconda dei gruppi microbici. In Tab. 3 vien riportato un tipico pannello di prove assimilato-fermentative.

#### B. Resistenze a fattori fisici, chimici e biologici

Non esiste una categorizzazione predefinita per questa categoria di marcatori. Nel pannello in Tab1 vengono elencati la resistenza a forte osmosi (50% glucosio) al cloruro di sodio, al cicloeximide e a varie temperature. (In verde in Tab.6)

**NOTA.** Va sottolineato che questi marcatori sono richiesti nella descrizione ufficiale di specie (da riportare in inglese e in latino) e hanno un grande valore per capire la funzionalità cellulare. Per

l'impegno di tempo e per la variabilità intrinseca, tali fattori hanno un peso inferiore a quelli molecolari sia nell'identificazione della specie che nella differenziazione a livello di ceppo. Restano validissimi i marcatori fisiologici per ricercare le caratteristiche che stabiliscono l'impiego dei microrganismi nell'industria e nell'ambiente.

**Tabella 6. Esempio di test fisiologici per ceppi di lievito**

	st1	st2	st3		st1	st2	st3
D-GLUCOSE	2	3	3	GLUC & LACTONE	0	3	3
D-GALCTOSE	3	0	0	K-GLUCONATE	0	0	0
L-SORBOSE	2	1	1	GLUCOSAMIONE	0	0	0
MALTOSE	0	0	0	DL-LACTIC ACID	1	3	3
SUCROSE	0	0	0	SUCCINIC ACID	3	3	3
CELLOBIOSE	0	3	3	CITRIC ACID	0	0	0
TREHALOSE	0	0	0	I-INOSITOL	0	0	0
LACTOSE	0	0	0	GLUCURONIC ACID	0	0	0
MELIBIOSE	0	0	0	Fermentation	0	1	0
RAFFINOSE	0	0	0	Starch	0	0	0
MELIZITOSE	0	0	0	growth at 4	0	0	0
INULIN	0	0	0	growth at 37	3	0	0
SOLUBLE STARCH	0	0	0	growth at 42	0	0	0
D-XYLOSE	3	3	3	osmotic medium	0	0	0
L-ARABINOSE	0	0	0	5% NaCl	3	2	2
D-ARABINOSE	0	0	0	10% NaCl	0	0	0
D-RIBOSE	0	0	0	12.5% NaCl	0	0	0
L-RHAMNOSE	0	0	0	lipase	0	0	0
ETHANOL	3	3	3	urease	0	0	0
GLYCEROL	3	3	3	nitrate	0	0	0
I-ERYTHRITOL	0	0	0	nitrite	0	0	0
ADONITOL	0	0	0	ethylamine	2	2	3
DULCITOL	0	0	0	casein	0	0	0
D-MANNITOL	3	0	0	methanol	0	0	0
D-SORBITOL	3	2	2	without amino acids	3	3	3
AMG	0	0	0	0.1 PPM cyclohexamide	3	0	0
SALICIN	0	3	3	1 PPM cyclohexamide	3	0	0
				10 PPM cyclohexamide	3	0	0

### c. Marcatori complessi morfo-fisiologici del suolo

**A. Marcatori macro e micro morfologici del suolo:** riguardano unicamente i microrganismi coltivabili. Dall'osservazione del colore e della morfologia della colonia sarà facile distinguere ad occhio nudo quali microrganismi popolano quel determinato suolo. Le tecniche di laboratorio sono riportate nel manuale "metodi di analisi microbiologica del suolo" di riferimento nazionale Supplemento ordinario G.U. n. 179 dell'1.08.2002. Poiché però tali metodologie analitiche comportano comunque un notevole dispendio di energia, tempo e denaro si ritiene che questi marcatori possano essere sostituiti con i marcatori funzionali sicuramente più efficaci nella definizione della fertilità biologica del suolo come suggerito nel paragrafo precedente.

**B. Marcatori fisiologici a livello del suolo:** sono comunemente definiti come marcatori di diversità funzionale del suolo e sono associati ai principali processi metabolici del suolo (respirazione, nitrificazione, mineralizzazione, ecc.). I metodi di analisi per identificare i diversi marcatori fisiologici ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N-NO}_3$ ,  $\text{N-NH}_4$ ,  $\text{O}_2$ , ecc.) sono riportati nel manuale “metodi di analisi biochimica del suolo”, anche in questo caso si tratta di metodi di analisi ufficiali Supplemento Ordinario alla G.U. N. 61 del 13.03.2004. Per determinati gruppi fisiologici per le sole comunità coltivabili sul manuale “metodi di analisi microbiologica del suolo” di riferimento nazionale Supplemento ordinario G.U. n. 179 dell’1.08.2002. dei quali nel paragrafo ad essi dedicato viene proposta una scelta ragionata.

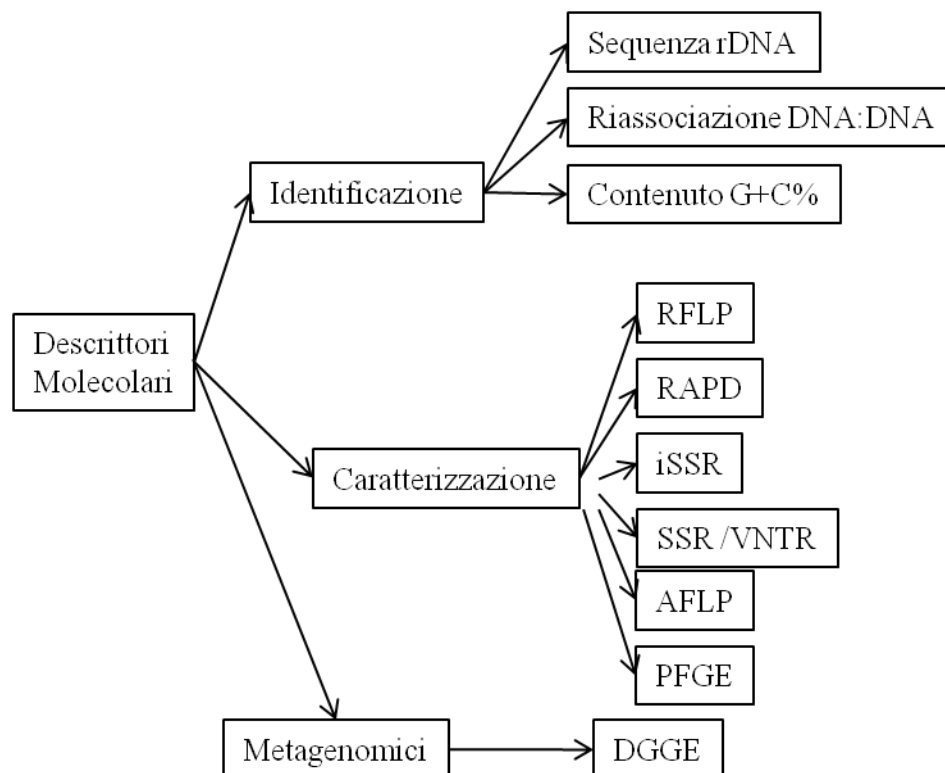
## II.4 – Definizione dei marcatori molecolari

I marcatori molecolari hanno un'importanza determinante nello studio della biodiversità microbiologica. Possono essere distinti in quelli impiegati a livello di identificazione (determinazione di specie) o di caratterizzazione (descrizione dei ceppi entro specie). Anche in questo caso è essenziale definire i marcatori in base ai gruppi microbici e sceglierli (o ordinarli) in base alla loro efficacia.

I marcatori molecolari hanno un'importanza determinante nello studio della biodiversità microbiologica. Possono essere distinti in quelli impiegati a livello di identificazione (determinazione di specie), di caratterizzazione (descrizione dei ceppi entro specie) o in meta genomici (analisi di popolazioni di genomi). Anche in questo caso è essenziale definire i marcatori in base ai gruppi microbici e sceglierli (o ordinarli) in base alla loro efficacia.

In Fig. 3 viene riportata una schematizzazione.

**Figura 3. Classificazione dei marcatori molecolari in base alla loro funzione**



### A. MARCATORI PER IDENTIFICAZIONE

#### 1. Sequenza DNA ribosomale (rDNA)

Si tratta della tecnica più impiegata attualmente. Va differenziata fra eucarioti e procarioti. Nei microbi eucarioti (funghi filamentosi, lieviti etc) si impiega di solito la sequenza del dominio D1/D2 del gene 26S del DNA codificante per il RNA ribosomale, abbreviato come rDNA. I primer amplificano una regione di ca. 570 bp. La bibliografia corrente concorda nel ritenere che i ceppi della stessa specie abbiano un'identità di sequenza non inferiore al 99%.

Nei batteri si usa il gene corrispondente, il rDNA 16S, amplificandone un tratto superiore all e 1000 paia di basi (bp). In questo caso la con specificità è riconosciuta a ceppi con identità non inferiore al 97,5%.

## **2. Riassociazione DNA:DNA**

Si tratta di una delle prime tecniche molecolari e si basa sul calcolo dell'omologia fra sequenze di DNA appartenenti a due ceppi diversi. L'analisi può essere effettuata con riassociazioni su membrana (metodi radioattivi o chemio-luminescenti) oppure in tampone con controllo spettrofotometrico. La soglia di con specificità varia fra il 70% e l'80% a seconda dei gruppi microbici.

## **3. Contenuto Guanina e Citosina (G+C%)**

E' un test escludente in quanto ceppi con differenze di G+C% maggiori del 2% sono considerati appartenere a specie diverse. La determinazione del G+C% può essere effettuata mediante curva di rinaturazione spettrofotometrica o mediante analisi della composizione del DNA con HPLC.

# **B. MARCATORI PER CARATTERIZZAZIONE**

## **1. RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism)**

Si tratta di una tecnica volta a costruire mappe di restrizione, ossia a determinare la posizione di specifici enzimi di restrizione in geni o comunque in regioni note di DNA. Variazioni delle posizioni di tali siti indicano differenze molecolari sulla cui base si possono calcolare le distanze genetiche fra ceppi.

## **2. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)**

Per molto tempo è stata una delle tecniche di caratterizzazione più popolari. Si effettua amplificando il DNA genomico con un solo primer molto corto a temperatura relativamente bassa. Questi primer innescano reazioni di amplificazione dei frammenti di DNA che si trovino fra due primer relativamente vicini e orientati in maniera opposta sul DNA che funge da obiettivo (target). La tecnica non è sempre riproducibile, ma è poco costosa e rapida. Le distanze genetiche vengono calcolate sulla base delle differenze dei pattern di amplificazione detti anche "bandeggi".

## **3. iSSR (inter SSR)**

Si tratta di una tecnica molto simile al RAPD che però impiega particolar primer a sequenza microsatellitare (es. GACAGACAGACAGACA). E' più riproducibile del RAPD, pur essendo ugualmente poco onerosa.

## **4. SSR/VNTR (Short Sequence Repeats / Variable Number Tandem Repeats)**

La tecnica SSR, chiamata anche VNTR o analisi microsatellitare)

## **5. AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism)**

## **6. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

### **C. MARCATORI METAGENOMICI**

Sono fondamentali per arrivare a definire le specie, presenti, ma anche per darne caratterizzazione. Anche in questo caso i metodi sono stati raccolti nel manuale “metodi di analisi molecolare a livello del suolo”, attualmente in corso di pubblicazione. Alcuni di questi metodi sono riportati, nella gerarchizzazione degli indicatori e si suggeriscono i metodi ritenuti più significativi e più utili nella definizione e caratterizzazione della diversità microbica del suolo.

Nel caso della biomassa microbica del suolo le metodiche vanno adatti alla matrice suolo, ma sono i medesimi proposti per i microrganismi alimentari.

#### **1. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**

#### **2. Sequenziamento di DNA marker dopo clonaggio metagenomico**

## Capitolo III – Metodologie (Protocolli standard)

In questo capitolo saranno presentate le varie metodologie, microbiologiche e molecolari, per lo studio della biodiversità microbica nei vari ambiti e a seconda del livello di precisione richiesto. Le metodologie e le scelte comuni a microbiologia ambientale ed alimentare saranno trattate insieme, mentre verranno presentate separatamente le metodologie più specifiche. Questa parte del manuale presuppone la normale capacità tecnico-microbiologica, normalmente fornita dai vari corsi di laurea magistrali in materia biologica, agraria e biotecnologica. Le metodologie ampiamente trattate in appositi manuali e nelle raccolte dei metodi ufficiali non verranno presentate, ma se mai citate quando ritenuto necessario per una miglior comprensione delle metodologie stesse.

Il capitolo è corredato da una tabella ipertestuale suddivisa per tipo, finalità e ambito applicativo delle procedure, organizzata in modo tale da accedere direttamente al file con un articolo che tratti o la proposta o l'utilizzo della suddetta tecnica.

### Premessa al capitolo III

In microbiologia il riconoscimento della specie da studiare e valorizzare non è automatico, per cui la metodologia condivisa si occuperà dei sistemi di identificazione specifica, prima dei metodi di caratterizzazione sub specifica.

### III.1 - Individuazione di protocolli standard per il prelievo e l'isolamento

#### La coltura pura: forza e debolezze

La coltura pura è un insieme di cellule derivanti dalla stessa cellula madre per esclusiva riproduzione vegetativa, senza quindi l'intervento della ricombinazione. La coltura pura rappresenta quindi un insieme di cellule pressoché identiche, ovvero identiche a meno delle mutazioni spontanee. Essa rappresenta un sistema necessario di studio microbiologico in quanto al momento esistono pochissime tecniche in grado di studiare la singola cellula ed è quindi necessario di avere a disposizione una biomassa omogenea sufficiente ad effettuare le varie analisi. Di fatto, l'unica tecnica che potrebbe al momento non ricorrere alla coltura pura è la microscopia. Purtroppo la relativa povertà morfologica dei microrganismi non permette di ottenere molte informazioni con il solo uso dei microscopi, ottici o elettronici che siano.

La coltura pura rappresenta anche un limite particolarmente gravoso sugli studi microbiologici, che può essere brevemente delineato nei seguenti punti:

#### A. Non esistenza in natura

Di fatto in natura non esistono colture pure se non in casi particolari, legati soprattutto alle situazioni di patogenesi in cui un unico agente eziologico colonizza un organismo e produce lo *status* di patogenicità o parassitismo. In quasi tutti gli altri casi i microrganismi vivono in comunità estremamente complesse. Studi recenti hanno dimostrato anche che, in certi casi, non è possibile far crescere microbi di una specie in assenza dei microbi di un'altra specie o dei loro prodotti esocellulari.

#### B. Eccesso nutrizionale

I terreni di coltura contengono quantità normalmente non limitanti di carbonio, azoto, e fattori di crescita. L'assenza di situazioni limitanti è sicuramente assente in natura nella maggior parte dei casi noti, con poche eccezioni quali l'accesso a frutti ricchi di nutrienti da

parte di patogeni o di saprofiti. Queste eccezioni hanno comunque carattere temporaneo, perché ben presto insorge una competizione fra specie, dovuta all'assenza di colture pure in natura come spiegato nel punto precedente.

### **C. Inadeguatezza nutrizionale**

L'assunto basilare della Microbiologia Classica, ovvero quella delle origini, tuttora abbastanza seguito è che la fonte di carbonio universale sia rappresentata dal glucosio. Di fatto questo zucchero è abbastanza raro in forma libera in natura. Nel corso degli studi sono stati isolati microrganismi in grado di crescere su terreni con pochissimo glucosio che vengono inibiti da concentrazioni di circa un decimo di quelle normalmente impiegate. In casi limite si è trovato che perfino tracce di questo esoso possono inibire la crescita microbica. Al di là del glucosio e della fonte di carbonio in genere, il problema fondamentale nella formulazione di un terreno di coltura è che non sappiamo con precisione quali siano le abitudini e le capacità nutrizionali dei microrganismi. A peggiorare questo problema c'è il fatto che in microbiologia, a differenza che nelle altre branche della biologia, è necessario far crescere i microbi per studiarli e per farli crescere si deve formulare e preparare un terreno di coltura che, però, di fatto non sappiamo sempre ben preparare perché ancora non abbiamo studiato i microbi in oggetto. Questo status di circolo vizioso non è facile da rompere, anche se non mancano gli sforzi in tal senso.

### **D. Densità cellulare**

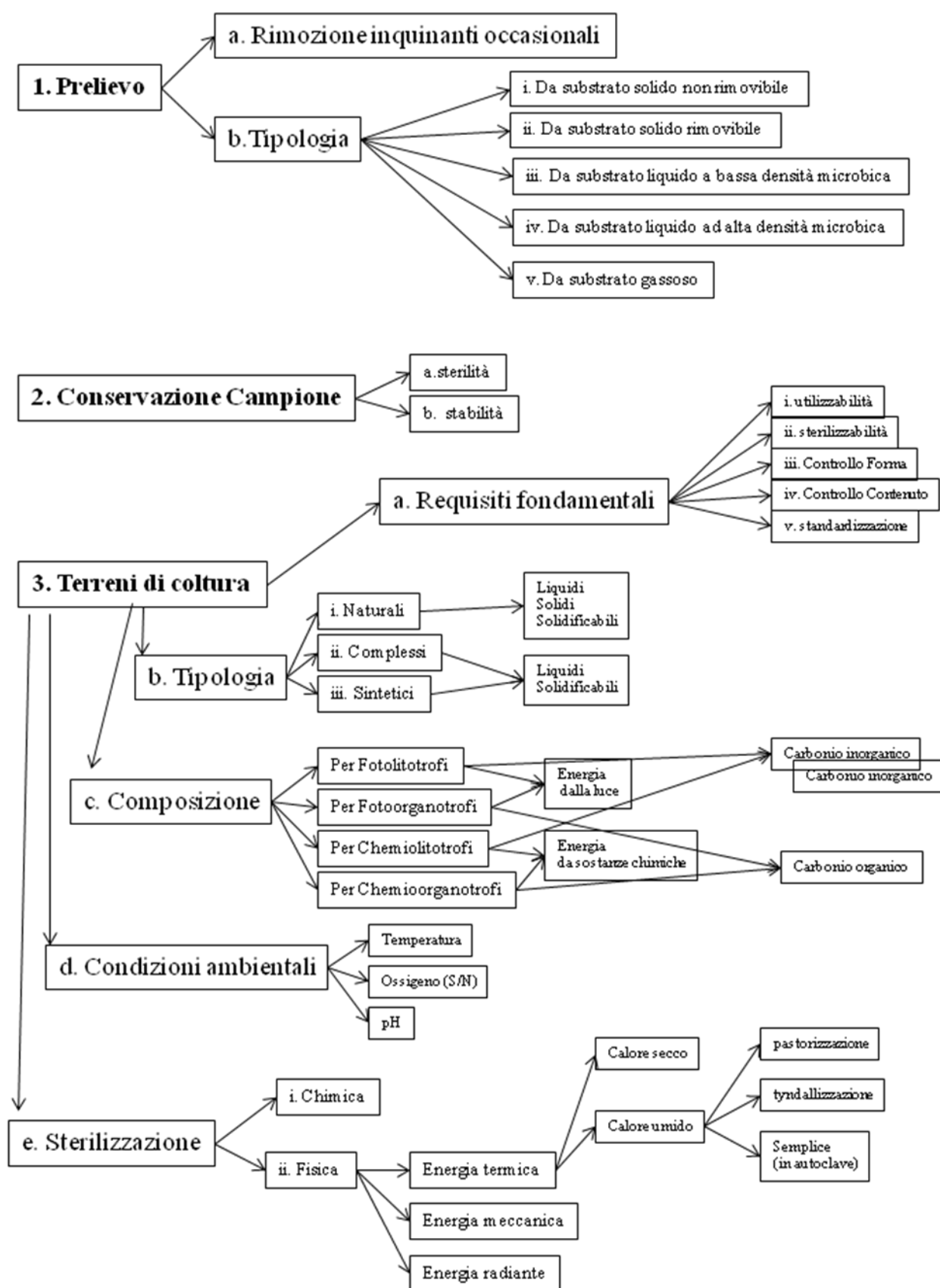
Le crescite microbiche vengono avviate sempre con quantità rilevanti di cellule e raggiungono densità (ovvero cellule per unità di volume) superiori a quelle trovate in natura anche di parecchi ordini di grandezza. In passato si riteneva che tale questione fosse solo quantitativa e non producesse effetti qualitativi, come ad esempio la capacità o l'incapacità di crescere. I recenti avanzamenti nel settore del *quorum sensing* stanno dimostrando che di fatto l'attività dei microbi è modulata dal numero delle cellule circostanti.

Queste poche considerazioni generali mostrano quanto numerosi e seri siano i limiti imposti dall'uso della coltura pura che, al momento è una specie di male necessario. Di fatto le dimensioni dei microrganismi impediscono un'osservazione diretta ed impongono osservazioni in laboratorio in condizioni non certo simili a quelle naturali. Questa limitazione intrinseca al momento impedisce di seguire un qualsiasi approccio olistico in cui l'osservatore sia sostanzialmente indifferente ed obbliga ad un accumulo di dati analitici ottenuti con forti interferenze dell'operatore. Per visualizzare meglio il problema si immagini di voler studiare il moto di una biglia di vetro con la limitazione di doverla prendere, esaminare e rimettere in moto ogni pochi istanti.

Il Capitolo che segue è incentrato sulle tecniche per monitorare e conservare la biodiversità microbica con tecniche microbiologiche. Nel terzo capitoletto saranno anche discusse due tecniche molecolari di monitoraggio della biodiversità (DGGE e T-RFLP), che di fatto non richiedono la coltivazione dei microrganismi e di fatto evitano i problemi connessi all'uso della coltura pura.



## Dall'ambiente alla coltura pura



### III.1.1. SISTEMI DI PRELIEVO

#### a. Microbiologia alimentare

##### A. Matrici solide non asportabili

Si tratta normalmente di superfici (muri, tavoli, pavimenti) o attrezzature (pompe, filtri, graticci, fiescoli, tottrchi, botti, barriques etc) che per loro natura non possono essere frazionati ed asportati. In questo caso si deve procedere *in loco* al prelievo superficiale. La tecnica universalmente applicabile consiste nel predisporre tubi sterili contenenti un lungo stecchino sulla cui sommità sia avvolto un batuffolo di cotone idrofilo. Si inserisce lo stecchino nel tubo contenente ca. 5 ml di soluzione fisiologica in modo che il batuffolo stia a bagno. Si chiude con un tappo e si sterilizza in autoclave per 15 min. a 121 °C. All'atto del prelievo si estrae lo stecchino, si passa la punta su una superficie che, in caso di conta, deve essere misurata. Si reintroduce lo stecchino nella soluzione fisiologica. In laboratorio si procede all'isolamento dalla soluzione fisiologica. Esistono in commercio tubi già predisposto come sopra descritto. Esistono anche speciali piastre che permettono di spingere il fondo con il terreno culturale solidificato sulla superficie in modo da "timbrare" la microflora sulla superficie del terreno stesso.

##### B. Matrici solide asportabili

Il prelievo di matrici solide si riferisce soprattutto ad alimenti quali formaggi, salumi, carni fresche etc. Si tratta in genere di substrati che possono essere asportati dall'ambito della produzione e frazionati con tecniche relativamente semplici. Va ricordata l'importanza di procedere a campionamenti numerosi e differenziati per poter disporre di campioni significativi che permettano di distinguere l'informazione dalla variabilità accidentale. Il problema principale delle matrici solide è la scarsa omogeneità microbica e quindi la necessità di frazionare il prelievo. Un caso tipico è il campionamento dei formaggi in cui è opportuno distinguere la microflora della superficie, inclusa spesso in una densa sugna oleosa, dalla microflora della crosta, del sottocrosta e della polpa. Uno studio recente ha dimostrato come all'interno di un frutto quale l'ananas esistono differenze significative fra la zona periferica, quella centrale e lo stilo.

Un altro problema del campionamento da matrici solidi è il fatto che operazioni di taglio possono trascinare la microflora superficiale verso l'interno dell'oggetto da campionare. Anche se il problema non è di facile soluzione, una possibile tecnica (applicata alle forme di formaggio) può essere la seguente: si effettua un taglio orizzontale con il quale si preleva la crosta. Si risterilizza il coltello, si effettua un taglio parallelo e si elimina un fettina sottile in quanto sulla sua superficie superiore potevano essere stati trascinati i microbi della crosta laterale. Si risterilizza il coltello e si effettuano due tagli verticali prelevando la parte centrale. Nel caso di prelievi ancor più differenziati si continua con la stessa sequenza di tagli perpendicolari e di risterilizzazioni del coltello.

### **C. Matrici liquide ad alta densità microbica**

Si tratta di matrici in cui la crescita microbica sia già avvenuta da poco o sia in pieno svolgimento. Alcuni esempi possono essere il mosto di vino e di malto in fermentazione, tutte le bevande alcoliche prima della decantazione, gli yogurt e le bevande fermentate a base di latte.

In questa tipologia di prelievo la quantità di cellule da isolare non è sicuramente un problema, viceversa può essere difficile ottenere campionamenti significativi e rappresentativi. Un caso esemplificativo può essere la fermentazione dei mosti in grandi vasche aperte o chiuse. E' noto, ed intuibile, che si avrà una certa variabilità in base all'altezza del punto di prelievo che condiziona tra l'altro anche il livello di ossigeno disponibile nel mezzo. Prelevare dalla parte superficiale è banale (sempre che esistano le necessarie aperture), mentre campionare a quote diverse è particolarmente difficile in quanto si rischia di prelevare inavvertitamente anche quote di campione derivanti dalle quote superiori. A questo scopo, se se ne riscontra la necessità, è possibile predisporre all'inizio della fermentazione una batteria di tubicini assicurati in modo da aspirare a quote diverse. Al momento del campionamento non si farà altro che aspirare da ciascun tubicino, scartare un volume almeno pari a quello contenuto nel tubicino, infine si procede al campionamento vero e proprio.

### **D. Matrici liquide a bassa densità microbica**

Si tratta di liquidi appena inoculati o presumibilmente asettici. In questo caso si deve presumere una carica bassissima di poche cellule per litro. Considerando che l'obiettivo è di allocare circa cento cellule per piastra e che su una piastra possono essere sparsi non più di 0.1 – 0.2 ml di liquido, è necessario procedere ad una concentrazione. Esistono due sistemi di concentrazione: per filtrazione e per centrifugazione. La filtrazione viene effettuata con un imbuto di Büchner (precedentemente sterilizzato) piazzato su una beuta. Sulla superficie dell'imbuto viene sistemata una membrana filtrante sterile con porosità di 0.22 µm e al beccuccio apposito della beuta viene applicato un tubo da collegare ad una pompa a vuoto vedi (Fig.1). si versa nel bicchiere dell'imbuto una quantità definita di liquido. Si accende la pompa. In caso sia necessario, si procede a riempire il bicchiere finché non sia filtrata la quantità di liquido necessaria. Alla fine si stacca la pompa, si rimuove il bicchiere superiore, si preleva il filtro con pinzette sterili e lo si adagia su un terreno di coltura solidificato in piastra Petri. Si procede come con qualsiasi altra coltura in piastra.



Nel caso si impieghi la centrifugazione, si preleva il liquido, lo si centrifuga negli appositi contenitori precedentemente sterilizzati. Si rimuove tutto il sopranatante e si riscalda il corpo di fondo con 0.1 ml di liquido per ogni piastra da inoculare. Si procede al piastramento e alla coltura.

Protocolli dettagliati possono essere reperiti nelle norme ufficiali di analisi o in documenti molto chiari ed esaurienti di cui segnaliamo uno a cura del servizio sanitario della regione Emilia e Romagna ([http://asr.regione.emilia-romagna.it/wcm/asr/collana\\_dossier/doss030/link/doss30.pdf](http://asr.regione.emilia-romagna.it/wcm/asr/collana_dossier/doss030/link/doss30.pdf)) .

### **Scheda di rilievo**

Ogni prelievo dovrebbe essere pianificato e corredato di tutta una serie di informazioni che talvolta sembrano addirittura eccessive, ma che servono quasi sempre a ricostruire l'effettiva situazione del campione prelevato.

Le informazioni dovrebbero essere raccolte in sezioni secondo uno schema come quello sotto riportato:

#### **a. Sezione Geografico/topografica**

- ✓ Latitudine
- ✓ Longitudine
- ✓ Altitudine
- ✓ Orografia
- ✓ Tipo di locale (se opportuno)
- ✓ Oggetto/strumento/ superficie etc di isolamento
- ✓ Nome della località
- ✓ Comune (Provincia)

#### **b. Sezione tipologica**

- ✓ Tipo di prodotto
- ✓ Eventuale sottotipo (se pertinente)
- ✓ Marchio (se pertinente)
- ✓ Materie prime (con eventuali razze [animali] o cultivar [vegetali] di provenienza)
- ✓ Località di origine delle materie prime

**c. Sezione tecnologica**

- ✓ Conservazione delle materie prime prima della lavorazione (se pertinente)
- ✓ Tipo di lavorazione
- ✓ Fase della lavorazione/ invecchiamento/ conservazione al momento del prelievo
- ✓ Macchine impiegate per la lavorazione
- ✓ Materiali con cui è venuto a contatto il prodotto durante la lavorazione
- ✓ Tipologia degli operatori

**d. Sezione microbiologica**

- ✓ Data di prelievo
- ✓ Ora di prelievo
- ✓ Operatore/i
- ✓ Quantità di campione prelevato
- ✓ Indicazioni sul substrato o superficie di prelievo
- ✓ Temperatura del campione
- ✓ pH del campione
- ✓ acidità del campione
- ✓ Modalità di campionamento
- ✓ Repliche di campionamento
- ✓ Raggruppamento dei campioni (tecnica bulk)
- ✓ Sistemi usati per evitare contaminazioni
- ✓ Temperatura di mantenimento
- ✓ Tempo di trasporto al laboratorio
- ✓ Temperatura di mantenimento in laboratorio prima delle analisi
- ✓ Tempo di immagazzinaggio in laboratorio
- ✓ Tipo di isolamento
- ✓ Conta totale del campione
- ✓ Conta vitale del campione
- ✓ Identificazione/i specie del campione
- ✓ Numero di ceppi isolati
- ✓ Modalità di mantenimento della coltura pura
- ✓ Collezione/i di deposito
- ✓ Numeri dell'accessione

**e. Note libere**

**Accorgimento n°1**

Chiaramente le schede di prelievo vanno adattate alle condizioni ed ai prodotti specifici, per cui è possibile che anche schede di rilievo più semplici possano risultare soddisfacenti.

L'ampia diffusione di dispositivi elettronici portatili a prezzi accessibili suggerisce di preparare le schede con software di database elettronico che sino in grado di variare i formati delle schede in modo che, una volta definiti tutti i campi di interesse, possano essere agevolmente prodotti diversi formati, ciascuno relativo ad una specifica situazione. Ulteriore vantaggio di quest'accorgimento è il fatto che i dati possono essere automaticamente tabulati, ponendo ciascun campione in una riga e riportando i vari parametri nelle diverse colonne. Tali tabelle sono poi preziose per le eventuali analisi statistiche.

### **Accorgimento n°2**

Al momento del prelievo è bene dedicare qualche momento per chiarire con l'operatore alimentare quali siano le reali condizioni del prodotto che si va a campionare. E' particolarmente importante cercare di capire se effettivamente la materia prima è locale o derivi da altre zone.

### **Accorgimento n°3**

Andando ad isolare microrganismi per lo studio e il mantenimento della biodiversità è importante conoscere la storia dell'impianto, specialmente se siano stati impiegati in passato o al momento del prelievo ceppi starter di origine commerciale. In certi casi è possibile riscontrare una certa ritrosia a rispondere, come la possibilità che l'operatore non comprenda appieno la domanda. Per esempio, in certe cantine domestiche è inutile chiedere se siano stati usati "starter" o "lieviti" o "secchi attivi", è molto meglio chiedere se siano stati mai aggiunti "fermenti" acquistati. In altre parole è bene ricordare che l'operatore alimentare appartiene ad una particolare cultura che va rispettata e preservata, il linguaggio ed il lessico ne fanno parte integrante e l'isolatore deve calarsi in essa con garbo ed intelligenza.

### **b.Microbiologia ambientale**

Il suolo è l'ambiente naturale, costituito da materiali minerali ed organici, che sulla superficie della Terra garantisce la vita agli organismi viventi.

Recentemente è stato definito "la zona critica" della terra meritando un'attenzione particolare grazie al suo ruolo chiave negli equilibri ambientali a sostegno dell'intera vita del nostro pianeta.

Mantenere in collezione i microrganismi del suolo rappresenta una necessità irrinunciabile soprattutto nel caso di studi a livello ambientale per comprendere quali pressioni realmente possano intervenire da parte dell'uomo o di eventi ambientali sul suolo, quali i cambiamenti climatici. Alcuni ceppi microbici o fungini possono essere utilizzati come biomarcatori e, quindi, fungere da eccellenti bioindicatori ambientali (Bloem *et al.*, 2006).

Il suolo rappresenta comunque una miniera di geni inesplorata e, dallo studio e caratterizzazione dei microrganismi del suolo, è possibile individuare i principali artefici di molti processi biotecnologici, che spaziano dalla bioenergia alla biofertilizzazione al biorecupero, alla biodegradazione, ecc.

Oggi si è in grado, attraverso appropriati indicatori microbiologici, biochimici e molecolari, di definire la qualità e la salute di un suolo, prevederne ed arginarne processi di degrado, fino alla desertificazione, nonché calibrare correttamente gli interventi di fertilizzazione con una gestione integrata dei nutrienti, sulla base della conoscenza del ciclo e del bilancio dei diversi elementi nutritivi, quali ad esempio l'azoto. Su questo principio si possono basare tutti gli studi che rientrano nel tema della metagenomica del suolo.

Realizzare una collezione di microrganismi del suolo risulta più complesso della raccolta in collezione di altri microrganismi di interesse agrario in quanto è noto dalla letteratura che

solo l'1% dei microrganismi che vivono nel suolo sono coltivabili e quindi isolabili, caratterizzabili e conservabili in collezione (Linch *et al.*, 2004 ).

Poiché una collezione di microrganismi del suolo dovrebbe consentire la caratterizzazione del suolo stesso nella sua complessità funzionale e genetica, si ritiene di fondamentale importanza ed utilità mettere in collezione oltre al singolo individuo, caratterizzato e catalogato secondo quanto prescritto nelle schede “Batteri” e “Funghi”, anche una scheda che possa riguardare tutti i microrganismi non coltivabili.

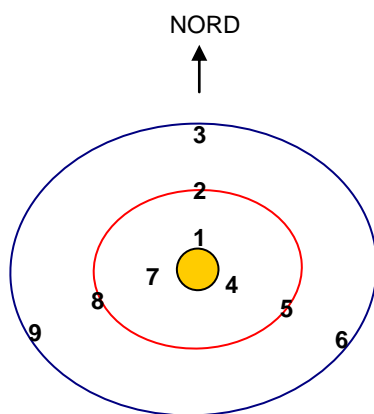
Verranno riportate di seguito le modalità per la messa in collezione di batteri e funghi tellurici, ma verranno anche descritte le attività necessarie alla creazione di una collezione *in situ* con l'obiettivo di poter correlare gli isolati con l'ambiente, di fornire una base per l'inserimento dei microrganismi non coltivabili come genoma del suolo, nella prospettiva della creazione di un database per il metagenoma suolo degli ambienti italiani.

La metodologia descritta per la conservazione dei microrganismi del suolo *ex situ* (in laboratorio) è tratta dal manuale “COLMIA” redatto nell'ambito del Progetto Nazionale Collezione di Microrganismi di Interesse Agrario, Industriale ed Ambientale coordinato dalla Dott.ssa Marina Barba e finanziato dal Mipaaf, reperibile sul sito [www.cra-pav.it](http://www.cra-pav.it), nonché dai manuali di analisi di Microbiologia del Suolo e di Biochimica del Suolo realizzati nell'ambito delle attività dell'Osservatorio Nazionale Pedologico del Mipaaf. Tali documenti costituiscono punto di riferimento normativo ai quali si rimanda per approfondimenti mirati, reperibili rispettivamente sul S.O. G.U. n. 179 dell'1.08.2002 e sul S.O. G.U. n. 61 del 13.03.2004 e sul sito del Mipaaf cliccando sul link esterno – Rete Rurale Nazionale 2007/2013 (<http://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/1034>).

In alcuni casi si è ritenuto opportuno inserire pedissequamente la metodologia perché è di fondamentale importanza utilizzare metodologie comuni e condivise per rendere possibile la creazione di una “banca dati” a livello nazionale utilizzabile non solo su scala nazionale, ma anche a livello internazionale.

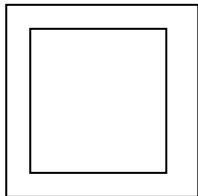
### Campionamento del suolo per l'isolamento dei microrganismi

**Arboree:** nel caso in cui si pratichi la conservazione del germoplasma di specie arboree sarà necessario raccogliere il suolo corrispondente a piante di età intermedia (non troppo giovani, nè troppo vecchie) all'interno della chioma, ma non troppo vicino al fusto e in tre punti, radialmente al fusto stesso, come illustrato di seguito



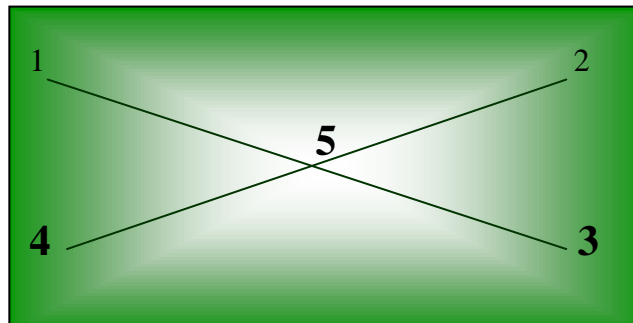
nei primi 20 cm di profondità e mescolare tra loro i tre campioni di terreno. Il campionamento dovrebbe essere effettuato alla ripresa vegetativa ed eliminando eventualmente il cotico erboso.

**Erbacee:** il campionamento dovrà essere effettuato nel pieno della fase vegetativa prescelta nei primi 20 cm di profondità vicino alla pianta ma in più punti dell'apprezzamento mescolando tra loro i campionamenti

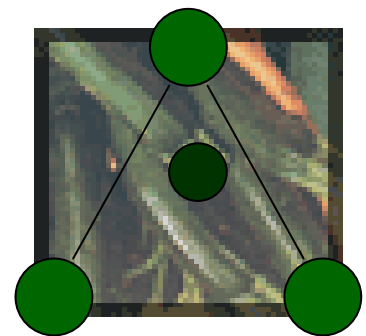


Il campionamento dovrà essere effettuato all'interno dell'apprezzamento lasciando all'esterno un bordo coltivato

Bordo coltivato con la stessa coltura



campionamento del suolo intorno alla singola pianta



Il campione può essere prelevato con trivelle, pale o campionatori a martellamento con cilindro o pistone facendo attenzione a mantenere il più possibile il campione indisturbato. Per ciascun sito di prelievo viene generalmente compilata una apposita scheda. La scheda dovrebbe fornire al potenziale utente della collezione informazioni utili alla collocazione del microrganismo nell'ambiente di raccolta, al fine di consentire comparazioni o rappresentare strumento di riferimento.



Al fine di costituire un campione medio rappresentativo, il campionamento viene effettuato in maniera randomizzata lungo un percorso a X o a W che non tenga conto delle zone anomale e dei bordi della parcella, prelevando almeno 5 sottocampioni. Il campione di terreno viene, quindi, liberato dai residui colturali superficiali presenti.

La profondità del prelievo è di norma compresa tra 0-20 cm, anche se condizioni particolari della parcella (ad es. aratura) o particolari tipi di terreno (ad es. suolo con copertura forestale) possono richiedere differenti profondità o la suddivisione di una profondità in diversi campioni in relazioni ai diversi strati; per informazioni più dettagliate su questo punto si rimanda al “Manuale di metodi di analisi Microbiologica del suolo della SISS (Allievi et al., 2003).

Per il bulk soil si campiona a debita distanza dalla vegetazione.

Per la rizosfera si preleva un pane di terra contenente la pianta con la massima parte dell'apparato radicale, nel caso di pianta erbacea, mentre nel caso di piante arboree si effettuano prelievi di suolo ad una distanza dalla pianta e ad una profondità che variano a seconda dello sviluppo radicale della specie studiata.

**Scheda di campagna per il rilevamento dell'agrobiodiversità a livello di suolo con compilarsi ogni qualvolta venga effettuato un prelievo di suolo per la definizione della biodiversità microbica**

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

Le informazioni da riportare nella scheda sono relative a:

**Dati generali:** costituiscono l'elemento base per l'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 le precipitazioni (piovose, nevose, medie, ecc) e le temperature (medie) dell'aria.

**Uso del suolo:** anche questo tipo di informazione risulta di fondamentale importanza al fine di caratterizzare al meglio l'organismo e l'ambiente. Pertanto occorre specificare la coltura in atto e la gestione culturale 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 informazione utile a ricostruire l'evolversi dell'ecosistema. Ad esempio sarebbe interessante conoscere, nel caso si osservasse un terreno incolto, 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..

### **III.1.2. SISTEMI DI MANTENIMENTO PRELIMNARE DEL CAMPIONE**

#### **a. Microbiologia alimentare**

Una volta prelevato, il campione dovrebbe essere sottoposto ad isolamento il prima possibile. In alternativa è opportuno mantenerlo in condizioni di sterilità ad una delle tre temperature sotto indicate.

- ✓ Temperatura normale del prodotto. Questa viene scelta in caso non esista il rischio di un'eccessiva proliferazione microbica o di una crescita selettivamente differente fra vari componenti del microbiota del prodotto prelevato. Per esempio, nella pasta acida mantenuta a temperature medio basse si favorisce la crescita dei lieviti, a temperature sopra i 30°C tendono a prevalere i batteri
- ✓ Refrigeramento (2-6°C) E' forse il caso più comune e serve a limitare la crescita del microbiota. Va verificato non esistano nel prodotto organismi frigido filici che tenderebbero a prevalere
- ✓ Congelamento. Viene effettuato quando si teme che variazioni significative di quantità e composizione del microbiota possano avvenire in tempi brevi. Va verificato a priori che i microrganismi non abbiano a subire una mortalità eccessiva. A questo proposito è bene mettere in atto la procedura riportata di seguito.  
Si effettua un prelievo e si divide in due parti uguali ed omogenee la prima viene sottoposta immediatamente a conta, la seconda viene congelata per almeno due giorni. Dopo lo scongelamento si effettua la conta con le stesse quantità impiegate per il primo campione. Si confrontano i dati ottenuti nelle due prove.  
Le temperature di congelamento possono essere di -20°C o di -80°C. La seconda favorisce un congelamento più rapido e la scarsa presenza di aghi d'acqua che perforino le cellule. Tale inconveniente può essere ulteriormente ridotto mediante aggiunta di glicerolo sterile fino alla concentrazione finale del 17%. Nel caso il campione venga aggiunto di glicerolo, all'atto dell'isolamento e della conta si dovrebbe usare un quantitativo pari a 1,17 volte il peso (o il volume) del campione fresco, per compensare l'aumento di peso o di volume dovuto al glicerolo.

