

Giornata di studio su:

Il Metagenoma del suolo:  
problematiche di ricerca  
e prospettive applicative

Firenze, 6 dicembre 2010



## Introduzione alla metagenomica del suolo

Il suolo è un sistema biologico complesso e affascinante caratterizzato da una notevole biomassa microbica e una elevata diversità microbica (Torsvik et al., 1996), da complesse interazioni trofiche, dal predominio della fase solida, dalla presenza di superfici che possono assorbire molecole di importanza biologica come le proteine e gli acidi nucleici (in questo modo geni ed enzimi attivi possono essere protetti dalla degradazione microbica e mantenuti per periodi di tempo più o meno lunghi) e dal fatto che gli organismi viventi occupano un piccolo volume del suolo essendo presenti in zone come la rizosfera (suolo che circonda le radici) o la detritosfera (suolo con residui vegetali in decomposizione), che sono delle “oasi in una desolata landa”. Inoltre ci sono composti inorganici che possono catalizzare reazioni simili a quelle enzimatiche (Nannipieri et al., 2003). Recentemente si è osservato, grazie all’impiego delle tecniche molecolari, che il numero dei virus è più elevato di quello che si riteneva in passato; infatti il rapporto tra numero di virus e numero di batteri è di circa 100, cioè più elevato che negli altri comparti ambientali, con prevalenza dei virus batterici (batteriofagi o fagi) rispetto a quelli animali, di piante o insetti (Wommack comunicazione personale).

Oggi è forse possibile conoscere le specie microbiche che vivono nel suolo attraverso il sequenziamento del DNA estratto dal suolo (meta genoma del suolo). Si tratta di una notevole sfida metodologica, basti pensare che il sequenziamento umano ha riguardato 3 Gbp (1Gbp =  $10^9$  coppie di basi) e quello del genoma microbico del Mar dei Sargassi ha riguardato 6 Gbp mentre quello del suolo può riguardare 1000 Gbp di sequenze microbiche per

\* *Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali, del Suolo e dell’Ambiente Agroforestale, Università degli Studi di Firenze*

grammo di suolo (Vogel et al., 2009). Tuttavia i recenti sviluppi delle tecniche di sequenziamento hanno reso questo obiettivo possibile.

Gli obiettivi della meta-genomica sul suolo sono molteplici poiché consentono: 1) lo studio dei fattori microbiologici implicati nel miglioramento della fertilità del suolo; 2) la comprensione delle interazioni tra microrganismi e piante; 3) la scoperta e il potenziale sfruttamento di microrganismi benefici in agricoltura; 4) la scoperta di nuovi geni e nuove funzioni metaboliche che possono consentire il biorisanamento e biotrasformazione (uso di enzimi nei processi industriali) di terreni inquinati; 5) lo studio per il miglioramento delle potenzialità di accumulo di carbonio (carbon sink) da parte del suolo; 6) l'identificazione di nuove molecole ad attività farmacologica (antibiotici).

L'espressione di frammenti di DNA estratti dal suolo ha consentito di scoprire nuovi antibiotici quali la terragina con attività anti-*Mycobacterium*, che è stata prodotta da *Streptomyces levidans* (Wang et al., 2000), gli antibiotici N acetiltirosina a lunga catena (Brady et al., 2004), gli agenti antifungini in *E.coli* (Chung et al., 2008), e gli antibiotici triaril cationici turbomicina A e B in *E. coli* (Gillespie et al., 2002). Occorre sottolineare che l'espressione del meta-genoma del suolo può produrre antibiotici diversi a seconda dell'ospite batterico in cui è espresso (Kakirde et al., 2010). Con un approccio simile sono stati scoperti dei nuovi enzimi quali  $\alpha$ -amilasi termostabili e resistenti alle condizioni acide (Richardson et al., 2002), lipasi pectinolitiche da suoli con residui vegetali (Solback et al., 2005), agarasi (Vogel et al., 2003), esterasi e lipasi (Rondon et al., 2000; Lee et al., 2004; Ferrer et al., 2005), nitrilasi (Robertson et al., 2004) e  $\beta$ -glucosidasi (Robertson et al., 2004).

Ci sono diversi aspetti metodologici che devono essere decisi prima di iniziare lo studio della meta-genomica del suolo. Occorre decidere se si procede con il solo sequenziamento o con il clonaggio del DNA estratto e con il successivo sequenziamento. Altra decisione da prendere è quella relativa al metodo di estrazione del DNA. Il metodo indiretto, con la separazione delle cellule batteriche dal suolo e la successiva lisi cellulare, consente di avere dei frammenti di DNA piuttosto grossi e quindi di scoprire sequenze di geni. Quello diretto, basato sulla lisi cellulare *in situ* e successiva estrazione del DNA, consente di avere rese maggiori del metodo indiretto ma con frammenti più piccoli che sono idonei al "pyrosequencing" (Bakken e Frostegard, 2006). Il problema maggiore è quello di estrarre il DNA di specie microbiche rare, prevalenti rispetto a quelle presenti con numero di cellule elevato.

Gli altri Paesi hanno investito risorse considerevoli nella meta-genomica del suolo. Ad esempio, l'Agenzia di ricerche francese ha finanziato nel 2008

un progetto di ricerca che prevede il sequenziamento del DNA estratto da un suolo francese di riferimento. Inoltre a livello internazionale è stato costituito un Consorzio internazionale (TerraGenome; <http://terragenome.org>) che ha lo scopo di sequenziare il DNA estratto da un suolo del “Park Grass”, incluso in un esperimento di campo iniziato da circa 150 anni, presso la “Rothamsted Experimental Station” a Harpenden in Gran Bretagna, e ritenuto, dal punto vista internazionale, un esperimento di riferimento. È quindi necessario che ci sia un finanziamento adeguato in Italia per consentire lo studio della meta-genomica del suolo. Ciò oltre a rimanere al passo con gli altri Paesi consentirebbe: 1) la formazione di reti di ricerca transnazionali nelle quali l'Italia potrebbe avere un suo ruolo; 2) la formazione di una scuola italiana di scienza del suolo fortemente internazionalizzata e legata anche allo sviluppo di metodi innovativi (p.e. biologia computazionale); 3) la costituzione di centri di riferimento nazionali per il sequenziamento e l'analisi “ad alta resa” del DNA genomico; 4) lo sviluppo, nei settori biotecnologici, sia in ambito pubblico sia di industria biotech privata, di spin-off per lo sfruttamento delle conoscenze sviluppate.

#### RIASSUNTO

Le tecniche classiche di conta su piastra determinano solamente una bassa percentuale di microorganismi del suolo. L'approccio meta-genomico, basato sulla estrazione del DNA, e sulla purificazione e sequenziamento, con o senza clonaggio, del DNA estratto, consente di determinare la diversità microbiologica del suolo. Inoltre la meta-genomica del suolo consente di comprendere meglio i fattori microbiologici implicati nel miglioramento della fertilità del suolo, le interazioni tra microorganismi e piante e le potenzialità di accumulo di carbonio (carbon sink) da parte del suolo; può anche portare alla scoperta e al potenziale sfruttamento di microorganismi benefici in agricoltura, alla scoperta di nuovi geni e nuove funzioni metaboliche che possono consentire il biorisanamento e biotrasformazione (uso di enzimi nei processi industriali) di terreni inquinati all'identificazione di nuove molecole ad attività farmacologica (antibiotici).

#### ABSTRACT

The plate counts only allow determining a small percentage of microorganisms inhabiting soil. This problem can be overcome by soil metagenomics, based on extraction of DNA from soil, its purification and sequencing. Soil metagenomics can also improve our understanding on microbial processes involved in soil fertility, mechanisms at the basis of the interactions between plant roots and soil microorganisms, and processes at the basis of carbon storage in soil; in addition it can allow the discovery of potential bene-

ficial microorganisms, new genes and metabolic pathways to be used in bioremediation of polluted soils and the identifications of molecules, such as antibiotics, to be used for human health.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BAKKEN L., FROSETGARD A. (2006): *Nucleic acid extraction from soil*, in *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, a cura di P. Nannipieri e K. Smalla (Eds), Springer, Berlin, pp. 49-73.
- BRADY S.F., CHAO C.J., CLARDY J. (2004): *Long-chain N-acyltyrosine synthase from environmental DNA*, «Applied and Environmental Microbiology», 70, pp. 6865-6870.
- CHUNG E.J., LIM H.K., KIM J.C., CHOI G.J., PARK R.J., LEE M.H., CHUNG Y.R., LEE S.W. (2008): *Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in Escherichia coli*, «Applied and Environmental Microbiology», 74, pp. 723-730.
- FERRER M., GOLYSHINA O.V., CHERNIKOVA T.N., KHACHANE A.N., MARTINS DOS SANTOS V.A., YAKIMOV M.M., TIMMIS K.N., GOLYSHIN P.N. (2005): *Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin*, «Chemical Biology», 12, pp. 895-904.
- GILLESPIE D.E., BRADY S.F., BETTERMANN A.D., CIANCIATTO N.P., LILES M.R., RONDON M.R., CLARDY J., GOODMAN R.M., HANDELSMAN J. (2002): *Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA*, «Applied and Environmental Microbiology», 68, pp. 4301-4306.
- KAKIRDE K.S., PARSELY L.C., LILES M.R. (2010): *Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics*, «Soil Biology and Biochemistry», 42, pp. 1911-1923.
- LEE S.W., WON K., LIM H.K., KIM J.C., CHOI G.J., CHO K.Y. (2004): *Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 65, pp. 720-726.
- NANNIPIERI P., ASCHER J., CECCHERINI M.T., LANDI L., PIETRAMELLARA G. AND RENELLA G. (2003): *Microbial diversity and soil functions*, «European Journal of Soil Science», 54, pp. 655-670.
- TORSVIK V.L., SØRHEIM R. AND GOKSOYR J. (1996): *Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review*, «Journal of Industrial Microbiology», 17, pp. 170-178.
- RICHARDSON T.H., TAN X., FREY G., CALLEN W., CABELL M., LAM D., MACOMBER J., SHORT J.M., ROBERTSON D.E., MILLER C. (2002): *A novel high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase*, «The Journal of Biological Chemistry», 277, pp. 26501-26507.
- ROBERTSON D.E., CHAPLIN J.A., DE SANTIS G., PODAR M., MADDEN M., CHI E., FARWELL B., PRESON L.A., TAN X., SNEAD M.A., KELLER M., MATHUR E., KRETZ P.L., BURK M.J., SHORT J.M. (2004): *Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis*, «Applied and Environmental Microbiology», 70, pp. 2429-2436.
- RONDON M.R., AUGUST P.R., BETTERMANN A.D., BRADY S.F., GROSSMAN T.H., LILES M.R., LOIACONO K.A., LYNCH B.A., MACNEIL J.A., MINOR C., TIONG C.L., GILMAN M., OSBURNE M.S., CLARDY J., HANDELSMAN J., GOODMAN R.M. (2000): *Cloning the soil metagenome, a strategy for accessing the generic and functional diversity in uncultured microorganisms*, «Applied and Environmental Microbiology», 66, pp. 2541-2547.

- SOLBACK A.I., RICHARDSON T.H., MCCANN R.T., KLINE K.A., BARTNEK F., TOMLINSON G., TAN X., PARRA-GESSERT L., FREY G.J., PODAR M., LUGINBUHL P, GRAY K.A., MATHUR E.J., ROBERTSON D.E., BURK M.J., HAZLEWOOD G.P., SHORT J.M., KEROVUO J. (2005): *Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric*, «The Journal of Biological Chemistry», 280, pp. 9431-9438.
- VOGEL S., LEGGEWIE C., UESBECK A., RAASCH C., JAEGER K.E., STREIT W.R. (2003): *Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome*, «Applied and Environmental Microbiology», 69, pp. 6235-6242.
- VOGEL T.M., SIMONET P., JANSSON J.K., HIRSCH P.R., TIEDJE J.M., VAN ELSAS J.D., BAILEY M.J., NALIN R., PHILIPPOT L. (2009): *TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome*, «Nature», 252, editorial.
- WANG G.Y., GRAZIANI E., WATERS B., PAN W., LI X., MCDERMOTT J., MEURER G., SAXENA G., ANDERSEN T.J., DAVIES J. (2000): *Novel natural product from soil DNA libraries in a *Sterptomyces hos**, «Organic Letters», 2, pp. 2401-2404.



ERICA LUMINI\*, VALERIA BIANCIOTTO\*, PAOLA BONFANTE\*

## La biodiversità fungina nel suolo: un approccio di metagenomica

La metagenomica è una tecnologia relativamente recente che nasce grazie ai veloci progressi ottenuti con la genomica: si pone infatti l'obiettivo di sequenziare il genoma di tutti i microrganismi che proliferano in un determinato ambiente, o in una specifica nicchia. Questi studi si basano infatti sull'ipotesi che un determinato ecosistema (un oceano, ma anche l'intestino umano) funzioni grazie all'integrazione di attività metaboliche che provengono da svariati microrganismi. Diventa cruciale, pertanto, da una parte avere la lista dei microbi presenti (e quindi descrivere la biodiversità di quell'ambiente), ma dall'altra anche conoscere la funzionalità del sistema attraverso l'annotazione dei geni identificati nel processo di sequenziamento.

Alcune analisi metagenomiche hanno raggiunto entrambi gli obiettivi: ad esempio il gruppo di Craig Venter che non solo ha elencato i procarioti presenti ma ha anche identificato nuove funzioni in ambiente oceanico. Altri ambienti assai complessi ed eterogeni come il suolo si sono posti come primo obiettivo quello di descrivere la biodiversità.

### I FUNGHI:

#### UNA COMPONENTE ESSENZIALE DELLA COMUNITÀ MICROBICA DEL SUOLO

Procarioti e funghi rappresentano i componenti principali della biodiversità microbica di un suolo. I procarioti, presenti con un ampio numero di *taxa* differenti, sono il gruppo più abbondante nella maggior parte dei terreni con un

\* Istituto Protezione Piante, IPP- UOS Torino CNR e Dipartimento Biologia Vegetale, Università di Torino

numero di specie compreso tra 2000 e 8.3 milioni (Gans et al., 2005; Schloss e Handelsman, 2006), di cui solo una piccola parte è stata descritta, perché coltivabile. Il secondo raggruppamento di cui si compone la microflora del suolo è quello dei funghi. Studi recenti suggeriscono che il numero di specie fungine sia di circa 1 milione e mezzo, di cui poco più di 45.000 descritte (Hawskworth, 2001). Nonostante i funghi del suolo siano studiati da secoli, le moderne tecniche di biologia molecolare dimostrano che le strategie basate sulla coltivazione *in vitro* hanno fortemente sottostimato la ricchezza totale di comunità fungine che vivono nel terreno (Schadt et al., 2003; Jumpponen et al., 2005; O'Brien et al., 2005). Nel comparto suolo, anche se i batteri, in termini numerici, eccedono di alcuni ordini di grandezza i funghi, sono questi ultimi a fornire la maggiore biomassa (500-5.000 kg di massa umida per ettaro di suolo).

I funghi hanno una struttura miceliare grazie alla quale colonizzano tutti i substrati, ed – esplorando il suolo – assorbono elementi minerali e sostanze organiche necessarie per il loro metabolismo. Grazie a queste loro capacità hanno svolto un ruolo di fondamentale importanza aiutando le piante a conquistare le terre emerse più di 450 milioni di anni fa. Le funzioni svolte dai funghi nel suolo sono numerose: controllo dei cicli biogeochimici, della nutrizione e salute delle piante, della strutturazione e fertilità del suolo. Questa molteplicità di azioni è dovuta da un lato alla loro grande abbondanza, e dall'altro alle svariate modalità di nutrizione che essi hanno e che spaziano dalla chemioeterotrofia fino a relazioni trofiche tipiche delle simbiosi (Girlanda et al., 2007; Bonfante e Genre, 2010).

La straordinaria diversità genetica e funzionale dei funghi e la ricchezza di specie trovate nel suolo li rendono, pertanto, una componente chiave di quasi tutti gli ecosistemi con una grande potenzialità per ricadute applicative in diversi settori delle biotecnologie agro-ambientali.

Lo scopo del presente articolo è quello di sottolineare come l'utilizzo di un approccio di metagenomica basato sul pirosequenziamento (gene-target pirosequencing approach) possa aiutare a comprendere la distribuzione, la composizione e la dinamica delle comunità fungine nel suolo e in particolare quelle micorrizico arbuscolari (AM), che rappresentano il gruppo di funghi simbiotici maggiormente diffuso in molti ecosistemi naturali e agrari.

#### I SIMBIONTI MICORRIZICI: UN PONTE TRA IL SUOLO E LE PIANTE

Tra le varie categorie di funghi, quelli micorrizici rappresentano un gruppo particolarmente importante da un punto di vista ecologico perché colonizzano

la quasi totalità degli ecosistemi terrestri. I funghi micorrizici sono microorganismi del suolo che entrano in simbiosi con le radici delle piante (Smith e Read, 2008) stabilendo una simbiosi detta “micorrizza”. Le associazioni pianta-fungo sono ampiamente distribuite nel regno vegetale: non solo essi sono presenti nelle radici del 95% delle piante da seme, ma anche nei gametofiti di molte briofite e pteridofite, nonché negli sporofiti di queste ultime (Bonfante e Genre, 2008; Smith e Read, 2008; Brundrett, 2009). La funzione ormai riconosciuta per queste simbiosi è il miglioramento della nutrizione minerale della pianta ospite con conseguente effetto positivo sulla sua crescita e cessione di zuccheri all'ospite fungino. Grazie alla simbiosi micorrizica, la pianta risulta essere più resistente a stress biotici o abiotici, aumenta la tolleranza alla mancanza di acqua o alla presenza di inquinanti, e porta a una riduzione della sensibilità ai comuni agenti patogeni (Smith e Read, 2008). Le diverse associazioni micorriziche sono divise in numerose categorie tra cui le più diffuse sono: micorrize arbuscolari, ectomicorrize, micorrize ericoidi e micorrize delle orchidee.

Le associazioni micorriziche si trovano nella quasi totalità delle piante annuali e perenni. Circa i due terzi di queste piante, sono piante erbacee appartenenti a specie coltivate (per esempio, mais, leguminose e pomodoro) e formano simbiosi con i funghi micorrizici arbuscolari (AMF) appartenenti al *phylum* dei *Glomeromycota*. In particolare, le simbiosi AM aumentano la disponibilità di elementi minerali (es. fosforo) per la pianta, controllano la qualità delle comunità vegetali aumentandone la biodiversità e produttività e vengono perciò considerati dei biofertilizzatori naturali. Assumono, quindi, un notevole interesse nello sviluppo di una agricoltura sostenibile, basata fondamentalmente sulla limitazione dei fertilizzanti, sul rispetto degli equilibri microbiologici e sulla conservazione della struttura del suolo.

Per tutti questi motivi lo studio della distribuzione, della composizione e della dinamica delle comunità fungine AM nel suolo risulta prioritario per conoscere e comprendere il ruolo svolto da questi importanti microrganismi che rappresentano il gruppo di funghi simbiotici maggiormente diffuso negli ecosistemi naturali e agrari.