#### **b. Microbiologia ambientale**

Una volta prelevato, il campione si mantiene a 4°C attraverso un contenitore da trasporto refrigerato fino all'arrivo in laboratorio, preferibilmente entro la giornata stessa del prelievo.

Il campione può essere analizzato:

Fresco

Secco all'aria previo ricondizionamento all'atto dell'analisi.

Esistono scuole di pensiero diversificate sulle migliori condizioni d'analisi. Il suolo analizzato fresco consente di focalizzare l'attenzione sulla composizione della comunità microbica del suolo in funzione delle fluttuazioni stagionali, delle pratiche agricole in corso, dell'andamento climatico, ecc. Tale procedura necessita di tempestività analitica ed un monitoraggio nel tempo molto frequente. Inoltre il campione può risentire fortemente delle alterazioni imputabili alla manipolazione e dalle modalità di prelievo.

Il campione analizzato dopo essiccazione e ricondizionamento abbatte ogni eventuale variazione in termini di stagionalità e di manipolazione del campione di suolo mettendo in rilievo la popolazione « base » del campione che nel tempo potrà essere confrontata senza alterazioni

imputabili a fattori esterni. Approfondimenti su questo tema sono trattati nel Capitolo I del Manuale dei “Metodi di Analisi Microbiologica del Suolo” G.Picci e P.Nannipieri coordinatori (2003) e Bloem e nel volume “Microbial Methods for Assessing Soil Qualità” Bloem J., Hopkins D. e Benedetti A. Eds (2006).

### **III.1.3 SISTEMI DI ISOLAMENTO E CONTA VITALE**

#### **Isolamento**

L'isolamento è l'operazione che permette di separare i vari microrganismi di un substrato in colonie che possono essere definite come: gruppi di cellule microbiche distinti e discreti nello spazio, costituiti da cellule derivanti da un'unica cellula madre per esclusiva riproduzione asessuale.

La colonia è tale quindi se ha un'assoluta omogeneità genetica, a meno delle inevitabili mutazioni spontanee. Nell'isolamento vanno tenuti costantemente presenti alcuni principi generali, come sotto riportato.

#### **A. Purezza microbiologica**

La purezza microbiologica viene garantita da una buona tecnica di isolamento e soprattutto dalla reiterazione, ovvero dal re-isolamento, che consiste nel reisolare da una colonia. In ogni isolamento si può presumere che la colonia di partenza fosse omogenea se le colonie derivanti da isolamento sono macro-morfologicamente simili. Un'ispezione microscopica su alcune colonie scelte a caso dovrebbe poter confermare la valutazione macro-morfologica. In caso di reisolamento e di presenza di colonie disomogenee è opportuno adottare una nomenclatura che tenga traccia del re isolamento. Per esempio la sigla FNA1, potrebbe indicare il Formaggio di Norcia del Produttore “A”, colonia n°1. Se dal re isolamento di FNA1 derivino due o più colonie differenti si proceda di conseguenza isolandole entrambe e denominandole FNA1a e FNA1b. Non è escluso che le differenze macromorfologiche siano transienti e le due morfologie FNA1a e FNA1b possano revertire e scambiarsi.

#### **B. Contabilità**

La possibilità di contare il numero delle cellule con una tecnica di conta vitale è fondamentale per conoscere l'entità delle popolazioni microbiche. Si tenga presente però che la conta:

**NOTA: LA CONTA NON PUO' ESSERE EFFETTUATA DOPO ARRICCHIMENTO  
MENTRE PUO' ESSERE ESEGUITA IN SELEZIONE**

La contabilità di un campione ha valore statistico soprattutto quando in piastre Petri da 90 mm di diametro si ottengano da 30 a 300 colonie.

#### **C. Assenza di fenomeni di riproduzione sessuale**

Alcuni microrganismi (es. i lieviti, le muffe etc.) hanno un ciclo aplodiplonte e possono scorificare in piastra. La sporificazione porta alla formazione di nuovi tipi diversi dal parentale. Normalmente ogni cellula diploide produce 4 spore diverse, per cui le colonie con sporificazioni in atto avranno un numero di tipi (ovvero cellule della stessa linea genetica derivanti da una stessa cellula madre per riproduzione vegetativa) pari a

$$T=1 + 4*S.$$

In cui T è il numero di tipi e S il numero di cellule sporificanti. Le colonie di questo tipo sono politipiche in contrasto con le vere colonie monotipiche.

Si tenga comunque presente che il numero di fenotipi ottenibili per scorificazione è :

$$T_{max}=2^L$$

In cui  $T_{max}$  è il massimo numero di fenotipi e L il numero di *loci*. Per un lievito tale valore è circa  $2^{6000}$  che è molte migliaia di volte superiore al numero stimato di atomi nell'universo. Da ciò si desume che la sporificazione ha un potenziale assolutamente enorme nel produrre fenotipi diversi anche entro colonie singole.

La sporificazione si evita di solito favorendo la fermentazione e comunque usando terreni ricchi in glucosio. Si tenga comunque presente che tali terreni possono far perdere in brevissimo tempo ed in maniera definitiva la capacità di scorificare delle cellule che è uno dei caratteri tassonomici distintivi ed un prezioso aiuto per la variabilità genetica. Sarebbero quindi da preferire terreni con quantità non eccessive di glucosio, con un attento monitoraggio delle colonie sotto studio.

## **a. Microbiologia alimentare**

### **Isolamento di lieviti**

#### **Isolamento semplice per spandimento**

I lieviti vengono normalmente isolati per spandimento su piastre petri contenenti terreni complessi solidificati con agar. Nel caso di un semplice isolamento, senza necessità di calcolare la densità cellulare, si procede con uno dei metodi sotto elencati.

#### **A. Spandimenti con ansa su piastra di substrati solidi.**

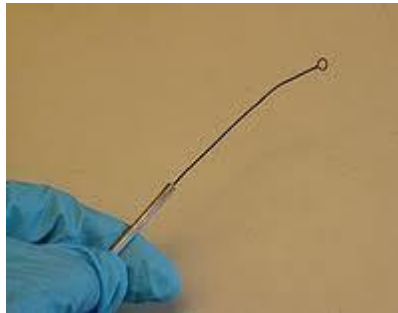
In questo caso si deve innanzitutto provvedere ad omogeneizzare una quantità del substrato prelevato in acqua o soluzione fisiologica (NaCl 0.9% = 0.154M) sterili. In certi casi l'omogeneizzazione è abbastanza facile e rapida come ad esempio per una ricotta. In altri casi è necessaria un'opera di frantumazione ed omogeneizzazione abbastanza energica ottenibile sia con piccoli omogeneizzatori casalinghi, da sterilizzare tassativamente prima e dopo ciascun uso con appositi composti chimici per evitare contaminazioni incrociate ed inquinamenti in genere. In alternativa può essere effettuata in molti casi un'omogeneizzazione in tubi da 15 ml (o similari) contenenti il substrato, la soluzione sterile e palline sterili di vetro di diametro variabile da 1 a 5 mm, a seconda del substrato. Il tubo deve essere agitato velocemente (Vortex) o posto in apparati che lo sottopongano a rapidi movimenti alternati con frequenze sull'ordine dei 1000 rpm. In ultimo, esistono omogeneizzatori a busta (vedi foto sotto) in cui il campione viene sigillato in un'apposita busta di plastica usata e gettata e sottoposta ad un movimento "a pedale" di due lamine metalliche all'interno dell'omogeneizzatore.



Omogeneizzatore a busta

Il campione omogeneizzato deve essere controllato per verificare che non ci siano stati riscaldamenti e perché il livello di omogeneizzazione sia completo o comunque sufficiente da evitare la presenza di pezzi grossolani.

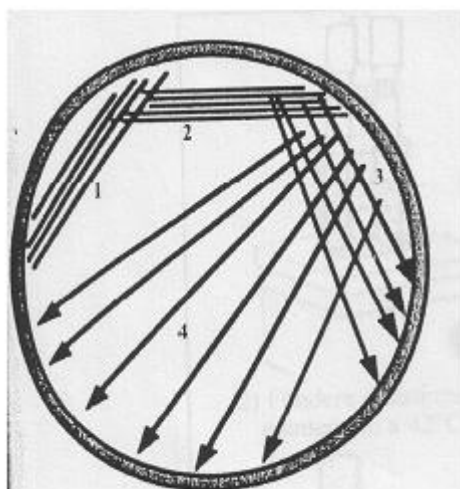
L'omogeneato viene sparso sulle piastre petri con un'ansa da microbiologia secondo



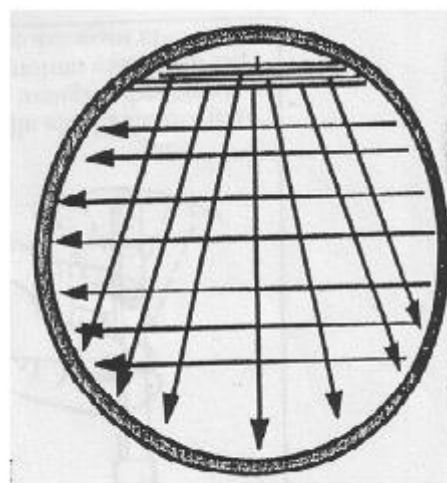
Ansa da microbiologia

uno degli schemi di spandimento sotto riportati a radianti o a quadranti.

# QUADRANTI



# RADIANTI



Schemi di isolamento per spandimento su piastra

Lo spandimento a quadranti prevede una serie di strisciate successive intervallate da sterilizzazioni alla fiamma. Nell'isolamento a radianti si procede con tre serie di strisciate, anche in questo caso con sterilizzazioni intermedie. Dopo lo spandimento si incubano le piastre a temperature da 25 a 30°C in termostati con atmosfera non controllata. I tempi di crescita delle colonie di lievito vanno da 2 a diversi giorni.

## **B.Spandimento su piastra di substrati liquidi o semiliquidi**

In questo caso si opera come descritto per i substrati solidi senza però dover procedere ad omogeneizzazione.

## **C.Spandimento su piastra di tamponi da superfici**

Il campionamento da superfici effettuato con tamponcini di cotone sterile e umido attaccati ad uno stecchino prevede una tecnica di isolamento per spandimento in cui il tampone viene usato per i primi tratti dello spandimento come se fosse un'ansa. La parte finale dello spandimento dovrebbe proseguire con un'ansa come sopra descritto.

## **Isolamenti con arricchimento o selezione**

In certi casi la popolazione blastomicetica è meno rappresentata di quella batterica o vi è il reale rischio di un'alta concentrazione di muffe. In questi casi è opportuno effettuare un arricchimento o una selezione prima dell'isolamento vero e proprio.

**Arricchimento.** L'arricchimento consiste nel predisporre una condizione di crescita che favorisca le specie microbiche da isolare e sfavorisca le altre. Si effettua di solito in terreno liquido con contenuto abbastanza elevato di zuccheri (dal 2 al 20%) in modo da favorire i lieviti che sono di solito voraci utilizzatori di zuccheri ed hanno



tempi di generazione abbastanza rapidi. In altri casi si può operare sulla temperatura (la maggior parte dei lieviti sono mesofili, ma ne esistono anche di termofili non estremi e frigidofili), o sullo stato redox della coltura (la maggior parte dei funghi sono aerobi).

**NOTA. Dopo arricchimento non è possibile effettuare conte microbiche.** Questo principio è dovuto al fatto che l'arricchimento modifica le densità relative delle varie specie e qualsiasi conta verrebbe ad essere una grave sovra o sotto-stima delle densità reali.

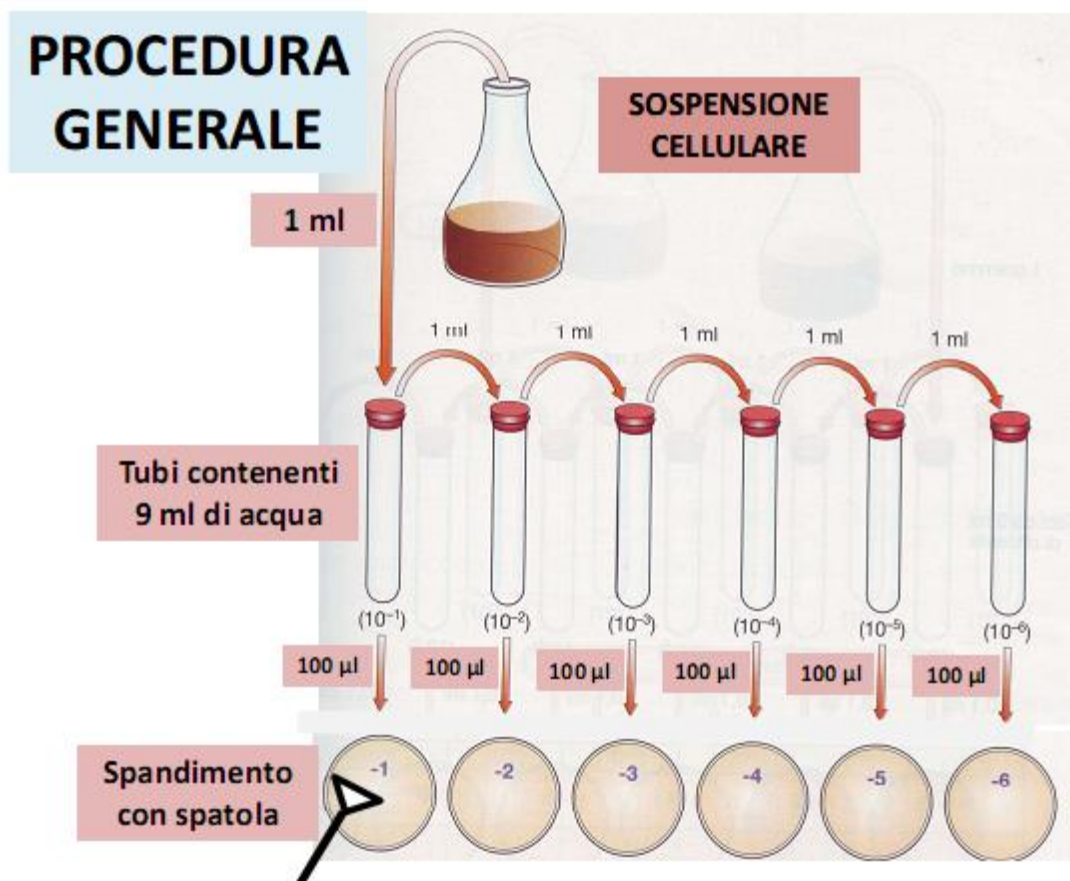
**Selezione.** A differenza dell'arricchimento, la selezione ha un effetto drastico in quanto permette o non permette la crescita delle varie specie microbiche. Esempi di selezione sono l'aggiunta di antibiotici ad ampio spettro per evitare la crescita batterica. Per contenere lo sviluppo delle muffe si usa aggiungere Rosa del Bengala o propionato di sodio. Tali composti non agiscono in maniera universale su tutte le specie di muffe, ma alle concentrazioni suggerite in letteratura non inibiscono la crescita dei lieviti, per cui vanno considerati agenti di selezione.

Dopo la selezione o l'arricchimento si prosegue con l'isolamento con la procedura base.

**Isolamenti con conta.** Nel caso si vogliano contare i microrganismi da isolare si devono effettuare le stesse operazioni della conta vitale come sotto descritto.

Omogeneizzazione del campione con le stesse procedure descritte per l'isolamento.

Diluizione su base decimale, ottenuta aggiungendo 1 ml di omogenato ad un tubo con 9 ml di acqua sterile (diluizione  $10^{-1}$ ). Dopo vigorosa agitazione si aggiunge 1 ml di sospensione ad un altro tubo con 9 ml di acqua sterile (diluizione  $10^{-2}$ ). Si procede fino a raggiungere la diluizione desiderata, secondo lo schema sotto riportato.



Schema di diluizione e piastra tura per la conta microbica vitale

**Spandimento su piastra.** Si effettua con spatole di vetro o di metallo, o alternativa con pipette da 1 o 2 ml di vetro. Si versa sulla piastra 0,1 ml (100 µl) della diluizione desiderata. Non è in genere necessario piastrare tutte le diluizioni, ma le ultime tre, in quanto le precedenti produrranno un tappeto indistinto di cellule. Dopo lo spandimento si incubano le piastre nelle condizioni descritte per gli isolamenti. Per ogni diluizione è opportuno predisporre due o tre repliche.

La densità cellulare,  $D_c$ , viene espressa in unità formanti colonia (ufc o cfu nella nomenclatura inglese) a mL [ $\text{cfu mL}^{-1}$ ]. La  $D_c$  si ottiene con la seguente formula:

$$D_c = C_m \cdot 10^{(d+1)}$$

In cui  $C_m$  è la media delle colonie per piastra rilevate nelle varie repliche. “d” è il tasso di diluizione, pari all’inverso dell’esponente della diluizione. Per esempio il “d” della diluizione  $10^{-5}$  è 5. Il piastramento di 1/10 di mL viene considerato nel termine “+1”.

Le diluizioni ottimali dovrebbero permettere di ottenere da 30 a 300 colonie per piastra (cfr. ISO 7218-2007, con l’adeguamento ISO/TS 19036 del 2006), per cui una regola generale permette di stimare il tasso di diluizione secondo la seguente formula:

$$d = D - 3$$

in cui D rappresenta l'ordine di grandezza atteso della densità cellulare.

A titolo di esempio da un mosto in attiva fermentazione ci si aspettano  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> per cui D=8 e d sarà 5. Si effettuerà quindi la diluizione fino al tubo  $10^{-5}$  e si piastre ranno le ultime due diluizioni.

### **Isolamento di batteri**

L'isolamento dei batteri viene eseguito con le stesse procedure descritte per i lieviti. Va precisato che in genere i batteri sono presenti a densità cellulari di almeno un ordine di grandezza superiore ai lieviti. Nel caso di colture selettive non si useranno antibiotici a largo spettro ma antibiotici selettivi nel caso si voglia isolare batteri Gram+ o Gram -. Nel caso non si vogliano funghi si impiegano antimicotici da definire volta per volta.

### **Alcuni terreni di coltura normalmente impiegati per isolamento crescita e conta microbica**

<b>TERRENO</b>	<b>FUNZIONE</b>
YEPD (2% glucosio, 1% estratto di lievito, 1% peptone)	Terreno di uso generale per lieviti.
PDA (Potato Dextrose Agar)	Terreno di uso generale per muffe e lieviti ambientali
Sabouraud	Come YEPD, con aggiunta di 0.05 gL <sup>-1</sup> cloramfenicolo
Mc Clarey's	Scorificazione lieviti
MRS Broth	Lattobacilli
Lura Bertani (LB)	Generico per biomassa batterica
Mac Konkey	Selettivo per batteri enterici
Brilliant green	Selettivo per batteri enterici

### **b. Microbiologia ambientale**

L'isolamento dei microrganismi del terreno avviene attraverso metodologie di laboratorio che differiscono in relazione alle caratteristiche dell'organismo cercato (trattato dal Manuale Col.Mi.A. [www.cra-pav.it](http://www.cra-pav.it) ).

#### *Isolamento di funghi e batteri*

Per la valutazione dei funghi e dei batteri colturabili, si mette il suolo, parzialmente sminuzzato, a seccare all'aria in vasche di materiale inerte in luogo buio e areato per non più di 5-6 giorni. I campioni vengono poi setacciati in vagli di dimensione di 2-4 o più mm, a seconda delle esigenze.

Nel caso dell'isolamento dei batteri dalla rizosfera, si rimuove il pane di terra dalle radici e si preleva l'apparato radicale della pianta con il suolo adeso per uno spessore non superiore ai 2 mm; si recupera il suolo tramite sbattimento, in agitatore orbitale a 200 oscillazioni min<sup>-1</sup> per alcuni minuti, di 5 g di radici spezzettate in frammenti di 1 cm ca., + suolo, in presenza di 25 ml di tampone fosfato salino PBS pH 7,4; si eliminano le radici e si recupera il suolo rizosferico con una centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente in tubi tipo Eppendorf.

### *Isolamento delle comunità dei batteri azotofissatori aerobi*

Vengono utilizzati i seguenti metodi:

1. Metodo con piastramento diretto da suolo (indicato per *Azotobacter*):

- Una piccola aliquota di suolo (30-50 g), vagliato come precedentemente indicato, viene impastato con una quantità pari all' 1% di Na-piruvato e acqua sterile in un mortaio di porcellana;
- L'impasto viene trasferito in capsule Petri con una spatola sterile, avendo cura di "lisciare" convenientemente la superficie dell'impasto, che non deve toccare il coperchio della piastra al fine di evitare condizioni di anaerobiosi. Dopo incubazione a 30°C per 3- 7 giorni si evidenziano le colonie di *Azotobacter*, di aspetto lucido e consistenza viscosa.

Per gli isolamenti viene adottata la metodologia secondo Beijerinck per Azotbacteriaceae (Beijerinck 1901):

20 ml della soluzione nutriente vengono aliquotati in beute da 100 ml sterilizzate, inoculate con 0,3-0,5 g di terreno e incubati per 2-7 giorni a 30°C.

Prelevato il film caratteristico della crescita di questi batteri e diluito in 10 ml di acqua sterile, u.p. (ultra pura) 100 µl di questa diluizione vengono ulteriormente diluiti in eppendorf contenenti 1,9 ml di acqua sterile u.p. (ultra pura) fino a raggiungere la quinta diluizione. 100 µl di ciascuna diluizione vengono strisciati su piastre da 10 cm di diametro contenenti il terreno di coltura e incubate a 30°C. Questo ulteriore passaggio in un mezzo solido privo di azoto si rende necessario per allontanare gli eventuali ceppi contaminanti la cui crescita in mezzo liquido, avvertibile dal forte odore di butirrato, può essere resa possibile dall'azoto fissato prodotto da *Azotobacter*.

- Allo sviluppo delle colonie, queste vengono strisciate su capsule Petri di 10 cm di diametro con terreno RM (Newton et al., 1953) e incubate per 24 h a 30°C. I substrati utilizzati sono quelli originali di Beijerinck 1901, riportati nei testi di microbiologia.

2. Isolamento con piastramento su terreni solidi o semisolidi

Gli isolamenti si ottengono a partire da 10 g di suolo vagliato, messo ad agitare in boccette di vetro sterili da 250 ml contenenti 90 ml di tampone fosfato pH 7,2 (0,8 g  $K_2HPO_4$  + 0,2 g  $KH_2PO_4$ ) per 30 minuti in shaker orizzontale oscillatorio a 120 rpm. Questa sospensione viene considerata una diluizione  $10^{-1}$ . Vengono poi effettuate successive diluizioni seriali in tampone fosfato e 100 µl delle diluizioni  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  vengono piastrati sui terreno solido o inoculati in 4,9 ml di terreno semisolido.

I terreni solidi sono realizzati con l'aggiunta di 15 g/l di Agar mentre per i semisolidi vengono aggiunti 5 g/l di Agar. Fra i terreni più usati si ricordano:

- Terreno di Rennie (Rennie, 1981) generale per Diazotrofi liberi aerobi;
- Terreno Nfb (Krieg e Döbereiner, 1984) per *Azospirillum spp.*;
- 

### *Isolamento delle comunità dei rizobi*

I rizobi sono batteri capaci di instaurare una simbiosi mutualistica con le radici di piante leguminose in quanto i batteri si riforniscono dei carboidrati prodotti dalla pianta mediante

fotosintesi, mentre le piante si riforniscono di azoto assimilabile (ammoniacale) prodotto dai batteri per riduzione dell'azoto atmosferico (azoto molecolare).

Questi batteri sono presenti in tutti i terreni e la loro capacità di adattamento a condizioni estreme (es. terreni salini, terreni semidesertici ecc.) rende gli studi su questa specie batterica molto interessanti. Particolare attenzione viene data alla selezione e all'impiego di ceppi dotati di maggiore efficienza azotofissatrice (Zaccardelli et al., 2002).

L'isolamento dei rizobi avviene generalmente dai tubercoli radicali. In caso di isolamento diretto dal suolo, campioni rappresentativi di terreno vengono prelevati e posti in vasi all'interno dei quali vengono successivamente seminati semi di leguminose, opportunamente sterilizzati in superficie. Quando le piante hanno raggiunto un sufficiente sviluppo, si procede alla raccolta dei tubercoli.

In caso di isolamento dei rizobi da campioni di seme, questi ultimi vengono posti direttamente in vasi contenenti agriperlite sterile e, dalle piante che si sviluppano, vengono prelevati i tubercoli per l'isolamento.

Operativamente, l'isolamento dai tubercoli radicali avviene secondo quanto segue:

- ogni singolo tubercolo o gruppo di tubercoli viene sterilizzato in superficie con soluzione acquosa sterile contenente il 2 % circa di ipoclorito di sodio, per un tempo di 2 minuti;
- dopo lavaggio con acqua bidistillata sterile (SDDW) per 2-3 volte, il tubercolo viene schiacciato in tubi Eppendorf sterili in presenza di 200 µl di SDDW;
- l'omogenato ottenuto viene strisciato, con un'ansa, in piastre di YEM-agar (composizione per litro: mannitolo 7,5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4$  0,2 g; NaCl 0,1 g; estratto di lievito 0,4 g; pH 7,2) e incubato a 28 °C per 4-6 giorni;
- da ognuna delle piastre di isolamento viene prelevata e purificata, per almeno due volte, una singola colonia.
- Avvenuto l'isolamento in purezza, si procede alla conservazione dei ceppi.

#### *Le comunità fungine colture del suolo o 'filamentous fungi living in the soil layer'*

Le comunità fungine dei suoli hanno caratteristiche molto diverse e non possono essere valutate con un solo metodo (Gams, 2007). Per valutare le comunità dei funghi colture del suolo con il metodo delle diluizioni seriali (Dhingra e Sinclair, 1985) su agar acqua si parte dai campioni essiccati all'aria, come descritto nel punto precedente sulla preparazione dei campioni. Il suolo così preparato viene vagliato con setaccio a 4 mm. Appena il campione di suolo è pronto si procede alla valutazione delle comunità fungine. Si prepara la soluzione madre  $10^{-1}$  a partire da 3gr di suolo in un falcon di 40 ml agitando alla massima velocità con vortex per 1 min. Dalla soluzione  $10^{-1}$  si ottengono le diluizioni successive  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , da cui si preleva 1 ml che viene aggiunto a 49 ml di agar acqua raffreddato a 40 °C, addizionato con 200 mg  $\text{l}^{-1}$  di streptomicina fosfato e 2 g  $\text{l}^{-1}$  Oxgal. La soluzione di suolo in agar acqua ottenuta viene distribuita in più piastre Petri in modo da creare un film sottilissimo di suolo incluso in agar che viene incubato a 24°C per 3 giorni. La diluizione più rappresentativa viene scelta per la conta del numero di propaguli espressi per grammo di suolo.

Per la valutazione qualitativa le colonie fungine vengono classificate in funzione della forma. Almeno 30 colonie per forma vengono trasferite da agar acqua a substrato nutritivo

(PDA) per: i) verificare la corrispondenza della specie con il simbolo di identificazione; ii) per la successiva identificazione.

#### *Le comunità dei funghi endofiti*

Per la valutazione delle comunità fungine dei suoli a comportamento endofita, la raccolta dei campioni di suolo avviene con i criteri generali di raccolta del suolo precedentemente indicati. Tuttavia in questo caso vengono raccolti almeno 5 Kg di suolo per campione, che vengono parzialmente asciugati all'aria in ambiente fresco e sminuzzati grossolanamente a mano o con piccoli attrezzi. In funzione della coltura oggetto di studio, il suolo viene distribuito in vasi di 8-10 cm di diametro o in contenitori multiferi con diametro minimo di 5 cm. Per le colture da seme, le piantine ottenute in sterilità vengono trapiantate nei vasi con il suolo campione, per le piante da frutto si possono utilizzare piantine micro propagate. Allevando per 2 mesi in serra le piantine, si ottiene una buona colonizzazione radicale del campione. Dopo questa fase di allevamento, le radici vengono delicatamente liberate dai residui di suolo, lavate sotto acqua corrente per almeno 10 minuti, disinfettate con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% per 1 minuto, risciacquate con acqua sterile e asciugate sotto cappa per almeno 15 minuti. Un numero predefinito di espianti (30-50 mm) delle radici viene posto su agar acqua e incubato per 4-5 gg.

Le colonie che partono dai singoli espianti vengono trasferite in substrato nutritivo (PDA) e incubate per almeno una settimana; le colonie risultanti vengono sottoposte a identificazione.

### **III.1.4 SISTEMI DI MANTENIMENTO DELLE COLTURE ISOLATE**

#### **I. Terreno di coltura (temporanea)**

Le manipolazioni microbiche vengono effettuate su biomasse ottenute facendo crescere le cellule microbiche su terreni liquidi o solidificabili. Dopo la crescita è possibile refrigerare i contenitori (tubi, bottiglie, piastre etc.) con le colture sul proprio terreno. Questo sistema di conservazione è normalmente adattabile a brevi periodi e può essere esteso con la refrigerazione. Volendo mantenere per qualche settimana le colture su terreno è opportuno predisporre tubi di vetro con il terreno solidificato a “becco di clarino” e chiusi con tappi di cotone, in modo da minimizzare gli inquinamenti.

In linea generale il mantenimento su terreno di coltura è sconsigliabile perché comunque avviene una qualche forma di variazione genetica nella coltura, come ad esempio ricombinazioni o mutazioni. E' piuttosto difficile rilevare tali variazioni in corso d'opera, ma numerosi sono i casi in cui l'evidenza sperimentale ha mostrato che tali variazioni sono avvenute. Eliminare o limitare al massimo le variazioni ereditabili è parte stessa della strategia di mantenimento della coltura *ex situ*, per cui si desidera immagazzinare una situazione fedele e stabile di una porzione della biodiversità microbica di un certo ambiente. Inoltre, tali variazioni non vengono selezionate in un ambito naturale (che è un po' la filosofia dell'*in situ*), ma in una condizione assolutamente artificiale sia per quanto riguarda i nutrienti che le relazioni inter ed intra-specifiche.

Un caso particolarmente grave di variazione stabile che interviene in terreno di coltura è la perdita di particolari caratteristiche morfologico-funzionali come la capsula o la

capacità di scorificare. Per questa ragione, anche in fase di isolamento primario è bene limitare al massimo il mantenimento della coltura in terreni da laboratorio e procedere al suo congelamento prima che essa venga studiata, in modo che si abbia sempre un campione originario da cui ripartire in caso le colture usate per lo studio abbiano subito tali variazioni. I ceppi per cui sia stata praticato a lungo il mantenimento su terreno di coltura, ed anche quelli congelati dopo una temporanea permanenza su terreno di coltura, vanno considerati con moltissima attenzione perché possono essere stati selezionati per condizioni diverse da quelle per cui erano stati isolati.

In conclusione, tale sistema, ampiamente usato in passato, è sconsigliato nella maggior parte dei casi.

## **II. Congelamento**

Il congelamento delle colture microbiche viene effettuato mescolando particolari agenti chimici che evitino la formazione di aghi di ghiaccio (di solito il glicerolo) alle colture appena cresciute e refrigerando il più rapidamente possibile tali colture o in azoto liquido (-195,8°C) o in congelatori a -80°C. La rapidità del congelamento è essenziale per evitare il danneggiamento delle cellule e mantenere un'elevata vitalità.

Tale tecnica viene applicata con diverse varianti pratiche per facilitare la movimentazione dei campioni, i quali sono solitamente di circa un mL o anche meno. In generale il congelamento è la tecnica ideale per il mantenimento a lungo termine delle colture, riduce al minimo i fenomeni di variazione genetica ereditabile e consente di immagazzinare molti ceppi in spazi ridotti. Basti pensare che in una tipica scatola per colture (120\*120\*50 mm) possono essere introdotti e mantenuti fino a 100 tubi.

## **III. Liofilizzazione**

La liofilizzazione è una sublimazione dell'acqua congelata. Viene applicata per conservare colture microbiche dal II dopoguerra. Le colture vengono congelate e sottoposte a vuoto spinto. Ne deriva una polvere che può essere mantenuta anche a temperatura ambiente. La liofilizzazione funziona egregiamente con moltissime specie batteriche, mentre produce alte mortalità negli eucarioti. Stante la necessità di effettuare diverse manipolazioni in condizioni di non assoluta sterilità, non è infrequente trovare colture liofilizzate inquinate.

## **CONSERVAZIONE**

(tratto dal Manuale Col.Mi.A. [www.cra-pav.it](http://www.cra-pav.it))

### *Funghi tellurici*

I funghi colturabili del suolo possono essere conservati con differenti metodi a seconda delle loro caratteristiche biochimiche:

- Tutti gli isolati possono essere conservati come porzioni di micelio o spore concentrate in azoto liquido (-180 °C), previo congelamento lento a -80°C per 2-3 gg, in acqua contenente Dimethylsulfoxide al 10%.

- Molti Ascomyceti, Oomicotai (Chromista) e Zigomyceti possono essere mantenuti in collezione in acqua sterile (10 ml) contenuta in provette di plastica da 15 ml, in frigorifero a 4°C.
- Pochi isolati come colonie su substrato nutritivo (Potato Sucrose Agar) a 6-8°C, in provette di vetro con tappo a vite in silicato.

Per tutte le modalità di conservazione vengono seguite le indicazioni descritte da Smith e Onions (1994).

#### *Batteri azotofissatori liberi*

I ceppi isolati sono mantenuti in collezione attraverso la preparazione di glicerolati conservati a -80°C. Per questo sistema di conservazione 1 ml di coltura del ceppo, allevato su un terreno liquido di tipo massimo viene aggiunto, in una provetta sterile per criogenia da 2 ml con tappo a vite, ad 1 ml di glicerolo 80% (w/v) in modo da ottenere una soluzione al 40% (w/v) finale in glicerolo. La provetta si agita energicamente per mescolare il glicerolo con la coltura e si conserva a -80°C.

#### *Rizobi*

La conservazione dei rizobi avviene secondo le modalità generalmente adottate per tutti i batteri coltivabili aerobi. Per periodi relativamente brevi (diversi mesi) i rizobi possono essere conservati in tubi di agar posti in frigorifero (4 °C). Per garantire la conservazione degli isolati per lunghi periodi (diversi anni) si ricorre alla preparazione di liofilizzati oppure, più semplicemente, alla crioconservazione a - 80 °C. In questo caso le sospensioni batteriche vengono concentrate (almeno 10<sup>9</sup> C.F.U. ml<sup>-1</sup>) in brodo addizionato con il 20 % di glicerolo.

Vista l'elevata variabilità dei rizobi dal punto di vista genetico, della specificità dell'ospite e dell'efficienza azotofissatrice (Zaccardelli *et al.*, 2002), è di estrema importanza conservare un numero molto elevato di ceppi affinché sia ben rappresentata la biodiversità di questa specie microbica simbiote. Pertanto, al fine di ridurre i tempi e i costi della conservazione, è anche possibile crioconservare a - 80°C direttamente i tubercoli, senza ricorrere all'isolamento dei rizobi.

A livello ambientale le collezioni di microrganismi in laboratorio sono uno strumento fondamentale nello sviluppo del lavoro di ricerca e infatti la stragrande maggioranza delle collezioni attualmente esistenti in Italia possono infatti considerarsi come "collezioni da lavoro" ove i microrganismi vengono conservati per esigenze di studio e non di propagazione e vendita.

Nel caso della conservazione della biodiversità microbica del suolo, in funzione della conservazione della fertilità del suolo e delle sue funzioni legate ai servizi ecosistemici, questa va tutelata e garantita attraverso l'attivazione di collezioni in situ-on farm. Sarà il monitoraggio in situ spazio-temporale a fornire indicazioni su eventuali modifiche a carico della della biodiversità microbica del suolo.

Nei capitoli di seguito riportati verranno fornite le metodologie da seguire.

Per quanto riguarda invece la conservazione di singoli ceppi microbici di interesse generalizzato è consigliabile attenersi ai protocolli internazionali quali ad esempio la Banca Mondiale dei glomali o la ECCO per la descrizione delle quali si rimanda ai loro siti ufficiali.



### **III.2 - Individuazione di protocolli standard di identificazione per macro-gruppi microbici**

#### **Premessa**

Al momento esistono alcune procedure condivise per le operazioni di identificazione, ma molti aspetti restano nell'ambito della discussione. Per elaborare procedure comuni nell'ambito del Piano Nazionale per la Biodiversità Agraria è necessario effettuare scelte motivate sia da criteri scientifici che applicativi. E' particolarmente importante la scelta fra sistemi radicalmente diversi quali, ad esempio, l'identificazione monofasica (una singola analisi) o polifasica (una serie contemporanea o successiva di analisi diverse). I protocolli attualmente in uso producono normalmente larghe messi di dati di tassonomia-numerica da elaborare con analisi statistica multivariata o filogenetica. Tutto ciò rende necessaria la definizione dei sistemi di biostatistica e bioinformatica da impiegare.

L'argomento della specie microbica, del suo significato, delle sue difficoltà ed implicazioni è stato trattato in precedenza. In questa sezione ci si occuperà solo delle strategie e delle metodologie per l'identificazione microbica.

Esistono due approcci fondamentali per l'identificazione: il monofazico ed il polibasico. Il primo si basa sull'uso esclusivo di una sola metodologia che sia in grado di discriminare fra specie, almeno nell'ambito di un gruppo ben definito. L'approccio polibasico si basa su un numero, talvolta anche rilevante, di tecniche diverse che descrivano il ceppo da diversi punti di vista.

L'approccio monobasico è chiaramente meno sicuro del polibasico, ma indubitabilmente più rapido e meno costoso. Negli ultimi tempi si ritiene che sia conveniente identificare in maniera monobasica e poi proseguire con una caratterizzazione che sia la più dettagliata possibile. Un ulteriore vantaggio di sistemi monobasici è che esistono database pubblici cui sottoporre i dati della tecnica monobasica (sequenziamenti), ottenendo un'indicazione quantitativa della similarità genetica del ceppo in oggetto con altri già identificati.

#### **III.2.1. IDENTIFICAZIONE POLIFASICA MORFO-FISIOLOGICA**

##### **a.Procarioti**

L'identificazione polifasica morfofisiologica dei procarioti è stata completamente soppiantata dall'avvento delle tecniche molecolari e quindi dalla caratterizzazione monobasica molecolare.

Molti infatti i limiti della caratterizzazione polibasica morfofisiologica.

- Non culturabilità del 99% dei microrganismi ambientali, ma recenti studi hanno anche dimostrato che nel caso dei microrganismi alimentari quelle che semplicisticamente venivano individuate come vie metaboliche semplici (piruvato) rappresentano l'espressione funzionale di un insieme di vie metaboliche che hanno come marcatore finale il piruvato, ma che in realtà vengono sviluppate da una catena di reazioni metaboliche generate da differenti popolazioni di microrganismi.
- Instabilità morfologica da parte di organismi isolati dal loro ambiente naturale e, se anche coltivabili, messi a riprodursi in completa assenza di tutti i cofattori che generalmente ne determinano anche le caratteristiche morfologiche oltre che quelle funzionali. Esempio classico è la perdita di caratteristiche come la capacità di produrre antibiotici, oppure quella di sporulare oppure ancora quella di possedere flagelli, ecc

- Ridondanza funzionale in natura molte funzioni vengono svolte da più di una specie di microrganismo, questo comporta che soprattutto nel caso di più organismi coltivabili che concorrono a svolgere la medesima funzione, ma con substrati diversi, che derivano da differenti nicchie metaboliche nella decadenza del metabolismo possono essere confusi o coperti dalla prevalenza di altri organismi in grado in determinate condizioni edafiche semplifica di prevalere gli uni sugli altri.
- Falsi positivi a causa della sensibilità degli strumenti di analisi, ancora legata molto alla manualità, alle condizioni di asepsi ed ad altri fattori involontari che possono portare inquinamento alle colture cellulari e quindi modificarne la risposta analitica.

### **b. Eucarioti**

L'identificazione polifasica degli eucarioti presenta tre passaggi fondamentali di seguito descritti

- **Analisi morfologica.** Consiste nel raccogliere una serie di osservazioni macro e micro morfologiche. Tali osservazioni vengono analizzate con chiavi dicotomiche o, più raramente, immesse in appositi software di confronto con database. Tale analisi permette in molti casi di giungere al livello di genere.
- **Analisi fisiologica.** Consiste nel raccogliere informazioni sulla capacità di fermentare o assimilare diversi composti del Carbonio e dell'Azoto. Vengono inoltre rilevate le resistenze a tutta una serie di agenti chimici o fisici. Anche tali osservazioni possono essere analizzate come quelle morfologiche. In linea di principio con tali dati si può giungere all'identificazione a livello di specie. Una parziale automatizzazione di tale fase può essere ottenuta con l'uso di kit in cui le varie fonti da saggiare sono contenute in piccoli pozzetti raccolti in un apposito contenitore plastico.
- **Analisi molecolare.** Storicamente si è trattato di un'analisi di riassegnazione nDNA:nDNA, per ibridazione radioattiva o per spettrofotometria, fra il DNA genomico del ceppo in esame e quello del ceppo tipo della specie di presumibile assegnazione. Tale tecnica, tutt'ora in uso in taluni laboratori, fu un enorme passo in avanti negli anni '60 del secolo scorso, ma ormai pare obsoleta soprattutto in termini di rapporto costi benefici. Infatti tali riassegnazioni richiedono elevate quantità di DNA e solo pochi ceppi all'anno possono essere identificati con certezza.

In particolare, per i funghi del suolo il riconoscimento delle colonie fungine viene svolto sulla base delle comuni chiavi tassonomiche (Ellis, 1971; Nelson et al. 1983; Burgess et al., 1988; Samson and van Reenen-Hoekstra, 1988; Watanabe 2002; CMI descriptions) e, in molti casi, a conferma del riconoscimento tassonomico, viene svolta l'analisi del DNA da micelio o da cellule libere con l'utilizzo di Kit specifici.

Anche se l'identificazione polifasica raggiunge un elevato livello di certezza tassonomica, risulta scarsamente compatibile con le caratteristiche dello studio della biodiversità, caratterizzato dalla necessità di analizzare molte centinaia di ceppi in tempi brevi.

### III.2.2 IDENTIFICAZIONE MONOFASICA MOLECOLARE (tratto dal manuale Col.Mi.A. [www.cra-pav.it](http://www.cra-pav.it))

#### a.Procarioti

##### *Riconoscimento dei batteri azotofissatori aerobi*

L'identificazione dei batteri azotofissatori liberi isolati dal suolo viene eseguita per via molecolare attraverso:

- il sequenziamento del gene per il 16S rDNA
- il sequenziamento di una porzione del gene *nifH* per la nitrogenasi reductasi, gene specifico dei batteri azotofissatori liberi.