### *Considerazioni sulla biodiversità dei funghi AM: un capitale ecologico del suolo*

La preservazione del patrimonio della biodiversità nel suolo è un obiettivo condiviso dalla comunità scientifica e dalle agenzie internazionali di ricerca (un esempio: Terragenome- International Soil Metagenome Sequencing

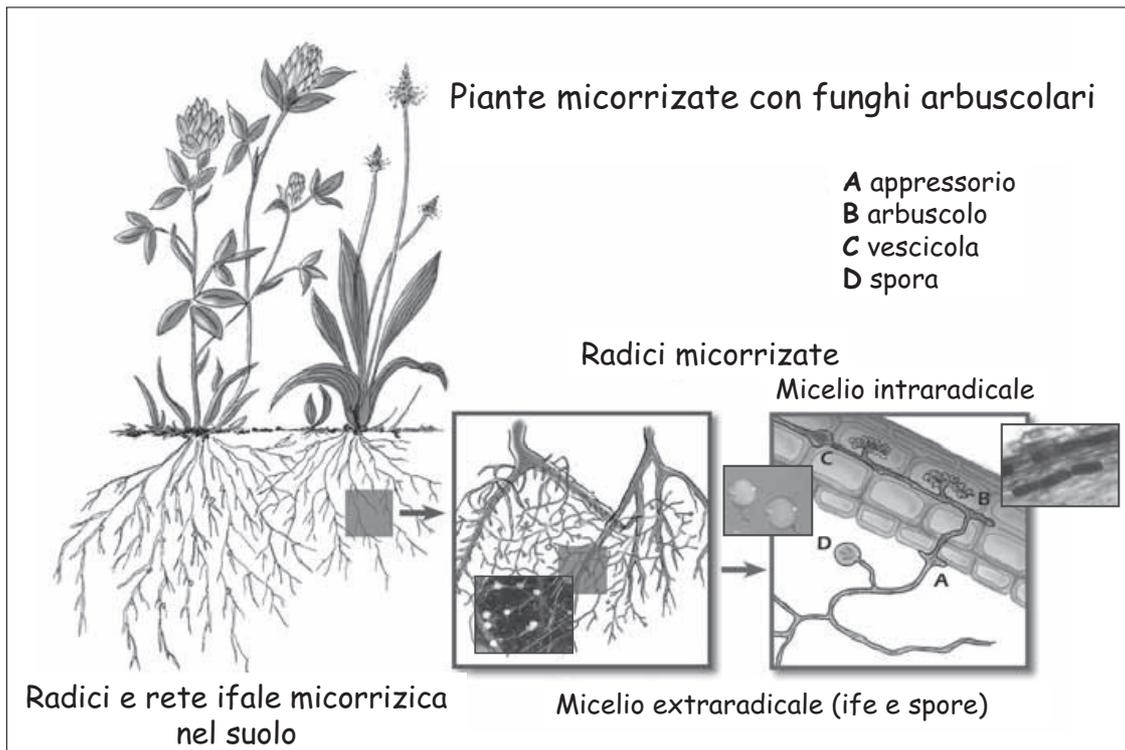


Fig. 1 *Ciclo vitale dei funghi micorrizici arbuscolari (AMF). I funghi AM colonizzano le radici delle piante ospiti e proliferano nel suolo formando spore e una fitta rete ifale extraradicale. Questa rete miceliare si estende dalle radici delle piante ospiti nel suolo contribuendo alla sua strutturazione*

Consortium, <http://www.terragenome.org/>). La sua realizzazione richiede una migliore comprensione della capacità delle comunità microbiche indigene di rimanere stabili se sottoposte a perturbazioni ambientali causate dalle attività umane. In questo quadro si comprende l'importanza del mantenimento della biodiversità dei funghi AM in quanto essi rappresentano una risorsa genetica che, variando, determina modificazioni nella qualità del suolo e delle comunità vegetali a essi associate. Essi, infatti, essi sono responsabili dell'incremento della biodiversità e dell'equidistribuzione delle specie in una comunità vegetale (van der Heijden et al., 2008). Questo effetto benefico è tanto maggiore quanto più elevata è la biodiversità dei funghi stessi in quanto la presenza di più generi o famiglie garantisce un tasso più alto di tratti funzionali (Gamper et al., 2010). Una comunità di AMF del suolo con il suo patrimonio genetico è formata sia da micelio extraradicale sia da spore (fig. 1). I miceli extraradicali rappresentano circa l'85% della biomassa dei funghi AM e il 20-30% della biomassa dei microrganismi del terreno (Girlanda et al., 2007). Nonostante l'elevata biomassa miceliare presente nel suolo, la maggior parte degli studi condotti finora

sulla biodiversità di funghi micorrizici-arbuscolari è stata basata sull'analisi di radici micorrizzate e/o di spore raccolte da suolo.

Il nostro gruppo ha intrapreso invece, per la prima volta, la caratterizzazione delle comunità fungine AM direttamente dal suolo applicando un approccio metagenomico di ultima generazione per l'analisi della biodiversità del "capitale genetico AMF" presente in un sito mediterraneo lungo un gradiente di uso del suolo (Lumini et al., 2010).

#### LE NUOVE STRATEGIE PER LO STUDIO DEI MICROORGANISMI APRONO UNA FINESTRA SULLA DIVERSITÀ FUNGINA DEL SUOLO

A partire dagli anni Novanta gli ecologi hanno incominciato a usare sempre più frequentemente un approccio cosiddetto di «Metagenomica» o «Genomica Ambientale» o «Genomica delle Comunità» (Hugenholtz e Tyson, 2008). Si tratta dello studio di genomi, o meglio di sequenze amplificate da genomi, ottenuti direttamente da campioni ambientali. Negli ultimi anni la metagenomica ha conosciuto un forte impulso, dovuto allo sviluppo di nuovi strumenti bioinformatici e al miglioramento delle tecniche di amplificazione del DNA. Recentemente, tra coloro che si occupano di analisi della biodiversità, ha trovato crescenti apprezzamenti nello studio dei metagenomi la tecnica del pirosequenziamento e in particolare le piattaforme 454 di pirosequenziamento massivo (Genome Sequencer FLX System, Roche), che evitando il processo di clonaggio permettono di ottenere un numero di sequenze così elevato (400 milioni di basi di alta qualità per in una corsa di circa 10 ore) che con le tecniche molecolari classiche sarebbe impossibile ottenere. Inoltre, l'alto numero di sequenze ottenute permette di catturare sequenze di organismi rari altrimenti non determinati.

Questa strategia di nuova generazione è basata sull'amplificazione massiva di frammenti di DNA di molecole target (gene-target approach sequencing) atte sia all'identificazione dei microrganismi a diversi livelli tassonomici (DNA barcoding *sensu lato*) che alla caratterizzazione di geni funzionali chiave per l'ecosistema studiato.

Dal 2009 a oggi sempre più gruppi di ricerca hanno utilizzato questo nuovo approccio negli studi di metagenomica volti ad analizzare le comunità fungine totali presenti in diversi ecosistemi: Buée et al. (2009) su suoli forestali francesi, Jumpponen et al. (2009 and 2010) sulla fillosfera e rizosfera di *Quercus* spp., Ghannoum et al. (2010) sull'apparato boccale di individui sani, Lim et al. (2010) su suoli di tre isole del Mar Giallo in Korea, Rousk et al. (2010) su aree a pH variabile di suoli agrari, Tedersoo et al. (2010) su suoli

tropicali del Korup National Park in Cameroon e Wallander et al. (2010) in impianti forestali di *Picea abies* in Svezia.

Fino a ora soltanto 2 gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione sulla componente fungina AM (Öpik et al., 2009; Lumini et al., 2010). Öpik e colleghi (2009) hanno utilizzato la strategia del pirosequenziamento per l'analisi delle comunità di AMF in radici di differenti piante erbacee in una foresta estone. Questo studio ha aumentato il numero di taxa fungini AM rilevati nello stesso sito forestale: 20 taxa in più rispetto ai 31 taxa precedentemente trovati utilizzando un approccio classico di clonaggio e sequenziamento (Öpik et al., 2008), evidenziando così una maggiore e inattesa diversità fungina. Il nostro gruppo, invece ha utilizzato la strategia del pirosequenziamento per caratterizzare e confrontare le comunità di AMF presenti in un sito mediterraneo (Berchidda, Olbia) in cinque suoli lungo un gradiente di uso del territorio (vigneto lavorato, vigneto inerbito, erbaio, pascolo, formazione forestale a *Quercus suber* – sughereta) (Lumini et al., 2010).

Questo studio è il primo e offre il più grande set di dati di sequenza AMF finora ottenuti da suolo. Esso ha utilizzato un approccio di “genetarget pyrosequencing” basato sull'amplificazione massiva di frammenti di rDNA (18S-SSU) come molecola target utilizzando diversi set di primer ritenuti adatti all'amplificazione di taxa appartenenti a *Glomeromycota*. Uno degli aspetti più critici del nostro studio è stato l'identificazione delle sequenze ottenute. Il primo passaggio dell'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute è stata la creazione di *Operational Taxonomic Units* (OTUs) con un grado di similarità del 97%. Un'OTU, infatti, è definita come un gruppo di sequenze aventi non più del 3% di dissimilarità l'una dall'altra. Questo valore percentuale non è scelto casualmente, in quanto esso consente una discriminazione a livello di specie (Hugenholtz et al., 1998; Sait et al., 2002; Schloss et al., 2004).

Dopo aver identificato ciascuna OTUs è stato stabilito di utilizzare esclusivamente quelle formate da sequenze di lunghezza  $\geq 200$  bp. Questa soglia ha permesso di escludere le sequenze troppo corte e non sufficientemente significative per individuare in modo sicuro un organismo. Infatti i *database* che raccolgono sequenze di specie fungine AM non sono ancora sufficientemente sviluppati per consentire un'analisi completa delle comunità del suolo e solo con il tempo e con nuove strategie metodologiche sarà possibile ovviare a questa mancanza. Un primo passo in questo senso è l'open-access *database* MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>) che comprende la maggior parte delle sequenze disponibili di *Glomeromycota* e i relativi metadata associati (Opik et al., 2010). Tale *database* infatti può guidare e aiutare il corretto

assegnamento delle sequenze ottenute ai diversi livelli tassonomici voluti (ordine, genere, specie).

Da un punto di vista ecologico, il principale risultato che emerge dal nostro studio sulle comunità fungine AM presenti nel suolo è l'inaspettata biodiversità rilevata negli ambienti analizzati arrivando a evidenziare fino a 74 *taxa* virtuali di *Glomeromycota* in un unico terreno. Questo risultato rappresenta il numero più alto di *taxa* finora descritti in un singolo suolo. In particolare i *taxa* appartenenti a *Glomerales* sono risultati dominanti in tutti e cinque i suoli indagati (vigneto lavorato, vigneto inerbito, erbaio, pascolo e la formazione forestale a quercia da sughero). Questo risultato non è casuale dato che tale *taxon* comprende il maggior numero di funghi AM noti al momento e predominanti sia in simbiosi con svariati ospiti vegetali che in moltissimi ambienti: dai suoli a coltivazione intensiva alle foreste tropicali e boreali, passando per le praterie e i pascoli (Öpik et al., 2006).

L'analisi condotta e i risultati ottenuti portano a una serie di considerazioni relative sia alla biodiversità complessiva del sito mediterraneo oggetto di studio sia di quella individuata singolarmente nei cinque sistemi agroforestali. Infatti, utilizzando i valori dell'indice di Shannon-Wiener per una stima della biodiversità dei funghi AM presente nei cinque diversi suoli si è notato che la biodiversità maggiore si trova nel pascolo, mentre quella più bassa nell'erbaio. Questo trova una spiegazione valutando la tipologia di ambiente: il primo ha un carattere più "naturale", mentre il secondo è un sito "artificiale" in quanto sottoposto annualmente a pratiche agronomiche che, è stato dimostrato, portano a una riduzione della biodiversità di AMF (Jansa et al., 2002; Öpik et al., 2006). Un altro dato significativo che emerge è il tasso di AMF trovato nel vigneto inerbito, superiore rispetto a quello del vigneto lavorato. Questo risultato conferma e suggerisce, in accordo con altri studi (Hijri et al., 2006, Balestrini et al., 2010), come attività agronomiche poco perturbanti, inclusa la rotazione colturale e il mantenimento della copertura vegetale, predispongano il suolo a preservare e incrementare il suo "capitale genetico" di funghi AM. Il valore dell'indice di Shannon-Wiener ottenuto nella formazione forestale a *Quercus suber* è risultato essere il più basso in assoluto. Questo non stupisce se si considerano le caratteristiche ecologiche della sughereta che è colonizzata prevalentemente da altri simbionti fungini, quelli ectomicorrizici. Infatti è noto che la presenza di specie arboree e arbustive determina la sostituzione delle comunità fungine endosimbiotiche (AMF) con gruppi micorrizici aventi altre peculiarità (Girlanda et al., 2007).

In generale, i risultati ottenuti hanno evidenziato l'influenza di due fattori diversi sulla biodiversità fungina AM: input antropico e caratteristiche eco-

logiche. Alti input antropici (ad esempio l' erbaio) hanno determinato bassa biodiversità AMF e vice-versa. Allo stesso modo, la presenza di tratti forestali (come nella formazione a quercia da sughero) determina una riduzione della diversità AMF.

#### PROBLEMATICHE LEGATE ALLO STUDIO DEL METAGENOMA FUNGINO DEL SUOLO

Considerando la probabile diffusione di approcci di metagenomica per la caratterizzazione della biodiversità fungina, basati sia su tecnologie di sequenziamento tradizionali che nuove, alcune considerazioni generali sui problemi inevitabili, che dovranno essere affrontati, sono obbligatorie.

Il primo problema che deve essere affrontato in uno studio di metagenomica è la strategia di campionamento, valutando criticamente le tecniche e il disegno sperimentale che si intende utilizzare per evidenziare il maggior numero di specie fungine presenti nei campioni. Infatti si deve tener presente la grande eterogeneità spaziale dell'ambiente suolo. Quando si studia la diversità fungina, solitamente si utilizzano repliche di 1-5 g di suolo per ciascun campione. Uno dei problemi legati a questo tipo di campionamento è l' intrinseca eterogeneità presente in ogni suolo. Il rischio è quindi quello di rilevare solo le comunità dominanti sottostimando la biodiversità. Alcuni autori suggeriscono di effettuare campionamenti su bassa scala, con numerosi prelievi in uno spazio limitato, in modo da valutare la diversità fungina a livello di *micro-habitat*. Un criterio base per cercare di ottimizzare i risultati è quello di effettuare campionamenti *random*: il campionamento casuale, infatti, permette a ogni campione di avere la stessa identica probabilità di essere scelto come elemento rappresentativo del sistema che si sta analizzando. In questo modo si ha il vantaggio di eliminare gli errori sistemici aumentando la significatività statistica dei risultati trovati, ovvero la loro attendibilità. Tuttavia, nelle comunità microbiche complesse, come quelle presenti nel terreno, una grande frazione di specie fungine è presente in basse quantità e anche con i recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento, un censimento completo di tutte le specie fungine, risulta essere un obiettivo difficile da raggiungere. Per questo, una strategia che preveda repliche statistiche dei campioni è sicuramente obbligatoria per ottenere la migliore copertura della biodiversità studiata e per operare confronti di ambienti diversi (Prosser, 2010).

Una volta che il disegno sperimentale è deciso, il secondo problema che deve essere superato riguarda l'ottimizzazione della estrazione del DNA.

Questo passaggio è particolarmente difficile quando il campione esaminato è una matrice complessa, come il suolo. Estrazioni di DNA da campioni ambientali sono possibili utilizzando sia kit commerciali che protocolli “fatti in casa”. Tuttavia, in alcuni casi, come per i terreni ricchi di argilla e/o sostanze umiche, è necessario modificare i protocolli disponibili, al fine di ottenere un DNA di buona qualità. Diversi articoli hanno riportato errori associati all'estrazione del DNA dal suolo e le possibili soluzioni per aggirare questo problema (Feinstein et al., 2009).

Una volta che il DNA metagenomico viene estratto, il terzo problema che deve essere affrontato per lo studio di una comunità fungina, riguarda la scelta di una o più coppie di primer idonea per analizzare la biodiversità complessiva. Infatti, oltre alla mancanza di un set di primer unico, in grado di coprire tutti i maggiori raggruppamenti fungini (*Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*) o di amplificare tutti i *taxa* attualmente descritti all'interno dei singoli raggruppamenti, la possibilità di utilizzare il pirosequenziamento ha portato in evidenza il problema della lunghezza dell'amplificato. La piattaforma di pirosequenziamento attualmente disponibile (GS FLX Titanium Series) permette di ottenere sequenze di una lunghezza media di 400 bp, che potrebbe non essere adeguata per discriminare i *taxa* in modo sufficientemente informativo scendendo a bassi livelli tassonomici o per valutarne le relazioni filogenetiche. Nonostante l'ampio passo compiuto grazie alla biologia molecolare questo problema è particolarmente rilevante in mancanza di un *database* di riferimento sufficientemente ampio e curato. Infatti i *database* che raccolgono più in generale le specie fungine non sono ancora sufficientemente sviluppati per consentire un'analisi completa delle comunità del suolo e solo con il tempo e con nuove strategie metodologiche sarà possibile ovviare a questa mancanza. Primi risultati in questo senso sono il *database* UNITE (<http://unite.ut.ee/>) che comprende circa 163500 sequenze provenienti da campioni fungini ben caratterizzati, essenzialmente funghi ectomicorrizici, (Abarenkov et al., 2010) e l' open-access *database* MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>) che comprende la maggior parte delle sequenze disponibili di *Glomeromycota* e i relativi metadata associati (Opik et al., 2010).

Tali *database* possono infatti facilitare l'individuazione di artefatti biologici e tecnici, che sono molto frequenti, come è stato riportato in alcuni recenti studi che hanno utilizzato il metodo del pirosequenziamento (Quinlan et al., 2008, Kunin et al., 2010; Medinger et al., 2010). Oltre a ciò, c'è un crescente interesse per lo sviluppo di nuovi algoritmi che siano in grado di gestire insieme di dati di grandi dimensioni e di eliminare gli errori di sequenziamento

(Gomez-Alvarez et al., 2009; Quince et al., 2009). Infatti, con una corsa di pirosequenziamento, è possibile ottenere fino a 1.200.000 sequenze. Il grande numero di dati ottenuti con questa metodologia in un tempo relativamente breve porta a molte domande sulla loro gestione.

Il quarto problema riguarda l'identificazione della specie. Gli ecologi e biologi molecolari di solito identificano delle *Operational Taxonomic Units* (OTUs) cioè dei gruppi di sequenze aventi un determinato valore di similarità l'una con l'altra. Un'OTU, infatti, è definita come un gruppo di sequenze aventi non più del 3% di dissimilarità l'una dall'altra. Questo valore percentuale consente una discriminazione a livello di specie, mentre il 5% a livello di genere e il 10% a livello di famiglia/classe. Tuttavia, il livello di somiglianza scelto per la separazione delle OTU come specie unica è arbitrario e discutibile. Questo, naturalmente, è un argomento molto importante perché influenza direttamente il livello di biodiversità rilevato e non è di facile soluzione in quanto uno standard globale per definire le specie fungine non esiste e la diversità genetica varia da *taxon* a *taxon*. Tuttavia, sia il nostro gruppo che Öpik e colleghi (2009) hanno utilizzato il 97% come livello di cut-off per discriminare a un "livello di specie virtuali" le sequenze dei funghi AM.