A partire dal DNA genomico, estratto dalle cellule batteriche attraverso il metodo detto del CTAB (Ausubel et al., 1987), la porzione del 16S rDNA viene amplificata utilizzando primer specifici (P0 e P6) e, successivamente, sequenziata (Castaldini et al., 2005)

##### *Riconoscimento dei rizobi*

Il riconoscimento dei rizobi può essere eseguito adottando mezzi biologici, biochimici e/o molecolari.

L'identificazione con mezzi biologici consiste nell'eseguire test di nodulazione su una o più specie di leguminose al fine di individuare la specie ed, eventualmente, la sottospecie di appartenenza del rizobio isolato. Questi test di nodulazione vengono eseguiti ricorrendo all'allevamento di piantine in vasi contenenti agriperlite sterile; queste piantine vengono ottenute dalla germinazione di semi preventivamente sterilizzati con soluzione di ipoclorito di sodio al 2 % e inoculati con il ceppo batterico da identificare. Dopo circa uno-due mesi di crescita, vengono eseguiti i rilievi sulle radici per verificare la presenza o meno di tubercoli. Il test di nodulazione presenta lo svantaggio di richiedere molto tempo ma fornisce indicazioni in merito all'efficienza azotofissatrice dei ceppi.

L'identificazione con mezzi biochimici si basa sul profilo catabolico mostrato dal ceppo batterico da identificare, cioè dalla capacità o meno di utilizzare una serie di specifici composti organici. Un sistema biochimico di identificazione semplice da utilizzare e che dà risposta in un paio di giorni è il BIOLOG. Questo sistema utilizza delle piastre, molto simili a quelle impiegate nei test ELISA, nelle quali i 96 pozzetti contengono specifici substrati che, se catabolizzati dallo specifico ceppo da identificare, assumono una colorazione violacea.

I metodi molecolari di identificazione dei rizobi si basano, come per la maggior parte dei batteri, sulla reazione a catena della polimerasi (PCR). Primer specifici per i geni *nodABC* sono stati disegnati per *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (Zhang et al., 2001)). Questo protocollo di PCR è sicuramente molto valido ma, purtroppo, permette l'identificazione soltanto di questa sottospecie. Diversi altri metodi molecolari, universalmente usati per la caratterizzazione e l'identificazione dei batteri, sono stati sviluppati anche per i rizobi. Tra questi si ricordano l'amplificazione del 16S rDNA, seguita dall'analisi di restrizione (ARDRA) o dal sequenziamento; l'amplificazione di specifici geni implicati nell'azotofissazione, seguita dalla restrizione o dal sequenziamento ecc. Tuttavia, questi metodi sono abbastanza laboriosi nell'interpretazione dei risultati e, pertanto, non molto adatti ad essere applicati nell'identificazione routinaria.

### **b.Eucarioti**

L'identificazione monobasica dei funghi segue il protocollo pubblicato da Kurtzman e Robnett nel 1998 (Articolo L0 nella tabella dei metodi), basato sull'amplificazione mediante PCR del dominio D1/D2 del DNA codificante per il RNA ribosomale 26S. Tale amplicone viene poi sequenziato nelle due direzioni e la sequenza è comparata con le altre presenti nel database GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Si ritiene che un ceppo appartenga ad una specie nota quando l'omologia fra le due sequenze è uguale o superiore al 99%. Esistono lavori che dimostrano come talvolta tale identificazione non sia sufficientemente accurata, ma nella maggior parte dei casi è possibile con essa risalire alla classificazione corrente.

### **III.3 - Individuazione di protocolli standard di caratterizzazione dei raggruppamenti sub specifici (varietà, ceppi, popolazioni)**

#### **Premessa**

Le stesse indicazioni per l'obiettivo O2.2 sono riferibili all'obiettivo O2.3 con la differenza che i marcatori fenotipici sono più largamente impiegati nella caratterizzazione che nell'identificazione. numerosissimi descrittori molecolari di caratterizzazione sono stati proposti nei vari gruppi microbici. Le relative procedure saranno scelte dopo averne vagliato criticamente costi e benefici.

#### **III.3.1 A CARATTERIZZAZIONE FISIOLÓGICA**

La caratterizzazione fisiologica si distingue dall'identificazione polifasica con metodi fisiologici per due motivi principali. Nella caratterizzazione si cercano caratteri variabili entro specie, mentre nell'identificazione venivano cercati caratteri stabili e costanti entro specie. Ancor più rilevante il fatto che la caratterizzazione fisiologica impiega caratteri quantitativi legati, di solito, alle possibili applicazioni tecnologiche. Da questo punto di vista la caratterizzazione fisiologica risulta un sistema potente per ottenere informazioni preziose relative all'effettiva utilizzabilità dei microrganismi. Va qui sottolineato che la biodiversità non va salvata solo in funzione della sua applicazione e ancor meno dell'applicabilità diretta ed immediata. Le ragioni sono che anche nell'ambito dell'applicazione della biodiversità è quanto mai probabile che caratteristiche attualmente non utilizzabili o lo divengano in seguito. Ancor più importante è il fatto che la biodiversità si è formata e sviluppata in funzione dell'ecosistema globale e non delle sole necessità umane per cui la sua importanza va oltre le frontiere della mera applicazione. Allo stesso tempo è innegabile che molti fondi, anche pubblici, per la biodiversità puntino alla sua valorizzazione. Da queste brevi considerazioni deriva l'importanza di preservare la biodiversità anche al di là degli interessi applicativi immediati. In questo delicato equilibrio fra le istanze naturalistiche e quelle applicative, i marcatori fisiologici giuocano un ruolo chiave in quanto è in funzione della fisiologia microbica che di solito si decide che un certo ceppo è interessante e va preservato. Ne consegue che una caratterizzazione fisiologica è importante, ma non dovrebbe essere necessariamente impiegata come sistema per scartare organismi fisiologicamente poco interessanti nella visione applicativa attuale.

##### **a. Procarioti**

La caratterizzazione fisiologica dei procarioti segue gli stessi principi di quella degli eucarioti, descritta di seguito.

##### **b. Eucarioti**

##### **Sistemi di caratterizzazione**

I sistemi di caratterizzazione fisiologica coprono un ambito vastissimo di possibili analisi. Qui di seguito riportiamo solo una lista assolutamente non esaustiva con alcune potenziali ambiti applicativi per i quali tali caratteri risultino utili.

- **Capacità produttiva specifica.** E' il caso dell'etanolo dei lieviti da fermentazione per scopi alimentari (vino, birra, sake) o per scopi industriali. E' anche il caso dei microrganismi metanigeni.
- **Capacità produttiva generica.** E' il caso della produzione di biomassa, come, ad esempio quella dei lieviti impiegati per produrre estratto di lievito.
- **Capacità di biotrasformazione.** E' il caso di tutti quei microrganismi capaci di trasformare un substrato in un composto specifico senza impiegare sistemi chimici. Tale proprietà può essere assolutamente specifica o anche generica, come nel caso di certe capacità idrolitiche di substrati complessi.
- **Resistenza.** La resistenza a diverse situazioni ambientali (temperatura, pH, salinità, carenza di N etc.) è un carattere importante sia per comprenderne i meccanismi, spesso ancora poco chiari e comunque complessi, sia per avere a disposizione microrganismi per svariati utilizzi quali ad esempio la bio-depurazione (bioremediation). Infatti per depurare acque di conseria si cercheranno organismi resistenti al cromo, ai fenoli e alla salinità e così via.

Tutte queste categorie di funzioni fisiologiche possono essere analizzate con una grande quantità di saggi, spesso messi a punto ad hoc. In ogni caso i saggi possono essere suddivisi in quattro categorie:

- **Saggi di produzione.** Sono tutti saggi in cui si pone il microrganismo in uno specifico substrato misurandone la conversione in un prodotto o in una gamma di prodotti.
- **Saggi di resistenza.** Sono tutti i saggi in cui il microrganismo viene posto a contatto con dosi crescenti (per tempo di contatto o di concentrazione) di agenti stressanti di origine chimica, fisica o biologica. La riduzione di crescita che ne deriva è una misura diretta della suscettibilità all'agente in questione.
- **Saggi di specificità.** Sono tutti saggi in cui si valuta se il microrganismo sia capace di crescere o di degradare o di assorbire specificamente un particolare composto.
- **Saggi di antibiosi.** Sono i saggi in cui si verifica se i microrganismi a livello di presenza cellulare o a livello di estratto acellulare contengano agenti capaci di inibire altri organismi e in particolare altri microrganismi.

### III.3.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

#### i. AFLP

Polimorfismo della lunghezza dei frammenti amplificati per PCR (Amplified Fragments Length Polymorphism) è uno strumento basato sulla PCR utilizzate nella ricerca genetica, nel DNA fingerprinting, e nel monitoraggio. Sviluppato nei primi anni del 1990 da Keygene [1], l' AFLP utilizza due enzimi di restrizione per digerire il DNA genomico, i frammenti vengono poi legati (ligation) ad adattatori appositi. Un sottoinsieme dei frammenti di restrizione è quindi selezionata per essere amplificato. Questa selezione è realizzata usando primer complementari alla sequenza adattatore, ovvero la sequenza del sito di restrizione e di pochi nucleotidi all'interno del frammento del sito di restrizione. I frammenti amplificati sono visualizzati su gel di poliacrilamide denaturante attraverso metodologie autoradiografiche o a fluorescenza.

#### ii. ARDRA

L' ARDRA (Amplified rDNA (Ribosomal DNA) Restriction Analysis ) è un'estensione della

tecnica del RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) per il gene che codifica per una parte del RNA ribosomiale microbico. La tecnica comporta l'amplificazione PCR con primer delle regioni conservate alle estremità del gene, seguita da digestione con enzimi di restrizione "tetra cutter". I profili di bandeggi ARDRA sono spesso usati per replicare gli isolati prima del sequenziamento del rDNA.

### **iii. ARISA**

L'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) è una tecnica di fingerprint molecolare applicata alle comunità microbiche basata sul polimorfismo di lunghezza delle regioni spaziatrici dell'operone rRNA (ITS). I frammenti sono marcati al terminale 5' e soggetti a corsa in un sequenziatore automatico. La tecnica si basa sul fatto che anche gli ITS, come i 16S rRNA e 26S rRNA, sono in copia multipla. Inoltre, gli ITS sono molto più variabili dei geni dell'operone codificanti per le varie sub unità di RNA ribosomiale.

### **iv. FAME**

La tecnica FAME (Fatty acid methyl ester) si basa sulla separazione gascromatografica degli esteri di acidi grassi. Può essere effettuata su coltura pura o per definire popolazioni complesse.

### **v. iSSR**

La tecnica iSSR (intra Short sequence Repeat) è sostanzialmente simile ad un RAPD in cui i primer sono costituiti da sequenze micro satellitari (es GACA GACA GACA GACA, indicato come GACA<sub>4</sub>). Questo fatto permette di innalzare la T<sub>m</sub> e quindi la temperatura di annealing della PCR producendo risultati più ripetibili di quelli del RAPD.

### **vi. DGGE/TGGE**

Queste due tecniche (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis o Temperature Gradient Gel Electrophoresis) sono finalizzate a stimare il numero di specie partendo dal DNA metagenomico estratto da comunità microbiche complesse. Le sequenze non vengono separate in base al loro peso molecolare, ma piuttosto per la loro composizione complessiva e in particolare di alcuni siti. Infatti, le sequenze ricche di G e di C si denaturano meno di quelle con A e T in presenza di agenti alcalini e caotropici come l'urea (DGGE) o per effetto della temperatura (TGGE). Gli ampliconi vengono sottoposti a queste particolari elettroforesi da cui risultano sostanzialmente tante bande distinte quante sono le specie presenti nella comunità.

Per l'estrazione di DNA da suolo, il suolo essiccato e vagliato a 2 mm viene conservato a -40°C o a temperature inferiori. L'estrazione del DNA viene svolta con l'utilizzo dei kit per estrazione di DNA da suolo, utilizzando le istruzioni della ditta fornitrice. Il DNA estratto viene amplificato con primer specifici per il 16S rDNA e gli amplificati vengono clonati direttamente o previa separazione mediante Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

I frammenti provenienti dalla scelta random dei cloni o dalle bande elettroforetiche più significative vengono sequenziati, come descritto in Castadini et al. (2005); la collocazione tassonomica degli organismi viene poi eseguita per comparazione con il database di sequenze nucleotidiche disponibile in web (GenBank).

## **vii. MICROARRAY**

L'uso dei microarray è nato per definire con un solo esperimento l'attivazione o la disattivazione trascrizionale di tutti i geni di un genoma. Successivamente, sono stati prodotti vetrini di microarray "tassonomici" contenenti sequenze di specie ben note, per cui quando tali vetrini vengono ibridati con DNA metagenomico marcato si evidenzieranno gli "spot" su cui sono stati depositi i DNA specifici delle specie presenti nella comunità. Il limite di tale sistema è l'incapacità di rilevare o anche di indicare la presenza nella comunità microbica di specie non considerate nel microarray. Altro problema è determinare e ritrovare sequenze specie specifiche da impiegare nella produzione del vetrino.

## **viii. RAPD**

La metodologia RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) si basa sull'amplificazione casuale di frammenti di DNA con un solo primer abbastanza corto da potersi ibridare frequentemente nel genoma. La tecnica può essere effettuata in "multiplex" impiegando più di un primer in modo da aumentare il numero di bande ottenibili in ogni corsa elettroforetica. Il RAPD è stata una delle prime tecniche di caratterizzazione ceppo specifica ed è tuttora impiegato, anche se la ripetibilità della tecnica non è elevatissima.

## **ix. RFLP**

Questo approccio (Restriction Fragment Length Polymorphism) si basa su una serie di tecniche che mirano ad evidenziare la posizione di specifici enzimi di restrizione lungo il gene. Si hanno tre forme particolari di RFLP:

- ✓ restrizione diretta del DNA genomico e corsa su gel d'agarosio colorato con Etidio Bromuro (funziona solo per geni in copia multipla come quelli del rRNA)
- ✓ elettroforesi del DNA genomico ristretto e rilievo delle bande specifiche mediante sonde marcate (tecnica del Souther Blot)
- ✓ Amplificazione PCR del gene da studiare seguita da restrizione e corsa su gel d'agarosio. Un caso particolare di questa tecnica è l'ARDRA.

## **x. Sequenziamento**

Il sequenziamento di regioni particolarmente discriminanti a livello di specie (16S nei batteri e 26S nei funghi) o a livello di ceppo (ITS) è lo strumento per l'identificazione monofasica e per una caratterizzazione molto particolareggiata a livello di ceppo. Si effettua l'amplificazione delle sequenze marcatrici e poi si sottopongono immediatamente a sequenziamento su entrambi i filamenti.

## **xi. SSR**

Questa tecnica (Short Sequence Repeat) chiamata anche analisi micro satellitare si basa sul fatto che molte regioni del genoma contengono numeri variabili di brevi sequenze, per cui alleli diversi risultano essere caratterizzati da lunghezze diverse, rilevabili con gli apparati di sequenziamento.



## xii. T-RFLP

Come la DGGE e la TGGE, la T-RFLP (Terminal RFLP) è una tecnica finalizzata alla stima del numero di specie diverse in comunità microbiche. Si effettua di solito amplificando la regione 16S o 26S con i normali primer, di cui uno fluorescente. Dopo restrizione con enzimi a taglio frequente si sottopone il preparato a migrazione in un apparato da sequenziamento. Specie diverse di solito esibiscono siti diversi di restrizione nelle zone sopra dette, per cui dalla presenza di bande di lunghezza diversa si può desumere il numero delle specie presenti.

I metodi sopra riportati sono applicabili alla caratterizzazione o all'identificazione dei vari microrganismi procarioti o eucarioti di interesse agroalimentare e ambientale. Le tabelle nella parte finale di questo capitolo riportano i collegamenti ipertestuali a vario articoli a seconda della combinazione fra tecnica e ambito applicativo o fra tecnica e tipo di organismo da studiare. Ulteriori approfondimenti possono essere trovati sia nella sezione "ulteriori letture" sia nel manuale "Metodi di analisi Molecolare per lo studio dei microrganismi del suolo" a cura della Società Italiana Scienza del Suolo (SISS) e del MiPAF.

### TABELLA METODI DI IDENTIFICAZIONE MONOFASICA E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

	Funzione	Batteri	Lieviti e Muffe
<b>rDNA</b>	identificazione	<u>B0</u> , <u>B00</u>	<u>L0</u>
<b>AFLP</b>	caratterizzazione	<u>B1</u> , <u>B2</u> , <u>B3</u> , <u>B4</u> , <u>B7</u>	<u>L1</u> , <u>L2</u> , <u>L3</u> , <u>L4</u> , <u>L5</u> , <u>L39</u>
<b>ARDRA</b>	caratterizzazione	<u>B6</u> , <u>B8</u> , <u>B9</u> , <u>B10</u> , <u>B11</u> , <u>B12</u> , <u>B13</u>	<u>L6</u> , <u>L7</u> , <u>L8</u> , <u>L9</u> , <u>L10</u>
<b>ARISA</b>	caratterizzazione	<u>B20</u> , <u>B21</u> , <u>B22</u> , <u>B23</u>	<u>L12</u> , <u>L13</u> , <u>L28</u> , <u>L29</u> ,
<b>PFGE</b>	caratterizzazione	<u>B3</u>	<u>L11</u>
<b>DGGE</b>	caratterizzazione	<u>B12</u> , <u>B29</u>	<u>L9</u> ,
<b>DNA mitocondriale</b>	caratterizzazione		<u>L17</u> , <u>L20</u> , <u>L25</u> , <u>L26</u> , <u>L27</u> , <u>L37</u> , <u>L38</u>
<b>FAME</b>	caratterizzazione	<u>B15</u> , <u>B16</u> , <u>B17</u> , <u>B18</u> ,	<u>L22</u> , <u>L23</u> , <u>L24</u> ,
<b>Interdelta seq</b>	caratterizzazione		<u>L15</u> , <u>L17</u> , <u>L18</u> , <u>L19</u> , <u>L20</u> , <u>L21</u> ,
<b>iSSR</b>	caratterizzazione	<u>B5</u> , <u>B19</u> ,	<u>L8</u> , <u>L14</u> , <u>L15</u> , <u>L16</u> , <u>L30</u> ,
<b>ITS</b>	caratterizzazione	<u>B3</u>	<u>L4</u>
<b>microarray</b>	caratterizzazione	<u>B24</u> , <u>B30</u>	<u>L41</u> , <u>L42</u>
<b>RAPD</b>	caratterizzazione	<u>B3</u> , <u>B4</u> , <u>B6</u> , <u>B14</u> , <u>B19</u> , <u>B25</u> , <u>B26</u> , <u>B27</u>	<u>L15</u> , <u>L31</u> , <u>L32</u> , <u>L33</u> , <u>L34</u> , <u>L35</u> , <u>L39</u>
<b>RFLP</b>	caratterizzazione	<u>B33</u> , <u>B34</u>	<u>L17</u> , <u>L36</u> , <u>L37</u> , <u>L38</u>
<b>SSR</b>	caratterizzazione	<u>B32</u>	<u>L19</u> , <u>L33</u> , <u>L39</u> , <u>L40</u>
<b>T-RFLP</b>	caratterizzazione	<u>B28</u> , <u>B29</u> , <u>B31</u>	<u>L43</u>

## TABELLA METODI DI IDENTIFICAZIONE MONOFASICA E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

	Funzione	Vino e birra	Formaggi e latticini	salumi	Pane e pr. forno	Prodotti vegetali	Suolo etc.
<b>rDNA</b>	identificazione	<u>L0, B0, B00</u>	<u>L0, B0, B00</u>	<u>L0, B0, B00</u>	<u>L0, B0, B00</u>	<u>L0, B0, B00</u>	<u>L0, B0, B00</u>
<b>AFLP</b>	caratterizzazione	<u>L1, L2, B7, L39</u>	<u>L3, B3, L4, B14</u>	<u>B1</u>	<u>B2, L4</u>	<u>B4, L5</u>	
<b>ARDRA</b>	caratterizzazione	<u>B6, B9, L8, B10</u>	<u>L7, B11</u>	<u>B12, L9</u>	<u>B13, L10</u>	<u>B8, L6,</u>	
<b>ARISA</b>	caratterizzazione						
<b>PFGE</b>	caratterizzazione	<u>L11</u>	<u>B3</u>		<u>L11</u>		<u>L11</u>
<b>DGGE</b>	caratterizzazione			<u>B12, L9</u>			<u>B29</u>
<b>DNA mitocondriale</b>	caratterizzazione	<u>L27, L37</u>	<u>L38</u>				
<b>FAME</b>	caratterizzazione					<u>B18, L22, L24,</u>	
<b>Interdelta seq</b>	caratterizzazione	<u>L15, L17, L19, L20,</u>			<u>L21,</u>		
<b>iSSR</b>	caratterizzazione	<u>B5</u>					
<b>ITS</b>	caratterizzazione	<u>L8, L15</u>	<u>B3</u>				
<b>microarray</b>	caratterizzazione	<u>L42</u>					<u>B30</u>
<b>RAPD</b>	caratterizzazione	<u>B6, L32, B27, L33, L39, L35</u>	<u>B3, B26</u>	<u>L31, B25</u>		<u>B4, L34</u>	
<b>RFLP</b>	caratterizzazione	<u>L15, L36, L37</u>	<u>L38, B33</u>	<u>B33</u>	<u>B34</u>		
<b>SSR</b>	caratterizzazione	<u>L19, L33, L39, L40</u>					
<b>T-RFLP</b>	caratterizzazione		<u>B28</u>			<u>B31</u>	<u>B29, B31</u>

## Capitolo IV - Linee guida per la conservazione dei microrganismi

In questo capitolo saranno presentate le tre strategie fondamentali per la conservazione della biodiversità microbiologica di interesse agroalimentare ed ambientale con un'analisi critica delle motivazioni per adottarle. Particolare cura sarà prestata agli effetti delle varie forme di conservazione sulla struttura genetica dei materiali conservati. L'ottimizzazione delle procedure per mettere in essere tali progetti di conservazione e un'analisi critica delle modalità attualmente in uso, saranno presentati nella seconda parte del capitolo.

### IV.1 Analisi critica dei sistemi di conservazione microbica

Come qualsiasi altro organismo, anche i microbi possono essere conservati nello stesso posto dove risiedono e da dove verrebbero isolati (*in situ*), oppure in apposite collezioni (*ex situ*). Per i microrganismi ad uso agro-industriale è possibile applicare una forma intermedia che potremmo denominare “in factory”, simile all’ “on farm” di piante ed animali.

A ciascun sistema sono associati vantaggi e svantaggi, inoltre le particolari tipologie di microrganismi possono prestarsi o meno ai diversi tipi di conservazione. Di seguito vengono riportate alcune considerazioni sui tre sistemi di conservazione.

#### a. Conservazione *ex situ*

##### Breve carrellata storica dei sistemi di conservazione microbica

La conservazione *ex situ* è stata la prima forma di preservazione della diversità microbica molto tempo prima dei trattati sulla biodiversità e della nascita di una sensibilità in questo senso. Dalla seconda metà del XIX secolo i microbiologi hanno avviato a conservare le colture che ottenevano, cercando di conservarle. I primi tentativi avvennero in terreno liquido, solo più tardi si poté passare a terreni solidificati. Per l'inizio del XX secolo era stata messa a punto la tecnica del tubo con il terreno solidificato “a becco di clarino” (ottenuto facendo solidificare il terreno in un tubo posto in posizione quasi orizzontale) e chiuso da tappo di cotone cardato. Solo dopo il secondo dopoguerra si diffuse la refrigerazione ed anche la liofilizzazione. Il congelamento a bassissime temperature in azoto liquido o a -80°C si resero disponibili solo verso la fine del secolo scorso ed adesso sono considerate fra le più valide e diffuse.

Questa breve storia del mantenimento della coltura è funzionale a due aspetti: capire le diverse tipologie di conservazione e comprendere che le tecnologie connesse sono ancora *in fieri*.

#### Collezioni

Le collezioni microbiche permettono il mantenimento *ex situ* delle risorse genetiche microbiche (coltivabili) isolate sottoforma di ceppi distinti e possibilmente ben descritti.

Si possono distinguere diversi tipi di collezioni in base alle finalità che si propongono:

- Collezioni tassonomiche. Si tratta di collezioni che raccolgono ceppi di specie e comunque ceppi di varia derivazione, ma comunque identificati a livello di specie in maniera inequivocabile secondo gli standard del momento.
- Collezioni brevettuali. Queste collezioni raccolgono ceppi naturali, ingegnerizzati e soggetti a miglioramento genetico su cui sussistono rivendicazioni brevettuali.

- Collezioni di lavoro. Ogni laboratorio tende a mantenere i ceppi isolati e studiati per tutto il tempo del loro impiego. L'avvento dei sistemi di crioconservazione ha incoraggiato il mantenimento di tali colture anche per tempi più lunghi.
- Collezioni di Servizio. Si tratta di collezioni tassonomiche con disponibilità a fornire servizi di mantenimento, identificazioni, etc..
- Collezioni applicative e settoriali. Si tratta di collezioni per settori specifici (fitopatologico, alimentare, ambientale, etc. e possibilmente finalizzate al mantenimento della biodiversità e alla sua reintroduzione. Tali collezioni debbono minimizzare la selezione indotta dall'isolamento e dal mantenimento in laboratorio e in collezione. Queste collezioni sono particolarmente finalizzate al binomio "conservazione e valorizzazione".

## BOX

### **Collezioni di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale del CRA**

Attraverso il sito [www.cra-pav.it](http://www.cra-pav.it) è possibile collegarsi alla Banca dati Col.Mi.A. che raccoglie tutte le schede descrittive dei microrganismi conservati in collezione presso le diverse strutture di ricerca del CRA.

La Banca dati Col.Mi.A., finanziata dal Mipaaf, nasce nell'ambito delle iniziative intraprese per la conservazione delle risorse genetiche di interesse agrario.

La Banca dati riguarda tre diversi comparti:

Microrganismi fitopatogeni

Microrganismi alimentari

Microrganismi del suolo

La Banca dati è gestita dal Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, mentre le singole collezioni sono conservate nelle differenti strutture del CRA.

Nell'ambito del progetto Col.Mi.A. sono state redatte "linee guida per la conservazione in collezione di microrganismi di interesse agrario" al fine di uniformare le procedure e poter acquisire standard di qualità nella conservazione validi a livello europeo in una prima approssimazione, per tenedere a livello di standard mondiale successivamente. Le linee guida sulla conservazione sono anche esse riportate sul sito del CRA-PAV.

### **La coltura pura: forza e limite della conservazione *ex situ***

Fondamentale aspetto della conservazione *ex situ* è il concetto di tenere fuori dall'ambiente d'origine una frazione specifica di tutta la biodiversità per conservarla e poi, magari riutilizzarla. Tale strategia è stata di grande efficacia in tutti i casi in cui il microrganismo agisca come una coltura pura nel suo ambiente di prelievo. Due casi paradigmatici sono le colture patogene e le colture di alcune trasformazioni alimentare. Trascurando le prime, che in certi casi sono delle vere colture pure in certi distretti infetti, passiamo a considerare le colture industriali. Forse non è un caso che la messa a punto definitiva della coltura pura sia stata attribuita a Emil Christian Hansen che operava in ambito birrario. La birra viene ottenuta da un mosto di malto virtualmente sterile per via dell'alta temperatura impiegata, ne consegue che le colture di *Saccharomyces cerevisiae* o *S. pastorianus* inoculate in esso agiscano da colture pure vere e proprie. Meno definita è la situazione della fermentazione vinaria controllata, infatti in questa si riduce la vitalità di batteri e lieviti apiculati con l'uso dell'anidride solforosa e dei metabisolfiti, ma non si raggiunge mai una vera e propria sterilità, per cui la coltura starter di *S. cerevisiae* deve comunque interagire con altre specie

o con altri ceppi della sua stessa specie, sia pure da una posizione di vantaggio per l'alto numero di cellule dell'inoculo rispetto alle cellule naturalmente presenti, per di più inattivate dai bisolfiti. Nel latte si hanno situazioni che spaziano da quelle della birra a quelle del vino per la prima parte della fermentazione e maturazione dei formaggi. I formaggi pastorizzati si comportano tendenzialmente come la birra, viceversa quelli da latte crudo. Resta il fatto che il latte è comunque un ambiente complesso e molto appetito da una gran quantità di microrganismi, per cui si instaurano in esso e soprattutto sulla sua superficie tutta una serie di interazioni alcune molto interessanti ed utili sia dal punto di vista della sicurezza alimentare che della qualità del prodotto.

La situazione microbiologica dei salumi è molto meno nota di quella dei formaggi, ma esistono sia tecnologie che prevedono massicci inoculi, sia metodi che confidano nell'inoculo naturale presente nei laboratori e che si sviluppa nei tempi di stagionatura. In generale è difficile immaginare la maggior parte dei salumi come soggetti a colture pure.

La produzione del pane ha profili simili a quelli del formaggio, ma per ragioni diverse, si spazia infatti dall'uso delle colture madri (pasta acida o sourdough) in cui esiste una congerie di microbi anche molto diversi fra di loro, ai pani ottenuti con notevoli aggiunte di lievito di birra (*S. cerevisiae*) all'impasto. In questa seconda tecnologia si ottiene una coltura quasi pura in quanto si ha un inoculo massiccio, ma non è stata effettuata alcuna forma di inibizione o sterilizzazione delle farine e degli altri ingredienti prima dell'impasto.

Questa disamina necessariamente sommaria delle tipologie di colture che agiscono nel settore agroalimentare. Ne emerge che le situazioni in cui prevalga la coltura pura non sono la totalità. Va anche aggiunto che l'uso di starter "puri" si è diffuso soprattutto in conseguenza dello sviluppo della coltura pura e della nascita di collezioni di collezioni di colture pure. Ne deriva una considerazione sul fatto che la prima stagione della conservazione della biodiversità ha portato alla diffusione di sistemi a coltura singola o prevalente, modificando le tipologie produttive e la stessa biodiversità microbica alimentare. Il fatto che si abbiano difficoltà a trovare siti incontaminati da colture pure (prevalentemente commerciali) è una testimonianza dell'impatto avuto dalla conservazione *ex situ* sulla biodiversità microbica. Paradossalmente, queste prime attività sulla biodiversità hanno avuto il merito di elucidarne molti aspetti e di mettere in salvo alcune colture di pregio, ma erano basate su un concetto di selezione spinta che ha inevitabilmente ridotto la biodiversità microbica, specialmente agroalimentare, disponibile.

Una considerazione finale va fatta sulla sostenibilità delle collezioni dal punto di vista dei costi energetici. Molti enti, infatti lamentano un'eccessiva spesa per il mantenimento delle collezioni che racchiudono, come detto, solo circa l'1 o 2% della biodiversità totale. Questi due dati di fatto, costi elevati e bassa capacità di isolamento delle specie, porta alla conclusione che è probabilmente saggio effettuare anche conservazione dei substrati *in toto* da lasciare alle future generazioni che, magari, sapranno isolarne e studiarne meglio la microflora. Questa operazione permetterebbe di ridurre drasticamente i costi di conservazione a lungo termine, ma richiede un'attenta ricerca per stabilire le condizioni migliori di conservazione dei substrati per periodi lunghi o lunghissimi.

## **b. Conservazione "in factory"**

La biodiversità microbica agroalimentare si è sviluppata quasi sicuramente nei siti di trasformazione, anche primitivi in cui venivano effettuate le prime rudimentali operazioni per trasformare e conservare le derrate alimentari. Il fatto che molta bibliografia sottolinei la presenza,

ma a bassa densità, di *S. cerevisiae* in natura, mentre esso è presente ad alte concentrazioni in ambienti di cantina, è una delle tante evidenze che suggeriscono come lo sviluppo del lievito sia fortemente legato al suo inconsapevole utilizzo nelle trasformazioni dei succhi zuccherini fermentati. In generale, va ricordato che la trasformazione, anche nelle sue forme più semplici, comporta masse di prodotto mantenuto in qualche modo isolato dal resto dell'ambiente, in cui si sviluppano alcuni ceppi microbici a densità elevatissime che spesso superano i  $10^8$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ . A fronte di alcune migliaia di cellule per grammo di substrato negli ambienti naturali, le densità delle fermentazioni alimentari sono quindi di circa 4 o 5 ordini di grandezza superiori. E' proprio questa differenza di concentrazione che sottolinea l'importanza delle strutture di trasformazione nello sviluppo e nel mantenimento della biodiversità. Di fatto la singola struttura produttiva non presenta necessariamente una biodiversità elevatissima a livello di ceppo perché tutta una serie di operazioni hanno portato ad una inconsapevole selezione massale da cui emergevano pochi stipiti. Tali operazioni sono il riutilizzo delle "madri" che hanno dato buoni prodotti (come per molti passiti tradizionali e per gli aceti), il riutilizzo delle "botti buone", ovvero di quelle in cui si produceva il miglior vino, ma anche il lavaggio accuratissimo, la disinfezione e, in ultima istanza, lo smantellamento delle botti da cui era stato ottenuto un cattivo prodotto.

Il fatto che nei singoli siti di trasformazione ci sia una biodiversità non necessariamente elevatissima, può anche essere dovuto in taluni casi alla limitazione dei mezzi con cui tale biodiversità è stata rilevata e poi caratterizzata. In ogni caso l'aspetto fondamentale da sottolineare è il fatto che nelle zone di produzione tipica la biodiversità è elevata soprattutto considerando i tanti piccoli e diversi impianti di produzione, come le molte cantine che letteralmente tappezzavano le zone vitivinicole o i piccoli caseifici sparsi per monti e colline. La complessa orografia del nostro territorio ha poi favorito lo sviluppo di specificità, magari in valli attigue, con un ovvio incremento della biodiversità.

Da questi aspetti geografici, socio-politici e di coltura locale (compreso il tanto maltrattato "campanilismo") si è originata la biodiversità microbica agroalimentare. Molta di questa biodiversità è restata nei singoli impianti e tutt'ora potrebbe essere mantenuta in essi.

Al momento attuale, mantenere la biodiversità nel proprio impianto significa sostanzialmente applicare tutte le attenzioni per evitare contaminazioni massicce da ceppi contaminanti, senza impedire, però, l'eventuale evoluzione del corredo microbico dell'impianto stesso. Poiché questa evoluzione non è necessariamente positiva dal punto di vista qualitativo, sarà opportuno mettere in atto strategie che possano al contempo salvare la biodiversità, ma anche i produttori che ad essa affidano il proprio lavoro.

### **c. Conservazione *in situ* dei microrganismi**

Nel caso dei microrganismi del suolo la conservazione *ex situ*, cioè in laboratorio, rappresenta solo una piccolissima parte della realtà ambientale. Infatti come è noto solo l'1% della popolazione microbica del suolo, la popolazione che attivamente contribuisce al mantenimento delle funzioni del suolo e della sua fertilità, è attualmente coltivabile. Questo comporta che solo per l'1% dei principali artefici della vita nel suolo può essere isolata e conservata in collezioni *ex situ*. Ciò non toglie che le tecniche di conservazione descritte non siano utili ed interessanti per conservare e studiare *ex situ* organismi riconosciuti artefici di un determinato processo od azione.

Per la biodiversità correlata alle funzioni del suolo ed alla sua fertilità è importante invece andare ad operare la conservazione *in situ*, come descritto nel capitolo apposito. Inoltre nel caso del presente lavoro sarà ancora meglio andare ad operare una conservazione di tipo ecosistemico, cioè analizzare e monitorare i microrganismi in relazione alle colture.

Cos'è la conservazione della biodiversità a livello ecosistemi. E' lo studio e la conseguente valutazione della biodiversità microbica associata ad una determinata coltura o specie vegetale. E' noto dalla letteratura che ogni specie vegetale rilascia nel suolo, in funzione anche delle caratteristiche pedoclimatiche ed ambientali, essudati radicali, che selezioneranno una determinata popolazione microbica. Si verranno a creare dei microambienti edafici che costituiranno reti trofiche specifiche associate alla pianta. Questo comporta che soprattutto nel caso delle specie vegetali tipiche o a rischio erosione una conservazione del solo germoplasma vegetale *ex situ*, potrebbe non garantire il desiderato risultato di conservazione.

E' ormai noto da tempo che alla diminuzione della sostanza organica sono direttamente legati sia la diminuzione della massa microbica che la perdita di biodiversità, nonché di funzionalità dei suoli. Il fattore principale della degradazione dei suoli agrari è la progressiva diminuzione della sostanza organica tanto che l'European Soil Bureau stima che i tre quarti dei suoli dell'Europa meridionale hanno un contenuto di sostanza organica inferiore all'1,7%.

La diversità microbica è stata ampiamente correlata alla gestione dei suoli, pertanto le comunità batteriche, essendo le più rappresentate, sono state anche le più studiate per prevedere la fertilità dei suoli agrari; meno studiati, invece, sono stati i funghi del suolo, benché essi rappresentino buona parte della massa microbica, siano coinvolti in processi fondamentali come la degradazione dei residui organici ed abbiano un ruolo primario nella 'C sequestration'. L'ostacolo principale che ha limitato le ricerche in questo settore è sempre stata la scarsa propensione dei microrganismi del suolo a crescere in vitro (coltivabile), rendendo di fatto impossibile studiarli. La possibilità di studiare le comunità microbiche del suolo a partire dagli acidi nucleici, grazie alle nuove tecniche molecolari che permettono una caratterizzazione anche degli organismi non coltivabili superando le difficoltà legate al riconoscimento microbiologico tradizionale, rendono possibile la caratterizzazione tanto dal punto di vista qualitativo che quantitativo delle comunità microbiche. Questo permette di calcolare, con maggiore facilità rispetto al passato, gli indici di diversità microbica dei sistemi agrari con la possibilità di poterli applicare anche per il monitoraggio della biodiversità.

Le comunità batteriche e fungine hanno funzionalità e distribuzione diverse nei suoli, con un rapporto diverso nei confronti delle piante, pertanto la "lettura" di un sistema agricolo attraverso questi due indicatori microbici permette un approccio completo allo studio della ecologia microbica dei suoli agrari

## **IV.2 Ottimizzazione dei protocolli di conservazione in collezione(*ex situ*), in factory e *in situ***

### **a. Ottimizzazione conservazione *ex situ***

La conservazione *ex situ*, o in collezione microbica, presenta i vantaggi e i limiti indicati precedentemente. L'ottimizzazione dei protocolli di conservazione deve considerare i seguenti principi:

#### **1. Limitare al massimo la selezione delle popolazioni complesse in fase di isolamento**

Si ottiene impiegando terreni di isolamento il più possibile universali ed evitando l'arricchimento. In caso si sia interessati ad una forma di biodiversità non prevalente nel terreno è opportuno ricorrere a terreni o condizioni selettive. L'uso di terreni di coltura liquidi andrebbe comunque evitato per ridurre la competizione fra colture a diversa fitness nelle particolari condizioni colturali.

**2. Limitare i cambiamenti della coltura indotti da un terreno colturale necessariamente diverso dalle condizioni ambientali del substrato da cui il microbo è stato isolato**

Si ottiene mantenendo le colture su terreni di isolamento solo per il tempo strettamente necessario alle operazioni di isolamento

**3. Anteporre la conservazione alla piena caratterizzazione della coltura**

Consiste nel congelare a  $-80^{\circ}\text{C}$  le colture subito dopo il secondo re-isolamento, al caso si può congelare addirittura dopo il primo isolamento, procedere al re isolamento ed eventualmente congelare la coltura da secondo isolamento. Certe caratteristiche quali la presenza di capsula o la capacità di scorificare vengono perse in maniera massiccia dopo poche generazioni in terreni da laboratorio.

**4. Accertamento della purezza microbiologica della coltura**

Si effettua con accurate osservazioni macro e microscopiche. In caso di dubbio si procede ad un nuovo isolamento. D'altra parte non va dimenticato il naturale polimorfismo di molte specie.

**5. Mantenimento della coltura in condizioni in grado di minimizzare eventuali mutazioni**

Il mantenimento dovrebbe essere effettuato direttamente in azoto liquido o a  $-80^{\circ}\text{C}$ , evitando prolungati mantenimenti in coltura.

**6. Provvedere ad un'identificazione affidabile**

A seconda della tecnica prevalente è opportuno procedere all'identificazione con sistemi inequivocabili, anche se spesso di carattere tipicamente nominalista e tipologico.

**7. Effettuare dereplicazioni in grado di limitare la ridondanza delle collezioni.**

La dereplicazione è l'operazione che permette di riunire ceppi identici in un unico gruppo. Di solito si mantiene uno o pochissimi isolati per gruppo e si scartano gli altri, considerati copie identiche. Le tecniche di dereplicazioni includono tutti i sistemi di caratterizzazione molecolari descritti nell'obiettivo 2 e le tecniche di fingerprint metabolomico come la FTIR (Fourier Transform InfraRed spectroscopy).

**8. Registrazione in un apposito database elettronico con tutte le informazioni raccolte**

Per quanto riguarda le informazioni si faccia riferimento alle schede di prelievo trattate in precedenza.



### **b. Ottimizzazione della conservazione “in factory”**

La conservazione delle colture in factory consiste nel loro mantenimento nelle condizioni d'uso normale. Due diverse maniere di conservazione possono essere messe in atto: *conservazione dinamica* e *conservazione statica*.

La *conservazione dinamica* è quella che non pone significative restrizioni all'uso delle colture, salvo l'introduzione o la miscelazione con colture di altra provenienza. Questa conservazione potrebbe non mantenere la biodiversità né a livello delle comunità, né a livello delle singole componenti e rispecchia in qualche modo l'andamento evolutivo aperto a inconvenienti di vario tipo (es. contaminazioni da materie prime) come a selezioni interne al microbiota.

La *conservazione statica* è molto restrittiva e cerca di mantenere la coltura in condizioni tali da evitare cambiamenti di qualsiasi natura. Nella conservazione statica devono essere evitate le contaminazioni (soprattutto se massicce) da parte del microbiota delle materie prime, l'introduzione o la miscelazione con altre colture anche se provenienti dalla stessa area, i cambiamenti di tecnologia, la contaminazione ambientale di qualsiasi tipo.

Anche nelle conservazioni tradizionali esistono approcci diversi che in qualche modo richiamano queste due scuole di pensiero. Per esempio, nella conservazione delle paste acide da panificazione sono state tramandate due modalità denominate “alla maniera del contadino” e “alla maniera del fornaio”. Nella prima tutta la pasta acida conservata viene impiegata per formare l'impasto da cui, prima della cottura o prima della formazione delle pagnotte, viene prelevata un'aliquota da conservare. Nella modalità del fornaio solo una parte della pasta acida viene impiegata nella formazione dell'impasto. La parte residua viene mescolata ad acqua e farina e lievitata a parte.