Un altro problema riguarda la corretta identificazione delle sequenze. Molte delle letture ottenute non trova corrispondenza con alcuna sequenza depositata nelle banche dati. Ciò è dovuto alla percentuale molto bassa (0,6-1,3%, a seconda se si considera 1,5 o 3,5 milioni il numero stimato di specie fungine) delle sequenze fungine rappresentati nelle banche dati (Hibbett et al., 2009). Vi è inoltre il rischio che il crescente numero di studi basati su queste nuove tecnologie possa peggiorare tale situazione poiché molte delle sequenze depositate sono denominate "campione ambientale (environmental sample)" o "organismo sconosciuto (unknown organism)". Per questo motivo, la collaborazione tra tassonomisti, ecologisti e bioinformatici è necessaria per stabilire degli standard accettati da tutti al fine di individuare, descrivere e registrare nuove specie fungine, non solo utilizzando metodologie tradizionali, ma anche le nuove risorse molecolari. Studi recenti (Tedersoo et al., 2010; Napoli, 2009) hanno confrontato le prestazioni del pirosequenziamento con approcci di sequenziamento tradizionali per la caratterizzazione di specie di funghi ectomicorrizici. Anche se il pirosequenziamento e il metodo tradizionale hanno prodotto simili risultati dal punto di vista qualitativo, ci sono state significative differenze a livello della composizione tassonomica delle comunità fungine rilevati per mezzo dei due approcci, in particolare nel numero di taxa rari che sono stati recuperati (i cosiddetti "singleton", che sono *taxa* rappresentati da una solo sequenza).

Concludendo si può dunque affermare che rispetto ai metodi di sequenziamento tradizionali il pirosequenziamento risulta essere un potente strumento per la caratterizzazione delle comunità fungine del suolo.

#### RINGRAZIAMENTI

La Ricerca è stata finanziata dal Progetto Soil-Sink-FISR del Miur e dal Progetto Europeo ENDURE (European Network of Excellence). Si ringraziano il Dr. Alberto Orgiazzi e il Dr. Roberto Borriello che hanno collaborato alle ricerche e il Dr. Giuseppe Torrisi per l'elaborazione grafica della figura.

#### RIASSUNTO

Negli ultimi anni gli studi di metagenomica hanno offerto nuovi approcci per far luce sulle comunità microbiche in una grande varietà di ambienti. In questo contesto il pirosequenziamento viene utilizzato sempre più per indagare le comunità di microrganismi presenti nell'ambiente suolo. I funghi, che sono componenti essenziali della comunità microbica del terreno, dove agiscono come decompositori, agenti patogeni e simbionti micorrizici, sono stati invece largamente trascurati in queste ricerche. Tuttavia, gli ultimi due anni (2009-10) sono stati caratterizzati da un'esplosione di studi di metagenomica applicati alle comunità fungine del suolo e basati sulla tecnologia del pirosequenziamento. Lo scopo della presentazione è quello di sottolineare come l'utilizzo di un approccio di metagenomica basato sul pirosequenziamento (gene-target pirosequencing approach) può aiutare a comprendere la distribuzione, la composizione e la dinamica delle comunità fungine in suoli soggetti a diversi input antropici e in particolare quelle micorrizico arbuscolari che rappresentano il gruppo di funghi simbionti maggiormente diffuso in molti ecosistemi naturali e agrari.

#### ABSTRACT

Metagenomics is a relatively recent technology that was born thanks to the fast progress in genomics, with the main goal of sequencing the genome of all organisms that proliferate in a particular environment, or in a specific niche. These studies are in fact based on the assumption that a given ecosystem (an ocean, but also the human intestine) functions through the integration of metabolic activities that come from a variety of microorganisms. It becomes crucial, therefore, on one hand to get a list of microbes (and then describe the biodiversity of specific environment), but also know functionality of an environment through the annotation of the genes identified in the process of sequencing. Some metagenomic analyses achieved both objectives: for example, Craig Venter's group not only listed the prokaryotes present but also identified new genomic functions in oceans. For other highly complex and heterogeneous environments such as soil the first objective is to describe the microbial biodiversity.

## REFERENCES

- ABARENKOV K., NILSSON R.H., LARSSON K.-H., ALEXANDER I.J., EBERHARDT U., ER-LAND S., HØILAND K., KJØLLER R., LARSSON E., PENNANEN T., SEN R. ET AL. (2010): *The UNITE database for molecular identification of fungi e recent updates and future perspectives*, «New Phytologist», 186, pp. 281-285.
- BALESTRINI R., MAGURNO F., WALKER C., LUMINI E., BIANCIOTTO V. (2010): *Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in Vitis vinifera, a typical Mediterranean fruit crop*, «Environmental Microbiology Report», 2 (4), pp. 594-604.
- BONFANTE P., GENRE A. (2008): *Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective*, «Trends Plant Science», 13, pp. 492-498.
- BONFANTE P., GENRE A. (2010): *Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis*, «Nature Communication», pp. 1-48.
- BRUNDRETT M.C. (2009): *Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis*, «Plant and Soil», 320, pp. 37-77.
- BUÉE M., REICH M., MURAT C., MORIN E., NILSSON R.H., UROZ S., MARTIN F. (2009): *454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpected high fungal diversity*, «New Phytologist», 184, pp. 449-456.
- FEINSTEIN L.M., SUL W.J., BLACKWOOD C.B. (2009): *Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil*, «Applied Environmental Microbiology», 75, pp. 5428-5433.
- GAMPER H.A., VAN DER HEIJDEN M.G.A., KOWALCHUK G.A. (2010): *Molecular trait indicators: moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology*, «New Phytologist», 185, pp. 67-82.
- GANS J., WOLINSKY M., DUNBAR J. (2005): *Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil*, «Science», 309 (5739), pp. 1387-1390.
- GHANNOUM M.A., JUREVIC R.J., MUKHERJEE P.K., CUI F., SIKAROODI M., NAQVI A., GILLEVET, P.M. (2010): *Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals*, «PLoS Pathogens», 6, p. e1000713.
- GIRLANDA M., PEROTTO S., BONFANTE P. (2007): *Mycorrhizal Fungi: Their Habitats and Nutritional Strategies*, in *The Mycota. IV. Environmental and Microbial Relationships*, a cura di Kubicek, C.P., Druzhinina I.S., Springer-Verlag: Berlin, 2<sup>nd</sup> edn., pp. 229-256.
- HAWSKWORTH D.L. (2001): *The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species revisited*, «Mycological Research», 105, pp. 1422-432.
- HIBBETT D.S., OHMAN A., KIRK P.M. (2009): *Fungal ecology catches fire*, «New Phytologist», 184, pp. 279-282.
- HIJRI I., SYKOROVA Z., OEHL F., INEICHEN K., MÄDER P., WIEMKEN A., REDECKER D. (2006): *Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity*, «Molecular Ecology», 15, pp. 2277-2289.
- HUGENHOLTZ P., GOEBEL B.M., PACE N.R. (1998): *Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*, «Journal of Bacteriology», 180, pp. 4765-74.
- HUGENHOLTZ P., TYSON G.W. (2008): *Microbiology: metagenomics*, «Nature», 455, pp. 481-483.
- JANSA J., MOZAFAR A., KUHN G., ANKEN T., RUH R., SANDERS I.R., FROSSARD E. (2003): *Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots*, «Ecological Application», 13, pp. 1164-1176.

- JUMPPONEN A., JOHNSON L.C. (2005): *Can rDNA analyses of diverse fungal communities in soil and roots detect effects of environmental manipulations - a case study from tallgrass prairie*, «Mycologia», 97, pp. 1177-94.
- JUMPPONEN A., JONES K.L. (2009): *Massively parallel 454-sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate Quercus macrocarpa phyllosphere*, «New Phytologist», 184, pp. 438-448.
- LIM Y.W., KIM B.K., KIM C., JUNG H.S., KIM B.S., LEE J.H., CHUN J. (2010): *Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing*, «Journal of. Microbiology», 48, pp. 284-289.
- LUMINI E., ORGIAZZI A., BORRIELLO R., BONFANTE P., BIANCIOTTO V. (2010): *Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach*, «Environmental Microbiology», 12, pp. 2165-2179.
- MEDINGER R., NOLTE V., PANDEY R.M., JOST S., OTTENWÄLDER B., SCHLÖTTERER C., BOENIGK J. (2010): *Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms*, «Molecular Ecology», 19, pp. 32-40.
- NAPOLI C. (2009): *Dissecting the dynamics of microbial communities in a natural truffle-ground: an approach of environmental genomics*, «PhD Thesis» pp. 1-152, Turin University.
- O'BRIEN H., PARRENT J., JACKSON J., MONCALVO J., VILGALYS R. (2005): *Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples*, «Applied Environmental Microbiology», 71, pp. 5544-50.
- ÖPIK M., METSIS M., DANIELL T.J., ZOBEL M., MOORA M. (2009): *Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest*, «New Phytologist», 184, pp. 424-437.
- ÖPIK M., MOORA M., LIIRA J., ZOBEL M. (2006): *Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe*, «Journal Ecology», 94, pp. 778-790.
- ÖPIK M., MOORA M., ZOBEL M., SAKS Ü., WHEATLEY R., WRIGHT F., DANIELL T. (2008): *High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest*, «New Phytologist», 179, pp. 867-876.
- ÖPIK M., VANATO A., VANATO E., MOORA M., DAVISON J., KALWIJ J.M., REIER Ü., ZOBEL M. (2010): *The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota)*, «New Phytologist», 188, pp. 223-241.
- PROSSER J.I. (2010): *Replicate or lie*, «Environmental Microbiology», 12, pp. 1806-1810.
- QUINLAN A.R., STEWART D.A., STRÖMBERG M.P., MARTH G.T. (2008): *Pyrobayer: an improved base caller for SNP discovery in pyrosequences*, «Nature Methods» 5, pp. 179-181.
- ROUSK J., BAATH E., BOOKES P.C., LAUBER C.L., LOZUPONE C., CAPORASO J.G., KNIGHT R., FIERER N. (2010): *Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil*, «ISME Journal», 10, pp. 1-12.
- SAIT M., HUGENHOLTZ P., JANSSEN P.H. (2002): *Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys*, «Environmental Microbiology», 4 (11), pp. 654-666.
- SCHADT C.W., MARTIN A.P., LIPSON D. A., SCHMIDT S.K. (2003): *Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils*, «Science», 301, pp. 1359-61.
- SCHLOSS P.D., HANDELSMAN J. (2004): *Status of the Microbial Census*, «Microbiology and Molecular Biology Reviews», 68 (4), pp. 686-91.

- SCHLOSS P. D. AND HANDELSMAN J. (2006): *Toward a Census of Bacteria in Soil*, «PLoS Computational Biology», 2 (7), pp. e92.
- SMITH S.E., READ D.J. (2008): *Mycorrhizal symbiosis* 3<sup>rd</sup> edn. (Academic Press).
- TEDERSOO L., NILSSON R.H., ABARENKOV K., JAIRUS T., SADAM A., SAAR I., BAHRAM M., BECHEM E., CHUYONG G., KÖLJALG U. (2010): *454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases*, «New Phytologist», 188, pp. 291-301.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., BARDGETT R.D., VAN STRAALEN N.M. (2008): *The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems*, «Ecology Letters», 11 (3), pp. 296-310.
- WALLANDER H., JOHANSSON U., STERKENBURG E., BRANDSTRÖM DURLING M., LINDAHL B.D. (2010): *Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce forests*, «New Phytologist», 187, pp. 1124-1134.

## Produzione e analisi delle sequenze metagenomiche

### INTRODUZIONE

Si definisce qui metagenomica lo studio delle sequenze di DNA, per un totale di almeno 100 Mbp (milioni di coppie di basi), ottenute con un metodo di tipo “shotgun” cioè non ordinate, da un campione ambientale. Tipicamente l’analisi metagenomica mette insieme sequenze di DNA provenienti da molti microrganismi diversi, di cui non è richiesta la coltivabilità e quindi includendo anche i microrganismi difficili o impossibili da coltivare; la molteplicità delle informazioni di sequenza ricavate dall’analisi metagenomica consente infine di affrontare le problematiche connesse alle interazioni tra microrganismi presenti nella comunità microbica. L’analisi metagenomica quindi richiede di produrre e analizzare un numero molto grande di sequenze di DNA.

Questo breve capitolo cercherà di illustrare i problemi connessi a queste due fasi; in particolare, considerando la potenza di produzione di sequenze per mezzo delle apparecchiature di ultima generazione (*next generation sequencing technologies*), sembra evidente che lo sforzo maggiore vada concentrato sull’analisi dei dati, la quale spinge a sua volta la richiesta di potenti e sempre nuove applicazioni bioinformatiche.

In questa comunicazione cercheremo di affrontare le varie fasi dell’analisi metagenomica del suolo seguendo il loro sviluppo temporale, dalla progettazione del lavoro alla sua conclusione.

Le fasi che prenderemo in considerazione, e che costituiscono l’indice del presente capitolo, sono quindi: 1) Considerazioni pre-sequenziamento; 2) Campionamento e raccolta dati; 3) Sequenziamento; 4) Analisi dei dati,

\* Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università degli Studi di Firenze

quest'ultimo a sua volta organizzato in: a) Assemblaggio, b) Annotazione (predizione della funzione dei geni), c) Assegnazione tassonomica (*binning*), d) Composizione della comunità.

#### CONSIDERAZIONI PRE-SEQUENZIAMENTO

Prima di avviare il lavoro di raccolta del campione e di sequenziamento, è necessario stabilire i termini e le finalità del progetto. L'analisi metagenomica, e quindi i risultati che si raggiungono, infatti possono essere fortemente influenzati dalla costituzione della comunità microbica che si va ad analizzare ma anche dalla potenza di sequenziamento utilizzabile (quante basi si possono sequenziare) e infine dalla potenza di analisi disponibile (programmi bioinformatici e componenti hardware disponibili).

La prima domanda che ci si può porre è cosa includere nell'analisi: in un campione di suolo sono presenti procarioti (batteri e archea), eucarioti microscopici quali funghi e protozoi, ma anche piccoli animali quali nematodi e artropodi e infine una grande varietà di virus legati agli organismi suddetti. È chiaro che includere tutti i componenti del suolo è una scelta necessaria alla completezza dell'indagine, in particolare tenendo conto dello stretto legame ecologico, e spesso simbiotico, che c'è tra procarioti ed eucarioti. Includere tutto, in particolare la componente eucariota, significa d'altra parte appesantire enormemente la quantità di dati da analizzare poiché è noto che negli eucarioti le dimensioni molto grandi del genoma si accompagnano spesso a una molto bassa densità dei geni. Rimuovere il DNA eucariotico dal campione che si va a sequenziare può comunque essere complicato e può portare a introdurre altri tipi di errori di campionamento. La scelta quindi va calibrata sulla potenza di sequenziamento e di calcolo che si è in grado di mettere in campo e come è ovvio sugli obiettivi specifici della ricerca.

Un secondo aspetto che va considerato preliminarmente al campionamento e al sequenziamento è la "complessità" della comunità microbica da analizzare. La complessità genetica di una comunità è proporzionale al numero di specie (sequenze diverse) presenti, un parametro definito spesso come *richness*, e alla abbondanza relativa delle specie stesse, definita anche come *eveness*. Quindi una comunità che ha un alto numero di specie diverse, come è quasi sempre quella del suolo, e che presenta una abbondanza relativa delle specie ben distribuita, è molto complessa; al contrario una comunità con poche specie e che tra queste ne abbia solo qualcuna molto rappresentata, è una comunità poco complessa. La maggiore complessità di una co-

munità microbica si riflette nella minore probabilità che due sequenze qualsiasi siano contigue (appartengano cioè allo stesso frammento di DNA). La conseguenza di ciò è che l'analisi metagenomica di una comunità complessa produrrà un numero molto alto di piccoli frammenti non assemblabili, detti contig (il contig è una porzione di DNA genomico formato da sequenze sovrapposte tra loro), mentre una comunità poco complessa tenderà a produrre un numero minore di contig di dimensioni molto grandi, perché in questo caso le sequenze ottenute derivano da pochi genomi. Sapere quindi che la comunità microbica del suolo che si va ad analizzare contiene una o poche specie dominanti è un potente aiuto nell'organizzare i passi successivi del progetto metagenomico. Più avanti, quando parleremo di assemblaggio, vedremo come la grandezza dei contig sia un fattore determinante nel completare con successo un'analisi metagenomica. Quanto più sono grandi i contig, tanto più è possibile ricostruire porzioni significative dei genomi che compongono la comunità. Allo stato attuale dello sviluppo tecnologico, possiamo quantificare questo importante aspetto affermando che le comunità poco complesse, con poche specie dominanti, producono alla fine del processo di assemblaggio contig che vanno da 10 a 100 e più kbp (migliaia di coppie di basi). Le comunità complesse producono contig di dimensioni inferiori alle 10 kbp e spesso molto più piccoli.

Altri elementi da prendere in considerazione nella fase pre-sequenziamento riguardano la tecnologia di sequenziamento che si vuole adottare e la quantità di DNA da sequenziare. Questi due aspetti sono ovviamente legati tra loro e a loro volta legati all'impegno di spesa disponibile perché qualunque metodo di sequenziamento costa in proporzione alle basi sequenziate. Metodi di sequenziamento di ultima generazione (vedi più avanti) hanno un costo per base molto basso e sequenziano in breve tempo un numero di basi molto alto, tuttavia hanno lo svantaggio di produrre frammenti di sequenza molto piccoli che sono poi più difficili da assemblare. Il clonaggio del DNA in vettori di vario tipo d'altra parte, rallenta la velocità di sequenziamento e ne aumenta i costi, ma favorisce enormemente il lavoro di assemblaggio.

Per quanto riguarda la quantità di sequenze da produrre e analizzare non esiste un valore massimo, specialmente per il metagenoma del suolo è improbabile che qualunque progetto, per quanto ambizioso, riesca veramente a comprendere "tutte" le sequenze presenti in un certo suolo; quindi più sequenze si producono maggiore sarà il successo del progetto, sempre che si abbia un apparato di calcolo in grado di gestire tutti i dati ottenuti. Per analizzare una comunità microbica del suolo poco complessa e accontentandosi di mettere in evidenza solo le specie più rappresentative, si può ragionevolmente

stabilire una soglia minima di sequenze da determinare intorno a un valore tra i 100 e i 500 Mbp (milioni di coppie di basi).

#### CAMPIONAMENTO

Una volta scelto il sito in cui campionare il suolo per l'estrazione del DNA, ci sono almeno quattro aspetti molto rilevanti che vanno presi in considerazione prima di passare al campionamento vero e proprio.

Il primo aspetto riguarda il metodo di estrazione e purificazione del DNA che è strettamente correlato alla qualità del suolo, ma che è anche necessario mettere in relazione con la strategia di approccio al metagenoma. I tre punti critici sono la rappresentatività del campione rispetto alla composizione reale della comunità, la quantità di DNA necessaria all'intero progetto e la qualità intesa come dimensione dei frammenti ottenuti. Questi tre punti, insieme a molti altri correlati, sono ampiamente trattati in un altro capitolo di questa raccolta, per cui saranno adesso solamente accennati gli elementi che legano l'estrazione del DNA alle analisi successive.

Se si tratta di un progetto che prevede la produzione di una libreria di cloni bisogna privilegiare tecniche che non frammentano eccessivamente il DNA stesso, anche a scapito della resa; se invece il progetto è finalizzato al sequenziamento del DNA così come estratto, specialmente se si applicano tecniche di *next generation sequencing* il DNA può anche essere "maltrattato" e ridotto a piccoli frammenti, con un notevole incremento di resa. Nel caso di suoli molto poveri di materia organica, la resa del DNA può essere così bassa da rendere necessaria una amplificazione totale del DNA per raggiungere le quantità richieste per il sequenziamento. Questa procedura ha lo svantaggio di tendere ad alterare la rappresentatività relativa delle diverse sequenze, ma allo stesso tempo consente di recuperare le sequenze a singolo filamento, cosa essenziale se nel metagenoma si vuole includere anche quello virale.