Evidentemente le due forme sono diverse e quella del fornaio permette un mantenimento più accurato della pasta madre oltre alla libertà di integrare l'impasto da panificare con altri ingredienti, magari incompatibili con la pasta madre stessa.

Le attenzioni da dedicare a questa forma di conservazione possono essere delineate nei seguenti principi:

1. Evitare introduzione di microrganismi alloctoni
2. Evitare miscelazioni dell'inoculo con componenti a forte carica microbica
3. Evitare contaminazioni ambientali (per la conservazione statica)
4. Evitare contaminazioni da materie prime (per la conservazione statica)
5. Evitare cambi tecnologici che possano squilibrare l'inoculo
6. Mantenere diverse aliquote dell'inoculo in collezioni *ex situ*.
7. Controllare periodicamente il mantenimento della qualità dei prodotti trasformati con l'inoculo conservato.
8. Favorire la disseminazione dell'inoculo presso diversi trasformatori, possibilmente entro aree circoscritte.
9. Promozione dei prodotti di qualità: le politiche della qualità dei prodotti agricoli possono avere impatti positivi sulla biodiversità. La tutela dei prodotti "tradizionali" tipici delle regioni italiane è, indirettamente, utile alla conservazione della biodiversità in quanto è associata al sistema ambientale e al patrimonio culturale, artigianale e artistico locale.

### c. Conservazione *in situ*

In Italia la conservazione *in situ* è possibile nelle aree ad agricoltura tradizionale soprattutto se poste all'interno di zone protette, non solo per il regime vincolistico che ne deriva, che è utile a garantire la continuità nell'uso del suolo e una gestione dell'agrosistema in coevoluzione con la biodiversità in esso presente, ma anche perché garantisce un accesso più agevole ai regimi di sostegno alla produzione.

Conservare i microrganismi *in situ*, oppure meglio, sarebbe dire *on farm* può essere praticato congiuntamente alla conservazione del germoplasma vegetale. Là dove verranno condotte azioni conservative di germoplasma vegetale sarà necessario conservare i microrganismi del suolo.

Il protocollo per la conservazione è molto semplice: conservare il suolo e la sua fertilità secondo le seguenti azioni.

- a) Caratterizzazione secondo il protocollo precedentemente riportato della diversità della comunità microbica funzionale e genetica.

Tale analisi dovrà essere condotta secondo un approfondimento “per livelli”.

Il livello 1 dovrà considerarsi irrinunciabile e dovrà essere condotto contemporaneamente, o meglio ancora, preventivamente rispetto al punto “0” costituito dalla compilazione della matrice e dell'analisi del risultato, come riportato al punto 01.3.2. A secondo di quanto segnalato dalla matrice verranno approntati, compatibilmente all'interesse territoriale e di specie vegetale conservata, gli altri tre diversi livelli. Il secondo e terzo livello sono consigliabili per distretti ecologici di grande interesse territoriale quali ad esempio “Brunello di Montalcino”, oppure là dove ci siano delle specie a forte erosione genetica.

Il livello 4 dovrà invece essere sempre praticato. Quindi i livelli 0 – 1 – 4 andranno sempre effettuati, mentre i livelli 2 – 3 nei casi di distretto ecologico di grande valore oppure di erosione genetica.

Livello	Azione
0	Analisi matricale
1	Valutazione della IFB Conservazione del suolo <i>ex situ</i>
2	Analisi della composizione genetica e funzionale della comunità microbica
3	Sequenziamento e caratterizzazione di singole specie ed eventuale conservazione <i>ex situ</i>
4	Monitoraggio spazio-temporale. Il monitoraggio spaziale potrà essere facoltativo, mentre il monitoraggio temporale sarà obbligatorio.

#### LIVELLO 0

L'agricoltore custode dovrà essere aiutato a compilare la matrice e guidato nella sua interpretazione. Sarà necessario spiegare all'agricoltore quali elementi/caratteri macroscopici (morfologici) osservare nel tempo e come interpretarne i mutamenti. All'agricoltore custode dovrà essere richiesto di contattare i servizi tecnici regionali quando le sue osservazioni lasceranno percepire dei mutamenti non occasionali.

L'agricoltore dovrà annotare eventuali modificazioni di gestione del suolo rispetto al tempo 0 (fertilizzazione, irrigazione, lavorazione, eventuale successione colturale, ecc.) contestualmente si chiederà all'agricoltore di conservare 1 Kg di terreno essiccato all'aria in bottiglie di vetro scuro e sigillate ed etichettate.

Ogni 5 anni sarà necessario raccogliere e conservare 1 Kg di terreno essiccato all'aria e campionato nel medesimo sito.

Qualora dovessero intervenire pesanti mutamenti nella gestione del suolo o eventi calamitosi sarà necessario raccogliere e conservare 1 Kg di suolo essiccato all'aria, annotando sull'etichetta il perché del nuovo campionamento.

Nel caso di successioni diverse sarà necessario campionare per ogni specie su tutte le specie se queste sono oggetto di conservazione del germoplasma.

#### LIVELLO 1

L'analisi della fertilità biologica IFB (indice di fertilità biologica) andrà effettuata in laboratorio sul suolo corrispondente alla coltura oggetto di conservazione del germoplasma. Andrà analizzata per ogni specie conservata. Le modalità di campionamento del suolo sono le medesime descritte per la conservazione del suolo *ex situ*. Quest'analisi potrà essere effettuata ogni 5 anni in corrispondenza dell'operazione di conservazione di suolo *ex situ*. Tale analisi sarà necessario ripeterla qualora intervengano pesanti modificazioni nella gestione della coltura. Essa potrebbe fornire importanti informazioni circa l'efficacia di eventuali azioni correttive che interessino la fertilità.

#### LIVELLO 2

Consiste nella identificazione vera e propria della biodiversità delle comunità microbiche del suolo. Infatti attraverso l'estrazione del DNA dal suolo si è in grado di osservare abbondanza e ricchezza della biodiversità. E' una misura che può essere effettuata unicamente in laboratorio. Dovrebbe essere fatta in tutti i siti in cui si va a conservare germoplasma vegetale, ma ovunque si voglia conoscere la biodiversità microbica dei suoli. Dato il costo di questa analisi, comunque, si consiglia di farla in siti di particolare importanza. Anche in questo caso il livello 4 dovrebbe essere ripetuto nel tempo secondo quanto riportato in allegato.

#### LIVELLO 3

Ulteriori informazioni sul "chi fa cosa" o "io chi sono" possono derivare solo da questo livello di approfondimento. Si tratta sempre di analisi molecolare da condurre in laboratorio che va a caratterizzare il singolo organismo e la singola comunità. Deve essere mirata a screening che possono emergere dall'analisi di 2 livello. Se in un distretto ecologico dall'analisi molecolare di

abbondanza e ricchezza dovesse emergere l'esistenza di bande tipiche associate ad una determinata specie vegetale in quel determinato areale pedoclimatico sarà necessario andare a caratterizzarla perché quella determinata comunità potrebbe essere biunivocamente correlata alla specie vegetale e quindi essere fondamentale per la sua conservazione.

Tutti i campionamenti di suolo per le analisi di 2 e 3 livello dovranno essere effettuati come precedentemente riportato. Se questo microrganismo risulterà coltivabile si potrà isolare e conservare in collezione secondo quanto stabilito al punto III.1.4.

#### LIVELLO 4

Consiste unicamente nella temporizzazione e nella spazializzazione delle azioni. Saranno le Regioni a stabilire su quanti siti monitorare la biodiversità dl suolo.

1 - A questo punto potrebbero organizzarsi campagne di monitoraggio temporale: sempre nello stesso sito con rilievi ogni 5 anni.

2 - Sulla stessa coltura, ma su siti diversi della regione: una tantum, ma qualora si trovassero organismi diversi andrebbe organizzata una nuova campagna di raccolta dati.

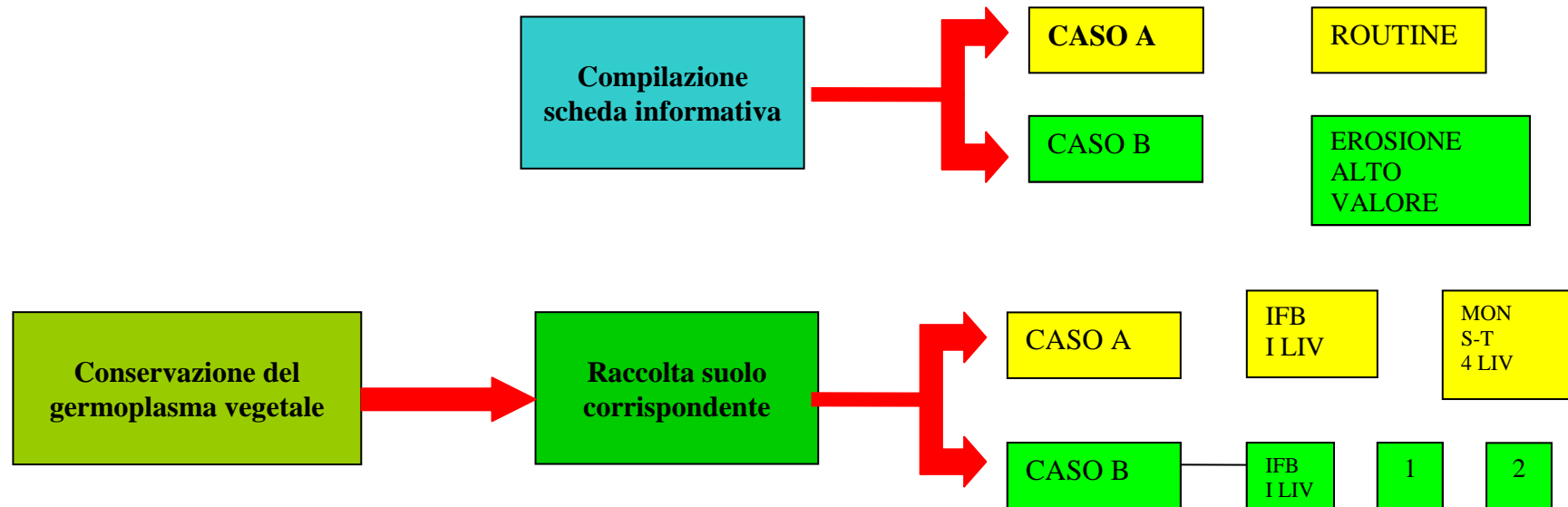
3 - Random senza una correlazione con la coltura, ma seguendo ad esempio la maglia di campionamento europeo "LUCAS" entro quadrati di 9 Km x 9 Km.

#### Note generali

Definire la biodiversità delle comunità microbiche del suolo, fino a caratterizzare geneticamente i singoli organismi è ormai possibile grazie alle tecniche di biologia molecolare standardizzate per lo studio del suolo. Più difficile sicuramente la divulgazione e la pratica a livello di campo per arrivare alla possibilità di realizzare una conservazione *on farm*.

Attualmente si hanno solo pochi esempi di applicazione di questo protocollo di appannaggio esclusivo di istituti di ricerca. Se da un lato questo può essere riduttivo da un altro è sicuramente rassicurante il fatto che una standardizzazione delle metodologie in campo è stata già attuata.

Il piano nazionale sulla biodiversità può costituire una grande opportunità per riuscire finalmente a portare al livello di attività routinaria queste osservazioni. Già semplicemente poter iniziare a raccogliere informazioni relative alla matrice (livello 0) da correlate ad alcune analisi di primo livello IFB e di 2 e 3 associate alla conservazione del germoplasma vegetale in alcuni distretti ecologici particolari, operate con la collaborazione tra ricercatori - regioni ed agricoltori, sarebbe un risultato di straordinaria innovazione e progresso. A livello europeo si hanno pochi esempi sul territorio, a quanto risulta sono di appannaggio di Istituti di ricerca, ma senza il coinvolgimento diretto degli agricoltori. Riuscire a comunicare agli agricoltori che il suolo deve essere gestito e curato anch'esso come un organismo vivente contribuirebbe in maniera determinante alla sensibilizzazione ecologica ed alla gestione sostenibile dell'ambiente.



La caratterizzazione della biodiversità microbica del suolo è fortemente legata alle caratteristiche pedoambientali. Sarebbe importante conoscere le principali caratteristiche chimico-fisiche del suolo per iniziare a capire la tipologia di composizione microbica che ha colonizzato quel suolo. Sono fattori limitanti la vita microbica: pH, temperatura, umidità, carenze nutritive quali sostanza organica, ma anche macroalimenti N-P-K, presenza di elementi potenzialmente tossici quali (metalli pesanti, o micro elementi in quantità eccessiva), eccesso di Sali, compattamento.

Altro elemento fondamentale è conoscere le pratiche agricole a livello “storico” per capire se sono intercorse delle situazioni nelle quali si è spinto verso una eccessiva specializzazione della popolazione microbica. La stessa agricoltura biologica produce una semplificazione del sistema suolo.

## Capitolo V - Definizione di rischio di estinzione e di erosione genetica

In questo capitolo saranno analizzati i rischi di erosione, estinzione e sostituzione cui può andare incontro la biodiversità microbica di interesse agrario, considerando le specificità proprie dei microbi quali la numerosità, la velocità riproduttiva e l'estrema adattabilità.

### V.1 Analisi bibliografica del rischio di fenomeni di estinzione, erosione e sostituzione

#### Premessa

I rischi di erosione genetica e di estinzione in microbiologia debbono tener conto di tutta una serie di fattori fondamentali, di seguito elencati e discussi.

##### a. Numerosità

Una delle caratteristiche meglio conosciute dei microrganismi è la loro grande numerosità che si estrinseca in alte densità di cellule vive per grammo di substrato. A questo proposito basti pensare che nel suolo si trovano fino a  $10^5 - 10^6$  cellule batteriche e circa  $10^3$  cellule fungine per grammo e che in un mosto in fermentazione si arrivano a contare circa  $3 \cdot 10^8$  cellule a millilitro. Questi dati stanno a significare che anche le specie meno rappresentate negli ambienti meno densamente popolati assommano almeno a qualche decina di cellule per grammo. Questo significa che, per esempio, nei 100 mm superficiali di un ettaro di suolo agrario ( $1000 \text{ m}^3$ ) si trovano non meno di  $10^{10}$  cellule delle specie fungine meno rappresentate. Questi ordini di grandezza riportati alle superfici di terreno agrario, e alle biomasse effettivamente sottoposte a trasformazione, portano a ritenere che è estremamente difficile immaginare che si abbia una perdita totale di una specie microbica in un qualsiasi ambito agrario, soprattutto considerando che la numerosità entra in sinergia con gli altri fattori per favorire la sopravvivenza delle specie.

##### b. Riproduzione asessuale

Come già ampiamente trattato nella parte relativa alla natura della specie microbica, la riproduzione dei microrganismi può essere sia sessuale che asessuale (o vegetativa). La maggior differenza fra le due forme sta nel fatto che la riproduzione asessuale non richiede la compresenza di due partner, ma ciascuna cellula è capace di provvedere da sola alla funzione riproduttiva. Questo fatto non elimina soltanto il problema probabilistico dell'incontro di due partner compatibili (es. tipo sessuale opposto), ma risolve tutte le complicazioni relative alle barriere pre- e post-coniugative che, di fatto, sono i fenomeni che confinano i vari organismi superiori in specie ben definite, come ben specificato dai sostenitori del Concetto Biologico di Specie.

##### c. Velocità di crescita

La riproduzione asessuale è largamente predominante fra i microrganismi, permettendo alle popolazioni di raggiungere ritmi di crescita esponenziali che assicurino il rapido ripristino numerico delle popolazioni sottoposte, per qualche ragione, a moria o a selezione.

Va intanto specificato che la crescita microbica è condizionata da fattori intrinseci (le caratteristiche proprie specifiche) ed estrinseci quali la disponibilità di nutrienti, l'accumulo di cataboliti e la densità microbica stessa. Nelle condizioni ambientali non antropiche (es. suolo agrario) prevalgono situazioni con scarsi nutrienti e basse concentrazioni cellulari, per

cui la crescita è sostanzialmente limitata solo dai nutrienti. Ne deriva che, non appena alcune sostanze assimilabili si rendano disponibili, la crescita può avviarsi a ritmi sostenuti.

Per dare un'idea della potenza del sistema basta pensare che una popolazione che abbia subito una mortalità del 99,9 può tornare alle densità originali nel tempo di 10 generazioni come si evince dalla formula generale e dal susseguente sviluppo per l'esempio specifico in cui  $G$  è il numero di generazioni e  $M$  la mortalità espressa in termini decimali.

$$\begin{aligned}G &= \log_2 [1/(1-M)] \\G &= \log_2 [1/(1-0,999)] \\G &= \log_2 [1/0,001] \\G &= 9,9657\end{aligned}$$

Questi semplici esempi mostrano come le colture microbiche possano effettivamente ricostruire la propria consistenza con estrema rapidità. Inoltre, la capacità di riprodursi sessualmente evita tutti i problemi di eccessivo *inbreeding* (quali la consanguineità elevata negli animali) tipicamente provocati dai bottleneck nelle popolazioni delle piante e degli animali che vadano incontro a forti contrazioni numeriche.

#### **d. Capacità di vita latente**

Tutti i microrganismi hanno la capacità di rallentare la propria crescita fino a passare ad un sistema di vita latente che, per certi batteri, è caratterizzato da strutture di resistenza quali le endospore che permettono di protrarre la vita delle cellule per tempi lunghissimi in attesa che si ripresentino le condizioni ideali per la crescita.

#### **e. Adattabilità per selezione**

La selezione in microbiologia assume significati abbastanza diversi da quelli correntemente attribuiti ad essa in biologia vegetale ed animale. Brevemente, la selezione dei macroorganismi avviene a carico di individui di una o più generazioni successive a quella in cui la variazione (di solito una mutazione) è avvenuta. Questo significa che le condizioni che hanno favorito la mutazione sono potenzialmente diverse da quelle presenti nel momento della sua eventuale selezione. Nei microrganismi aploidi e in tutti i procarioti, invece, la selezione è contestuale alla mutazione per cui entrambe sono sottoposte alle stesse condizioni ambientali, tanto che si potrebbe addirittura concludere che le stesse condizioni di selezione, ove sufficientemente drastiche, siano esse stesse mutageniche.

Queste differenze fra macro- e micro- organismi fanno sì che i microrganismi siano tendenzialmente sottoposti alle stesse variazioni che in una certa misura ne favoriscono lo sviluppo, tanto che in passato tutto il fenomeno venne chiamato con l'espressione "mutazioni adattative".

Altra differenza fondamentale è il fatto che il macroorganismo che muta (e la sua discendenza) possono avere alternatamente successo o insuccesso a causa della suddetta mutazione. Nel secondo caso (che è di solito prevalente) la linea evolutiva va in estinzione. Nei microrganismi, invece, lo stesso individuo è presente in tantissime copie identiche ciascuna delle quali può subire mutazioni con l'eventualità di successo o di insuccesso. Anche se le probabilità di successo fossero estremamente basse (diciamo circa  $10^{-5}$ ) esiste la quasi certezza che alcune cellule appartenenti a grandi popolazioni avranno successo. A proposito di grandi popolazioni ci si riferisca al paragrafo a. e si consideri che in una botticella di mosto da 100 litri ci sono circa  $2 \times 10^{11}$  i cellule, per cui anche una probabilità



di successo di  $10^{-5}$  e di mutazione di  $10^{-6}$  c'è comunque la possibilità di trovare  $2 \cdot 10^{11} / (10^5 \cdot 10^6) = 2$  cellule che, essendo mutate, si adattino alla nuova situazione.

Questo meccanismo, anche se sommariamente descritto, permette di capire come le situazioni più drastiche non siano un momento di estinzione per le popolazioni microbiche, ma piuttosto una crisi da cui derivino organismi più adatti alla situazione corrente.

Questi aspetti nel loro complesso mostrano come il rischio di estinzione per le specie microbiche sia teoricamente o bassissimo o addirittura nullo. Viceversa, i vari ceppi sono soggetti a variazioni e selezioni anche frequenti per cui possono benissimo scomparire ceppi precedentemente esistenti e nascerne di nuovi, in una dinamica complessivamente chiamata *sostituzione*.

Nel complesso si può concludere dicendo che :

- a. **Estinzione:** la scomparsa di intere specie microbiche è molto improbabile, per cui la diversità microbica è difficilmente a rischio
- b. **Sostituzione:** la sostituzione di ceppi con altri della stessa specie o di altre specie è molto probabile e frequente, per cui è a rischio la variabilità microbica e, soprattutto, la specifica variabilità che magari ha valorizzato territori ed alimenti
- c. **Erosione:** la perdita di carica microbica e di biodiversità complessiva è più che probabile, soprattutto là dove non vengano seguite le buone pratiche agricole e di trasformazione. Questo aspetto verrà trattato nei paragrafi successivi, soprattutto in relazione al suolo. Viceversa negli alimenti è probabile sia l'erosione (soprattutto con tecnologie che riducano eccessivamente la carica microbica) e la sostituzione.

### **Erosione di biodiversità microbica del suolo e perdita della fertilità**

Nei giorni 22 e 23 settembre 2010 si è tenuto a Bruxelles, organizzato dalla Commissione Europea, DG Ambiente, il convegno dal titolo “suolo, cambiamenti climatici e biodiversità: dove stiamo andando?” nel quale sono stati discussi i punti cruciali della conservazione della biodiversità del suolo quale nodo degli equilibri ambientali affermando che senza la conservazione della fertilità del suolo e della sua fertilità biologica viene messo a rischio l'intero pianeta. La biodiversità del suolo deve essere considerata elemento portante per la conservazione delle funzioni vitali del suolo e quindi, la biodiversità del suolo, vista come potenziale elemento di **contrasto** ed adattamento ai cambiamenti climatici.

In termini applicativi sino ad oggi difficilmente quando si parla di biodiversità si sente affrontare l'argomento della biodiversità microbica e ancora più difficilmente della biodiversità dei microrganismi del suolo commettendo una omissione molto grave in quanto sono i microrganismi del suolo a garantire la necessaria fertilità alla base della produttività vegetale e della vita sull'intero pianeta.

I microrganismi del suolo costituiscono un'enorme quantità di vita “invisibile” essendo l'elemento chiave di numerose attività quali 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 (Lavelle e Spain 2001).

La biodiversità del suolo è fortemente correlata al contenuto in sostanza organica del suolo stesso. E' una evidenza scientifica che il limite minimo per il mantenimento del 100% delle funzioni biologiche del suolo è garantito da un contenuto in carbonio organico dell'1,784%, cioè circa 3,5%

di sostanza organica Lynch et al. 2004, mentre l'OCSE stabilisce il limite dell'1% in sostanza organica quale innesco dei processi di desertificazione (OCSE 1996).

Tali considerazioni, se relazionate alla realtà italiana evidenziano seria preoccupazione. La superficie agraria utilizzabile in Italia è pari al 56% dell'intero territorio nazionale. La media in sostanza organica dei suoli agrari italiani è di 1,5%, di questo 1,5% senza le dovute integrazioni organiche se ne perde l'1,5% annuo (Tombesi et al. 1990). Vi sono poi regioni più vulnerabili di altre a causa delle caratteristiche del proprio territorio e della storia che le ha attraversate. Nel caso ad esempio della Regione Marche oltre il 75% del territorio ha un contenuto di sostanza organica del suolo inferiore all'1%. Rapportando a questi dati quanto precedentemente affermato risulta che ormai tutta la SAU italiana ha perso gran parte delle funzioni del suolo e che in alcuni casi, come ad esempio la Regione Marche, sono già in corso processi di desertificazione del territorio.

L'agricoltura nei confronti della biodiversità riveste un duplice ruolo essendo al contempo elemento di conservazione mediante presidio sul territorio, tutela delle risorse genetiche autoctone, selezione di specie adattabili a cambiamenti climatici anche attraverso e integrazione della conservazione della biodiversità nelle politiche agricole, ma anche di erosione mediante l'uso non sostenibile delle risorse acqua, aria, suolo; l'introduzione di specie aliene, la sostituzione o l'alienazione di specie autoctone perché poco produttive, il trasferimento di parassiti da aree agricole alle aree selvatiche, ecc..

### **Concetto di erosione genetica microbica**

Per erosione genetica microbica si intende la perdita di diversità genetica in una determinata area e in un determinato periodo di tempo, associata, al contempo, al concetto di perdita di una funzione.

Il concetto di erosione resta legato al concetto di diversità genetica e diversità funzionale.

In un ecosistema dotato di numerose vie metaboliche ed energetiche come il suolo l'alterazione di una specie determina un effetto minore sulle altre specie presenti di quanto potrebbe causare la medesima alterazione a carico di una specie di un ecosistema dotato di una scarsa rete energetica. Sulla base del modello proposto da MacArthur sono nate numerose teorie ecologiche per spiegare la relazione tra la biodiversità e la stabilità o la produttività di un suolo (Lynch et al., 2004). Una di queste è la "ipotesi dell'eterogeneità delle risorse" (Resource heterogeneity hypothesis – RHH) proposta da Tilman (1982): essa parte dal presupposto che un suolo uniformemente arido avrà una bassa biodiversità. All'aumentare della fertilità del suolo, aumenteranno anche la distribuzione e la diversità delle risorse nutrizionali determinando, di conseguenza, un incremento della biodiversità e della produttività. Ad un certo punto però la tendenza si inverte e ad una elevata fertilità del suolo corrisponde un abbattimento della eterogeneità delle risorse e quindi della biodiversità. Questo fenomeno è dovuto al fatto che, all'aumentare della fertilità, il suolo si avvicina sempre di più ad un plateau di nutrienti che saranno uniformemente distribuiti su tutto il suolo, selezionando così quei microrganismi che meglio si adattano a quelle condizioni.

Tutto questo comporta che il concetto di erosione genetica, come perdita di ceppi può essere mascherata dalla rispondenza in termini di funzionalità e quindi di conservazione delle espressione genica finale data dalla somma e dalla compartecipazione a livello di "comunità di più ceppi o più organismi anche differenti" alla medesima funzione. L'erosione genetica microbica potrebbe essere quindi valutata come:

- 1) Perdita della funzione
- 2) Perdita di una intera comunità microbica che svolge una determinata funzione
- 3) Perdita di alcuni ceppi o organismi che concorrono allo svolgimento di una funzione senza che questa venga interrotta

#### 4) Perdita di un ceppo

Il dibattito scientifico in questo senso è molto ampio. In termini assoluti ogni qual volta vengano persi geni si configura perdita di biodiversità. In termini funzionali è importante andare a valutare la ridondanza dei diversi organismi per quantificare il danno che può derivare dalla perdita di quel determinato ceppo.

Sicuramente il problema dell'erosione a livello genetico è più importante nel caso dei microrganismi degli alimenti più che del suolo, data la ridondanza funzionale che viene a stabilirsi nel suolo grazie anche alla ricchezza in termini edafici che si trova nel suolo stesso.

#### **Cause di erosione genetica microbica.**

Molte possono essere le cause di erosione genetica microbica e molto spesso sono associate all'impatto antropico, ai cambiamenti climatici al verificarsi di eventi calamitosi e catastrofi ambientali.

Nel presente documento verranno unicamente analizzate le cause legate a pratiche agricole aggressive.

E' importante sottolineare che nel caso del suolo i fattori limitanti la vita microbica sono:

- 1) condizioni edafiche (abbondanza di substrato nutritivo)
- 2) temperatura
- 3) umidità

Quali le cause di perdita di biodiversità del suolo e di perdita della fertilità? Molte e semplicemente restando nel comparto agricolo, l'agricoltura può essere sia fonte di perdita della biodiversità attraverso pratiche agricole troppo aggressive, l'introduzione di inquinanti nel suolo, sfruttamento eccessivo e scorretto della risorsa, ecc., ma anche al contrario elemento di tutela, monitoraggio ed incremento della fertilità mediante il costante ed accorto presidio sul territorio da parte degli agricoltori.

Tutte le pratiche agricole che vanno ad incidere su questi tre fattori ovviamente possono potenzialmente essere causa di stress per i microrganismi fino a diventarne causa di erosione. Poi possono essere causa di erosione l'utilizzo di sostanze xenobiotiche tossiche e nocive, la cementificazione, e tutte le forme di inquinamento, ecc.

**Lavorazioni:** lavorazioni profonde provocano mineralizzazione della sostanza organica e diluizione della stessa. Al contempo la compattazione del suolo provoca anossia.

**Irrigazioni:** eccesso d'acqua causa la lisciviazione dei nutrienti, innesca condizioni di asfissia e carenza d'ossigeno. Compresenza di temperatura ed umidità alta innescano processi di mineralizzazione della sostanza a con perdita della fertilità

**Concimazioni:** uso di fanghi e compost non garantiti possono introdurre elementi indesiderati tossici e nocivi. Eccesso di nutrienti in forma salina possono causare variazioni di pH e quindi causare problemi osmotici e morte del microrganismo

**Tipo di coltura:** è noto che le piante rilasciando nel suolo essudati radicali entrano in associazione con i microrganismi del suolo, la monocoltura riduce enormemente la differenziazione microbica producendo una eccessiva specializzazione delle comunità microbiche associate alla pianta con drastica riduzione delle funzioni del suolo stesso.

**Difesa:** uso di fitofarmaci può causare danni alla popolazione microbica, se le quantità utilizzate sono eccessive. Prodotti organici di sintesi possono essere degradati dai microrganismi, ma possono al contempo far prevalere delle comunità su altre. La solarizzazione e le macchine a vapore sterilizzano il suolo non solo nei confronti dei patogeni, ma anche nei confronti dei microrganismi utili

**Incendi:** sono causa di perdita di microrganismi termolabili e lasciano prendere il sopravvento a comunità resistenti alle alte temperature. E' sconsigliata la bruciatura delle stoppie.

**Cementificazione:** costruzione di edifici su suoli fertili provoca la perdita irreversibile del suolo.

**Inquinamento da sostanze xenobiotiche:** utilizzo di biomasse organiche come ammendanti di origine incerta che possono contenere sostanze xenobiotiche e quindi tossiche e nocive (fanghi, compost, ecc.).

## V.2 - Sistemi di valutazione del rischio di estinzione, erosione e sostituzione.

### Premessa

La valutazione dei rischi di estinzione, sostituzione e di erosione avviene tramite opportuni monitoraggi come sotto descritti.

#### a. Come monitorare in genere la biodiversità microbica

Il monitoraggio della biodiversità microbica avviene secondo le tecnologie ampiamente descritte nel capitolo relativo ai metodi condivisi per l'identificazione e la caratterizzazione.

Per sintetizzare al massimo, e richiamare i concetti sopra descritti, è utile ricordare che:

1. La **diversità** attiene al numero di specie di un ambiente, cibo o habitat
2. Le specie sono definite mediante il processo di **identificazione**
3. La **variabilità** attiene ai ceppi, ovvero alle varianti di ciascuna specie, presenti in un dato ambiente alimento o habitat
4. La variabilità viene definita mediante **caratterizzazione**
5. La **biodiversità** è l'integrazione di diversità e variabilità
6. Non tutta la biodiversità è studiabile con metodi microbiologici, ma può essere affrontata anche con strategie molecolari **metagenomiche** ovvero in grado di analizzare tutto il DNA (o RNA) di un ambiente, alimento o habitat.

La valutazione dei rischi di perdita o cambiamento della biodiversità va effettuata quindi a seconda dei casi mediante analisi di identificazione o di caratterizzazione a seconda che si sia più interessati al livello di specie o di ceppo. Tipicamente, in campo ambientale ci si concentra più sulla composizione a livello di specie all'interno di comunità straordinariamente complesse. A livello alimentare, viceversa, prevale il concetto che particolari ceppi imprimano sapori o caratteristiche peculiari ai diversi alimenti, per cui il mantenimento o il miglioramento a livello di ceppo è prevalente sulle considerazioni a livello di specie. Per fare un esempio, non ci sono dubbi che il vino, come definito dalla tradizione, dalla merceologia e dalla legge, sia il prodotto della fermentazione dei mosti d'uva effettuata dal lievito *Saccharomyces cerevisiae* e non da altre specie. Ci sono d'altra parte grandi evidenze che i vari ceppi producano vini diversi a partire dallo stesso mosto d'uva, per cui ogni particolare ceppo ha caratteristiche sue peculiari, che possono essere variamente apprezzate, ma che comunque fanno focalizzare l'interesse sul livello tassonomico della variabilità fra ceppi. Non è escluso che nel prossimo futuro la microbiologia ambientale si apra sempre più alla dimensione delle comunità microbiche, anche trans-dominio

come batteri lieviti, nei cibi, che rappresenta la realtà sviluppatasi nella preparazione tradizionale dei cibi e delle bevande trasformate ad opera dei microrganismi.

### **Una sintesi operativa**

Da quanto sopra detto, emerge come il monitoraggio della biodiversità possa far uso di diverse tecniche a seconda degli ambiti e degli interessi. Senza nulla togliere alla potenza delle strategie di studio basate su più tecniche (e talvolta assolutamente necessarie), emerge anche la necessità di sviluppare sistemi rapidi e sostanzialmente universali che fungano da strumenti di valutazione nel tempo e nello spazio della biodiversità, in modo da ottenere tante “fotografie” puntuali che permettano di essere giustapposte a formare il “film” dell’evoluzione locale della biodiversità microbica.

La strategia meta genomica è potenzialmente in grado di definire sia la variabilità che la diversità di un particolare substrato. La tecnica è sicuramente a punto dal punto di vista molecolare per i vari aspetti: estrazione del DNA, primer, condizione di amplificazione, formazione del gradiente, condizioni di elettroforesi, documentazione dell’immagine.

È sicuramente auspicabile che la tecnica venga standardizzata sia per la stima della diversità che per quella della variabilità per l’applicazione diretta nelle condizioni agro ambientali ed alimentari.

### **b. Come monitorare la biodiversità microbica in campo alimentare**

Il biomonitoraggio in campo alimentare segue da presso quanto descritto nel capitolo sulle metodologie condivise e può essere sintetizzata nelle tre strategie seguenti:

1. **Analisi microbiologico-molecolare.** E’ la forma più diffusa e prevede le seguenti operazioni:
  - ✓ Prelievo
  - ✓ Isolamento
  - ✓ Identificazione molecolare
  - ✓ Caratterizzazione fenotipica
  - ✓ Caratterizzazione molecolare

#### **Vantaggi:**

seguita nella sua completezza, questa strategia fornisce indicazioni esaustive a livello di diversità e di variabilità

Fornisce identificazioni stabili e certe a livello tassonomico

#### **Svantaggi:**

Non misura la biodiversità non coltivabile

Nella sua completezza è lunga e costosa

Non consente sempre di studiare troppi ceppi per ragioni logistiche

### **2. Analisi Microbiologica**

Era la forma più diffusa in passato, è spesso impiegata per i funghi filamentosi e prevede le seguenti operazioni:

- ✓ Prelievo
- ✓ Isolamento
- ✓ Identificazione morfologico-funzionale
- ✓ Caratterizzazione fenotipica

- ✓ Eventuale caratterizzazione molecolare

**Vantaggi:**

seguita nella sua completezza, questa strategia fornisce indicazioni a livello di diversità e di variabilità

Non richiede grandi costi di materiali

**Svantaggi:**

Non misura la biodiversità non coltivabile

Nella sua completezza è lunga e costosa

Non consente sempre di studiare troppi ceppi per ragioni logistiche

E' costosissima in termini di tempo

### **3. Analisi molecolare**

Consiste nello studio del DNA o del RNA meta genomico e prevede le seguenti fasi:

- ✓ Prelievo
- ✓ Estrazione del DNA o RNA
- ✓ Amplificazione PCR
- ✓ Analisi statistica

**Vantaggi:**

E' molto veloce

Consente di avere una visione complessiva

Si applica con poche differenze a tutti i grandi gruppi microbici

Funziona con i microbi vitali ma non colturabili

Può essere poco costosa

**Svantaggi:**

Non consente di ottenere materialmente i vari microrganismi

Non fornisce informazioni fenotipiche e funzionali

### **c. Come monitorare la biodiversità microbica agro-ambientale**

#### **Diversità genetica e funzionale del suolo**

Da quanto sino ad ora discusso appare evidente che, sia pure con una certa difficoltà e con un certo margine di approssimazione, è possibile definire la diversità microbica di un suolo e di darne una caratterizzazione temporale in termini di fluttuazioni naturali o patologiche.

La caratterizzazione della diversità microbica di un suolo, e della sua biodiversità in genere, va costruita per livelli di approssimazione:

- 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.
- Sarà poi indispensabile 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 (DNA, RNA) dal suolo e si procede con le opportune tecniche molecolari come, ad esempio, la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

- Il **terzo livello**, da effettuarsi su base comparativa, è questa la fase più delicata e di maggiore difficoltà interpretativa, sarà definire la diversità microbica specifica, che comporterà l'isolamento di singoli individui e l'attribuzione ad essi della corrispondente funzione.
- 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.

Appropriati metodi di studio biologici del suolo combinati con proprietà fisico-chimiche potrebbero servire come indicatori dei cambiamenti della qualità del suolo e fornire delle prime indicazioni se vi sia stata una alterazione o modificazione del “soil biota”. Tuttavia, Kennedy e Papendiek (1995) evidenziarono che sebbene gli strumenti per caratterizzare il suolo siano numerosi, mancano le strategie per integrare questi strumenti per determinare la qualità del suolo e la sua biodiversità in maniera univoca e incontrovertibile per tutte le situazioni ma che si deve ancora individuare caso per caso gli indicatori utili alla caratterizzazione di una data situazione.

E' importante che si consideri la standardizzazione di ogni aspetto del metodo, dal campionamento, attraverso lo stoccaggio ed il pre-trattamento dei campioni fino all'attuale procedimento analitico, all'interpretazione e alla presentazione dei risultati. A causa della natura molto dinamica dei microrganismi, si deve porre particolare attenzione agli indicatori microbiologici durante lo stoccaggio ed al pre-trattamento dei campioni.

### ***Indicatori di I° livello***

#### ***a) Determinazione del C organico totale (TOC)***

La determinazione del carbonio organico totale del terreno rientra tra le analisi di routine più importanti: il contenuto di carbonio, infatti, viene utilizzato sia come elemento diagnostico per la tassonomia dei suoli che come parametro cardine nelle valutazioni agronomiche. Sebbene la determinazione del contenuto di sostanza organica nel suolo sia un'analisi fondamentale, tuttavia non esiste un metodo univoco per la sua determinazione.

Comunemente il contenuto di sostanza organica viene stimato indirettamente moltiplicando la concentrazione del carbonio organico per un coefficiente di conversione: per molti anni è stato utilizzato il coefficiente di conversione Van Bemmelen (1,724), che si basa sull'assunto che la sostanza organica del suolo contenga il 58% di carbonio, ma è noto che il contenuto percentuale dell'elemento nella sostanza organica nel suolo varia in un ampio range ed ogni valore scelto sarebbe comunque un'approssimazione. Inoltre il fattore di conversione può variare non solo da suolo a suolo ma anche tra orizzonti dello stesso suolo e pertanto il fattore più appropriato dovrebbe

essere determinato sperimentalmente per ogni terreno. La maggior parte degli autori propone fattori di conversione compresi tra 1,724 e 2,5 per ottenere delle stime approssimative. Tutto questo suggerisce come sia più appropriato esprimere il dato come carbonio, che convertire questo dato nel contenuto in sostanza organica. Il carbonio organico può essere determinato mediante diverse metodologie, tuttavia quella più utilizzata è quella del metodo di Springer e Klee (1954) oltre che per semplicità, rapidità e adattabilità a tutti i tipi di suoli, anche perché è quella che garantisce la mineralizzazione completa del C organico. Questa prevede la riduzione del  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  ad opera della componente organica e successiva determinazione del  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  residuo mediante titolazione ossido-riduttiva con  $\text{Fe}^{2+}$  o mediante tecniche colorimetriche.

In questo metodo si assume che il carbonio presente nella sostanza organica del suolo abbia in media stato di ossidazione zero. Poiché tutta la sostanza organica viene ossidata, questa risulta essere una metodica quantitativa. Il dato analitico relativo al carbonio organico viene generalmente espresso su base ponderale (generalmente riferito al campione secco a  $105^\circ\text{C}$ ); tuttavia, quando il dato analitico deve essere estrapolato alla realtà di campo per ottenere una descrizione spaziale del suolo in esame, sia orizzontale (area) che verticale (profilo), allora è necessario considerare la densità del suolo ed effettuare il campionamento su una profondità tale da includere, idealmente, il contributo di tutta la sostanza organica presente. È evidente che ciò non è sempre realizzabile né significativo per tutti gli scopi prefissati, pertanto nella pratica vengono adottati dei compromessi in funzione della finalità dello studio. Uno di questi consiste nell'esprimere il dato su base volumetrica; un altro corregge le misure volumetriche scegliendo la profondità di campionamento fino ad ottenere masse equivalenti (Smith et al., 2000).

In sintesi, dato che la sostanza organica segue una distribuzione stratificata lungo il profilo del suolo, il metodo di campionamento più aderente alla realtà pedologica è quello secondo gli orizzonti; in questo caso la modalità di espressione del contenuto di sostanza organica del suolo avrà un valore convenzionale, in quanto tutti i dati sensibili per descrivere il pedon (spessore degli orizzonti, volume apparente, ecc.) permetteranno di elaborare i risultati nel modo più opportuno per le finalità dello studio.

#### *b) Azoto totale*

Nel suolo l'azoto è presente in varie forme, due delle quali sono assimilabili dalle piante: prontamente quella nitrica, più lentamente quella ammoniacale. La determinazione delle varie forme di azoto è essenziale per una razionalizzazione della concimazione azotata al fine di contenere l'impatto ambientale. I metodi di analisi ufficiali prevedono la determinazione dell'azoto totale e di quello minerale. A queste forme vanno aggiunte poi quelle relative alle riserve azotate del suolo, ossia la frazione potenzialmente mineralizzabile dell'azoto organico e quella potenzialmente assimilabile dell'ammonio fissato ai minerali argillosi nelle posizioni d'interstrato dei reticoli cristallini.

La determinazione dell'azoto totale deve comprendere tutte le forme azotate del suolo, sia organiche che inorganiche, e questo rende l'analisi particolarmente difficile. Due metodi sono generalmente accettati, il più utilizzato dei quali è il metodo Kjeldahl, che si basa su un processo di ossidazione per via umida. Il contenuto di azoto determinato con questo metodo è spesso collegato al contenuto in sostanza organica e oscilla nei suoli agrari tra 0,8 e 2 g/kg; più elevato nei suoli a prato permanente (3,5-5 g/kg) e soprattutto nei suoli forestali di latifoglie (3-12 g/kg).



La sempre più frequente disponibilità di strumenti automatizzati, infine, negli ultimi anni ha reso di uso comune anche le tecniche basate su combustione per via secca (analizzatori elementari secondo il metodo Dumas).

### c) *La respirazione microbica*

La respirazione del suolo è uno dei parametri più antichi e tuttora frequentemente utilizzati per quantificare le attività microbiche nei suoli. Il metodo è basato sul fatto che le cellule metabolicamente attive richiedono un apporto costante di nutrienti ed energia che, per la microflora eterotrofa, deriva dalla trasformazione della sostanza organica. Le reazioni che richiedono energia nelle cellule sono reazioni redox basate sul trasferimento di elettroni da un donatore ad un accettore. Nella respirazione, ovvero l'ossidazione della sostanza organica ad opera di microrganismi aerobici, l'ossigeno è l'accettore finale degli elettroni e i prodotti finali del processo sono acqua e anidride carbonica. Le attività metaboliche possono essere dunque quantificate misurando la produzione di  $\text{CO}_2$  (o il consumo di  $\text{O}_2$ ). La respirazione è un processo universale e come tale non solo ristretto ai microrganismi ma viene effettuata anche da altri organismi che vivono nel terreno e dipende dallo stato fisiologico delle cellule ed è influenzato da diversi fattori.

Il tasso di *respirazione basale* è una misura della respirazione microbica essenziale ed è comunemente considerata come decomposizione complessiva della sostanza organica (Anderson, 1982). La respirazione basale viene misurata senza l'aggiunta di alcun substrato al suolo; La respirazione indotta da substrato (SIR) è infatti la respirazione misurata in presenza di substrati quali glucosio, aminoacidi, ecc. Il tasso di *respirazione* è invece data dalla quantità totale di  $\text{CO}_2$  prodotta in un tempo  $t$  e dipende dai fattori che controllano l'attività microbica: temperatura, apporto di acqua, apporto di nutrienti e aerazione insieme alla disponibilità di materiali e substrati. Con la misura del tasso di respirazione è possibile costruire le *curve di respirazione* basate sia su dati cumulativi che giornalieri. Questi dati mostrano graficamente il tasso di respirazione microbica relativa alla decomposizione della sostanza organica. Infatti, la sostanza organica del suolo è composta da varie frazioni che vendono demolite in modo diverso.

La respirazione può essere determinata sia come evoluzione di  $\text{CO}_2$  che come consumo di  $\text{O}_2$ . Le differenze tra i due riflette lo stato fisiologico della biomassa microbica che risente delle condizioni dell'ambiente suolo. Sembra che la produzione di  $\text{CO}_2$  sia la strategia più comunemente utilizzata per la respirazione del suolo, probabilmente a causa sia della numerosa strumentazione disponibile per la stima in continuo della  $\text{CO}_2$ , sia per la sua relativa facilità di utilizzo (Nordgren, 1988; Heinemeyer et al., 1989). Tuttavia ci sono delle limitazioni: in suoli contenenti carbonati, ad esempio, il rilascio di  $\text{CO}_2$  abiotica può dare dei risultati erranei e perciò in certe condizioni il consumo di  $\text{O}_2$  viene preferito (Anderson, 1982). Nell'ambito di fattori come l'aratura è importante consentire alle emanazioni di  $\text{CO}_2$  di sparire. Per questo occorre circa una settimana a  $20^\circ\text{C}$  (Torstensson and Stenström, 1986; Martens, 1995). Questa pre-incubazione e la misura effettiva dovrebbero essere svolte in condizioni standardizzate di umidità e temperatura per ottenere dei risultati riproducibili e confrontabili.

### d) *La biomassa microbica*

La biomassa è l'intera popolazione microbica del suolo trattata come un'unica entità (Powlson, 1994). Un metodo fisiologico per determinare la biomassa microbica fu introdotta da Jenkinson e

Powlson (1976): il metodo dell'incubazione-fumigazione con cloroformio (CFI). I metodi più utilizzati oggi sono il CFI, la fumigazione-estrazione col cloroformio (CFE) (Vance et al., 1987) che è uno sviluppo della CFI, e la respirazione indotta da substrato (SIR) (Anderson e Domsch, 1978). La SIR è considerata la tecnica più semplice e rapida, con un basso coefficiente di variabilità, cosa che è auspicabile per misure routinarie (Kaiser et al., 1992). E' misurato anche insieme alla respirazione basale che lo rende persino più economico. La CFE, tuttavia, consente di analizzare tanto l'azoto microbico quanto il carbonio.

La SIR viene analizzata come produzione di  $\text{CO}_2$  dal suolo in seguito ad un'aggiunta ottimale di glucosio. L'iniziale tasso di respirazione è considerato proporzionale alla biomassa totale ed è calibrato contro la CFI-C della biomassa (Anderson e Domsch, 1978). Di solito la SIR viene trasformata in C della biomassa attraverso tali calibrazioni. La precisione di queste calibrazioni sono state tuttavia oggetto di discussione. Wardle e Parkinson (1991) suggerirono che diversi fattori di calibrazione sarebbero dovuti essere utilizzati (se usati tutti) per diverse "popolazioni" di suoli. Ci sono anche delle differenze principali nella determinazione della  $\text{CO}_2$ . Le calibrazioni effettuate per le analisi in cui il suolo è colto da un flusso d'aria o aria priva di  $\text{CO}_2$  non sono direttamente confrontabili con quelle in cui il suolo è in equilibrio con una trappola all'idrossido per  $\text{CO}_2$ , che è pure comune. Non ci si può aspettare che la ritenzione di  $\text{CO}_2$  sia la stessa (Kaiser et al., 1992; Martens, 1995). Tuttavia, con una metodologia standardizzata il tasso di produzione di  $\text{CO}_2$  può essere utilizzato come indice della biomassa. Strumenti automatici possono svolgere entrambi i principi per la determinazione della  $\text{CO}_2$ . Un sistema areato continuamente basato sull'analisi agli infrarossi del gas fu descritto da Heinemeyer et al. (1989). E' stato sviluppato anche un sistema statico basato sulle capacità di conduttività in una trappola all'idrossido per la  $\text{CO}_2$  (Nordgren, 1988, 1992).

Una critica più basilare contraria all'utilizzo della CFI per la calibrazione delle misure SIR è che le due tecniche misurano diverse componenti della biomassa, nonostante esista una forte correlazione tra le due (Wardle e Parkinson, 1991). Ad esempio è evidente che la risposta al glucosio sia data dalla parte attiva della biomassa (si presume che stiano crescendo, ad esempio gli organismi r) (Van de Werf e Verstraete, 1987). In contraddizione con questo studio Stenström et al. (1998) suggerì l'utilizzo di un'equazione matematica che suddivide la biomassa in una componente che "cresce" e in una che "non cresce". Nella stragrande maggioranza dei suoli analizzati finora, la componente che non cresce supera quella che cresce di circa dieci volte (dati non pubblicati). L'importanza ecologica della relazione tra una popolazione in crescita ed una non in crescita, determinata con questa tecnica, deve essere ancora investigata. Tuttavia, questa relazione si è dimostrata essere un test sensibile per la tossicità dei metalli applicati in condizioni controllate di laboratorio (Johansson et al., 1998).

#### *e) Quoziente metabolico ( $q\text{CO}_2$ )*

Il quoziente metabolico ( $q\text{CO}_2$ ) o il tasso di respirazione specifica non è una misura di per sé ma la respirazione basale in rapporto al C della biomassa. Il parametro ecofisiologico dell'attività specifica fu proposto da Anderson e Domsch (1985) come un adattamento alla microbiologia del suolo della teoria dello sviluppo di ecosistemi bioenergetici (Odum, 1969). Un basso quoziente indica un'utilizzazione economica di energia e si suppone che rispecchi un ecosistema più stabile (Insam and Haseiwandter, 1989; Anderson, 1994). Uno svantaggio è che l'effetto di situazioni di stress e altri disturbi potrebbero essere confusi. Lo stress provocato, ad esempio, da un basso pH o

da carenza di nutrienti potrebbe portare un alto  $qCO_2$  accoppiato con una bassa biomassa in confronto ad una situazione simile senza i fattori di stress. Allo stesso modo, il  $qCO_2$  aumenterebbe nel caso di disturbi nell'ecosistema come la coltivazione e la concimazione, ma questo aumento è probabilmente da collegare ad un incremento della biomassa.

#### *f) Quoziente di mineralizzazione ( $qM$ )*

Il quoziente di mineralizzazione non è altro che il rapporto tra la respirazione microbica basale (dopo 21 giorni) e il contenuto di C organico totale e sta ad indicare l'efficienza con cui la microflora metabolizza la sostanza organica del suolo.

### ***Indicatori di II° livello***

#### *a) Estrazione del DNA totale del suolo*

Le tecniche di estrazione di DNA dal suolo sono numerose ma si possono essenzialmente suddividere in due gruppi: metodi indiretti e metodi diretti. Nell'ambito del presente progetto si prendono in considerazione solo metodi diretti che prevedono la lisi delle cellule "in situ", direttamente nel suolo, e successivamente il recupero degli acidi nucleici. Per ottenere la rottura della membrana cellulare si possono utilizzare metodi fisici, chimici o enzimatici, oppure una combinazione di questi. I metodi fisici che si possono utilizzare sono molti, tra cui l'ultrasonificazione, la triturazione in azoto liquido, lo shock termico e altri ancora, ma il metodo più usato è sicuramente quello che in inglese si chiama "bead beating" e cioè il violento sbattimento del suolo, in un tampone di estrazione, in presenza di matrici di lisi composte da sfere di materiale vario (in genere vetro o ceramica) e di diverse dimensioni. Questo metodo è quello che garantisce la resa più alta in termini di DNA recuperato.

Insieme ai metodi fisici sono spesso utilizzati reagenti chimici che facilitano la rottura delle membrane cellulari o rimuovono sostanze che inibiscono l'estrazione. Tra i reagenti più impiegati ci sono il sodio dodecilsolfato (SDS) e il bromuro di cetiltrimetil-ammonio (CTAB), che facilita la rimozione degli acidi umici.

In molti protocolli di estrazione vengono utilizzati anche metodi enzimatici per migliorare la resa, tra gli enzimi più utilizzati ci sono il lisozima, che facilita la rottura della parete cellulare e l'eliminazione dei composti umici, e la proteinasi K, che elimina i contaminanti di natura proteica.

Dopo aver provocato la lisi dei batteri presenti nel suolo, è necessario isolare e purificare gli acidi nucleici rilasciati nella miscela di reazione in seguito alla lisi cellulare. I contaminanti più abbondanti e più difficili da eliminare sono gli acidi umici. Questi composti inibiscono molte delle tecniche che si usano per studiare la microflora del suolo e per eliminarli molte tecniche di estrazione prevedono, dopo la lisi cellulare, una purificazione con solventi organici come il fenolo e il cloroformio, seguita da passaggi di precipitazione degli acidi nucleici con isopropanolo, PEG o NaCl. Per purificare ulteriormente si possono usare la centrifugazione in gradiente di densità di CsCl o la separazione degli acidi nucleici tramite elettroforesi su gel di agarosio. Ci sono poi una serie di prodotti commerciali di diverse ditte che funzionano bene e consentono di purificare un alto numero di campioni in poco tempo, l'inconveniente è che spesso dopo la purificazione si registra una leggera diminuzione degli acidi nucleici rispetto alla quantità che si aveva in partenza.

I vantaggi dell'estrazione diretta degli acidi nucleici dal suolo sono il recupero di un'alta percentuale del DNA batterico presente nel suolo (molto superiore alle rese dell'estrazione indiretta), la sua relativa semplicità e rapidità (consente di processare un alto numero di campioni in breve tempo) e una minore dipendenza della resa finale dalla tipologia del suolo analizzato rispetto all'estrazione indiretta. Infatti in questo caso si possono usare metodi fisici più efficaci, così anche dai suoli caratterizzati dalla presenza di microaggregati molto resistenti si possono ottenere ottime rese di estrazione che consentono uno studio significativo della comunità batterica del suolo.

Anche queste tecniche presentano però alcuni svantaggi, il più grande è la frammentazione degli acidi nucleici causata dal violento sbattimento del suolo che comporta l'ottenimento di frammenti che in genere non superano le 20-30 kb. Un altro svantaggio è dato dal fatto che in genere gli acidi nucleici che si ottengono non hanno un elevato grado di purezza, questo però è un fattore che varia molto in base al tipo di purificazione che si effettua al termine dell'estrazione.

#### *b) Analisi molecolari delle comunità microbiche*

Non esiste una regola semplice o assoluta per scegliere le metodologie da utilizzare dato che la scelta deriva dal tipo di problema che si vuole esaminare. Identificare i componenti di una comunità batterica completamente ignota richiede un approccio diverso dalla classificazione di un singolo ceppo di una specifica specie batterica. Inoltre può spesso rivelarsi opportuno modificare la strategia nel corso dello studio poiché gli esperimenti preliminari possono dare indicazioni sull'utilità o meno delle varie tecniche disponibili e in particolare di quelle metodologie efficaci solo all'interno di certi gruppi tassonomici.

Per progettare una strategia per lo studio delle comunità microbiche naturali bisogna per prima cosa decidere se analizzare tutte le forme di microrganismi presenti nel campione ambientale o limitare l'analisi ai soli microrganismi coltivabili. In ogni caso, per quanto esista una vasta gamma di tecniche disponibili per lo studio della diversità microbica del suolo, ogni metodo ha i suoi limiti e fornisce solamente una visione (molto) parziale di un singolo aspetto della diversità microbica del suolo. Conseguentemente è sempre preferibile studiare le comunità microbiche a diversi livelli (quando possibile) ed utilizzando non un solo metodo, ma una combinazione di tecniche diverse che permettano di valutare la diversità microbica e le variazioni che si verificano in conseguenza delle fluttuazioni dei parametri ambientali (Kirk et al., 2004).

Il principale ostacolo dello studio della diversità microbica del suolo è l'incapacità di coltivare in vitro oltre l'1% dei batteri presenti. I motivi dell'incapacità di crescita dei batteri nei terreni di coltura sono molteplici, tra i quali la difficoltà di riprodurre in laboratorio le condizioni nelle quali questi microrganismi proliferano nell'ambiente e la presenza di batteri che si trovano in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC), (Xu et al., 1992). I batteri nello stato VBNC rimangono vitali pur non essendo in grado di dividersi in maniera sufficiente da formare colonie visibili su piastre di terreno di coltura non selettivo ed entrano in questo stato quando sono sottoposti a particolari stress ambientali, quali variazioni della temperatura, salinità, etc (McDougald et al., 1998; Oliver, 2005).

L'uso di tecniche di biologia molecolare ed in particolare lo sviluppo della tecnica della PCR ha reso possibile lo studio della diversità delle comunità microbiche senza la necessità di coltivare i batteri, in quanto ha permesso di amplificare geni da DNA genomico estratto direttamente dal suolo secondo i metodi precedentemente descritti.

Il marker molecolare che viene comunemente utilizzato per studiare le relazioni filogenetiche nei procarioti è il gene che codifica il 16S rRNA (Woese, 1987; Amann et al., 1995). Amplificando *via*

PCR il 16S rRNA da DNA genomico estratto direttamente dal suolo utilizzando primers universali per i batteri si ottiene una miscela di frammenti che possono essere analizzati sia mediante la tecnica del clonaggio che mediante tecniche di fingerprinting quali la DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Utilizzando la tecnica del clonaggio, singoli frammenti di 16S rRNA, ottenuti dall'amplificazione del DNA genomico estratto direttamente dal campione, vengono introdotti in un vettore plasmidico e quindi trasferiti in cellule di *Escherichia coli* in maniera da ottenere una libreria di cloni che possono essere separati mediante coltura su piastre di terreno di coltura agarizzato contenente agenti selettivi che permettono di selezionare i cloni che contengono ciascuno un singolo frammento amplificato del gene 16S rRNA. Il sequenziamento del frammento del 16S rRNA di ciascun clone selezionato è uno "step" fondamentale perché la comparazione della sequenza ottenuta con quelle presenti in banca dati permette di assegnare a ciascun clone una definita posizione tassonomica (Hugenholtz et al., 1998).

Con la tecnica DGGE si possono separare i frammenti del 16S rRNA mediante elettroforesi su un gradiente lineare di un gel di poliacrilammide poiché ciascun frammento si posiziona sul gel in base alla sua composizione nucleotidica. Il numero delle bande determinate dai frammenti separati (*richness*) e la loro intensità (*evenness*) consentono di "misurare" e confrontare il grado di diversità genetica presente. I frammenti separati sul gel possono inoltre essere recuperati e sequenziati al fine di assegnare una definita posizione tassonomica, oppure possono essere condotti esperimenti di ibridazione del gel con sonde molecolari specifiche per specifici gruppi tassonomici (Muyzer, 1999).

L'utilizzo delle tecniche molecolari basate sull'analisi filogenetica del gene 16S rRNA ha messo in evidenza la presenza nel suolo di nuovi "phyla" sia tra i batteri che tra gli archei, rivelando l'enorme diversità microbica presente in questo ambiente (Liesack e Stackebrandt, 1992; Borneman et al., 1996; Bintrim et al., 1997; Griffiths et al., 1996; Hugenholtz et al., 1998; Hugenholtz et al., 2001). Di conseguenza, l'interesse dei microbiologi si è rivolto verso la comprensione della fisiologia e del ruolo ecologico di questi microrganismi, la cui presenza viene rilevata solamente utilizzando delle metodiche che sono indipendenti dalla coltivazione.

### ***Indicatori di III° livello***

La percezione della diversità microbica è stata profondamente modificata in questi ultimi decenni dal sempre più esteso uso delle tecniche del DNA ricombinante e dei metodi di filogenesi molecolare. Molti dei metodi messi a punto per esaminare e studiare la struttura delle comunità microbiche del suolo utilizzano la PCR come metodo di elezione per amplificare il 16S rDNA (o altri marcatori filogenetici) dai batteri. Mediante l'uso di questi indicatori sarà possibile identificare direttamente o indirettamente i microrganismi del suolo. Infatti l'avvento della PCR ha rivoluzionato gli studi di ecologia microbica, poiché grazie ad essa è possibile amplificare il 16S rDNA non soltanto da microrganismi coltivabili in laboratorio, ma anche direttamente da DNA estratto da campioni di suolo. Questo ha rappresentato un enorme passo avanti nello studio della diversità delle comunità microbiche del suolo.

La possibilità di ottenere informazioni tassonomiche sui microrganismi non coltivabili si basa sull'amplificazione dei geni codificanti il 16S rRNA, attraverso una strategia che prevede estrazione del DNA direttamente da campioni di suolo. In tal modo vengono amplificate le molecole del 16S rDNA sia dei batteri coltivabili che di quelli non coltivabili; il prodotto di amplificazione è quindi una miscela eterogenea di molecole di 16S rDNA di diversa provenienza. La loro separazione viene

effettuata mediante il loro clonaggio in appositi vettori plasmidici che, generalmente, portano un gene che conferisce alla cellule ospiti la resistenza ad un antibiotico (tipicamente all'ampicillina) ed un secondo marcatore (lacZ) che permette la visualizzazione immediata dei cloni ricombinati dai non ricombinanti (screening bianco-blu); i plasmidi (ricombinanti o non) vengono quindi inseriti per trasformazione in cellule competenti di *Escherichia coli*. La fase successiva prevede l'amplificazione del 16S rDNA contenuto nel plasmide ricombinante utilizzando due primer esterni, complementari cioè a due sequenze del vettore plasmidico localizzate ai lati del sito in cui è stato inserito il 16S rDNA. Il prodotto di amplificazione può, a questo punto, essere processato secondo due strategie alternative:

- 1) La prima strategia prevede l'immediato sequenziamento del 16S rDNA. Questo approccio ha il seguente svantaggio: durante il clonaggio diverse molecole di vettore possono fondersi a copie identiche dello stesso 16S rDNA, cioè derivanti dall'amplificazione della stessa molecola presente nel DNA estratto. Di conseguenza, esiste una probabilità piuttosto alta di sequenziare cloni "gemelli", specialmente quando è necessario analizzare un numero elevato di 16S rDNA clonati, per esempio, per studiare la dinamica di queste comunità nello spazio e/o nel tempo. Questo problema può essere aggirato applicando la strategia alternativa seguente.
- 2) La seconda strategia, sfrutta l'analisi di restrizione dei 16S rDNA (ARDRA), utilizzando uno o più enzimi. Utilizzando questo metodo, originariamente messo a punto su batteri coltivabili, è possibile riunire i 16S rDNA in gruppi sulla base del profilo di restrizione ottenuto. Successivamente, viene determinata la sequenza nucleotidica di almeno un 16S rDNA rappresentativo di ogni gruppo. In questo modo viene minimizzato il numero di reazioni di sequenza da effettuare.

Indipendentemente da quale dei due percorsi abbia seguito lo sperimentatore, una volta ottenute la sequenza del 16S rDNA, essa viene ricontrollata utilizzando appositi programmi informatici e, quindi, utilizzata per recuperare dalle banche dati le sequenze ad essa più simili e con le quali viene poi allineata. L'allineamento viene infine utilizzato per costruire un albero filogenetico all'interno del quale verrà posizionata la sequenza del 16S rDNA clonata.

In linea di principio, ma solamente in linea di principio, questa strategia dovrebbe permettere di ottenere una "fotografia" dei 16S rDNA che dovrebbe rispecchiare la situazione reale, ovvero la biodiversità genetica presente.

I metodi di analisi delle comunità microbiche basate sulla PCR sono ampiamente utilizzati per via della facilità con la quale è possibile analizzare numerosi campioni e la possibilità di rilevare la presenza di particolari organismi o taxa attraverso l'uso di primer universali o gruppo-specifici. Negli ultimi anni queste metodologie sono state applicate all'analisi di comunità microbiche complesse provenienti dai più disparati ambienti naturali. La mole di dati ottenuti conferma che la nostra visione del mondo microbico era estremamente limitata e che esiste una enorme "biodiversità invisibile" ancora da esplorare.

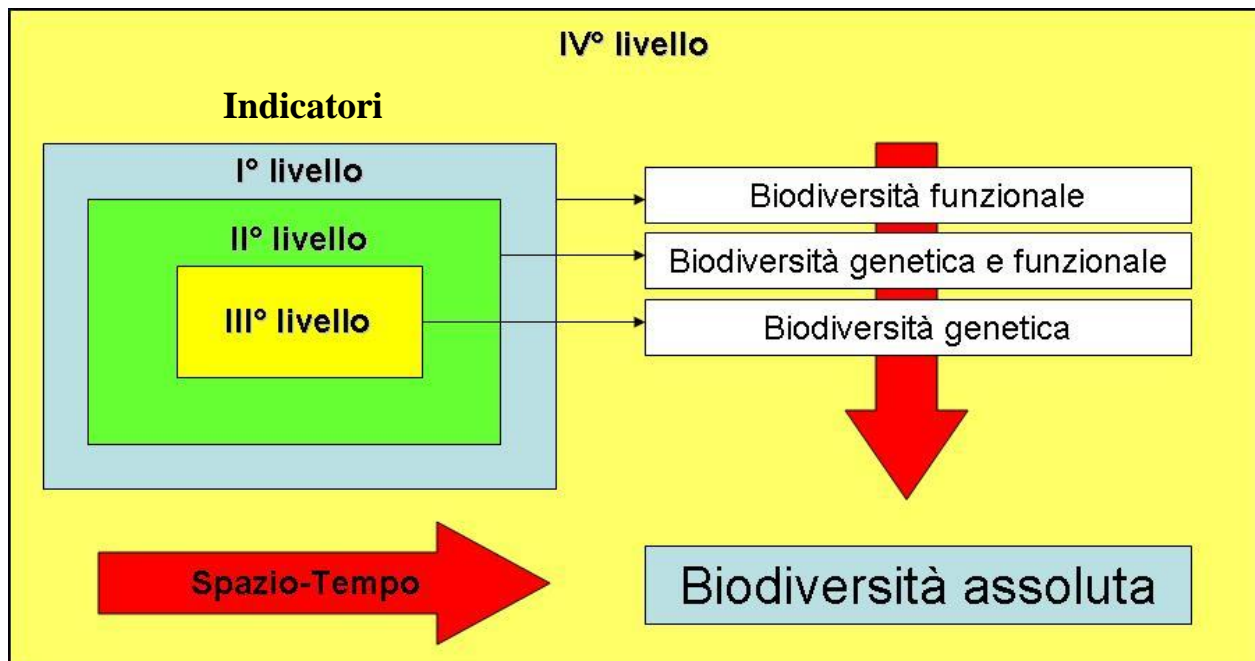
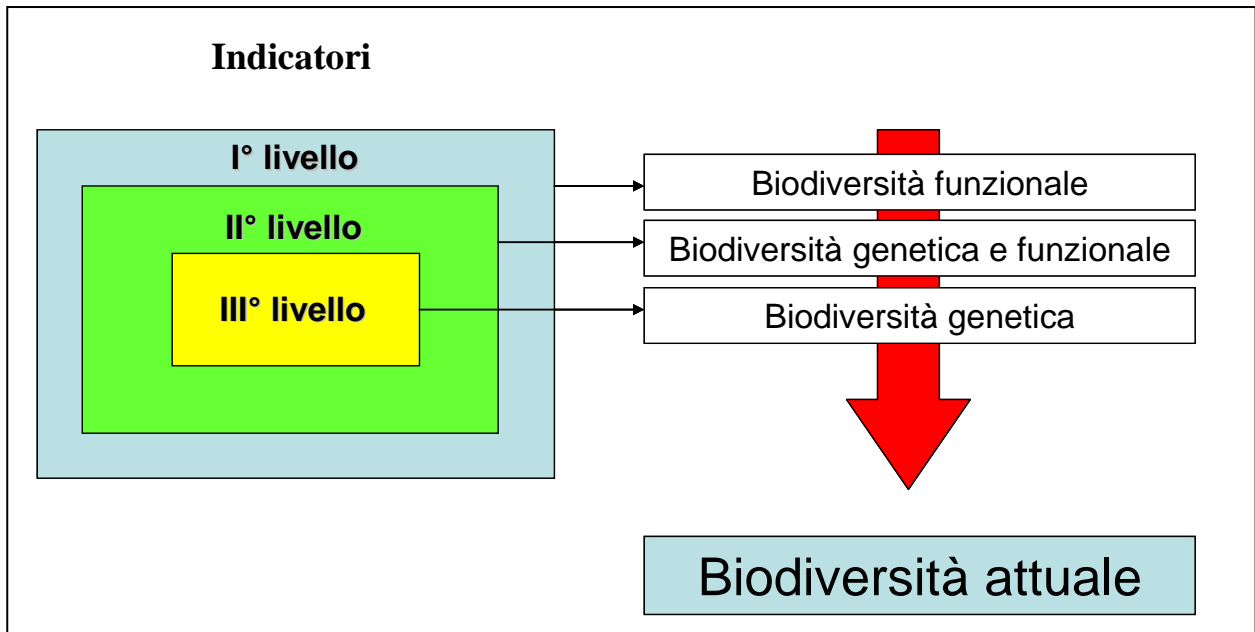
### ***Indicatori di IV° livello***

Le analisi di IV° livello prevedono la possibilità di intraprendere o meno un percorso di monitoraggio spazio-temporale della biodiversità del suolo sulla base dell'analisi comparativa dei risultati ottenuti nei livelli precedenti. E' bene specificare che questo livello di approfondimento può essere correlato indipendentemente sia alle analisi di I°, che di II° che di III° livello, in funzione della "*fitness for use*", ovvero il livello di approfondimento sulla conoscenza della biodiversità del suolo: fertilità biologica e abbondanza del biota (I° livello), richness e evenness (II° livello), identificazione degli individui (III° livello).

Qualora, ad esempio, dalle analisi di livello inferiore venisse evidenziata una situazione di grave erosione di biodiversità del suolo (sia di richness che di evenness) e venisse osservato un ridotto numero di specie microbiche, tali organismi andrebbero caratterizzati in quanto resistenti e adattati a condizioni sfavorevoli di vita per la maggior parte dei microrganismi del suolo. Questo sito potrebbe essere destinato ad un monitoraggio temporale per valutare l'evoluzione nel tempo della diversità attuale. Nelle figure seguenti sono rappresentati schematicamente i livelli di approfondimento di indagine e le informazioni complessive ricavabili per la definizione di biodiversità attuale ed assoluta.

Nel caso in cui la caratterizzazione tassonomica evidenziasse una popolazione microbica specifica per quelle determinate condizioni, sarebbe interessante procedere ad un monitoraggio spaziale in aree limitrofe al fine di verificare la sua eventuale diffusione. L'individuazione di organismi caratteristici del sito e non rilevati nelle zone limitrofe, consiglia la messa in collezione degli organismi stessi.

## Schema di rappresentazione della biodiversità attuale ed assoluta





## Formule di calcolo degli indicatori e indici con esempi applicativi di un caso studio

Viene di seguito illustrata una procedura interpretativa che combina parametri di tipo chimico e biochimico per la stima della fertilità biologica di un suolo sulla base di intervalli di valori dedotti dalla letteratura, che può costituire la prima base valutativa della fertilità biologica del suolo e quindi il primo passaggio della definizione della diversità microbica genetica e funzionale (Benedetti et al., 2006).

### Indice di Fertilità del Suolo basato sui Parametri Biochimici

I parametri utilizzati per la determinazione di questo indice, e le loro unità di misura, sono riportati nella seguente tabella. 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>
Sostanza organica	S.O.	%
Respirazione basale	C <sub>bas</sub>	ppm
Respirazione cumulativa	C <sub>cum</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 intervalli di valori a ciascuno dei quali viene assegnato il punteggio dell'intervallo a cui appartiene.

<u>Parametri utilizzati</u>	<b>Punteggio</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
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

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

<i>Classe di Fertilità</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>
	stanchezza allarme	stress preallarme	media	buona	alta
<b>Punteggio</b>	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30

**Esempio:**

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

<b>S.O.</b>	<b>C<sub>bas</sub></b>	<b>C<sub>cum</sub></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.

<b><u>Parametri analizzati</u></b>	<b><u>Punteggi assegnati</u></b>
Sostanza organica	2
Respirazione basale	2
Respirazione cumulativa	2
Carbonio microbico	2
Quoziente metabolico	3
Quoziente di mineralizzazione	3
<b>TOTALE</b>	<b>14</b>

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

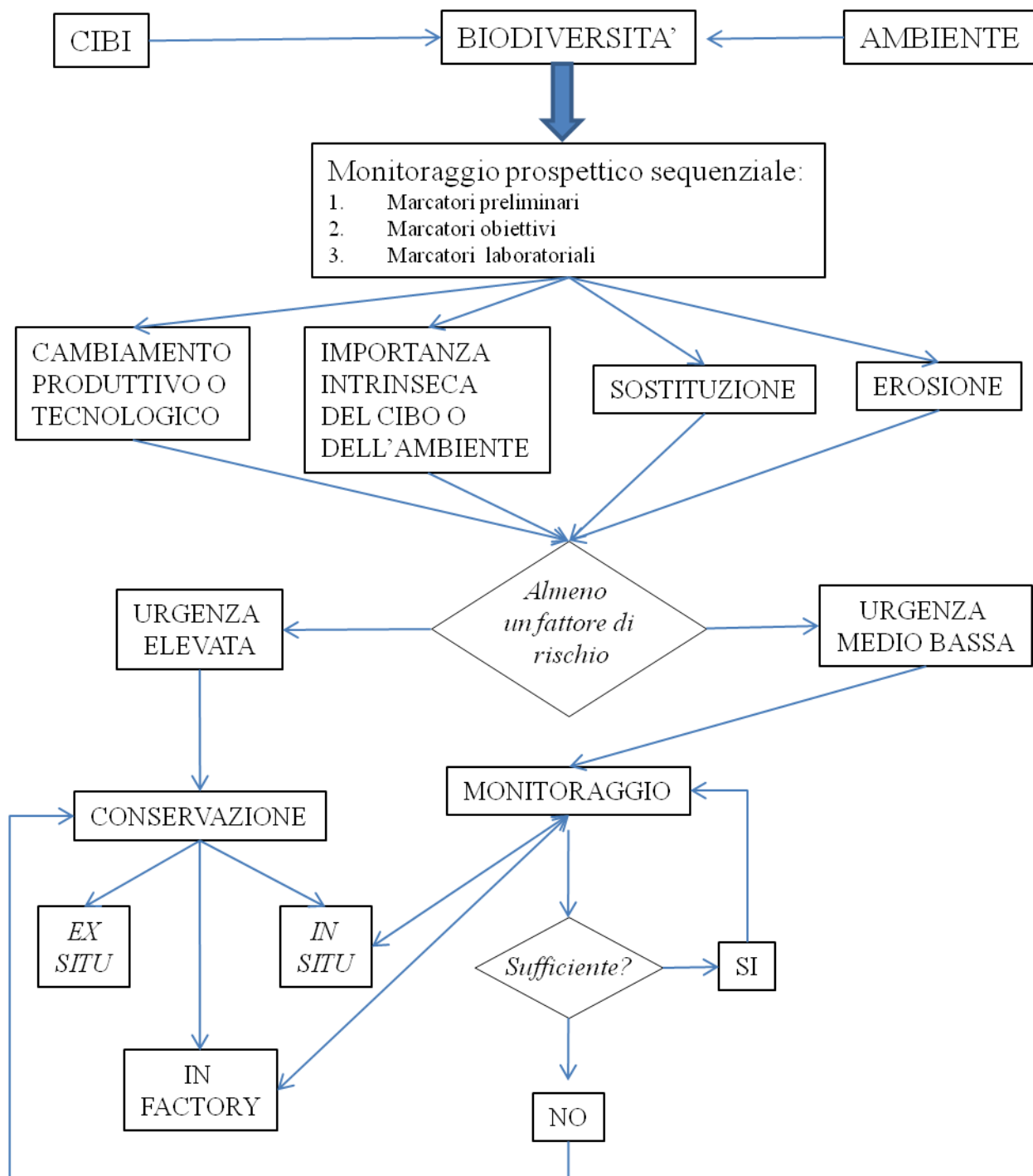
**N.B.**

È consigliabile utilizzare l'indice proposto per suoli a tessitura franco- argillosa e valori di pH compresi tra 6,5 e 7,5. Inoltre è da tenere in considerazione che gli intervalli di valori proposti per i singoli parametri biochimici sono specifici per ambienti dell'area mediterranea. Infine gli stessi sono stati tarati per un tipo di analisi di laboratorio che prevede essiccazione del terreno e ricondizionamento a temperatura ed umidità ottimali per l'attività microbica.

## CONCLUSIONI

Una sintesi per delineare le linee guida finalizzate ad ottimizzare la conservazione sostenibile della biodiversità agraria

### FLOW CHART DECISIONALE PER LA CONSERVAZIONE SOSTENIBILE DELLA BIODIVERSITA' MICROBICA DI INTERESSE AGROAMBIENTALE E ALIMENTARE



Il flow chart presentato cerca di sintetizzare tutto il materiale proposto in questa relazione per trarre delle linee guida dinamiche che funzionino in maniera diversa e appropriata a seconda delle situazioni. Il paragrafo che segue è una breve spiegazione di questa procedura complessa.

1. La **biodiversità** è costituita dalla diversità e dalla variabilità sia di origine **ambientale** che **alimentare**. Sarebbe opportuno considerare anche altre origini, non strettamente agroalimentari da cui trarre biodiversità impiegabile in campo agrario. Nel settore ambientale *sensu lato* esistono tutta una serie di realtà da considerare, la cui biodiversità è impiegabile in campo agrario. Si consideri per esempio la biodiversità che si sta formando nelle discariche, negli impianti di produzione del metano e nei siti inquinati. Tutta questa microflora può essere impiegata per esempio per la valorizzazione *in situ* delle biomasse di scarto delle produzioni agrarie.
2. Il **Monitoraggio** è stato ampiamente descritto nell'obiettivo O1.3. Nell'ambito dell'obiettivo 6 è stata poi discussa la modalità di monitoraggio per prevenire o per lo meno per misurare i fenomeni erosivi e sostitutivi. Il monitoraggio ricorre due volte nel flow chart. Il primo (prospettico) dovrebbe essere una ricognizione veloce e poco costosa basata per lo più su parametri (marcatori) preliminari ed obiettivi, con alcuni approfondimento mediante i marcatori laboratoriali. Il Monitoraggio di controllo (nella parte bassa del grafico) è un monitoraggio specifico funzionale al controllo delle situazioni a rischio e al funzionamento delle conservazioni *in situ* e in-factory. Il Monitoraggio si pone quindi come la misura fondamentale per la conservazione della biodiversità. Esso deve essere quanto più flessibile possibile ed idealmente riducibile ad una sola tecnica (monofasico) per le ragioni spiegate nell'obiettivo 6.
3. I **fattori di rischio** della biodiversità sono stati spiegati nell'ambito dell'obiettivo 6 e possono essere condensati in quattro voci:
  - a. Cambiamento produttivo o tecnologico
  - b. Importanza intrinseca del cibo o dell'ambiente da conservare
  - c. Sostituzione
  - d. Erosione

Tutti i fattori sono ipotizzabili sulla base dei marcatori preliminari ed obiettivi. I marcatori laboratoriali (ed in particolare le tecniche metagenomiche come la DGGE). Debbono essere impiegati o come approfondimento nel monitoraggio prospettico o come sistema monofasico nel monitoraggio di conservazione

4. **Conservazione.** Le tre modalità *in situ*, *ex situ* ed in-factory sono state spiegate nell'ambito dell'obiettivo 5 sui sistemi di conservazione.
5. **Le scelte** di carattere tecnico e politico sono evidenziate in corsivo entro i due rombi.

La prima scelta riguarda la valutazione se esista almeno un singolo fattore di rischio (rombo in alto). La complessità della scelta sta nella valutazione dei dati di monitoraggio che descrivono la situazione della biodiversità microbica, soprattutto se non esistono (come è adesso) degli standard di valutazione e delle condizioni comparabili. Minore il numero di questi standard, maggiore sarà il peso della discrezionalità e della soggettività della scelta. Premesso che tale discrezionalità non può e non deve essere abolita, soprattutto per la fase politica della scelta, una maggior standardizzazione e normalizzazione dei dati non possono che avere effetti altamente benefici. A questo proposito due sono le misure

possibili, una di carattere tecnico-scientifico, l'altra logistico-organizzativo, sottolineando che le due ipotesi dovrebbero essere integrate e non considerate alternative.

- a. **Soluzione tecnico scientifica.** Consiste nel comparare situazioni a diverso livello di rischio con una o pochissime tecniche. Il livello di rischio potrebbe essere espresso come un indice che vari fra 0 e 1 mediante la seguente formula in cui  $R_n$  è il rischio normalizzato  $R_i$  il rischio riscontrato in una data situazione,  $R_{max}$  e  $R_{min}$  il rischio massimo e minimo trovati nel corso di questi studi di messa a punto:

$$R_n = (R_i - R_{min}) / (R_{max} - R_{min})$$

- b. **Soluzione logistico-organizzativa.** Si tratta di mettere a sistema gli enti preposti ed interessati alla tutela della biodiversità in modo da promuovere monitoraggi standardizzati i cui risultati vengano fatti confluire in un database unico ed organizzato in modo da fornire in tempo reale i valori di  $R_{min}$  e  $R_{max}$  di ciascuna situazione alimentare ed ambientale.

La scelta sulla sufficienza del monitoraggio (rombo in basso nello schema) è soggetta come la precedente a soggettività e discrezionalità. Chiaramente la scelta deve tener conto della sostenibilità della scelta sapendo che la conservazione *ex situ* è fortemente limitante dal punto di vista del mantenimento delle effettive risorse genetiche microbiche e che è la più costosa, soprattutto in termini energetici. D'altra parte la conservazione in collezione è la scelta privilegiata nel caso di cambio di tecnologia o di forte rischio erosivo o sostitutivo.

Si tratta quindi di considerare i costi complessivi della forma di conservazione e le effettive risorse disponibili. In taluni casi è ipotizzabile che sia difficile anche effettuare conservazioni *in situ* o *in farm*, per questo si raccomanda fortemente di puntare con decisione sullo sviluppo di effettivi sistemi di monitoraggio che permettano di:

- Conoscere meglio la struttura della biodiversità microbica nei vari ambiti tipologici, geografici e nel suo divenire temporale
- Evitare l'avvio delle procedure di conservazione là dove non siano indispensabili
- Favorire le forme meno costose di conservazione (*in situ* o *in farm*), evidenziando il livello di rischio cui è sottoposta la biodiversità microbica nel corso di tali conservazioni
- Fungere da strumento di supporto all'isolamento per quantificare la porzione di biodiversità microbica effettivamente isolata e messa in collezione.

Da queste considerazioni si evince che una conservazione sostenibile della biodiversità richiede un approccio diverso da quello seguito fino ad ora con il collezionamento affidato solo alla sensibilità dei singoli, ma spesso fortemente ridondante nei molti casi in cui sia stata ripetutamente isolata la stessa sorgente di biodiversità. La forma proposta è quindi quella di favorire la conoscenza della biodiversità e di preferire le conservazioni che lascino libero corso all'evoluzione della biodiversità negli ambienti naturali o antropizzati interessati all'attività agricola. Questo non deve significare eliminare o limitare l'intervento degli agricoltori e dei trasformatori obbligandoli a pratiche non funzionali ed economicamente insostenibili, ma piuttosto vuol dire favorire i tanti operatori agricoli che svolgono la loro attività con scienza e coscienza scoraggiando le forme di "agricoltura da rapina". In estrema sintesi significa ricordare che la biodiversità microbica di interesse agrario non è un ambito prettamente naturale, ma una derivazione della plurimillennaria attività agricola e trasformativa che permette all'Uomo di affrancarsi dalla fame e che ha ben modellato anche il mondo microbico da esso consapevolmente o inconsapevolmente coinvolto nella sua attività, come dimostrato dal peggioramento della biodiversità microbica dei suoli abbandonati.

Infine, è evidente che le operazioni di scelta richiedono una competenza ed una sensibilità che dovrebbe essere supportata da opportuna informazione e soprattutto favorita da una specifica formazione che veda coinvolti i tanti attori interessati al mantenimento e allo sviluppo della biodiversità microbica.

## VI CASI STUDIO

### Caso studio sulla tipicità dei lieviti associati al formaggio e sulla relazione fra variabilità entro specie e diffusione nell'ambiente

(Del Bove, M., Lattanzi, M., Rellini, P., Pelliccia, C., Fatichenti, F. and Cardinali, G. (2009). Comparison of molecular and metabolomic methods as characterization tools of *Debaryomyces hansenii* cheese isolates. *Food Microbiol* **26**, 453-9.)