Un altro accorgimento che va considerato è quello di prelevare campioni supplementari da utilizzare in parallelo per eventuali ulteriori analisi che si rendessero utili durante lo studio del metagenoma. La ragione di ciò sta nel fatto che se, durante lo studio, si rendesse necessario disporre di ulteriori campioni, il ricampionamento in un tempo successivo non garantisce l'equivalenza dei campioni stessi. Le analisi supplementari che potrebbero essere utili a migliorare i dati metagenomici sono ad esempio quelle sul metatrascrittoma, sul metaproteoma, l'ibridazione con sonde fluorescenti (FISH).

Il terzo aspetto da considerare preliminarmente al campionamento, è la

raccolta dei cosiddetti “metadati”. Questi sono un complemento necessario alla descrizione del metagenoma e spesso ne consentono una corretta chiave interpretativa. Si tratta principalmente di dati collaterali di tipo geografico quali le coordinate geografiche del sito, la temperatura, l’umidità, la data di raccolta e le condizioni climatiche generali. Altri metadati sono la composizione chimica-fisica del suolo (ad esempio tessitura, contenuto in sostanza organica, C, N, P, salinità, presenza di composti organici, metalli pesanti ecc.) la profondità del campione, il tipo di copertura vegetale e la storia dei trattamenti subiti. Infine vanno anche considerate e incluse nella descrizione del campione le principali attività biochimiche riscontrate nel campione. Tra i metadati si sono aggiunti recentemente quelli che riguardano l’analisi delle capacità metaboliche del suolo dovute alla comunità microbica attiva in esso. Questa analisi, nota anche come metafenomica è descritta in dettaglio in un altro capitolo di questa raccolta e non sarà ulteriormente trattata qui.

Infine il quarto aspetto che va affrontato in vista del campionamento è la raccolta di informazioni preliminari sulla comunità microbica residente. Avere un profilo della comunità microbica è un’informazione importantissima prima di iniziare il progetto metagenomico vero e proprio. Usando marcatori tradizionali quali la sequenza del rRNA 16S o di altri geni metabolicamente rilevanti per quel particolare tipo di suolo, si può ricostruire un quadro della comunità che potrà aiutare a indirizzare il lavoro successivo. In particolare questa indagine può risultare conveniente a determinare l’abbondanza e la rappresentatività delle specie nel metagenoma e la possibile presenza di specie dominanti, che, come discusso in precedenza, può essere una informazione determinante per la strategia di sequenziamento.

## IL SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento dei frammenti di DNA metagenomico è la fase cruciale del progetto, anche se non è forse quella più impegnativa in termini di tempo. Grazie alle nuove tecnologie *high-throughput* o *next-generation* (chiamate così perché si considera il metodo di sequenziamento di Sanger come prima generazione) l’ottenimento di miliardi di basi di sequenze è alla portata anche di piccoli laboratori con investimenti relativamente modesti. Non è negli scopi di questa relazione entrare nel dettaglio tecnico delle varie piattaforme di sequenziamento disponibili attualmente, si vuole solo dare un quadro generale delle possibilità e dei vantaggi legati a esse. Le tecnologie attualmente disponibili per il sequenziamento ad alta resa sono riportate nella tabella 1.

PIATTAFORMA	LUNGHEZZA DEL FRAMMENTO SEQUENZIATO	DURATA DEL PROCESSO (GIORNI)	BASI SEQUENZIATE PER PROCESSO (GBP)	COSTO DELLA MACCHINA (US\$)	PRO	CONTRO
Roche 454 - Titanium	300-400	0.35	0.45	500000	Sequenze abbastanza lunghe; processo veloce	Alto costo del proces- so; errori di lettura
Illumina - Solexa	70-100	4-9	18-35	540000	La piat- taforma attual- mente più usata per metageno- mica	Produzio- ne degli stampi; tempi lunghi di processo; sequenze brevi
Life/APG SOLiD	50	7-14	30-50	600000	L'uso di dinucleotidi riduce gli errori	Tempi di processo molto lunghi; sequenze molto brevi

Tab. 1 *Alcune delle piattaforme di sequenziamento di nuova generazione*

Tutti questi sistemi sono applicabili a frammenti di DNA estratti direttamente dal suolo e non necessitano del clonaggio in un vettore. Naturalmente questi stessi metodi si possono applicare a DNA metagenomico precedentemente clonato in un vettore quali plasmidi, cosmidi o fosmidi quando il progetto metagenomico preveda questa procedura per aumentare la possibilità di sequenziare interi geni o anche interi operoni. È da tener presente che le tecnologie di sequenziamento sono in continua e rapida evoluzione ed è quindi possibile che fra pochi anni anche quelle elencate nella tabella saranno diventate obsolete e saranno state sostituite da altre più potenti o più economiche. In ogni caso, nei grandi progetti metagenomici realizzati finora, generalmente sono state applicate in parallelo due tecniche di sequenziamento che hanno aumentato l'accuratezza delle letture e la possibilità di assemblare i frammenti sequenziati.

Alla produzione delle sequenze deve seguire la loro analisi che deve essere a sua volta preceduta da una fase detta di preprocessamento, spesso non attentamente considerata ma essenziale. In questa fase le brevi sequenze prodotte dalle macchine sequenziatrici sono controllate per l'attribuzione delle basi a partire dai grafici o cromatogrammi, in modo da associare a ciascuna base un punteggio che ne indichi il livello di qualità, cioè indichi la probabilità che una certa base sia effettivamente quella indicata. Nel caso si sia usata per il

sequenziamento una libreria di cloni plasmidici, sarà anche necessario eliminare tutte le sequenze appartenenti al vettore plasmidico stesso o all'ospite del clonaggio, in genere l'*Escherichia coli*. Queste operazioni sono svolte in maniera automatica attraverso l'impiego di programmi bioinformatici dedicati.

#### ASSEMBLAGGIO

Come si è accennato in precedenza, l'assemblaggio è una fase cruciale nell'analisi metagenomica e dalla sua qualità può dipendere la buona riuscita di un progetto metagenomico. L'assemblaggio è il processo attraverso cui le singole sequenze lette dalla macchina sequenziatrice vengono messe insieme in catene contigue dette *contig* sulla base della loro similarità. In genere un contig è prodotto dalla sovrapposizione di molti frammenti; il numero di frammenti che si sovrappongono in ogni data sequenza costituisce la "copertura" (*coverage*) o "profondità" della sequenza stessa; quanto più è alta la copertura tanto più è affidabile la sequenza che si sta considerando. Da un primo assemblaggio che consente di ottenere un numero grande di contig, una analisi successiva, la finitura, può consentire di mettere in evidenza una ulteriore contiguità tra contig diversi e assemblarli a loro volta in strutture più grandi e meno numerose dette "impalcature" (*scaffold*). L'assemblaggio delle sequenze in contig e scaffold è un'operazione impegnativa anche nei progetti genomici relativi a una singola specie a causa della presenza di zone ripetute e di possibili parti del genoma, anche piccole, che, per motivi strutturali, non riescono a essere sequenziate; queste difficoltà sono enormemente ampliate nell'assemblaggio delle sequenze metagenomiche, dove l'alto numero di specie e la presenza di sequenze simili appartenenti a genomi diversi rende arduo trovare le corrette sovrapposizioni. I due elementi che di più contribuiscono alla qualità dell'assemblaggio sono la lunghezza delle sequenze lette e la complessità della comunità con la presenza o meno di specie dominanti. Per quanto riguarda le lunghezza dei frammenti questa si è andata sempre più riducendo con l'utilizzo di macchine sequenziatrici di nuova generazione (tab. 1), per quanto riguarda la complessità della comunità questa è sempre molto alta nel metagenoma del suolo e il risultato è spesso una qualità di assemblaggio molto bassa.

Un cattivo assemblaggio può manifestarsi principalmente in due forme: una è costituita da errori di assemblaggio (*misassembly*) che nel metagenoma del suolo sono spesso dovuti alla formazione di contig "chimerici" che contengono parti di sequenza proveniente da specie diverse; l'altra è la dimensione ridotta e il conseguente numero alto di contig.