#### 1. Introduzione

*Debaryomyces hansenii* è una delle specie di lievito prevalente isolate da formaggio (Fadda et al, 2004; Mounier et al, 2006b; Romano et al, 2001). Esercitando una importante attività metaboliche in stagionatura (Bonaiti et al, 2004. Cholet et al, 2007; Kumura et al, 2002; Lopez Del Castillo-Lozano et al, 2007) e nel limitare la crescita di batteri nocivi (Fatichenti et al, 1983). La sua elevata resistenza al cloruro di sodio (Butinar et al, 2005; Corte et al, 2006) rende *D. hansenii* ideale per molti ambienti ricchi di sale (Gadanhó et al, 2003; Seiler e Busse, 1990), tra i quali formaggio è il meglio studiato (Kurtzman e Robnett, 1998).

Questa specie è una componente importante nella produzione di Cheddar e formaggi Gouda, (Viljoen e Greyling, 1995; Welthagen e Viljoen, 1998), nei formaggi a pasta blu (Addis et al, 2001; Besancon et al, 1992; Roostita e Fleet, 1996), nei formaggi stagionati (Corsetti et al.2001; Gente et al, 2007; Leclercq-Perlat et al, 2000; Mounier et al, 2006b; Rea et al, 2007), mozzarella di bufala (Romano et al, 2001) e in diversi tipi di formaggio prodotto con latte di pecora (Pereira-Dias et al.2000), in particolare il formaggio Pecorino italiano (Cosentino et al.2001; Fadda et al, 2004; Gardini et al, 2006). Nonostante la grande quantità di letteratura su *D. hansenii*, pochi studi sono stati dedicati alla differenziazione e distribuzione a livello di ceppo (Petersen et al., 2001, 2002).

Il desiderio di prodotti alimentari di qualità legati alla specifica "terroir" (Barham, 2003) o anche di cibi acquistati presso il loro punto di origine agricola (Gilg e Battershill, 1998) ha portato ad una serie di sforzi per proporre misure affidabili e relativamente poco costose ed a stabilire procedure per la tracciabilità alimentare su una solida base scientifica. Tra le strategie esplorate, particolare attenzione è stata dedicata ai sesquiterpeni come marcatori dell'origine montagna di alcuni tipi di formaggio (Favaro et al. 2005), anche se l'elevata variabilità di composizione di formaggi ha ostacolato lo sviluppo di una procedura generale applicabile ad ogni tipo di formaggio a base di composti queste o simili.

Metabolomica è l'ultima nata della "omiche" le scienze dopo la genomica, la trascrittomica e la proteomica. Profili metabolomici altamente riproducibili sono stati realizzati con la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) e sono stati utilizzati con successo per identificare lieviti e batteri a livello di specie (Helm et al, 1991; Kümmerle et al, 1998; Rudol e Scherer, 2001; Wenning et al, 2006) e in alcuni casi a livello di ceppo (Naumann et al, 1991; Zhao et al, 2004).

L'ipotesi esplorata in questo studio è che i ceppi *hansenii* *D.* possono essere indicatori naturali e onnipresente di origine del formaggio. Questa possibilità si basa sulla presenza di questo lievito in tutti i formaggi studiati e sul fatto che un elevato numero di cellule sopravvivono dopo la maturazione (Mounier et al., 2006a). Abbiamo preso in considerazione diversi tipi di formaggio pecorino prodotto con protocolli diversi in varie regioni italiane per verificare l'ipotesi che esiste una correlazione tra i descrittori di deformazione che caratterizzano e la zona di isolamento. La variabilità all'interno della specie è stata studiata con strumenti molecolari e metabolomici per valutare la diversità a livello del DNA e fenotipico, con il sequenziamento del DNA, il profilo

RAPD, il fingerprint metabolomico FTIR e quello assimilativo. Questo studio ha esaminato 22 ceppi al fine di valutare la presenza di un certo tipo di biodiversità (variabilità) e del suo legame putativo con la zona di isolamento. Sulla base dei risultati ottenuti, ulteriori studi sono stati progettati per studiare la variabilità di *D. hansenii* in modo più sistematico e con strumenti di caratterizzazione più potenti come i micro satelliti. I risultati ottenuti in altri studi (non mostrati in questa sede) con microsattelliti hanno sostanzialmente confermato la struttura della biodiversità di questo lievito nelle zone considerate.

## **2. Materiali e metodi**

### **2.1. Terreni e condizioni di crescita, procedura di pre-identificazione**

I ceppi sono stati coltivati e mantenuti in piastre YEPDA (estratto di lievito 1%, peptone 1% Destrosio 2%, agar 1,7%). Per l'isolamento selettivo il terreno di isolamento IM è stato impiegato (YEPDA piastre sup-plemented con Rosa Bengala 0,025 g / l, 10% NaCl e cloroamphenicolo 0,1 g / l). La pre-identificazione dei ceppi è stata effettuata con prove eseguite su piastre di assimilazione secondo i metodi in Yarrow (Yarrow, 1998), utilizzando le fonti di carbonio di cui alla tabella 1, in particolare quelli che non mostrano variabilità nella descrizione standard della specie. La pre-identificazione è stato utilizzata anche come metodo di dereplicazione al fine di includere solo ceppi putativi di *D.hansenii* nello studio e di escludere quelli appartenenti ad altre specie. L'Identificazione è stata confermata dal sequenziamento del 26S, dominio D1/D2, come descritto di seguito.

La biomassa per l'analisi FTIR è stata ottenuta con il terreno per metabolomica (MM: YEPDA senza peptone). Le cellule sono state coltivate su una precoltura di MM per 24 ore e poi trasferite in una piastra fresca MM per altre 24 ore. Questo metodo con due successive crescita di 24 h assicura che le cellule siano raccolte nelle stesse condizioni fisiologiche e che le differenze tra spettri si verifichino solo per la diversa disposizione metabolomica caratteristica del ceppo. La crescita, l'isolamento e l'assimilazione sono state effettuate a 25°C. I risultati delle assimilazioni sono stati letti dopo 2 e 4 giorni.

### **2.2. Campionamento**

Campioni di formaggio pecorino sono stati raccolti direttamente dai produttori, conservati in modo asettico in sacchi sterili e mantenuti in una scatola di ghiaccio per il trasporto al laboratorio. Al fine di evitare la contaminazione incrociata, la parte esterna del campione è stato rimossa con lame flambate prima della escissione sterile dei pezzi impiegati nella procedura di isolamento.

### **2.3. Isolamento selettivo**

Circa un grammo di ogni campione è stato mescolato con 9 ml di acqua sterile e omogeneizzato per 3 minuti con un frullatore da laboratorio. La sospensione è stata diluita e poi piastrata su piastre IM. Dopo la crescita, le colonie sono state oggetto di una procedura di re-isolamento per garantire la purezza microbiologica e poi sono state mantenute sui piastre YEPDA per brevi periodi a 4 ° C, mentre il congelamento rapido a 80 ° C in glicerolo 17% è stato utilizzato per la conservazione a lungo termine.

### **2.4. RAPD-PCR e sequenziamento del DNA ricombinante**

Il DNA è stato estratto come precedentemente descritto (Bolano et al, 2001;. Cardinali et al, 2001).L' amplificazione di PCR è stata condotta con un PTC 100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc. Waltham, Massachusetts-USA). Due amplificazioni RAPD sono state effettuate: una con i primer M13m (50 - GAG GGT GGC GGT TC -30) e Rp 11 (50 - GAA ACT CGC CAA G - 30), l'altra con i primer RP8 (50 - AGA TTC TTG GCA C - 30) e RP9 (50 - AAA CCA CGA GAT



C -30). Il DNA è stato amplificato per 35 cicli (denaturazione, 94 °C per 1 min; annealing a 38° C per 1 min; elongation a 72° C per 1 min) seguito da un singolo ciclo di elongation da 15 minuti a 72 °C. Gli ampliconi sono stati sottoposti a elettroforesi su gel in 1 % di agarosio gel pre-colorati con etidio bromuro. Le immagini dei gel sono state digitalizzate con una macchina fotografica Kappa (Kappa GmbH -. Germania, [www.kappa.de](http://www.kappa.de)). Il dominio D1/D2 del 26S rDNA è stato amplificato e sequenziato secondo la procedura precedentemente descritta da Kurtzman (Kurtzman e Robnett, 1998). L'analisi delle sequenze è stata effettuata con BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Geneious (<http://www.geneious.com>).

## 2.5. Analisi FTIR

Le misure FTIR di ogni ceppo sono state effettuate su tre sospensioni di cellule indipendenti, usando uno spettrofotometro a infrarossi FTIR Tensor 27 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germania), la lettura è stata effettuata nel range tra 4000 e 400 cm<sup>-1</sup> in modalità di trasmissione, con 4 cm<sup>-1</sup> di risoluzione spettrale. Ogni spettro è la media di 64 campionamenti. Le analisi preliminari (prima correzione derivati e di base) sono state effettuate con il software OPUS 6.5 (Bruker).

## 2.6. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software libero "R" (<http://cran.r-project.org/>). I bandeggi RAPD sono stati trans-formati in matrici binario segnalato la presenza della bande come "1" e la sua assenza come "0" con il software ClassMaker (Cardinali et al., 2003). Le distanze tra i ceppi sono stati calcolati dalle matrici RAPD binaria con la funzione *dist.* utilizzando il coefficiente di Gower e Legendre implementato nel pacchetto ADE4 del CRAN.

Le matrici di distanza degli spettri sono stati ottenute con la funzione *dist.* (distanza euclidea). Le matrici di distanza da RAPD e FTIR sono stati elaborati l'Analisi delle Coordinate Principali (PCoA) (Legendre e Legendre, 1998).

## 3. Risultati

### 3.1. Isolamento e identificazione convenzionale

Circa 50 ceppi di lievito sono stati isolati da Pecorino di 10 regioni d'Italia (Fig. 1). Tra tutti gli isolati 22 ceppi hanno mostrato un profilo assimilativo compatibile con quello di *D. hansenii* e sono stati utilizzati in questo studio preliminare. I profili di assimilazione (Tabella 1) hanno indicato che tutti i ceppi condividano nove caratteri positivi e uno negativo non-variabile con il ceppo tipo (Nakase et al., 1998). alcuni ceppi, compreso il ceppo tipo, sono cresciuti su raffinose, D-mannitolo, succinato e xilosio meno vigorosamente rispetto agli altri (Tabella 1). Altri cinque fonti di carbonio (amido solubile, ribosio, lattosio, ramnosio e il citrato), che non erano necessariamente assimilati dai ceppi impiegati nella descrizione delle specie (Nakase et al., 1998), sono risultati variabili anche per i 22 ceppi analizzati. In effetti, le prime tre fonti sono state utilizzate dalla maggior parte degli isolati, mentre il mannosio e citrato sono stati metabolizzati solo da sette e due ceppi, rispettivamente (tabella 1). I sette ceppi isolati nei dintorni di Norcia e Sellano (30 km di distanza) hanno mostrato un modello identico assimilazione a queste cinque variabili di carbonio, con la sola differenza che i due ceppi di Sellano assimilare ramnosio, mentre quelli di Norcia no.

I rappresentanti di ciascun gruppo geografico sono stati oggetto di identificazione molecolare mediante sequenziamento diretto del dominio D1/D2 del DNA che codifica per il 26S RNA. Le sequenze lunghe 570 bp hanno mostrato una assoluta identità al ceppo tipo CBS 767 (dati non riportati), confermando l'identificazione preliminare che ha assegnato questi isolati alla specie *D. hansenii*. D'altra parte, questi risultati indicano la mancanza di variabilità molecolare nel dominio D1/D2 di questa specie come precedentemente trovato con analisi preliminari delle sequenze depositate in GenBank.

### 3.2. Analisi molecolare

Ventidue formaggi isolati sono stati sottoposti a finger-print molecolare utilizzando due procedure adoppio primer RAPD consistenti in due amplificazioni indipendenti, ciascuna con due primer. La prima coppia di primer (RP8 e RP9) ha prodotto solo quattro bande, di cui i tre maggiori erano presenti in 3 ceppi, rispettivamente LCF552, 561 e LCF LCF 562. È interessante notare che questi ceppi (LCF 552, LCF 561 e LCF562) sono stati isolati in uno spazio ristretto di circa 70 km di larghezza. L'altra coppia di primer (M13m e RP11) ha prodotto 13 bande diverse, precisando il particolare efficacia della coppia M13m più RP11. L'utilizzo di queste due coppie di primer era dovuto alla constatazione che ogni doppio innescato RAPD prodotto più bande che la somma dei due amplificazione RAPD con un singolo primer (risultati non mostrati). I profili dei bandeggi sono stati analizzati con il software ClassMaker (Cardinali et al., 2003), ottenendo una matrice binaria in cui è stata segnalata la presenza della bande come "1" e l'assenza come "0". La matrice binaria è stata elaborata con la funzione binaria *dist* del "pacchetto" ADE4 di "R" per ottenere una matrice triangolare di distanza da impiegare come input del della PCoA. Gli autovalori delle prime due dimensioni sono state tracciate per ottenere la dispersione riportata in Fig. 3. L'ispezione di questa foto indica che tutti i ceppi da Norcia, anche se non identici, sono abbastanza simili e formare un cluster stretto, lontano da tutti gli altri ceppi. I due ceppi di Sellano (LCF LCF 420 e 423) sono posti relativamente vicini l'uno all'altro, ma distante dal cluster di Norcia, anche se i caseifici di isolamento sono vicini e le tecnologie di produzione apparivano essere estremamente simili. Sul lato superiore sinistro del grafico, i tre ceppi provenienti dalla regione Marche (LCF 409, 411 e LCF LCF 415) formano un altro gruppo vicino ai quattro ceppi provenienti da caseifici vicini ad Orvieto (LCF LCF 551 e 552) e Pienza (LCF LCF 561 e 562). La parte centrale del grafico è occupata da due ceppi isolati da formaggio sardo (LCF LCF 557 e 558) e dalla zona intorno a Roma (LCF 387). È utile sottolineare che il formaggio Pecorino Romano è prodotto nelle regioni Sardegna e Lazio (la regione in cui si trova Roma) e nella parte meridionale della Toscana con tecniche molto simili.

Quattro ceppi piuttosto correlati sono stati isolati dalla parte meridionale della Toscana (LCF 445 e 454 LCF di Pienza) e dal nord di questa regione (LCF 554 e 555 da Livorno). Il ceppo trovato solo in un formaggio piemontese (LCF 373) è tra il gruppo Sardegna - Roma e il cluster Toscana.

### 3.3. Analisi metabolomica

La Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) è una tecnica promettente per il fingerprinting metabolomico di cellule microbiche intatte, che permette ai ricercatori di caratterizzare i microbi sulla base del loro fenotipo. I 22 isolati e il ceppo tipo sono state oggetto di FTIR, producendo spettri simili a quelle mostrate in fig. 2. Questi spettri esposti alta riproducibilità, come dimostra il brano quasi identico delle tre repliche (Fig. 2). Inoltre, alcune regioni tipiche contengono la variabilità spettrale sufficiente a discriminare tra ceppi (vedi pannelli ingrandimento della fig. 2). Il PCoA indica che la tecnica FTIR esplica un grande livello di variabilità tra i ceppi, di ossia il 58,07% e il 20,73% sul ascisse e sulle ordinate, rispettivamente (Fig. 3). I ceppi sono risultati meno chiaramente separati da questa tecnica che dal RAPD, anche se i ceppi isolati nelle vicinanze sono stati generalmente riconosciuti vicini secondo la PCoA. Il gruppo di Norcia non è stata separata in modo efficiente e si sovrappone parzialmente a quella di Pienza, Orvieto e ad un isolato dalla regione Marche (LCF 411). Due dei quattro ceppi di Pienza (LCF LCF 454 e 561) sono quasi indistinguibili, anche se isolati in due diverse campagne a diversi mesi di distanza. Per contro, due ceppi isolati contemporaneamente dallo stesso caseificio, LCF 557 e LCF 558 (entrambi provenienti dalla Sardegna), sembrano piuttosto lontani secondo l'elaborazione

statistica. È interessante notare che il tipo di ceppo CBS 767, che è stato isolato fuori d'Italia alcuni decenni fa (si veda la <http://www.cbs.knaw.nl/lievito/> URL. NL / lievito / per ulteriori dettagli), era l'unico punto piuttosto isolato nel diagramma PCoA (Fig. 4).

Questi risultati sono stati ottenuti impiegando le informazioni da tutto lo spettro, anche se risultati simili sono stati prodotti da specifiche zone spettrali o combinazioni di esse, come suggerito da altri autori (Naumann et al., 1991).

Anche se il RAPD ha mostrato un segnale geografico piuttosto chiaro, i profili metabolomici hanno evidenziato alcune caratteristiche interessanti. Una è il fatto che il tipo di ceppo CBS 767 è chiaramente separata dai ceppi italiani mediante FTIR e non dal RAPD. Un altro esempio è la capacità di analisi IR di discriminare tra LCF 561 e 562 LCF, altrimenti identici secondo la tecnica RAPD. Infine, il gruppo di Norcia e che da Sellano, che dovrebbero essere simili, risultano più diversi secondo la tecnica RAPD che secondo la FTIR.

#### 4. Discussione

La presenza di *D. hansenii* come lievito predominante in vari tipi di formaggi è stata studiata approfonditamente, anche se poco si sa sulla variabilità dei ceppi appartenenti alla specie. Questo studio ha lo scopo di esplorare l'ipotesi che la variabilità del ceppo è in qualche modo legata alla distribuzione geografica e alla tecnologia formaggio. Quattro gruppi di variabili sono state considerate: assimilazioni fonte di carbonio, la sequenza di dominio D1/D2, RAPD e fingerprint metabolomico mediante FTIR. Nel complesso queste tecniche forniscono due marcatori genomici e due descrittori fenotipici. Il dominio D1/D2 non ha mostrato variabilità tra i ceppi studiati e serve solo per confermare l'identificazione del ceppo. Questo risultato è stato confermato da una analisi delle sequenze del *D. hansenii* in BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dove poco se si trova una variazione tra gli depositati ceppi di questa specie, ulteriormente confermando una osservazione iniziale di forte omogeneità di 26S DNA in specie *Debaryomyces* (Kurtzman e Robnett, 1998). D'altra parte, il contributo delle fonti di carbonio variabile assimilate era molto povera, per il limitato numero di caratteri utilizzati, ma anche per l'instabilità noto dei tratti assimilativi delle specie di lievito (Scheda e Yarrow, 1966).

Sebbene l'analisi RAPD non è più considerata uno degli strumenti più potenti dell'arsenale attuale del biologo molecolare dei lieviti, l'uso combinato di due o più primer è in grado di aumentare il numero di bande amplificate. In questo studio, l'uso contemporaneo di due distinti gruppi di primer ha prodotto 17 gruppi, sufficienti a discriminare tra la maggior parte dei ceppi oggetto di studio.

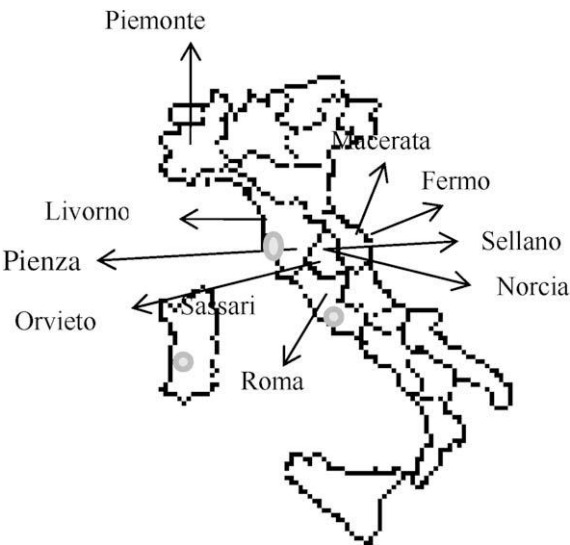
Il fatto che solo i ceppi di Norcia sono ben risolti da altri può essere spiegata in almeno due modi. In primo luogo, è possibile che questo approccio RAPD non garantisca una risoluzione sufficiente per separare ceppi isolati da zone di produzione vicine. In secondo luogo, la similarità complessiva (o la non discriminabilità) dei ceppi di tutte le zone diverse da Norcia può essere dovuta al fatto che negli ultimi decenni pastori sardi e pecore Sarde si sono sparsi in varie parti del centro Italia, portando con sé la propria tecnologia e, possibilmente, i ceppi associati con il loro ambiente. L'ipotesi che le pecore possono essere in qualche modo portatrici di *D. hansenii* sembrava essere esclusa dalla prova che non si è mai potuto isolare un ceppo di questa specie da pecora, latte crudo o anche dalle mani del pastore (dati non riportati). Nel complesso, sembra possibile che questa specie di lievito tecnologicamente importante si comporti come un contaminante ambientale e venga inoculato accidentalmente nel formaggio durante le prime fasi della maturazione o anche durante la formazione della cagliata. Tuttavia, la PCoA dei dati RAPD ha mostrato che i ceppi dalla zona di Norcia sono molto diversi dagli altri a livello del DNA, sottolineando che questo prodotto è in realtà

tipico e collegato al suo distretto. L'evidenza che i ceppi isolati in Sellano, a pochi chilometri da Norcia, erano abbastanza discriminati ha ulteriormente confermato questa conclusione. Tuttavia, i ceppi di località diverse da Norcia sono stati raggruppati in un modo fortemente legato alla distribuzione geografica delle aree di isolamento, tra cui spiccano la somiglianza dei ceppi da Roma, la Sardegna e la Toscana meridionale, che rientrano nella stessa zona tipica di produzione. Nel complesso, l'ipotesi che qualche fenomeno abbia permesso la diffusione di ceppi simili, al di là delle aree di produzione dei prodotti tipici, sembrava più probabile piuttosto che la limitata risoluzione inerente alla tecnologia RAPD per spiegare le distribuzioni dei ceppi sopra descritte. Questo problema deve essere ulteriormente affrontato con strumenti molecolari più potenti, tra cui alcuni marcatori codominanti, come microsatelliti, al fine di ottenere maggiore risoluzione e ulteriori approfondimenti sui meccanismi genetici coinvolti nel fenomeno che governa la presenza di ceppi simili in aree vicine.

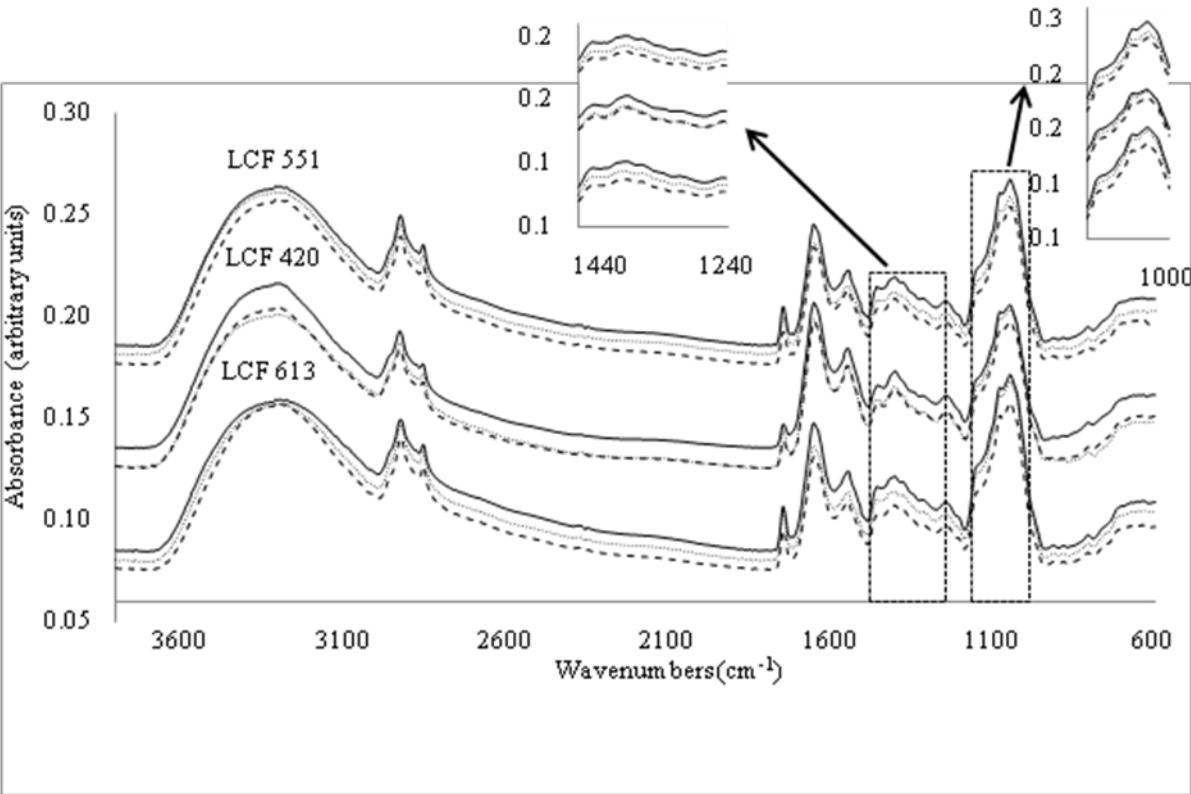
L'analisi metabolomica non ha mostrato un chiaro segnale geografico, tuttavia, gli spettri IR sono stati in grado di discriminare i ceppi che erano identici secondo la RAPD, come LCF 561 e 562 LCF, i quali sono peraltro discriminati da due caratteri di assimilazione, di cui uno, il lattosio, particolarmente importante per l'industria lattiero-casearia (Tabella 1). In generale, questi dati suggeriscono che la caratterizzazione del ceppo secondo la RAPD e la FTIR sono poco correlabili. In effetti, la tecnica molecolare è piuttosto sensibile alle origini di isolamento, mentre il metodo di metabolomica permette una differenziazione ceppo più fine. Questo significa che i ceppi considerati identici sulla base di RAPD mostrano qualche differenza metabolomica. Questo fatto sembra importante perché significa che la FTIR offre un potente strumento di discriminazione, e, cosa più importante, perché può evidenziare le differenze metabolomiche e fisiologiche che rappresentano le caratteristiche più importanti di microbi utilizzati nell'industria alimentare. Inoltre, il fatto che la PCoA dei dati FTIR spieghi il 78% della variabilità complessiva indica che questa tecnica può produrre clustering più affidabile rispetto al RAPD, che ha prodotto una PCoA clustering con solo il 51% di variabilità nei due assi. Questa ipotesi è degna di ulteriore approfondimento in luce del fatto che il fenotipo metabolomico evidenzia differenze fenotipiche condizionate dalle condizioni selettive come quelle imposte dalle tecnologie di produzione. Viceversa i marcatori RAPD non sono necessariamente condizionati dalla selezione, ma piuttosto da fenomeni di deriva genetica causata dalla segregazione parziale dei ceppi in caseifici diversi.

Nonostante il numero limitato di campioni non permetta di effettuare una correlazione affidabile fra assimilazioni, metabolomica e RAPD, i dati presentati indicano che questi tre approcci per la caratterizzazione ceppo specifica meritano ulteriori studi e confronti.

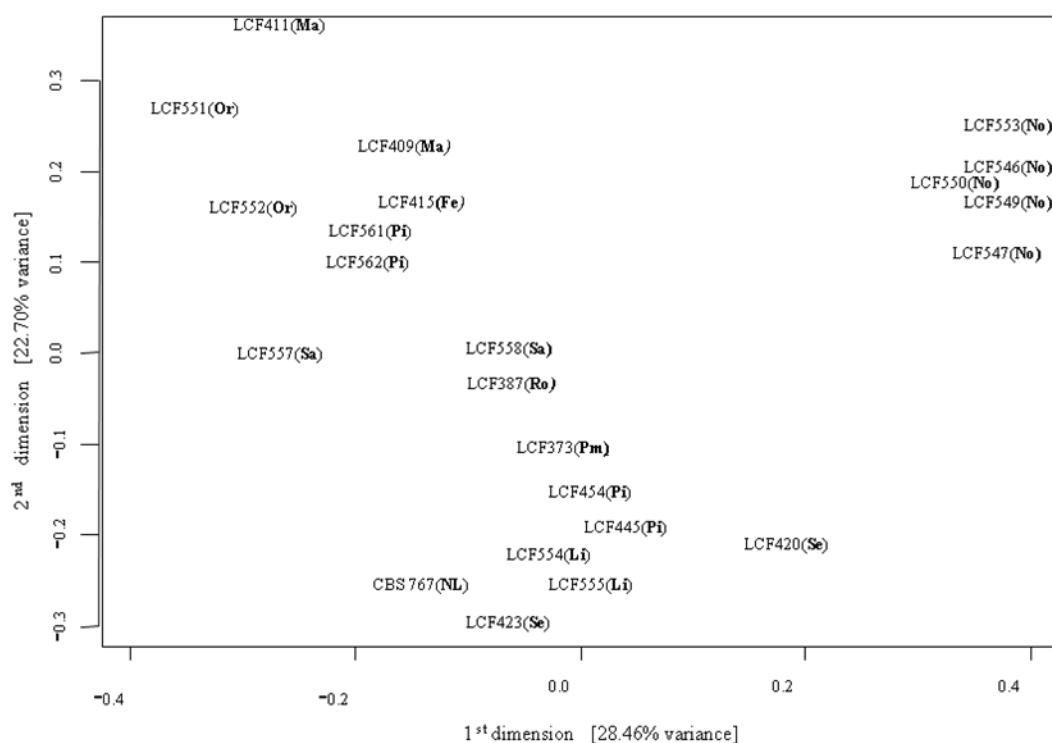
**Figura 1: Zone di isolamento dei formaggi**



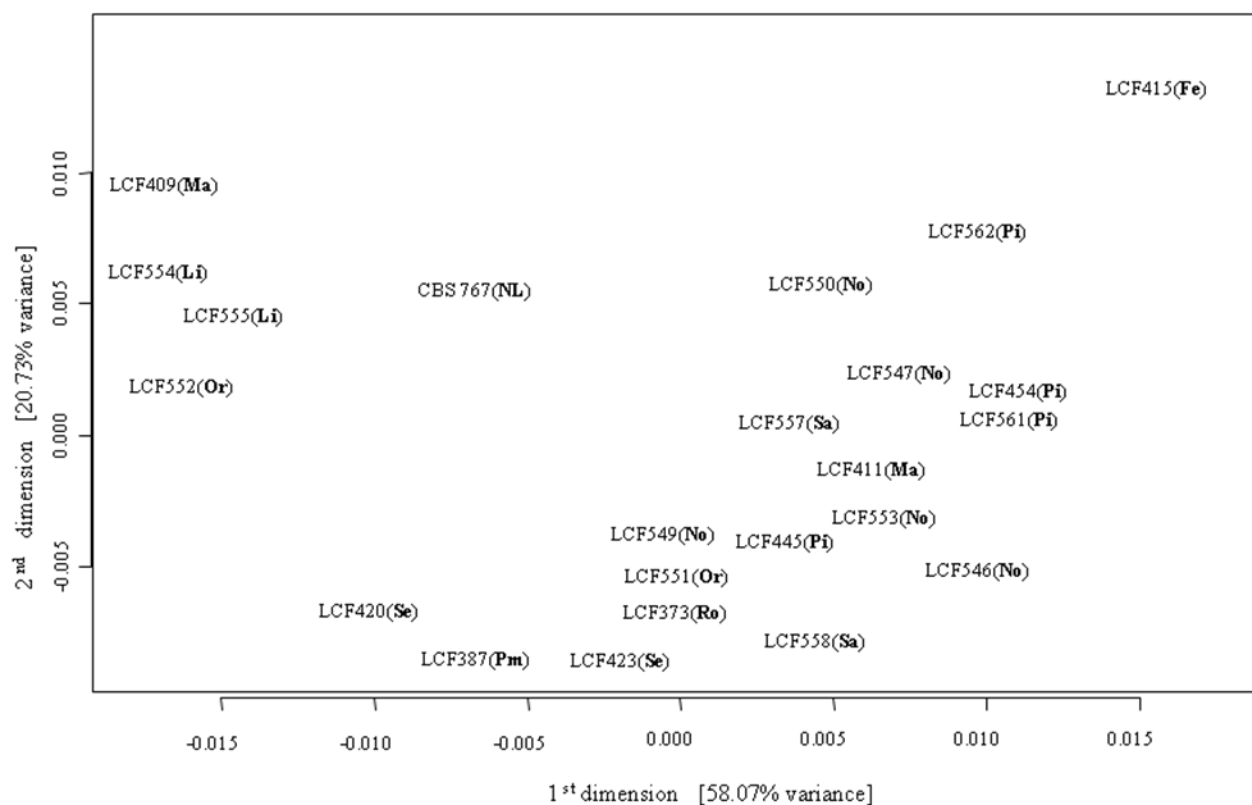
**Fig. 2 Spettri FTIR**



**Fig. 3 . PCoA dei dati RAPD**



**Fig. 4 PCoA dei dati FTIR**



**Tabella 1. Ceppi usati e loro assimilazioni**

strain	locale of isolation	Type of cheese	Glucose	Galactose	Sucrose	Maltose	Trehalose	Cellobiose	Raffinose	D-Mannitol	Succinate	D-Xylose	Inositol	Starch	D-Ribose	L-Rhamnose	Lactose	Citrate
LCF 373	Piemonte	Pecorino of Bagnolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
LCF 387	Roma	Pecorino Romano DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	-	+	+	-	+	-
LCF 409	Macerata	Pecorino Dolce Nero	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
LCF 411	Macerata	Pecorino Dolce Nero	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	-	-	+	-	+	-
LCF 415	Fermo	Pecorino Dolce Rosso	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 420	Sellano	Partially aged Pecorino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
LCF 423	Sellano	Partially aged Pecorino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
LCF 445	Pienza	Pecorino Toscano DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	-	-	+	-	+	-
LCF 454	Pienza	Pecorino Toscano DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
LCF 546	Norcia	Pecorino of Norcia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 547	Norcia	Pecorino of Norcia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 549	Norcia	Pecorino of Norcia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 550	Norcia	Pecorino of Norcia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 551	Orvieto	Pecorino of Orvieto	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	-	-	+	-	+	-
LCF 552	Orvieto	Pecorino of Orvieto	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 553	Norcia	Pecorino of Norcia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 554	Livorno	Pecorino Toscano DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
LCF 555	Livorno	Pecorino Toscano DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
LCF 557	Sardegna	Pecorino Sardo DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
LCF 558	Sardegna	Pecorino Sardo DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
LCF 561	Pienza	Pecorino Toscano DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	-	+	+	-	-	-
LCF 562	Pienza	Pecorino Toscano DOP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>CBS767</b>	<b>Denmark</b>	<b>Strain Type</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	w	+	-

## Bibliografia

1. Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolak, D., Leung, T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 25–36.
2. Barham, E., 2003. Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. *J. Rural Stud.* 19, 127–138.
3. Besancon, X., Smet, C., Chabalier, C., Rivemale, M., Reverbel, J.P., Ratomahenina, R., Galzy, P., 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 9–18.

4. Bolano, A., Stinchi, S., Preziosi, R., Bistoni, F., Allegrucci, M., Baldelli, F., Martini, A., Cardinali, G., 2001. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. 1, 221–224.
5. Bonaiti, C., Leclercq-Perlat, M.N., Latrille, E., Corrieu, G., 2004. Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: relative humidity and temperature influences. J. Dairy Sci. 87, 3976–3988.
6. Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., Gunde-Cimerman, N., 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. FEMS Microbiol. Lett. 244, 229–234.
7. Cardinali, G., Bolano, A., Martini, A., 2001. A DNA extraction and purification method for several yeast genera. Ann. Microbiol. 51, 121–130.
8. Cardinali, G., Maraziti, F., Selvi, S., 2003. Electrophoretic data classification for phylogenetics and biostatistics. Bioinformatics 19, 2163–2165.
9. Cholet, O., Henaut, A., Casaregola, S., Bonnarne, P., 2007. Gene expression and biochemical analysis of cheese-ripening yeasts: focus on catabolism of L-methionine, lactate, and lactose. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2561–2570.
10. Corsetti, A., Rossi, J., Gobbetti, M., 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. Int. J. Food Microbiol. 69, 1–10.
11. Corte, L., Rellini, P., Lattanzi, M., Picchetta, C., Fatichenti, F., Cardinali, G., 2006. Diversity of salt response among yeasts. Ann. Microbiol. 56, 363–368.
12. Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Mulargia, A.F., Palmas, F., 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. Int. J. Food Microbiol. 69, 53–58.
13. Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M., Cosentino, S., 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. Int. J. Food Microbiol. 95, 51–59.
14. Fatichenti, F., Bergere, J.L., Deiana, P., Farris, G.A., 1983. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. J. Dairy Res. 50, 449–457.
15. Favaro, G., Magno, F., Boaretto, A., Bailoni, L., Mantovani, R., 2005. Traceability of Asiago mountain cheese: a rapid, low-cost analytical procedure for its identification based on solid-phase microextraction. J. Dairy Sci. 88, 3426–3434.
16. Gadanho, M., Almeida, J.M., Sampaio, J.P., 2003. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. Antonie Van Leeuwenhoek 84, 217–227.
17. Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. Food Microbiol. 23, 641–648.
18. Gente, S., Larpin, S., Cholet, O., Gueguen, M., Vernoux, J.P., Desmasures, N., 2007. Development of primers for detecting dominant yeasts in smear-ripened cheeses. J. Dairy Res. 74, 137–145.
19. Gilg, A.W., Battershill, M., 1998. Quality farm food in Europe: a possible alternative to the industrialised food market and to current agri-environmental policies: lessons from France. Food Policy 23, 25–40.
20. Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D., 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J. Gen. Microbiol. 137, 69–79.



21. Kummerle, M., Scherer, S., Seiler, H., 1998. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2207–2214.
22. Kumura, H., Takagaki, K., Sone, T., Tsukahara, M., Tanaka, T., Shimazaki, K., 2002. Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1370–1373.
23. Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371.
24. Leclercq-Perlat, M.N., Oumer, A., Buono, F., Bergere, J.L., Spinnler, H.E., Corrieu, G., 2000. Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of soft smear cheese from reconstituted milk: protein degradation. *J. Dairy Sci.* 83, 1674–1683.
25. Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*, second English ed. Elsevier Science B.V.
26. Lopez Del Castillo-Lozano, M., Delile, A., Spinnler, H.E., Bonnarne, P., Landaud, S., 2007. Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine–cysteine mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1447–1454.
27. Mounier, J., Fitzgerald, G.F., Cogan, T.M., 2006a. Survival of surface ripening cultures during storage and monitoring their development on cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 425–431.
28. Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Brennan, N.M., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F., Cogan, T.M., 2006b. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.* 101, 668–681.
29. Nakase, T., Suzuki, M., Phaff, H.J., Kurtzman, C.P., 1998. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier, pp. 157–173.
30. Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351, 81–82.
31. Pereira-Dias, S., Potes, M.E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes'cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 55–63.
32. Petersen, K.M., Moller, P.L., Jespersen, L., 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 11–24.
33. Petersen, K.M., Westall, S., Jespersen, L., 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.* 85, 478–486.
34. Rea, M.C., Gorges, S., Gelsomino, R., Brennan, N.M., Mounier, J., Vancanneyt, M., Scherer, S., Swings, J., Cogan, T.M., 2007. Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *J. Dairy Sci.* 90, 2200–2210.
35. Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Suzzi, G., 2001. Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 45–51.
36. Roostita, R., Fleet, G.H., 1996. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 393–404.

37. Rudol, M., Scherer, S., 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. Int. J. Food Microbiol. 63, 91–98.
38. Sceda, R., Yarrow, D., 1966. The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts. Arch. Mikrobiol. 55, 209–225.
39. Seiler, H., Busse, M., 1990. The yeasts of cheese brines. Int. J. Food Microbiol. 11, 289–303.

#### **SINTESI DEI CASI STUDIO IN MICROBIOLOGIA ALIMENTARE : UN PARADIGMA**

Nel caso della prospezione della biodiversità alimentare è opportuno avviare lo studio con una disanima di alcuni marcatori preliminari minimi . Nella tabella “SINTESI DEI CASI STUDIO” sono riportati i rilievi effettuate per situazioni-tipo di tte delle maggiori filiere agroalimentari italiane.

**Tabella SINTESI DEI CASI STUDIO** Descrizione sintetica dello stato delle conoscenze della biodiversità microbica in cinque diverse filiere alimentari.

<b>PARAMETRI</b>	<b>VINO DOC (caso del Sagrantino)</b>	<b>Vino DOC mediamente noto</b>	<b>Pecorino (es. Norcia)</b>	<b>Grana o Parmigiano Reggiano</b>	<b>Pane a lievitazione naturale</b>
Risorsa presente nel territorio di origine o reintrodotta in/da un altro territorio	SI	SI	SI	si	SI
Tempo di presenza del prodotto nel suo territorio	> 100 anni	nd	>100 anni	>100 anni	>100 anni
Entità del legame della risorsa con il territorio	ALTO	MEDIO	Elevatissimo	alto	Elevato
Disponibilità di documentazione storico/archivistica a supporto del legame del prodotto con il territorio ed elementi a sostegno della “autenticità” di quella risorsa genetica	SI	NON SEMPRE	parziale	si	SI
Rischio presuntivo di sostituzione ed erosione della risorsa	ALTA	ALTISSIMA	ALTA	medio	ALTA
interventi di salvaguardia presenti	POCHI (un collezionamento <i>ex situ</i> )	NESSUNO	POCHI E NON COORDINATI	Presenti ma nono coordinati	BUONIE COORDINATI
Valorizzazione commerciale del prodotto	OTTIMA	VARIABILE	MEDIA	alta	OTTIMA

Pressione del mercato e gli starter sulla risorsa genetica	ALTISSIMA	ALTISSIMA	ALTISSIMA	media: presenza di limiti nel disciplinare	PARZIALE
Presenza di marchi UE (IGP, DOP, IGP, ecc.) o altri marchi di tipo commerciale, di filiera, locali	SI	SI	SI	si	SI
Attività di caratterizzazione	BUONA (in fase di introduzione nella collezione manca un monitoraggio standard)	QUASI MAI	POCA (VEDI CASO STUDIO)	buona (progetti MIPAF )	BUONA
Iniziative di conservazione anche congiunte	Collezioni parziali	Nessuna	SCONOSCIUTE	Collezioni parziali	COLLEZIONI DISLOCATE PRESSO ALCUNI CENTRI DI RICERCA MA NON RICONOSCIUTE E COORDINATE
Risorsa inserita nella Misura 214 dei PSR	SI	TALVOLTA	NON RISULTA		NON RISULTA
Stato dell'abbandono della trasformazione autoctona	ELEVATO	QUASI TOTALE	ELEVATO	limitato	MODESTO
Capacità degli operatori a gestire tali risorse genetiche	BASSA	BASSA	BASSO/VARIABILE	bassa	BASSO

## VI. 2 Fumigazione del suolo mediante bromuro di metile.

Il caso studio è relativo ad una situazione colturale particolare, per oltre venti anni è stato infatti utilizzato per la disinfestazione delle colture della carota, bromuro di metile. Si riporta una sintesi del lavoro:

Mocali S., Paffetti D., Emiliani G., Benedetti A., Fani R. (2008): “*Diversity and dynamics of microbial communities isolated from soils treated with fumigant agents*”. *Biology and Fertility of Soil* 44, 557-569.

### Riassunto

Una combinazione di tecniche di biologia molecolare e microbiologia classica è stata utilizzata per studiare la composizione, la struttura, la diversità e le dinamiche della comunità coltivabile aerobica eterotrofa batterica isolata da cinque diversi campioni di terreno trattati con l'agente fumigante 1,3-dicloropropene (1,3-D) e in seguito sottoposti a differenti ammendamenti (C2 e C4) e fertilizzazione ( $F + C$  e NPK) in due periodi diversi (maggio e luglio). L'analisi di restrizione e la sequenza del gene 16S rDNA effettuati su 189 isolati hanno rivelato una percentuale molto alta (94%) di batteri Gram-positivi, molti dei quali (83%) appartenenti al genere *Bacillus*. Il grado di diversità genetica intraspecifica è stata elevata, come dimostrano le analisi del DNA. Questi dati sembrano essere correlati con l'aumento del contenuto della biomassa microbica C ( $C_{mic}$ ) e la diminuzione del C organico ( $C_{org}$ ) e del quoziente metabolico ( $qCO_2$ ). La presenza di un'altissima percentuale di batteri Gram-positivi potrebbe essere correlata alla capacità di sporulazione di questi batteri tale da renderli resistenti ai fumiganti, piuttosto che di una pressione selettiva dei geni coinvolti nella biodegradazione di 1,3-D.

**Parole chiave** Biodiversità, fumiganti, fertilità del suolo.

### Introduzione

Uno dei problemi più importanti nella produzione vegetale è rappresentato da parassiti delle piante quali nematodi (Baldwin et al. 2004). In particolare, il nematode *Heterodera carotae* provoca danni nella coltura della carota. Per molti anni, il fumigante bromuro di metile (MeBr) è stato utilizzato per fornire un efficace controllo dei nematodi nei terreni agricoli. Tuttavia, è stato riconosciuto avere effetti negativi sull'ozono stratosferico (Park et al 2004; Prather et al 1984.), Di conseguenza, secondo il protocollo di Montreal (1997), è stato gradualmente posto fuori uso in Europa e negli USA.. La maggior parte dei fumiganti comunemente utilizzati per sostituire MeBr possono avere ampia attività biocida nei terreni agricoli (Giannakou et al. 2002), ma i loro effetti sulla microflora del suolo sono ancora largamente sconosciuti. L'applicazione ripetuta di fumiganti su suoli agricoli per molti anni può modificare la diversità microbica del suolo, la biomassa e l'attività con effetti indiretti sulla "qualità" del suolo che, secondo Doran e Parkin (1994), può essere definita come "La capacità del suolo di interagire con l'ecosistema al fine di mantenere la produttività biologica, qualità dell'ambiente e promuovere la salute animale e vegetale".

Recentemente, gli effetti della 1,3-dicloropropene (1,3-D), isotiocianato di metile e cloropicrina sulla struttura della comunità microbica del terreno sono stati studiati utilizzando l'approccio sia della cultura-dipendente sia della cultura indipendente (Al Ibekwe et al. 2001a). E' stato dimostrato che i batteri Gram-positivi sono sopravvissuti meglio di quelli Gram-negativi al trattamento fumigante e che 1,3-D è stato il fumigante meno efficace nella modificazione della struttura della comunità microbica del terreno. Ibekwe et al. (2001b) hanno inoltre dimostrato che, in microcosmo trattato con il bromuro metile per 6 mesi sono risultate quali specie predominanti *Pseudomonas* e *Actinomyces*. Inoltre, Smelt et al. (1989) e Ou et al. (1995) hanno rilevato che, dopo applicazioni ripetute di 1,3-D, l'effetto del fumigante-nematocida era notevolmente diminuito a causa del degrado microbico (Gan et al. 1998). Ben poche informazioni si hanno sugli effetti dell'aggiunta di

ammendanti diversi sull'attività microbica e sulla qualità del suolo dei terreni sottoposti a fumigazione.

Poiché i parametri biologici hanno assunto particolare importanza nella valutazione della qualità del suolo, in quanto i microorganismi rispondono più rapidamente rispetto alla maggior parte dei parametri chimici e fisici ai cambiamenti di uso del suolo, delle condizioni ambientali, o di contaminazione (Burns et al. 2006) sono stati utilizzati per lo studio della fertilità biologica dei suoli. In particolare, un insieme di indicatori di qualità del suolo basati sulle funzioni microbiologiche del suolo, come il quoziente metabolico ( $qCO_2$ ) e il quoziente di mineralizzazione ( $qM$ ), sono stati utilizzati per verificare l'effetto di diversi trattamenti agronomici sulla fertilità del suolo. Indici basati sulla combinazione della respirazione microbica e la misurazione della biomassa microbica, come  $qCO_2$ , possono essere considerati più sensibili di quelli relativi al solo dosaggio della biomassa microbica o di alcune attività (Nannipieri et al 1990; Brookes 1995; e Dilly Munch 1998) nel quantificare gli effetti di inquinanti. Il  $qCO_2$  può riflettere l'immobilizzazione del carbonio nella biomassa microbica, mentre un aumento del  $qCO_2$  può essere invece legato a stress metabolico a carico dei microorganismi (Anderson 2003) o alle variazioni del rapporto batteri/funghi (Sakamoto e Oba 1994; Landi et al. 2000). Il quoziente microbico è un parametro sensibile delle variazioni del contenuto di C organico (Anderson e Domsch 1990) e di solito varia tra 1 e 4%, con valori al di sotto dell'1% , è indicativo di stress microbico (Jenkinson e Ladd 1981). Il quoziente di mineralizzazione che rappresenta il rapporto tra la respirazione e il contenuto di C organico totale indica l'efficienza della microflora nel metabolismo della sostanza organica del suolo.

Ad oggi, non è disponibile nessuno studio relativo alla valutazione del fumigante bromuro di metile sulla diversità microbica.

Obiettivo del presente lavoro è la valutazione dell'impatto delle fumigazioni del suolo con bromuro di metile sulla qualità del suolo e sulla composizione della comunità batterica eterotrofa aerobica coltivabile. Inoltre si è voluto anche valutare l'effetto di diversi trattamenti agronomici sul recupero del suolo fumigato.

## **Materiali e metodi**

### **Trattamenti del suolo e raccolta dei campioni**

Questo studio è stato condotto nella cooperativa agricola di S. Antonio di Maccarese (Roma), una delle più importanti aree agricole del Lazio per la coltura della carota (*Daucus carota*). Il terreno, a tessitura sabbiosa 92% con pH 8.3 e alto contenuto di Ca scambiabile ( $2,74 \text{ cmol}_{(+)} \text{ kg}^{-1}$ ), contenuto di N totale e di sostanza organica, molto basso (0,04% e 0,43%, rispettivamente), così come la capacità di scambio cationico ( $7,11 \text{ meq}/100 \text{ g}$ ) è stato sottoposto a fumigazione per più di 20 anni con 1,3-D bromuro di metile per la lotta ai nematodi. Campioni di suolo sono stati raccolti alla profondità di 20 cm a maggio 2002 (40 giorni dopo la semina) e alla fine di luglio 2002 (dopo la raccolta) con una vanga. La prova di campo si è basata sui quattro trattamenti che seguono, adottando un disegno sperimentale a blocco randomizzato in cinque parcelle con tre repliche, per un totale di 15 trattamenti:

1. *F*; fertilizzazione con 100 kg di nitrato di ammonio applicato prima della semina, 50 kg di nitrato d'ammonio alla fine di maggio, e 50 kg di nitrato di potassio alla fine di giugno;
2. *F + C*; il suolo è stato ammendato con  $4 \text{ t ha}^{-1}$  prima della semina e fertilizzazione alla fine di maggio con 100 kg di nitrato di ammonio;
3. *C*<sub>2</sub>; suolo è stato ammendato con  $16 \text{ t ha}^{-1}$  di ammendante compostato misto prima della semina (in febbraio);
4. *C*<sub>4</sub>; suolo è stato ammendato con  $32 \text{ t ha}^{-1}$  di ammendante compostato misto prima della semina (in febbraio);
5. *T* suolo di controllo senza trattamenti.

L'ammendante compostato misto (C; contenuto in N del 25%) è stato prodotto aerobicamente da una miscela di residuo di borlande della distillazione di vino (50-60%), sansa (10-15%), residui di potatura di olivo, vite, e altri fruttiferi (25-40%).

Ogni trattamento è stato applicato in parcelle di  $5 \times 5$  m situate ad una distanza di 1,5 m l'una dall'altra, e per ciascuna parcella, sono stati raccolti 8 più sottocampioni per ogni periodo di campionamento (maggio e luglio), essiccato all'aria e setacciato (2 mm).

### **Parametri biochimici e microbiologici**

I campioni di suolo sono stati analizzati secondo i metodi ufficiali del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (1997, 1999). Il carbonio organico totale ( $C_{org}$ ), espresso in  $mg\ kg^{-1}$  è stato determinato in base allo Springer e Klee (1954). La respirazione del suolo è stata espressa in  $mg\ C-CO_2\ Kg^{-1}\ soil\ d^{-1}$  e misurata in un ambiente controllato dopo 1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, e 21 giorni secondo Isermeyer (1952). La respirazione del suolo segue una cinetica di primo ordine  $C_t = C_0 (1 - e^{-kt})$ , che rappresenta la curva di mineralizzazione cumulativa, dove  $C_t$  è la quantità totale di carbonio mineralizzato in condizioni di laboratorio durante 21 giorni di analisi (Riffaldi et al. 1996). Un'analisi non lineare della regressione dei minimi quadrati è stata utilizzata per calcolare il pool di carbonio potenzialmente mineralizzabile  $C_0$  [ $mg\ (C)\ kg^{-1}\ suolo$ ]. La respirazione basale ( $C_{bas}$ ) rappresenta il valore di C mineralizzato in un periodo di tempo definito (21 giorni), quando si è raggiunta la stabilità metabolica. La biomassa microbica del carbonio  $C_{mic}$  ( $mg\ kg^{-1}\ suolo\ C$ ) è stata misurata secondo il metodo di fumigazione-estrazione (Vance et al. 1987) su terreno secco dell'aria e condizionato a -33 kPa di ritenzione idrica, preincubati per 10 giorni in vasi di vetro a 30° C. Sono stati calcolati quindi diversi parametri derivati: il  $qCO_2$  (quoziente metabolico),  $C_{bas}/C_{mic}$  [ $(mg\ C-CO_2\ basale\ mg\ C_{mic}^{-1})\ h^{-1}$ ], il rapporto  $C_{bas}/C_{mic}$  (quoziente microbico), [ $mg\ biomassa\ C/mg\ totale\ organico\ C \times 100$ ], e  $qM$  (quoziente di mineralizzazione), espresso in  $mg\ C-CO_2\ kg^{-1}\ h^{-1}$  di suolo e calcolato dalla respirazione cumulativa dopo 21 giorni.

### **Conta batterica**

I batteri sono stati estratti dal suolo fresco e diluiti in soluzione fisiologica (0,85% NaCl) a concentrazioni adeguate ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ). Aliquote (0,1 ml) di ogni diluizione sono stati seminati su piastra Luria-Bertani (LB) in triplo. Le piastre sono state incubate a 28° C per 2 giorni. I risultati sono riportati nella tabella 2 ed espressi come  $n^\circ$  di batteri/g di terreno fresco. Venti colonie visivamente distinte sono state prese a caso da ciascun campione ad ogni data di campionamento e trasferiti in piastre Multiplex (Corning, New York, NY, USA). Ogni colonia è stata purificata su Nutrient Agar Amido (NSA) e conservata a -20°C in LB (Difco Laboratories) con il 20% glicerolo.

### **PCR, restrizione, sequenziamento e analisi batterica di rDNA 16S**

Le colonie batteriche cresciute su piastre LB sono state risospese in 20  $\mu l$  di acqua distillata sterile, riscaldata a 95°C per 10 minuti e raffreddati in ghiaccio per 2 minuti; ogni lisato (2  $\mu l$ ) è stato utilizzato per la reazione di amplificazione tramite reazione di polimerasi a catena (PCR). Amplificazione del gene 16S rRNA è stata effettuata in un volume totale di 20  $\mu l$  contenente 2  $\mu l$  di  $10^x$  tampone di reazione (Polymed, Italia), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 150 ng di ciascun primer [27 septies, 5' GAGAGTTTGATCCTGG CTCAG, e 1495r, 5' CTACGGCTACCTTGTTACGA] (Grifoni et al. 1995), 200  $\mu M$  di ciascun dNTP, 0,5 U di Taq DNA polimerasi (Polymed). Le miscele di reazione, dopo incubazione a 95°C per 90 s, sono state sottoposte alle seguenti temperature del ciclo: denaturazione a 94°C per 30 s, a 72°C per 4 minuti, a 60°C per i primi cinque cicli, 55°C per i cinque cicli successivi e 50°C per gli ultimi 25 cicli. Poi le miscele sono state incubate a 72°C per 10 min; 2  $\mu l$  di ciascuna miscela di amplificazione è stata analizzata tramite elettroforesi (1,2% w/v) in Tris-acetato-etilendiamminotetraacetico acido (TAE) tampone (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA) contenente 0,5  $\mu g/ml$  (w/v) etidio bromuro.

Per l'analisi di restrizione, amplificato il gene 16S rRNA (1,5 µg) è stato digerito con 3 U di endonucleasi *AluI* (Boehringer, Mannheim, Germania) in 30 µl, per 3 ore a 37 ° C. L'enzima è stato poi inattivato a 65°C per 10 min. i prodotti di reazione sono stati analizzati su gel di agarosio (2,5% w/v) in tampone TAE e colorati con 0,5 µg/ml (w/v) di etidio bromuro.

La banda di interesse (osservata sotto raggi UV, 312 nm) è stata purificata utilizzando il kit di estrazione del gel "QIAquick" (QiAgen, Chatsworth, CA, USA), secondo le istruzioni del produttore. E' stato effettuato un sequenziamento diretto su entrambi i filamenti di DNA utilizzando un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e chemical dye terminator (Sanger et al. 1977).

Sequenze nucleotidiche sono state recuperate dai database GenBank, EMBL e RDP. Il programma ClustalW (Thompson et al. 1994) è stato utilizzato per allineare le sequenze del 16S rRNA ottenute con quelle più simili recuperate dal database. Ogni allineamento è stato controllato manualmente, corretto, e quindi analizzato utilizzando il metodo neighborjoining (Saitou e Nei 1987) secondo il modello delle distanze Kimura 2 (Kimura 1980). Gli alberi filogenetici sono stati costruiti con sequenze lineari utilizzando il software Molecular Evolutionary Genetics Analysis 3 (Kumar et al. 2004).

### **RAPD fingerprinting**

L'amplificazione casuale di frammenti di DNA è stata effettuata in 25 µl di tampone di platino (Gibco BRL) contenente 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl di sospensione di lisati cellulari, 500 ng di primer AP12 (5'-CGGCCCCTGC-3'), 200 mM di ciascun dNTP, e 0,625 U di *Taq* polimerasi Platinum (Gibco BRL; Mori et al. 1999). Le miscele di reazione sono state incubate in un termociclatore (modello 9600; Applied Biosystems) a 94°C per 2 min. Sono state poi sottoposte a 45 cicli, ciascuna consistente in incubazione a 95°C per 30 s, 36°C per 1 min, e 72°C per 2 minuti; infine, le reazioni sono state incubate a 75°C per 10 min e poi a 60°C per 10 min. I prodotti di reazione sono stati analizzati con elettroforesi su gel di agarosio (2%, w/v) in tampone TAE contenente 1 µg/ml di etidio bromuro.

Somiglianze genetiche in diversi campioni appartenenti al medesimo gruppo apotipo sono state determinate mediante il confronto a coppie delle presenze e delle assenze di bande con software Gelcompare II (Matematica Applicata). Questa matrice è stata utilizzata per costruire un dendrogramma secondo il metodo della coppia non ponderata, utilizzando l'analisi di gruppo della media aritmetica (UPGMA).

### **Analisi statistica**

I dati biochimici e i dati microbiologici del suolo sono stati testati per omogeneità della varianza con il test di Levene prima mediante analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il programma SPSS per Windows (vers. 11.0, 2001). Dopo aver ottenuto un test *F* statisticamente significativo da ANOVA. Per valutare la variabilità genetica tra i diversi gruppi di comunità, è stata utilizzata l'analisi della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier et al 1992.) utilizzando il programma ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al. 1997).

## **Risultati**

### **Caratteristiche del suolo**

I campioni raccolti in maggio, dalle parcelle *T* e *F* (Tabella 1) non mostrano differenze significative per i parametri chimici o microbiologici ( $p > 0,05$ ). Come previsto, la fertilizzazione con ammendante *C*<sub>2</sub> e *C*<sub>4</sub> ha prodotto un aumento significativo del contenuto di *C*<sub>org</sub> (+46,1% e del +75%, rispettivamente;  $p < 0,05$ ) e della respirazione basale (+112,8% e 250,5%, rispettivamente,  $p < 0,05$ ) rispetto ai valori di *T*.

Inoltre, un consistente aumento è stato osservato nei valori *C*<sub>mic</sub> in *F*+*C* (+169,9%), campioni *C*<sub>2</sub> (121,6%) e *C*<sub>4</sub> (+207,6%) e per *C*<sub>0</sub> nei campioni *C*<sub>2</sub> (+135,3%), *C*<sub>4</sub> (210,6%), e *F*+*C* (88,6%) rispetto ai valori di controllo non trattati ( $p < 0,005$ ). Il quoziente metabolico è stato più basso nel



campione  $F + C$ , ma le differenze tra i campioni non sono risultate statisticamente significative, mentre il quoziente di mineralizzazione nei campioni in  $C_2$ ,  $C_4$ , e di  $F+C$  è risultato significativamente superiore ai valori dei campioni di  $F$  e  $T$ . I valori più alti del quoziente microbico ( $C_{mic}/C_{org} \times 100$ ) sono stati ottenuti da terreni trattati con  $F+C$  (134,6%,  $p<0,05$ ) rispetto al valore delle parcelle di controllo, mentre i campioni  $C_2$  e  $C_4$  hanno mostrato valori più elevati rispetto ai campioni  $F$  e  $T$ , ma inferiori del valore del campione  $F+C$  ( $p<0,05$ ).

Nel mese di luglio (Tabella 1), il contenuto del carbonio organico totale ha mostrato generalmente valori inferiori a quelli di maggio, ma nelle parcelle  $C_2$  e  $C_4$  permane superiore a quello del suolo  $F+C$  (rispettivamente +19,6%,  $p<0,05$  e +34,7%,  $p<0,001$ ), il  $T$  e  $F$  dei terreni ha mostrato i valori più bassi. Rispetto a maggio, il valore  $C_{org}$  diminuisce più in  $T$  (-44%),  $F$  (-41%),  $C_2$  (-27%) e  $C_4$  (-32%) che nei suoli  $F + C$  (-23%). La respirazione basale non è risultata significativamente differente tra i diversi suoli ( $p>0,05$ ), ma i campioni  $C_4$  hanno mantenuto valori più elevati di  $C_0$ . La biomassa microbica nei campioni  $C_2$  e  $C_4$  è stata maggiore rispetto a qualsiasi altro campione ( $p<0,001$ ) ed è stata significativamente più alta nel mese di luglio rispetto a maggio ( $p<0,05$ ), mentre è stato osservato un forte calo nel suolo in  $F+C$  (-33,6%). Il quoziente metabolico dei suoli  $C_2$  e  $C_4$  è significativamente inferiore rispetto al suolo di controllo ( $p<0,05$ ), mentre il  $qCO_2$  dei suoli  $F+C$  ha mostrato valori intermedi tra suoli  $F$  e  $T$ . Il quoziente di mineralizzazione del terreno  $T$  è stata significativamente superiore a quello degli altri trattamenti ( $p<0,05$ ). Infine, il campione  $C_4$  ha mostrato il valore più alto di  $C_{mic}/C_{org} \times 100$ , mentre i suoli  $F$  e  $F+C$  hanno mostrato valori molto simili al suolo non trattato.

**Tab. 1** - Parametri chimici e microbiologici del suolo ( $C_{org}$  C totale organico,  $C_{bas}$  respirazione basale,  $C_0$  C potenzialmente mineralizzabile,  $C_{mic}$  C biomassa microbica,  $qCO_2$  quoziente metabolico,  $qM$  quoziente di mineralizzazione e  $C_{mic}/C_{org}$ )

Parametro	Unità	Maggio					Luglio				
		$T$	$F$	$F+C$	$C_2$	$C_4$	$T$	$F$	$F+C$	$C_2$	$C_4$
$C_{org}$	g C/100 g soil	0,52 <sup>a</sup> (0,06)	0,60 <sup>a</sup> (0,04)	0,60 <sup>a</sup> (0,02)	0,76 <sup>b</sup> (0,03)	0,91 <sup>c</sup> (0,06)	0,29 <sup>a</sup> (0,04)	0,35 <sup>a</sup> (0,01)	0,46 <sup>b</sup> (0,03)	0,55 <sup>c</sup> (0,04)	0,62 <sup>c</sup> (0,03)
$C_{bas}$	mg(C-CO <sub>2</sub> ) kg <sup>-1</sup> soil (21° giorno)	1,94 <sup>a</sup> (0,28)	2,56 <sup>a</sup> (0,61)	3,93 <sup>a</sup> (0,99)	4,13 <sup>ab</sup> (0,92)	6,80 <sup>b</sup> (1,77)	3,93 <sup>a</sup> (2,97)	3,40 <sup>a</sup> (1,25)	4,22 <sup>a</sup> (2,34)	4,06 <sup>a</sup> (1,53)	5,54 <sup>a</sup> (0,64)
$C_0$	mg(C-CO <sub>2</sub> ) kg <sup>-1</sup> soil	109,27 <sup>a</sup> (7,13)	139,80 <sup>a</sup> (10,91)	206,11 <sup>b</sup> (21,24)	257,08 <sup>c</sup> (23,06)	316,86 <sup>d</sup> (19,84)	170,20 <sup>a</sup> (38,75)	199,54 <sup>a</sup> (62,15)	213,24 <sup>a</sup> (44,24)	213,72 <sup>a</sup> (54,83)	315,92 <sup>b</sup> (48,90)
$C_{mic}$	mg C kg <sup>-1</sup> soil	52,8 <sup>a</sup> (11,5)	68,6 <sup>a</sup> (8,2)	142,4 <sup>bc</sup> (17,2)	116,9 <sup>b</sup> (19,3)	163,8 <sup>c</sup> (18,0)	81,8 <sup>a</sup> (16,5)	93,8 <sup>a</sup> (14,1)	94,4 <sup>a</sup> (17,3)	184,6 <sup>b</sup> (16,9)	353,4 <sup>c</sup> (41,3)
$qCO_2$	[(mg C-CO <sub>2</sub> <sub>bas</sub> mg <sup>-1</sup> C <sub>mic</sub> ) h <sup>-1</sup> ] 10 <sup>4</sup>	15,4 <sup>a</sup> (4,7)	15,5 <sup>a</sup> (5,3)	11,5 <sup>a</sup> (3,0)	14,7 <sup>a</sup> (1,8)	17,3 <sup>a</sup> (4,6)	25,1 <sup>a</sup> (11,0)	15,1 <sup>ab</sup> (3,7)	18,6 <sup>a</sup> (6,8)	9,2 <sup>b</sup> (4,4)	6,5 <sup>b</sup> (1,2)
$qM$	(mg C-CO <sub>2</sub> mg <sup>-1</sup> C)	3,73 <sup>a</sup> (0,44)	4,27 <sup>a</sup> (0,23)	6,55 <sup>b</sup> (0,31)	5,43 <sup>b</sup> (0,52)	7,47 <sup>b</sup> (0,49)	13,55 <sup>a</sup> (0,81)	9,71 <sup>b</sup> (1,21)	9,17 <sup>b</sup> (0,99)	7,38 <sup>b</sup> (1,21)	8,93 <sup>b</sup> (0,87)
$C_{mic}/C_{org}$	mg C <sub>mic</sub> mg <sup>-1</sup> C	1,01 <sup>a</sup> (0,12)	1,14 <sup>a</sup> (0,22)	2,37 <sup>b</sup> (0,23)	1,54 <sup>c</sup> (0,31)	1,80 <sup>c</sup> (0,09)	2,81 <sup>a</sup> (0,24)	2,67 <sup>a</sup> (0,36)	2,05 <sup>a</sup> (0,25)	3,35 <sup>b</sup> (0,10)	5,70 <sup>c</sup> (0,91)

Per ogni parametro, lettere diverse indicano differenze significative (Tukey HSD Test). La deviazione standard è riportata in parentesi.

### Conta batterica e caratterizzazione molecolare

I dati relativi alle conte batteriche sono riportati nella tabella 2 e hanno dimostrato che il numero di cellule vitali oscilla tra 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> CFU/g di terreno.

Venti colonie da ogni piastra sono state ulteriormente caratterizzate utilizzando una combinazione di tecniche molecolari basate sulla PCR, con un totale di 189 isolati. In primo luogo, il gene rRNA

16S è stato amplificato e ogni amplicon è stato trattato con l'enzima *AluI* come descritto in "Materiali e metodi". E' stato ottenuto un totale di 23 modelli di analisi amplificata ribosomiale di restrizione del DNA (ARDRA) (Vaneechoutte et al. 1992, 1993, 1995), e alcuni dei profili di restrizione sono apparsi molto simili, con molte bande monomorfe, suggerendo così una vicinanza tassonomica degli isolati batterici. Diciotto dei 23 aplotipi sono stati rappresentati solo da pochi isolati (Tabella 3). I rimanenti cinque (A, C, E, N e Q) sono stati i principali aplotipi, che hanno rappresentato circa il 65% della totalità dei batteri coltivabili.

E' stata determinata la sequenza nucleotidica del gene 16S rRNA di uno isolato di ogni gruppo ARDRA. Ciascuna delle sequenze ottenute è stata utilizzata per sondare i database nucleotide utilizzando l'opzione BLASTN del programma BLAST (Altschul et al. 1997). Le sequenze orthologous più simili sono state poi allineate, con il programma ClustalW (Thompson et al. 1994), alle sequenze ottenute.

L'analisi filogenetica ha rivelato che i 23 aplotipi sono rappresentativi di sette generi batterici. In particolare:

1. I batteri appartenenti a 15 diversi aplotipi (A, B, D, E, F, I, J, K, M, N, O, Q, R, S e T) appartenenti per genere *Bacillus*. Essi rappresentano la quota più ampia della comunità batterica (circa il 83%). Le 15 sequenze raggruppate in nove diversi gruppi e corrisponde a nove *Bacillus* di specie diverse, *B. firmus*., *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. simplex*, *B. endophyticus* e *B. psychrodurans*.

**Tab. 2** – La crescita di colonie batteriche in terreno LB espresso come n° di batteri/g di suolo fresco (i dati riportati sono la media di tre repliche)

Mese	Trattamento del suolo				
	<i>T</i>	<i>F</i>	<i>F+C</i>	<i>C<sub>2</sub></i>	<i>C<sub>4</sub></i>
Maggio	2,9±1,1×10 <sup>6</sup>	4,8±1,2×10 <sup>6</sup>	1,6±0,5×10 <sup>7</sup>	1,1±0,2×10 <sup>7</sup>	2,9±1,4×10 <sup>6</sup>
Luglio	4,2±1,7×10 <sup>6</sup>	7,2±2,3×10 <sup>6</sup>	1,6±0,3×10 <sup>6</sup>	7,8±1,8×10 <sup>6</sup>	4,2±1,5×10 <sup>6</sup>

2. Isolati appartenenti a C aplotipo sono stati raggruppati nel genere *Arthrobacter*.

3. Aplotipo G si è iscritto al genere *Sporosarcina*.

4. Isolati appartenenti a aplotipi H e L sentito nel genere *Staphylococcus*.

5. I cinque isolati appartenenti a aplotipo P sono stati raggruppati nel genere *Alcaligenes*.

6. L'isolato aplotipo che rappresenta U sentito all'interno del genere *Brachybacterium*.

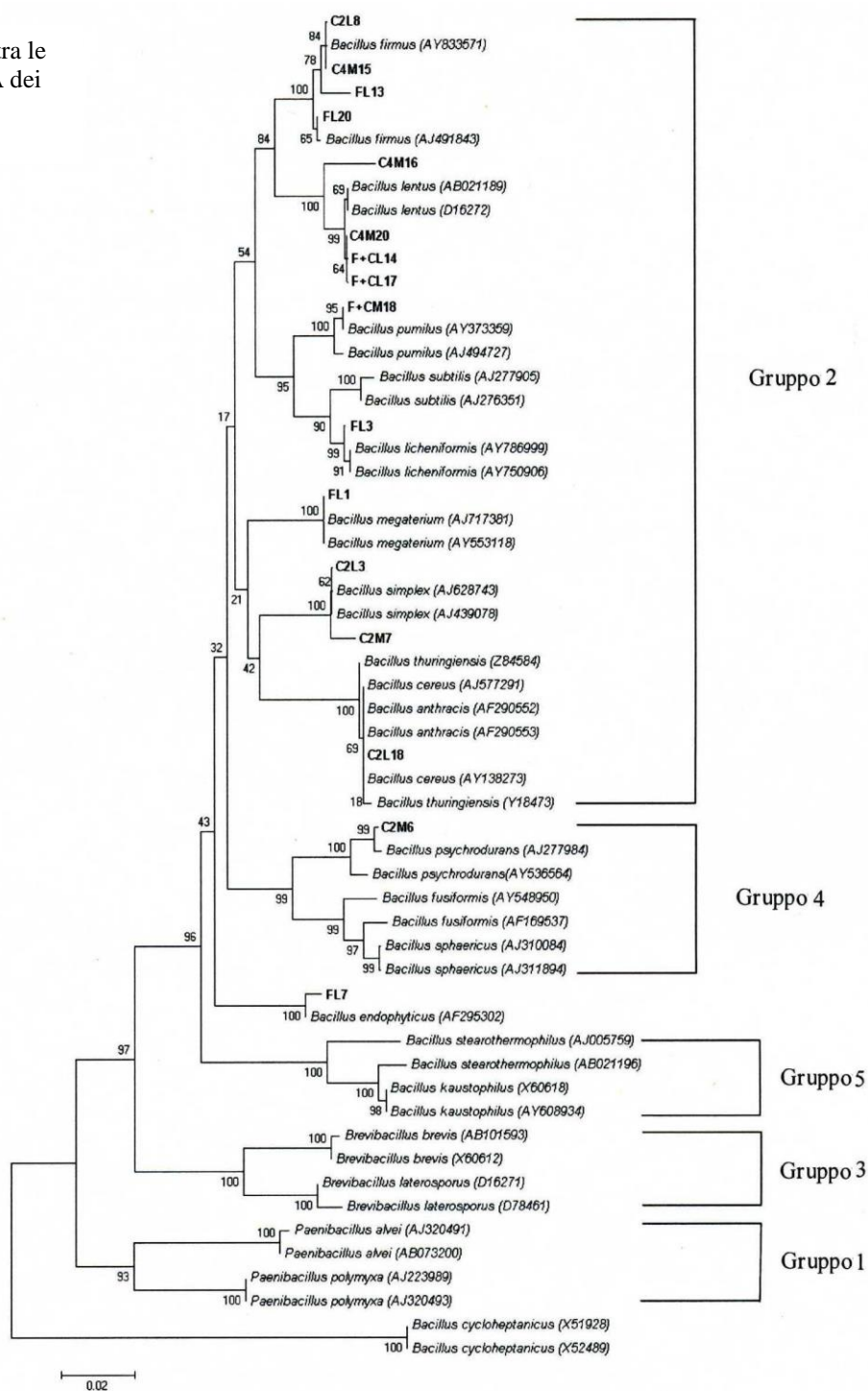
7. Gli isolati appartenenti agli ultimi due aplotipi (V e Z) sono stati raggruppati nel genere *Pseudomonas*. L'analisi dei dati riportata sopra dimostra che 20 dei 23 aplotipi (circa il 94,2% di tutta la comunità batterica ha studiato) sono Gram-positivi con un prevalenza del genere *Bacillus*. L'allineamento delle sequenze 16S di rDNA degli isolati del genere *Bacillus* è stato poi utilizzato per costruire l'albero filogenetico di fig. 1.

**Tab. 3** – Distribuzione di 23 aplotipi ARDRA ottenuti mediante analisi di restrizione del 16S rDNA con l'endonucleasi AluI da 189 batteri isolati da campioni di suolo diversamente trattati

ARDRA gruppo (aplotipo)	Trattamento del suolo										Numero di isolato/ aplotipo	% del totale	Tassonomia <sup>a</sup>	16S rDNA sequenza determinata	
														Ceppo	Numero di adesione
	<i>T</i>		<i>F</i>		<i>F+C</i>		<i>C<sub>2</sub></i>		<i>C<sub>4</sub></i>						
	Maggio	Luglio	Maggio	Luglio	Maggio	Luglio	Maggio	Luglio	Maggio	Luglio					
A	8	6	7	1	9	7	1	5	1	4	49	26,0	<i>B. firmus</i>	C2L8	DQ073459
B	1	0	0	1	1	1	1	0	0	2	7	3,7	<i>B. pumilus</i>	F+CM18	DQ073460
C	1	0	0	0	5	3	0	2	0	0	11	5,8	<i>Arthrobacter sp.</i>	F+CM7	DQ073463
D	0	0	0	1	0	0	0	3	0	1	5	2,7	<i>B. cereus</i>	C2L18	DQ073461
E	3	7	3	8	1	0	0	1	0	1	24	12,7	<i>B. firmus</i>	FL13	DQ073462
F	0	0	0	0	1	4	0	1	0	1	7	3,7	<i>B. lentus</i>	F+CL14	DQ112356
													<i>B. lentus</i>	F+CL17	DQ112357
G	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	1,6	<i>Sporosarcina sp.</i>	C4M11	DQ112359
													<i>Sporosarcina sp.</i>	C4M5	DQ112360
H	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	1,6	<i>Staphylococcus</i>	C2L11	DQ076322
I	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1,1	<i>B. firmus</i>	C4M15	DQ089747
J	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1,1	<i>B. megaterium</i>	FL1	DQ089745
K	0	0	2	1	1	2	0	3	0	0	9	4,7	<i>B. simplex</i>	C2L3	DQ089751
L	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	3	1,6	<i>Staphylococcus</i>	C2L16	DQ089746
													<i>sp.</i>		
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1,1	<i>B. lentus</i>	C4M16	DQ089753
N	0	0	0	0	0	0	10	0	10	2	22	11,6	<i>B. simplex</i>	C2M7	DQ073464
O	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1,1	<i>B. lentus</i>	C4M20	DQ112358
P	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2	5	2,6	<i>Alcaligenes sp.</i>	C4M17	DQ089749
Q	1	6	3	2	0	1	2	1	0	0	16	8,4	<i>B. licheniformis</i>	FL3	DQ089750
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1,6	<i>B. psychrodurans</i>	C2M6	DQ089754
S	0	0	3	2	0	1	0	0	0	0	6	3,2	<i>B. endophyticus</i>	FL7	DQ089755
T	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,5	<i>B. firmus</i>	FL20	DQ089748
U	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	<i>Brachybacterium</i>	TM6	DQ089752
													<i>sp.</i>		
V	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	<i>Pseudomonas sp.</i>	TM16	DQ078780
Z	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	5	2,6	<i>Pseudomonas sp.</i>	C2M11	-
N. isolati analizzati	19	19	19	19	18	19	20	19	19	18	189	100			

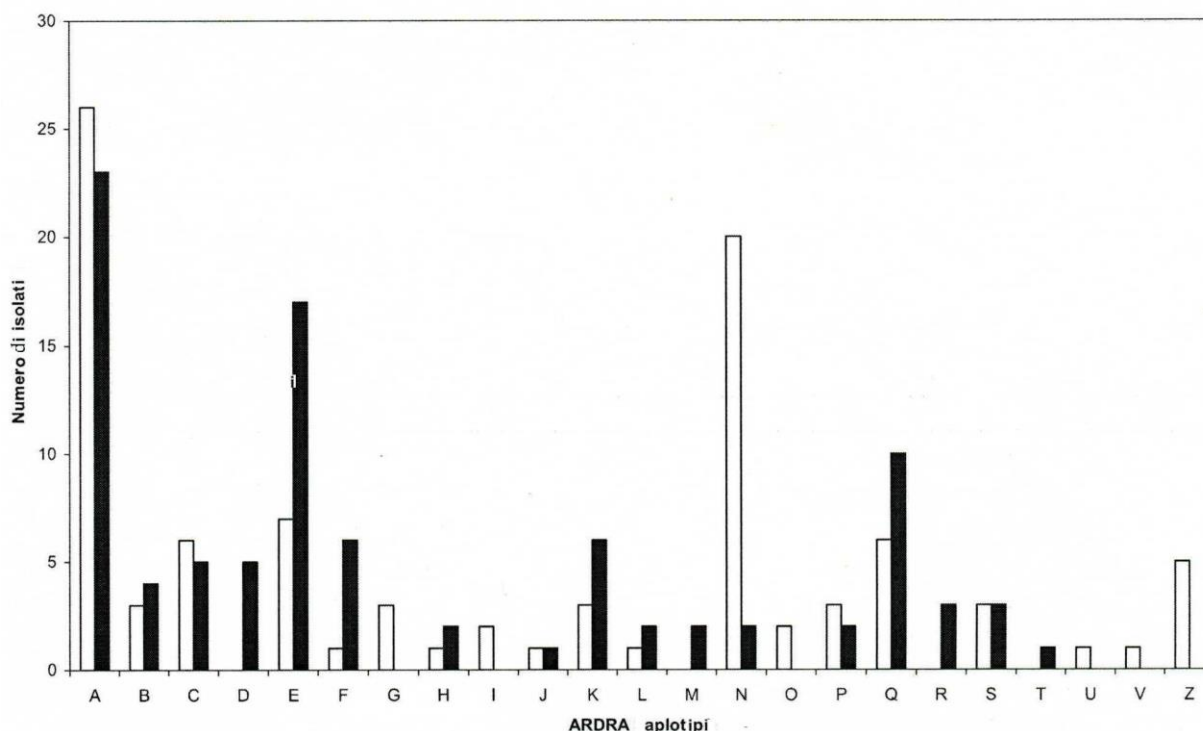
<sup>a</sup>Secondo la sequenza di 16S rDNA e identità % albero filogenetico (vedi anche Fig. 1.)

**Fig. 1** - L'Albero filogenetico mostra le relazioni tra le sequenze 16S rDNA dei *Bacillus* isolati.

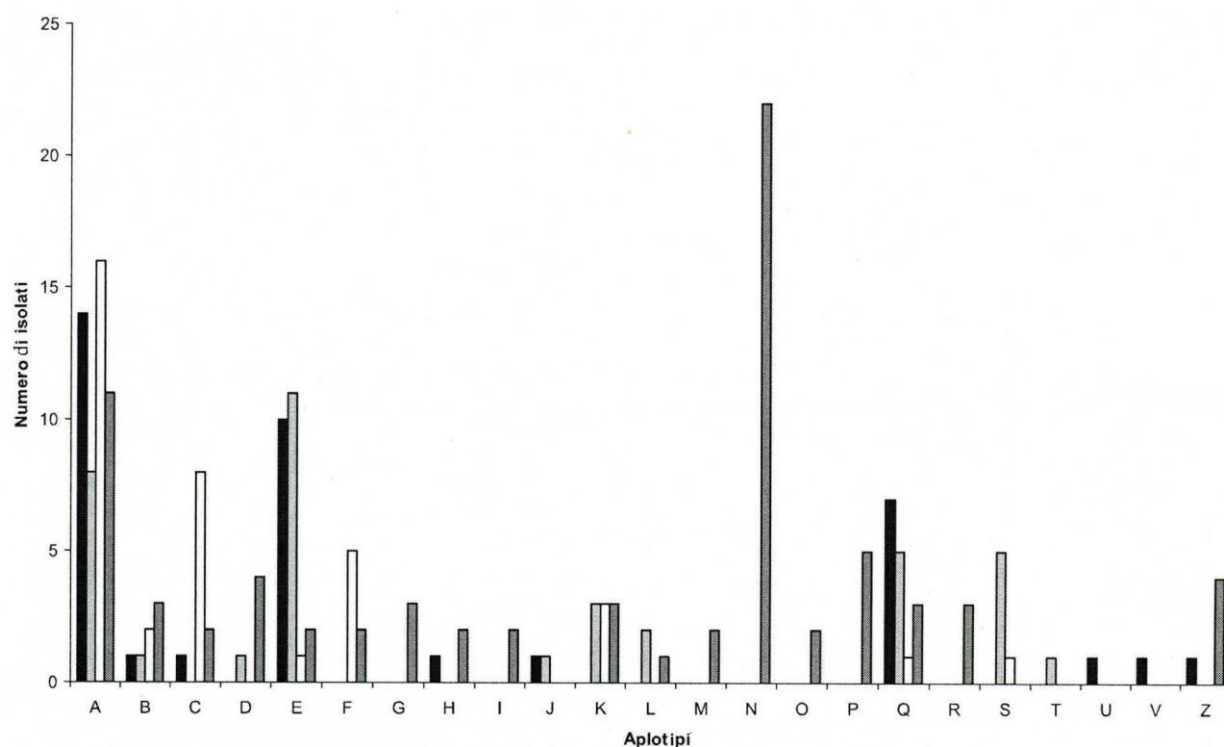


### Fluttuazioni della comunità batterica

La comunità batterica è stata analizzata per verificare l'esistenza di una condivisione di aplotipo per studiare l'effetto dei due variabili (mese di campionamento e trattamento del suolo) sulle variazioni di specie batteriche/densità generi all'interno della comunità. I dati ottenuti hanno rivelato che gli aplotipi 19 e 17 sono stati trovati rispettivamente nei mesi di maggio e luglio, (Fig. 2). Tredici aplotipi sono stati ripartiti tra i campioni di maggio e luglio, mentre sei e quattro aplotipi sono stati esclusivi rispettivamente in campioni di maggio e luglio. La distribuzione degli aplotipi ARDRA è stata analizzata per verificare l'effetto del trattamento del suolo sulla dinamica di ogni (o gruppo di) aplotipo ARDRA. Questa analisi ha rivelato che solo 1 dei 23 aplotipi, cioè ARDRA gruppo A (*B. firmus*), è rappresentato in tutti i campioni raccolti in maggio e luglio (Fig. 3). Oltre a questo, il numero totale di aplotipi diversi è stato superiore in C (13 in  $C_2$  e 12 in  $C_4$ ) rispetto ai campioni di suolo T (10), F (10), e F+C (8); questo è corrispondente all'aumento aplotipi unici (7 in campione C, 2 in T, 1 in F, e 0 in F+C). Pertanto, in campioni C, il numero di isolati per aplotipo è stato generalmente inferiore a quello trovato in campioni di T e F. L'unica eccezione è stata rappresentata da isolati appartenenti a aplotipo N che, secondo l'analisi del 16S rDNA, assegnato alla specie *B. simplex*. È interessante notare che tutti questi isolati (22), che rappresentano oltre il 28% di tutta la comunità  $C_2 + C_4$ , sono stati trovati solo in campioni di C, suggerendo che l'ammendante possa aver positivamente influenzato la crescita microbica. A quanto pare, l'aumento della frequenza in aplotipo N in maggio, è corrispondente alla diminuzione della presenza di isolati appartenenti al gruppo E ARDRA e, anche se in misura minore, al gruppo A, i cui isolati sono stati assegnati al specie *B. firmus*.



**Fig. 2** - La distribuzione degli aplotipi ARDRA a maggio (colonne bianche) e luglio (colonne nere)



**Fig. 3** - Numero di ceppi appartenenti ai 21 aplotipi ARDRA in relazione ai diversi trattamenti del suolo: *T* (colonne nere), *F* (colonne grigio chiaro), *F + C* (colonne bianche), *C<sub>2</sub>/C<sub>4</sub>* (colonne grigio scuro)

### Analisi statistica dei dati ARDRA

Per dare un supporto statistico alla distribuzione ARDRA, AMOVA è stato effettuato su profili ARDRA. I dati AMOVA hanno confermato che la maggior parte della varianza totale molecolare ( $p = 0,001$ ) è stata attribuita a specificità di ceppo (aplotipi) (91,9%) e in parte minore (8,1%) ai trattamenti di tipi di suolo (Tabella 4).

**Tab. 4** - AMOVA di 189 batteri isolati da suoli sottoposti a fumigazione

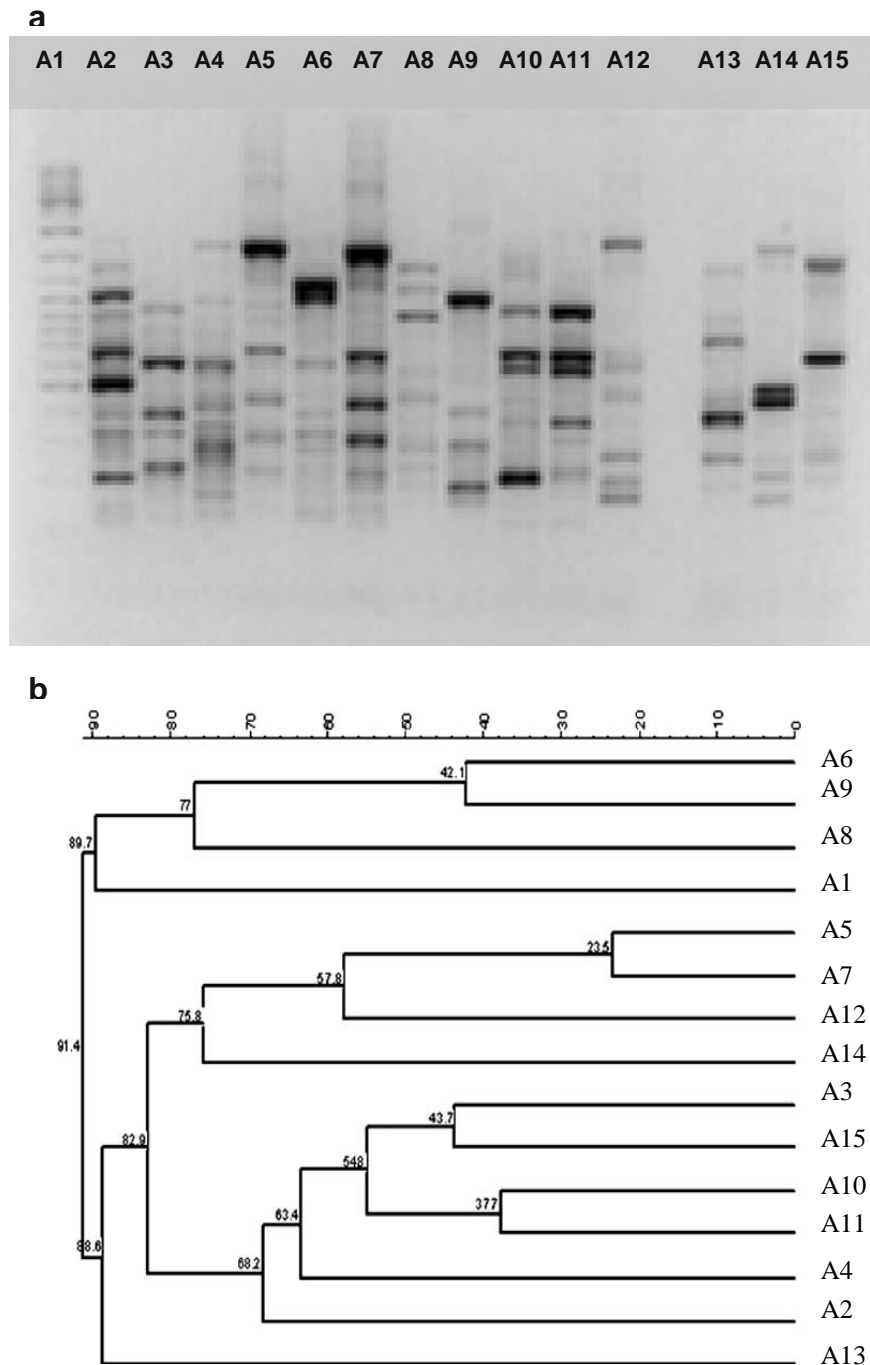
Fonte di variazione	df	Somma dei quadrati	Componenti di varianza	Percentuale di variazione
<b>AMOVA del totale aplotipi ARDRA</b>				
Tra suoli	4	7,2	0,04	8,1
All'interno dei suoli	184	76,3	0,41	91,9
Totale	188	83,4	0,45	
Tra gruppi	1	3,9	0,03	6,9
Tra suoli all'interno dei gruppi	3	3,2	0,02	3,7
All'interno dei suoli	184	76,3	0,41	89,4
Totale	188	83,4	0,46	
<b>AMOVA di <i>Bacillus</i> spp. ARDRA aplotipi</b>				
Tra suoli	4	7,3	0,05 Va	10,6
All'interno dei suoli	152	58,5	0,38 Vb	89,4
Totale	156	65,8	0,43	
Tra gruppi	1	4,4	0,05 Va	10,3
Tra suoli all'interno dei gruppi	3	2,9	0,02 Vb	4,2
All'interno dei suoli	152	58,5	0,38 Vc	85,6
Totale	156	65,8	0,45	

## RAPD fingerprinting e analisi statistica dei dati RAPD

Il grado di variabilità genetica intraspecifica tra ceppi appartenenti a quattro gruppi principali ARDRA (A, E, N e Q, contenenti rispettivamente isolati 49, 22, 24 e 16) è stato analizzato mediante RAPD (Williams et al. 1990, gallesi e McClelland 1990), come descritto in "Materiali e metodi".

Come previsto i modelli di amplificazione di ceppi appartenenti a aplotipi diversi sono stati molto diversi. Inoltre, un elevato grado di diversità genetica è stata trovata tra isolati appartenenti alla stessa ARDRA aplotipi, e 15 profili RAPD di aplotipi appartenenti a gruppo A (Fig. 4). AMOVA effettuato su profili RAPD degli isolati appartenenti al gruppo A ARDRA ha dimostrato che il 91,9% della varianza totale molecolare è attribuibile alla divergenza tra gli isolati e solo il 8,0% a diversi trattamenti. AMOVA dei gruppi 1 e 2 ha mostrato un valore basso (6,93%) di divergenza.

**Fig. 4 – a** Un esempio di profilo RAPD su DNA totale effettuato con primer AP12 da isolati di aplotipi A. ARDRA. **b** Analisi dei cluster basata su UPGMA di profili RAPD. I numeri riportati sulla scala indicano le divergenze tra i profili





## Discussione

In questo lavoro, abbiamo analizzato l'effetto del fumigante 1,3-D sulla diversità e le funzioni del suolo di eterotrofi aerobici coltivabili in comunità microbiche. Anche se la targa conta di solito stima solo 1-10% della microflora del suolo in generale, a nostro avviso, l'integrazione dei dati relativi coltivabili flora microbica e parametri del terreno possono aiutare a comprendere meglio l'effetto di fumiganti su batterica risposta ai cambiamenti dei parametri ambientali. Tuttavia rapporti tra i parametri microbiologici sono stati spesso utilizzati per valutare la risposta dell'attività microbica a fattori ambientali (Anderson 2003). In questo studio, le risposte del quoziente microbico,  $qCO_2$  e  $qM$  per trattamenti di fecondazione diversi, osservati durante 3 mesi, sembrava essere fortemente influenzato dallo stato nutrizionale del suolo. E' noto che l'assorbimento dei nutrienti da parte delle cellule microbiche è un processo dispendioso, in particolare quando i microbi sono costretti a degradare la materia organica stabile per ottenere nuovi supporti cartacei. Inoltre, le variazioni dei nutrienti disponibilità di energia è possibile modificare microbica manutenzione requisiti. Questo nutrizionale "stress" dei terreni sottoposti a fumigazione potrebbe spiegare il fatto che la percentuale di C organico presente come C della biomassa microbica (il quoziente microbica) in maggio è stato inferiore di 2,0, che è considerato un critico soglia per la salute del suolo (Anderson 2003).

Nel mese di maggio, il valore massimo del quoziente microbico nei campioni  $F + C$  probabilmente riflette un uso più efficiente dei substrati facilmente degradabili da biomassa microbica (Anderson 2003; Pinzari et al. 1999). I dati ottenuti a maggio non hanno mostrato differenze significative nelle proprietà chimiche e microbiologiche tra i campioni  $T$  e  $F$ , indicando che la fertirrigazione da sola non ha avuto significativi effetti di breve durata sulle proprietà del suolo e testato attività microbica. I valori più alti di mineralizzazione potenziale ( $C_0$ ) e  $C_{mic}$  sono stati osservati nei suoli ammendati con diverse quantità di compost ( $F + C$ ,  $C_2$  e  $C_4$ ), probabilmente per apporto di sostanza organica, che può essere la variabile principale microbica nel metabolismo, il  $qM$  a luglio indica un metabolismo stabile in suoli trattati con compost mentre aumento in  $T$  e  $F$  dovuto probabilmente a scarsa quantità di sostanza organica. Incremento di  $qCO_2$  potrebbero essere indotto da stress nutrizionali, nonché dall'aumento del rapporto batteri-funghi (Landi et al 2000.); potrebbe essere possibile che il quoziente metabolico di  $T$ ,  $F$ , e suoli  $F + C$  potrebbe essere stato influenzato dai valori bassi di sostanza organica raggiunti nel mese di luglio. Inoltre, l'aumento del valore  $qCO_2$  in terreni  $F+C$  di luglio indica un effetto di breve durata del trattamento.

L'esecuzione di AMOVA su ARDRA aplotipi appartenenti al genere *Bacillus* ha mostrato che la divergenza tra i gruppi 1 (senza o molto basso tasso di fertilizzazione) e 2 (con il tasso di fertilizzazione alto) è stata del 10,2%, indicando una diversa distribuzione di *Bacillus* spp. tra le diverse parcelle.

Sulla base del contenuto molecolare in  $G+C$ , il 16S rDNA, Priest (1993) ha suddiviso il genere *Bacillus* in cinque diversi gruppi. L'albero della filogenetica riportato nella fig. 1 ha rivelato che un'elevata percentuale degli isolati *Bacillus* (oltre il 94%) è stata posta nel gruppo 2, che è principalmente composta da specie di anaerobi facoltativi, crescono fortemente in assenza di ossigeno, producono endospore ellissoidali (Priest 1993). In particolare, *B. firmus* e i relativi batteri halotolerant, come *lentus* B., sono particolarmente comuni in habitat marini e di estuario e saline (Gordon e Hyde 1982; Gordon et al 1977). Bacilli Alkaliphilic sono diffusi nel suolo, possono essere trovati in suoli acidi, o nei terreni alcalini, come in quello analizzato in questo lavoro. Pertanto, è possibile che la pressione selettiva indotta da 1,3-D abbia fortemente favorito microrganismi resistenti agli agenti fumiganti attraverso la formazione di spore. Tuttavia, non possiamo escludere a priori la possibilità che un certo numero di ceppi avrebbero potuto sopravvivere degradando gli agenti fumiganti. I risultati di un elevato grado di variabilità genetica tra ceppi appartenenti ai gruppi principali ARDRA e il fatto che questa biodiversità non è stata influenzata dai trattamenti del terreno come dimostrato da AMOVA E' molto probabile che la



presenza di un'alta percentuale di batteri Gram-positivi nel terreno sottoposto a fumigazione, secondo Ibekwe et al. (2001a), in particolare, la prevalenza della Genere *Bacillus* potrebbero essere correlate alla capacità di questi batteri di formare spore per proteggersi dal fumiganti, piuttosto che alla presenza di un set di geni coinvolti nella biodegradazione di 1,3-D.

In conclusione, il trattamento dei terreni sottoposti a fumigazione è una soluzione temporanea per recuperare la perdita di fertilità del suolo da parte 1,3-D.

## **Riconoscimento**

Siamo molto grati a due anonimi revisori e all'editor-in-chief per la revisione del manoscritto e per i loro utili suggerimenti e commenti per migliorare il manoscritto.

## **Riferimenti**

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25:3389–3402
- Anderson TH (2003) Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agric Ecosyst Environ* 98:285–293
- Anderson TH, Domsch KH (1990) Application of eco-physiological quotients (qCO<sub>2</sub> and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories. *Soil Biol Biochem* 10:251–255
- Baldwin JG, Nadler SA, Adams BJ (2004) Evolution of plant parasitism among nematodes. *Annu Rev Phytopathol* 42:83–105
- Brookes PC (1995) The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol Fertil Soils* 19:269–279
- Burns RG, Nannipieri P, Benedetti A, Hopkins DW (2006) Defining soil quality. In: Bloem J, Hopkins DW, Benedetti A (eds) *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI publishing, pp 15–22
- Dilly O (2005) Microbial energetics in soils. In: Buscot F, Varma A (eds) *Microrganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin, pp 123–128
- Dilly O, Munch JC (1998) Ratios between estimates of microbial biomass content and microbial activity in soils. *Biol Fertil Soils* 27:374–379
- Dilly O, Bartsch S, Rosenbrock P, Buscot F, Munch JC (2001) Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn.) L.) forest. *Soil Biol Biochem* 33:921–930
- Doran JW, Parkin TB (1994) Defining and assessing soil quality. In: Doran JW, Coleman DC, Bezdicek DF, Stewart BA (eds) *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp 3–22 (Special Publication no.35 SSSA)
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro M (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491
- Gan J, Yates SR, Crowley D, Becker JO (1998) Acceleration of 1,3-dichloropropene degrading by organic amendments and potential application for emission reduction. *J Environ Qual* 27:408–414
- Giannakou IO, Sidiropoulos A, Prophetou-Athanasiadou D (2002) Chemical alternatives to methyl bromide for the control of rootknot nematodes in greenhouses. *Pest Manag Sci* 58:290–296
- Gordon RE, Hyde JL (1982) The *Bacillus firmus*–*Bacillus lentus* complex and pH 7.0 variants of some alkalophilic strains. *J Gen Microbiol* 128:1109–1116
- Gordon RE, Hyde JL, Moore JA Jr (1977) *Bacillus firmus*. –*Bacillus lentus*: a series or one species. *Int J Syst Bacteriol* 27:256–262
- Grifoni A, Bazzicalupo M, Di Serio C, Fancelli S, Fani R (1995) Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol Lett* 127:85–91

- Ibekwe AM, Papiernik SK, Gan J, Yates SR, Yang CH, Crowley DE (2001a) Impact of fumigants on soil microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 67:3245–3257
- Ibekwe AM, Papiernik SK, Gan J, Yates SR, Yang CH, Crowley DE (2001b) Microcosm enrichment of 1,3-dichloropropene-degrading soil microbial communities in a compost-amended soil. *J App Microbiol* 91:668–676
- Isermeyer H (1952) Eine Einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Z Pflanzenernähr Bodenkd* 56:6–38
- Jenkinson DS, Ladd JN (1981) Microbial biomass in soil: measurements and turnover. In: Paul EA, Ladd JN (eds) *Soil biochemistry*, vol. 5. Marcel Dekker, New York, pp 415–471
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:11–120
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinf* 5:150–163
- Landi L, Renella G, Moreno JL, Falchini L, Nannipieri P (2000) Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol Fertil Soils* 32:8–16
- Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (1997) Metodi ufficiali di analisi fisica del suolo. Decreto Ministeriale 1° agosto 1997. In: *Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n°204 del 2 Settembre 1997*
- Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (1999) Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo. Decreto Ministeriale 13 settembre 1999. In: *Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n°248 del 21 Ottobre 1999*
- Mori E, Lio' P, Daly S, Damiani G, Perito B, Fani R (1999) Molecular nature of RAPD markers amplified from *Haemophilus influenzae* rd genome. *Res Microbiol* 150:83–93
- Nannipieri P, Grego S, Ceccanti B (1990) Ecological significance of the biological activity in soil. In: Bollag JM, Stotzky G (eds) *Soil biochemistry*, vol 6. Marcel Dekker, New York, pp 293–356
- Ou LT, Chung KY, Thomas JE, Obreza TA, Dickson DW (1995) Degradation of 1,3-dichloropropene (1,3-D) in soils with different histories of field applications of 1,3-D. *J Nematol* 27:127–242
- Park MK, Kim JH, Dungan RS (2004) Sorption of the fumigant 1,3-dichloropropene on soil. *J Environ Sci Health B* 39:603–612
- Pinzari F, Trinchera A, Benedetti A, Sequi P (1999) Use of biochemical indices in the Mediterranean environment: comparison among soils under different forest vegetation. *J Microbiol Meth* 36:21–28
- Prather MJ, McElroy MR, Wofsy SC (1984) Reduction in ozone at high concentrations of stratospheric halogens. *Nature* 31:227–231
- Priest FG (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria, systematics and ecology of Bacillus*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 3–16
- Riffaldi R, Saviozzi A, Levi-Minzi R (1996) Carbon mineralization kinetics as influenced by soil properties. *Biol Fertil Soil* 22:293–298
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sakamoto K, Oba Y (1994) Effect of fungal to bacterial biomass ratio on the relationship between CO<sub>2</sub> evolution and total soil microbial biomass. *Biol Fertil Soil* 17:39–44
- Sanger F, Nicklesen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467
- Schneider S, JM Kueffer, D Roessli, L Excoffier (1997) ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis. Version 1.1, University of Geneva
- Smelt JH, Teunissen W, Crum SJH, Leistra M (1989) Accelerated transformation of 1,3-dichloropropene in loamy soils. *Neth J Agric Sci* 37:173–183

- Springer U, Klee J (1954) Prüfung der Leistungsfähigkeit von einigen wichtigeren Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs mittels Chromschwefelsäure sowie Vorschlag einer neuen Schnellmethode. *Z Pflanzenernähr Dang Bodenk* 64:1
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19:703–707
- Vaneechoutte M, Rossau R, De Vos P, Gillis M, Janssens D, Paepe N (1992) Rapid. identification of the bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett* 93:227–234
- Vaneechoutte M, De Beenhouwer H, Claeys G, Verschraegen GM, De Rouck A, Paepe N (1993) Identification. of Mycobacterium species with amplified rDNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 31:2061–2065
- Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg A, Eilachouni A, De Vos P, Claeys G, Verschraegen G (1995) Identification. of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 33:11–15
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 18:7213–7218
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18:6531–6535

### VI.3 Monocoltura di tabacco

Benedetti A., (1984): *“Fertilità biologica del terreno e concimi a lento effetto”*. Annali dell’Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Volume XII- Anni 1983-1984- Roma.

Nella tabella 2 e 3 vengono riportate le caratteristiche chimico, fisico e biologiche di tre suoli molto ben differenziati dal punto di vista fisico e chimico (sabbia 89%, 59%, 35%; pH 7,5, 7,9, 5,8, C org %, 2,44, 1,18, 0,27) ma non altro e tanto diversi nei parametri biologici. Mentre il suolo di Roma è a fertilità biologica alta, Paliano e Città di Castello hanno una fertilità biologica molto bassa e simile tra loro, contrariamente a quanto si sarebbe ritenuto per Città di Castello che si collocava in posizione intermedia tra i due. Le ragioni di questo comportamento sono da ricercare nella gestione agronomica del sito di Città di Castello a monocoltura di tabacco da decine di anni e con una evidente perdita di produttività negli ultimi anni a causa della stanchezza del suolo. Tale situazione emerge chiaramente solo dall’analisi dei parametri biologici riportati nelle ultime tre colonne della tabella. I valori infatti della respirazione, nitrificazione e ammonificazione esprimono per Città di Castello e Paliano valori più simili rispetto a Roma, giustificando anche differenti livelli produttivi.

**Tabella 2 - Principali caratteristiche fisico-chimiche e biologiche**

Luogo	pH				CSC (ammonio acetato N pH 7)	Totale N% (Kjeld.)	Sostanza organica %	Respirazio- ne C-CO <sub>2</sub> mg/kg	Nitrifica- zione %	Ammo- nificazione %
	S %	L %	A %	H <sub>2</sub> O (1:25)						
Roma	88,6	2,1	9,3	7,5	27,8	0,175	4,21	349	100	89
Città di Castello	59,2	14,3	26,5	7,9	17,4	0,131	2,04	110	76	51
Paliano	35,1	34,0	30,9	5,8	16,1	0,038	0,46	87	55	29

Caso studio: valutazione d'impatto di colture geneticamente modificate sui cicli biogeochimici del C e dei N.

Benedetti A., Pompili L., Mocali S., Marchionni M., Lener M., Nisini L. (2005):” *Monitoraggio dell'impatto diretto e differito delle colture geneticamente modificate sull'ambiente suolo nella Regione Lazio*”. Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante ed.

Negli anni 2000-2006 sono state condotte due campagne di monitoraggio dell'impatto differito sul suolo di colture geneticamente modificate relativamente a 29 siti sperimentali sul territorio della Regione Lazio. Nella tabella 3 viene riportata una sintesi dei rilievi biologici effettuali sul suolo e si evidenzia come in alcuni casi (pomodoro, zucchina, bietola, melone) sia stato impossibile poter valutare alcun impatto a causa della scarsa se non nulla attività biologica del suolo. Questo andamento non è ovviamente imputabile alla presenza di colture geneticamente modificate che vengono infatti confrontate con parcelle non GM, ma denunciano una bassissima fertilità biologica dovuta all'impatto generato dalla gestione agronomica condotta negli anni precedenti. Nel caso del melone (ultime due righe della tabella) si denota un accumulo di carbonio organico per l'assenza quasi totale di mineralizzazione da parte dei microrganismi (C biom).

**Tabella 3** – Valutazione dell'impatto delle colture geneticamente modificate sulla biodiversità del suolo

	Tex	pH	C <sub>org</sub> %	C <sub>biom</sub>	C <sub>biom</sub> /C <sub>org</sub>	C-CO <sub>2</sub> bas.	qCO <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	k	Nitrif. %
BIETOLA PONT. test	A	6,9	2,8	139	0,5	6	1,7	176	0,47	25
BIETOLA PONT. GM			2,9	241	0,8	5	0,9	158	0,58*	28
<i>Tolleranza al glufosinato + kanam.</i>										
BIETOLA B.go	FA	6,7	1,4	103	0,8	5	1,9	121	0,53	nd
BIETOLA B.go			1,2	72	0,6	5	2,8	100	0,53	
<i>Tolleranza al glufosinato + kanam.</i>										
POM test	FA	6,1	0,6	nr	—	2	—	33	0,38	nr
POM GM			0,7			2		41	0,44	
<i>Resistenza a virus + kanam.</i>										
ZUC test	SF	6,3	0,5	34	0,7	2	2,0	48	0,49	11
ZUC GM			0,5	20	0,4	2	3,2	37	0,43	9
<i>Resistenza a virus + kanam.</i>										
MEL test	FA	6,7	5,5	—	—	16		457	0,50	—
MEL GM			5,6	148	0,3	14	4,0	548	0,57	72
<i>gene iaaM (sintesi auxina) + kanam.</i>										

## Bibliografia

- Alianiello F., Benedetti A. (1994).: *"Effects of agricultural practices on mineralization kinetics of organic nitrogen"* Proceedings of Symposium held at the Institute for Soil Fertility Research
- Autori vari: *"Linee guida per una produzione di qualità Programma triennale sulla presenza di sostanze organoclorurate nei terreni e nelle colture agrarie della provincia di Latina"* (determina dirigenziale n. C0518 del 7/04/2004 della Regione Lazio); Istituzioni coinvolte Regione Lazio, CRA-PAV, CRA-RPS, ASL-Latina
- Benedetti A., (1984): *"Fertilità biologica del terreno e concimi a lento effetto"*. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Volume XII- Anni 1983-1984- Roma.
- Benedetti A., Pompili L. (2006): *"Batteri"* in: Cenci R. *"Il suolo della Provincia di Pavia"* Commissione Europea, Centro comune di Ricerca di Ispra . pag 48-64
- Benedetti A., Pompili L. (2006): *"Batteri"*. In: Cenci et al. *Il suolo della provincia di Pavia*. ISPRA pp. 48-98 Ed. Torchio De' Ricci
- Benedetti A., Pompili L., Mocali S., Marchionni M., Lener M., Nisini L. (2005): *"Monitoraggio dell'impatto diretto e differito delle colture geneticamente modificate sull'ambiente suolo nella Regione Lazio"*. Istituto Sperimentale per la nutrizione delle Piante ed.
- Bloem J., Hopkins D. and Benedetti A. (2006), Eds.: *"Microbial methods assessing soil quality"*. (2006) CABI Publishing.
- Jenkinson D.S., Ladd J.N. (1981) Microbial biomass in soil: measurement and turnover, in *Soil Biochemistry* (eds E.A. Paul and J.N. Ladd), Marcel Dekker, New York, pp. 415-71.
- Lavelle P., Spain A. V. (2001): *"Soil Ecology"* Kluwer Academy Publishers
- Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M., Smalla K., Torsvik V., P. Nannipieri (2004).: *"Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms"*. *Biology and Fertility of Soil* Volume 40, Number 6, Pages: 363-385
- Mocali S., Paffetti D., Emiliani G., Benedetti A., Fani R. (2008): *"Diversity and dynamics of microbial communities isolated from soils treated with fumigant agents"*. *Biology and Fertility of Soil* 44, 557-569.
- Tombesi L.; Benedetti A.; Nigro C.; Moretti R. (1990).: *"Bilanci idrologici nutritivi ed inquinamento"*. Irrigazione e drenaggio, supplemento al n.1

## Bibliografia citata nel testo

1. Gleick, J. (1989). *Caos*. Rizzoli.
2. Wheeler, Q. and Meier, R. (Eds) (2000). *Species concepts and phylogenetic theory - a debate*, Columbia University Press.
3. Cardinali, G., Martini, A., Preziosi, R., Bistoni, F. and Baldelli, F. (2001). Multicenter comparison of three different analytical systems in the evaluation of DNA banding patterns from *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2095-2100.
4. Cardinali, G. (2003). Measure of species variability for a microbial taxonomy based on the relative resemblance. *Riv Biol* **96**, 271-91.

5. de Rojas, M., Ubeda, J. M., Cutillas, C., Mora, M. D., Ariza, C. and Guevara, D. (2007). Utility of ITS1-5.8S-ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the *Rhinonyssus coniventris* species complex (Acari: Rhinonyssidae). *Parasitol Res* **100**, 1041-6.
6. Frealle, E., Rodrigue, M., Gantois, N., Aliouat, C. M., Delaporte, E., Camus, D., Dei-Cas, E., Kauffmann-Lacroix, C., Guillot, J. and Delhaes, L. (2007). Phylogenetic analysis of Trichophyton mentagrophytes human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology* **153**, 3466-77.
7. Antonielli, L. (2009). Teoria e applicazioni biotecnologiche del *continuum-discontinuum* microbico:
8. modelli di speciazione dei lieviti e prospettive per la biodiversità, Perugia.
9. Paccagnini, D., Sieswerda, L., Rosu, V., Masala, S., Pacifico, A., Gazouli, M., Ikonomopoulos, J., Ahmed, N., Zanetti, S. and Sechi, L. A. (2009). Linking chronic infection and autoimmune diseases: *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, SLC11A1 polymorphisms and type-1 diabetes mellitus. *PLoS One* **4**, e7109.

### **Bibliografia utilmente consultabile**

1. Alef K. and Nannipieri P.: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, New York. (1995).
2. Alef K.: Nutrient sterilization, aerobic and anaerobic culture technique. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry (K. Alef and Nannipieri P., eds), pp. 123-133, Academic Press, New York (1995a).
3. Alexander M. (1977). Introduction to Soil Microbiology. Wiley, NY.
4. Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleiffer (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.
5. Anderson T.H. 1994. Physiological analysis of microbial communities in soil: applications and limitations. In: Ritz, K. Dighton, J & Giller, K.E. (eds) Beyond the Biomass. John Wiley & Sons. Chichester, pp. 67-76.
6. Anderson T.H. & Domsh K.H. 1985. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biol. Fertil. Soil* 1. 81-89.
7. Anderson J.P.E. 1982. Soil respiration. In : Page, A.L. (ed.) methods of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Vol. 9, 2nd edn. ASA-SSSA. Madison, WI, pp. 831-871.
8. Anderson J.P.E. and Domsh K.H.: "A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 215-221 (1978).
9. Atlas R.M., Bartha R. (1998). Microbial ecology. Fundamentals and applications, 4th edn. Addison-Wesley, Reading
10. Benedetti A., Dell'Abate M.T., Mocali S., Pompili L. (2006). Indicatori microbiologici e biochimici della qualità del suolo. In: ATLAS - Atlante di Indicatori della Qualità del Suolo. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Osservatorio Nazionale Podologico. Edizioni Delta Grafica, Città di Castello (Perugia).

11. Bintrim, S.B., T.J. Donohue, J. Handelsman, G.P. Roberts, and R.M. Goodman. (1997) Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:277–282.
12. Bloem J., Bolhuis P.R., Veninga M.R. and Wieringa J.: Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (K. Alef and P. Nannipieri, eds.) pp. 162-173, Academic press, new York (1995).
13. Bloem J., Schouten T., Didden W., Akkerius G.J., Keidel H., Rutgers M., Breure T. (2003). Measuring soil biodiversity: experiences, impediments and research needs. In: *Agricultural Impacts on soil erosion and soil biodiversity: developing indicators for policy analysis. Proceedings from OECD Expert Meeting, Rome, Italy, March 2003*. Ed. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio, p.109.
14. Bloem J., Benedetti A., Hopkins D., Eds.: “Microbial methods assessing soil quality”. CABI Publishing (2006).
15. Bolton Jr H, Elliott LF, Papendick RI, Bezdicek DF (1985). Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effects of fertilization and cropping practices. *Soil Biol Biochem.* 17: 297-302.
16. Borneman, J., P.W. Skroch, K.M. O’Sullivan, J.A. Palus, N.G. Rumjanek, J.L. Jansen, J. Nienhuis, and E.W. Triplett. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *App Environ Microbiol* 62:1935–1943.
17. Brookes P.C.: The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soil* 19, 269-279 (1995).
18. Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, Nacamulli C, Tabacchioni S (1998). Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Appl. Soil Ecol.* 8: 11-18.
19. Curtis T.P. and Sloan W.T. (2005). Exploring microbial diversity- A vast below. *Science*, 309: 1331-1333.
20. Dobereiner J.: Isolation and identification of nitrogen fixing bacteria from soil and plants. In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. (K. Alef and P. Nannipieri, eds.), pp. 134-135. Academic Press, New York (1995).
21. Doran JW (1980). Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 765-771.
22. Felske A. and Akkermans A. D. L. (1998). Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soil. *Microb. Ecol.* 36:31–36.
23. Fierer N. and Jackson R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 103 (3): 626-631.
24. Gans J., Wolinsky M. and Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309: 1387-1390.



25. Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 243–70.
26. Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., and Ball A.S. (2003). Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (3): 1800-1809.
27. Gomez E., Ferreras L. and Toresani S. (2006). Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresour. Technol.* 97(13): 1484-1489.
28. Griffiths, B.S., K. Ritz, and L.A. Glover. (1996) Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridization technique. *Microb Ecol* 31:269–280.
29. Heinemeyer O., Insam H., Kaiser E.A. & Walenzik G. 1989. Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and soil* 116, 191-195.
30. Hugenholtz, P., B.M. Goebel, and N.R. Pace. (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180:4765–4774.
31. Hugenholtz, P., G.W. Tyson, R.I. Webb, A.M. Wagner, and L.L. Blackall. 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol* 67: 411–419.
32. Insam H. (2001). Development in soil microbiology since mid 1960s. *Geoderma* 100:389–402
33. Insam H., Amor K., Renner M and Crepaz C.: Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microbial Ecology* 31, 77-87 (1997).
34. Insam H. & Haselwandter K. 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia* 79, 174-178.
35. Jenkinson D.S. & Powlson D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on mycelialism in soil. V.A. method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8, 209-213.
36. Johansson M., Pell M. & Stenström J. 1998. Kinetics of substrate induced respiration (SIR) and denitrification: applications to a soil amended with silver. *Ambio* 27, 40-44.
37. Kaiser E.A., Mueller T., Joergensen R.G., Insam H. & Heinemeyer O. 1992. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 24, 675-683.
38. Kennedy A.C. & Papendick R.I. 1995. Microbial characteristics of soil quality. *J. Soil Water Conserv.* 50, 243-248.
39. Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, and Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58: 169-188.
40. Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P. (1996). The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2449-2456.

41. Lavelle P. (1997). Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research*, 27: 93-132.
42. Liesack, W., and E. Stackebrandt. (1992) Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol* 174:5072–5078.
43. Loczko E., Rudaz A. and Aragno M.: Diversity of anthropogenically influenced or disturbed soil microbial communities. In: *Microbial communities Functional Versus Structural Approaches* (H. Insam and A. Rangger, eds.), pp. 57-67, Springer-Verlag, Berlin (1997).
44. Lorch H.J., Benckieser G. and Ottow J.C.G.: Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. (K. Alef and P. Nannipieri, eds), pp. 136-161. Academic press, New York (1995).
45. Lynch J.M. (2003). Agricultural practices and biodiversity. In: *Agricultural Impacts on soil erosion and soil biodiversity: developing indicators for policy analysis*. Proceedings from OECD Expert Meeting, Rome, Italy, March 2003. Ed. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, p. 101.
46. Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M., Smalla K., Torsvik V., Nannipieri P. (2004): "Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms". *Biol Fertil Soils* 40: 363-385.
47. MacArthur R.H. (1955). Fluctuations of animal populations, and a measure of stability. *Ecology* 36:533–536.
48. McCaig A.E., Grayston S.J., Prosser J.I., Glover L.A. (2001). Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 37-48.
49. McDougald, D., S.A. Rice, D. Wiechart and S. Kjelleberg. (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol Ecol* 25:1-9.
50. Madsen E.L.: "A critical analysis of methods for determining the composition and biogeochemical activities of soil microbial communities in situ. In: *Soil Biochemistry* vol. 9 (G. Stotzky and J.M. Bollag, eds.), pp. 287-370 (1996).
51. Martens R. 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potentials and limitations. *Biol. Fertil. Soils* 19, 87-99.
52. Mocali S., Paffetti D., Emiliani G., Benedetti A. Fani R. (2007). Diversity of heterotrophic aerobic cultivable microbial communities of soils treated with fumigants and dynamics of metabolic, microbial, and mineralization quotients. *Biol. Fertil. Soils* (published on-line: DOI 10.1007/s00374-007-0235-5).
53. Montanarella L. Jones R.S.A. (1999). The European Soil Bureau. In: *Soil Resources of Europe*, P.Bullock, RJA Jones, L.Montanarella (Eds). European Soil Bureau Research Report N° 6, EUR 18991 EN, pp.3-14. Office for official Publications of the European Communities, Luxembourg.
54. Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opinion Microbiol* 2: 317-322.

55. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 54: 655–670.
56. Nordgren A. 1992. A method for determining microbial available N and P in an organic soil. *Biol. Fertil. Soils* 13, 195-199.
57. Nordgren A. 1988. Apparatus for the continuous long-term monitoring of soil respiration rate in large number of samples. *Soil Biol. Biochem.* 20, 955-957.
58. Odum E.P. 1969. The strategy of ecosystem development. *Science* 164, 262-270.
59. Ohtonen R., Aikio S., Vare H. (1997). Ecological theories in soil biology. *Soil Biol Biochem* 29: 1613–1619.
60. Oliver J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43:93-100.
61. Paoletti M.G. (1999). Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes. Elsevier, p. 447.
62. Pokarzhevskii A.D. (1996). The problem of scale in bioindication of soil contamination. In: N.M. van Straalen & D.A. Krivolutsky (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 111-121.
63. Powlson D.S. 1994. The soil microbial biomass: Before, beyond and back. In: Ritz K., Dighton J. & Giller K.E. (eds.) *Beyond the biomass*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 3-20.
64. Ramsay A.J., Standard R.E., Churchman O.J. (1986). Effect of conversion from ryegrass pasture to wheat cropping on aggregation and bacterial population in a silt loam soil in New Zealand. *Australian J. Soil. Res.* 24: 253-264.
65. Sessitsch, A., Weilharter A., Gerzabek M. H., Kirchmann H., and Kandeler E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4215– 4224.
66. Scheu S. (2002). The soil food web: structure and perspectives. *European journal of soil biology*, 38: 11-20.
67. Smith O.H., Petersen G.W. and Needelman B.A., (2000). Environmental indicators of agroecosystems. *Advances in Agronomy*, 69: 75-97.
68. Tilman D. (1982). *Resource competition and community structure*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
69. Torsensson L. & Stenström J. (1986). “Basic” respiration rate as a tool for prediction of pesticide persistence in soil, *Toxicity Assess*, 1, 57-72.
70. Van de Werf H. & Verstraete W. (1987). Estimation of activity soil microbial biomass by mathematics analysis of respiration curves: calibration and test procedure. *Soil Biol. Biochem*, 19, 261-265.
71. Vance E.D., Brookes P.C. & Jenkinson D.S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707.

72. Vignozzi N., Pagliai M. (2006). Indicatori fisici per la qualità del suolo. In: ATLAS - Atlante di Indicatori della Qualità del Suolo. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Osservatorio Nazionale Podologico. Edizioni Delta Grafica, Città di Castello (Perugia).
73. Wardle D.A., Giller K.E. (1996). The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. *Soil Biol Biochem*, 28: 1549–1554.
74. Wardle D.A. & Parkinson D. (1991). A Statistical evaluation of equations for predicting total microbial biomass carbon using physiological and biochemical methods. *Agric Ecosyst. Environ.* 34, 75-86.
75. Whittaker R.H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21:213–251
76. Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.
77. Xu, H.-S., N. Roberts, F.S., Singleton, R.W., Attwell, D.J. Grimes and R.R. Colwell (1992). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol* 8: 313-323.
78. Zdruli P., Jones R.J.A. and Montanarella L. (2004). Organic Matter in the soils of Southern Europe. European Soil Bureau Research Report, EUR 21083 EN, pp.16. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg.
79. Zuberer D.A.: Recovery and enumeration of viable bacteria. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties* (R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollum, eds), pp. 119-144. American Society of Agronomy, Madison.

## Ulteriori letture

- Allievi, L.; Benedetti, A.; Pinzari, F.(2003): “Campionamento, preparazione e conservazione”. In: “Manuale dei metodi di Analisi Microbiologica del suolo” coord. Nannipieri P. e Picci G., Franco Angeli ed.
- Ausubel F.M., et al. 1987. *Current protocols in molecular biology*, section 2.4.2. Wiley, New York, N.Y
- Beijerinck, M. W., 1901. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, vol. 3, 586–595.
- Bloem J., Hopkins D., and Benedetti A. Eds (2006): “Microbial Methods for assessing soil quality” CABI Publishing.
- Burgess L.W; Liddell C.M., Summerell B.A., 1988 *Labopratory Manual for Fusarium research* 2nd ed
- Castaldini et al., 2005. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 : 6719 - 6729
- Gams W (2007) Biodiversity of soil-inhabiting fungi. *Biodiversity Conservation* 16: 69–72
- Dhingra O.D. e Sinclair J.B. (1985) *Basic Plant pathology methods*. CRC press 355 pp.
- Ellis M.B. 1971 *Dematiaceous Hyphomycetes* CABI intern. Kew, Surrey, UK 608 pp.

- Grove and Randall. 1955. Assay methods of antibiotics. Medical Encyclopedia, Inc. New York, N.Y.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p.115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom
- Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M., Smalla K., Torsvik V., P. Nannipieri (2004): “Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms”. Soil Biology and Fertility Volume 40, Number 6, Pages: 363-385.
- Manici L. M. e Bonora P. (2007) Molecular genetic variability of Italian binucleate *Rhizoctonia* spp. isolates from strawberry. European Journal Plant Pathology 118: 31-42
- Mocali S., Paffeti D., Emiliani G., Benedetti A., Fani R. (2008): “Diversity and dynamics of microbial communities isolated from soils treated with fumigant agents”. Biology and Fertility of Soil
- Nelson PE, Tousson TA, Marasas W FO (1983) *Fusarium* Species. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania, PA: The Pennsylvania State University Press. 190 pp.
- Newton J.W. et al., 1953. The Journal of Biological Chemistry, 204: 445 - 451
- Poly et al., 2001. Appl. Environ. Microbiol., 67 : 2255 – 2262 MacFaddin, 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Rennie R. 1981. Canadian Journal of Microbiology, 27: 8 - 14
- Samson R A, van Reenen-Hoekstra ES (1988) Introduction to Food-borne Pathogens. 3rd edition.
- Baarn and Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 299 pp.
- Smith D. e Onions A.H.S. (1994). The Preservation and Maintenance of Living Fungi. IMI technical handbooks No. 2 CABI Publishing 2nd Revised edition
- Watanabe T (2002) Soil and seed fungi. 2<sup>o</sup> ed CRC press 486 pp.
- Zaccardelli M., Del Galdo A., Parisi M., Giordano I, 2002. Caratterizzazione molecolare di isolati di *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* e loro impiego, in pieno campo, per il miglioramento produttivo del pisello proteico. Agroindustria, 1 (3): 153-158.
- Zani et al., 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66 : 3119 - 3124
- Zhang X.X., Kosier B., Priefer B. 2001. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. Molecular Ecology, 10, 2297-2305.