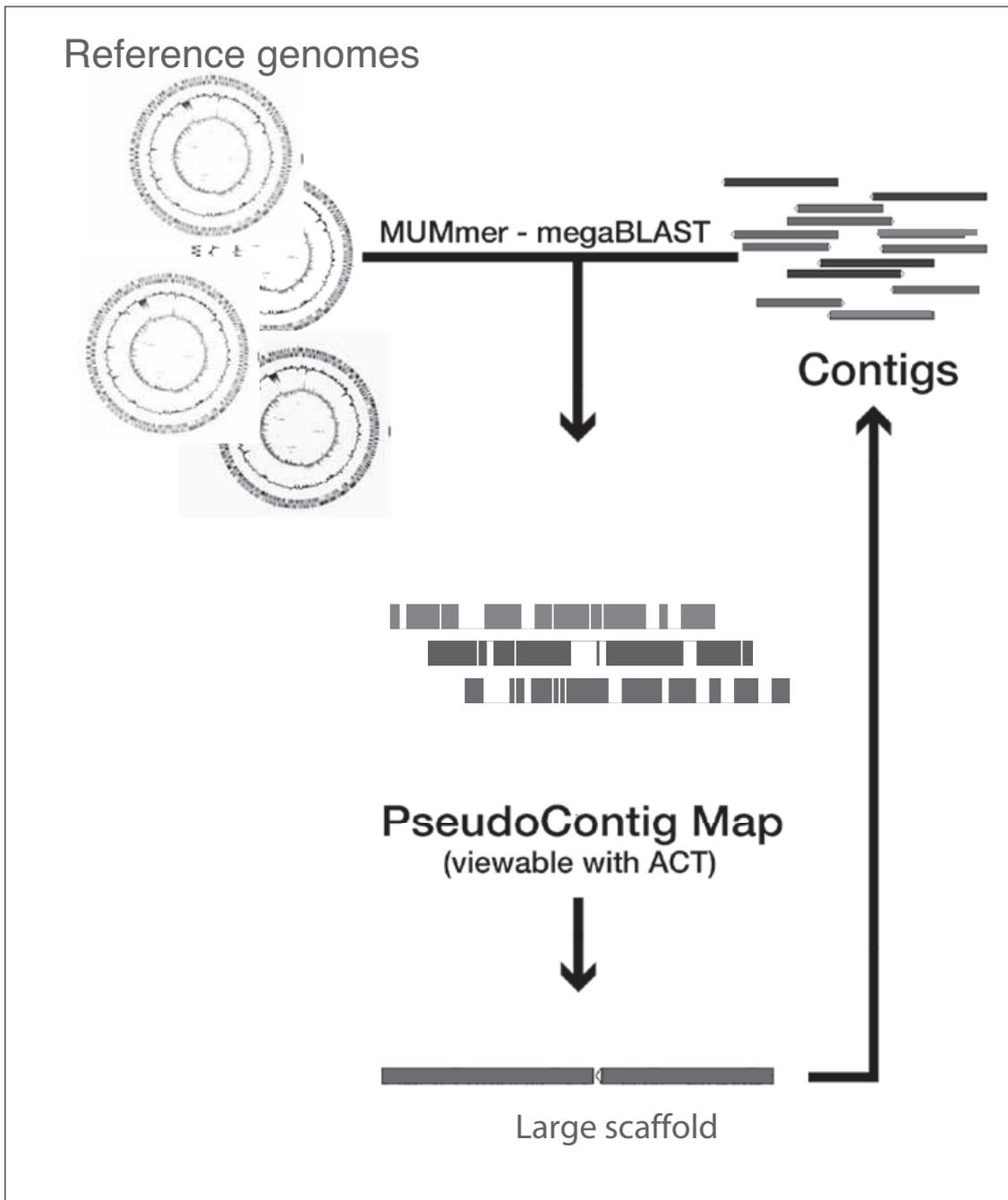


Fig. 1 Schema di assemblaggio comparativo delle sequenze metagenomiche; i contig ottenuti vengono allineati contro genomi noti (Reference genomes) allo scopo di generare una mappa in cui due o più contig possono risultare vicini e per cui sia poi possibile progettare eventuali reazioni di PCR per unire questi contig. Il processo può essere quindi nuovamente iterato fino a esaurimento

L'assemblaggio delle sequenze è assistito da una varietà di programmi bioinformatici che sono stati però spesso progettati per l'assemblaggio di singoli genomi e non sempre danno buona prova con dati metagenomici.

Un potente aiuto all'assemblaggio di sequenze genomiche, ma anche metagenomiche, è l'assemblaggio comparativo. Questo si basa sull'uso delle sequenze genomiche complete presenti in banca dati alle quali allineare i contig ottenuti dal sequenziamento, in modo da sfruttare i genomi già conosciuti come una guida per trovare sovrapposizioni tra contig e mapparli. Un esempio di schema di assemblaggio comparativo messo a punto nel nostro laboratorio è illustrato nella figura 1.

È utile ricordare che l'assemblaggio finale, quello che porta a unire tra loro tutti i contig e tutti gli scaffold e che costituisce l'obiettivo di tutti i progetti genomici relativi a singole specie, non è comunque possibile nel caso del metagenoma del suolo, dove l'alto numero di specie e di ceppi fa sì che il risultato sia in ogni caso un insieme di sequenze continue molto più piccole dei singoli genomi da cui sono derivate. Come vedremo nel prossimo paragrafo questo può non essere un impedimento decisivo nell'analisi dei dati per disegnare un quadro anche preciso della comunità microbica che si sta indagando.

#### ANNOTAZIONE

L'annotazione è la fase dell'analisi metagenomica in cui si cerca di attribuire un significato alle sequenze prodotte. In pratica con questa operazione si identificano i geni codificati dalle sequenze di DNA e possibilmente le loro funzioni. Anche in questo caso l'approccio iniziale si basa sull'uso di programmi bioinformatici che sono stati sviluppati nella genomica tradizionale per annotare i genomi di singole specie. L'annotazione si può fare su qualunque tipo di sequenza, a partire dalle corte sequenze lette dalle macchine sequenziatrici ai contig assembati e fino agli scaffold generati dal processo di finitura.

In genere l'annotazione si può realizzare con due diversi approcci. Il primo consiste nel cercare le omologie tra ciascuna sequenza del metagenoma e quelle presenti già annotate nelle banche dati. Questo metodo, basato sulla prova di somiglianza (*evidence-based*) si avvale dei numerosi programmi di ricerca di omologia disponibili tra cui va ricordato "BLAST" (Basic Local Alignment Search Tool) che è anche il più diffuso. Grazie all'enorme massa di sequenze annotate attualmente disponibili in banca dati questo approccio si rivela estremamente proficuo e in genere anche piuttosto veloce. L'altro approccio, che si basa sulle proprietà generali dei geni e non sulla conoscenza di sequenze specifiche, un metodo definibile come *ab initio*, parte dalle carat-

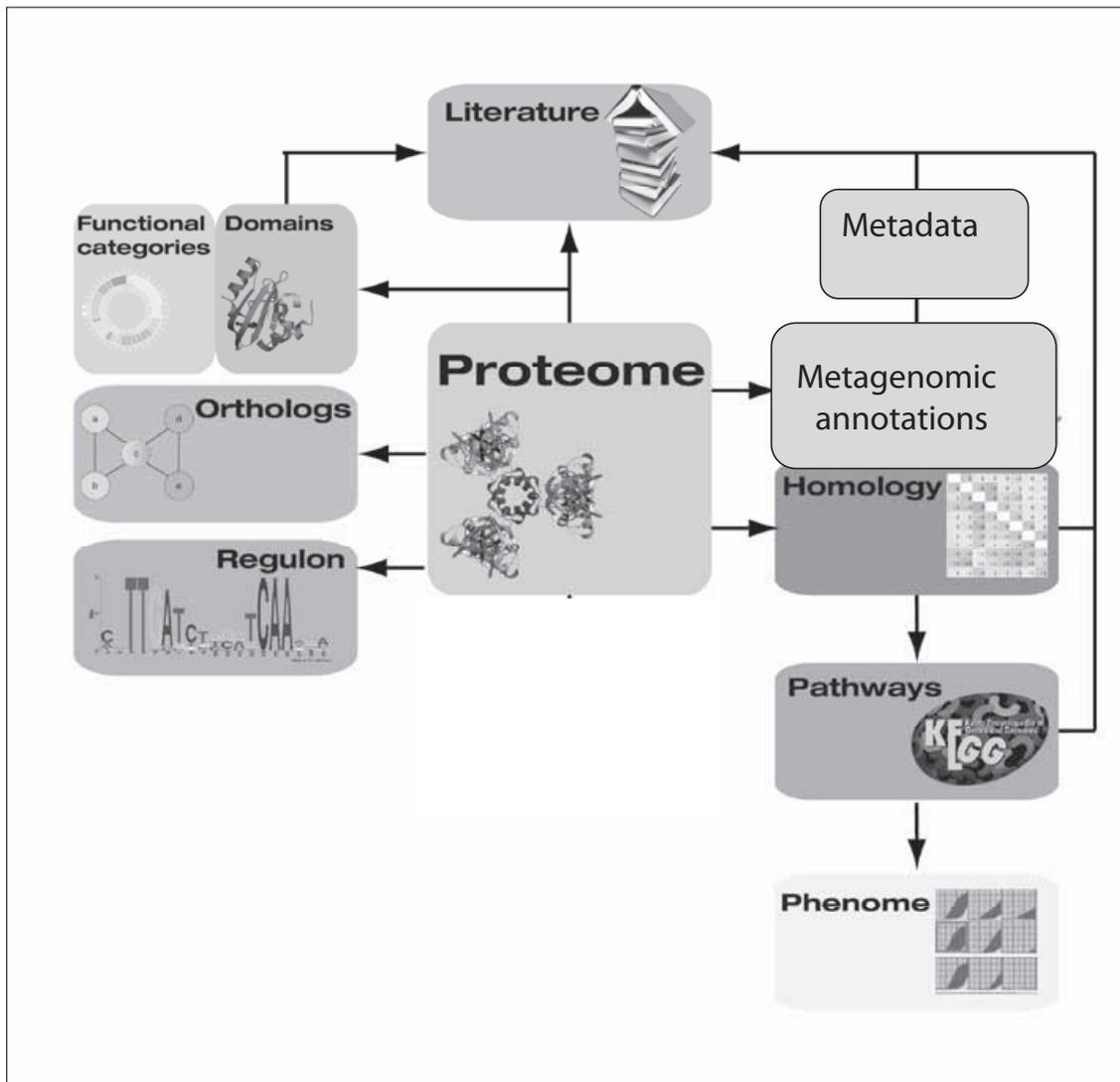


Fig. 2 Schema di database per organizzare tutte le annotazioni disponibili riguardo al metagenoma in esame; le frecce indicano una relazione diretta fra le varie sezioni e la possibilità di incrociare i dati afferenti alle diverse sezioni

teristiche intrinseche delle sequenze di DNA per individuare le possibili regioni codificanti, indipendentemente dal fatto che abbiano o meno omologia con sequenze in banca dati. Questo approccio consente quindi di individuare anche geni finora sconosciuti. Una corretta analisi metagenomica deve poter fare uso di entrambi questi approcci e integrarli con approssimazioni successive verso l'annotazione finale di ciascuna sequenza.

La qualità del lavoro di annotazione dipende in primo luogo dalla qualità e affidabilità del sequenziamento e dalla dimensione dei contig, se questi sono di buona qualità anche l'annotazione che ne segue sarà proporzionalmente più attendibile.

Un ulteriore aiuto all'accuratezza dell'annotazione viene infine dalle cosiddette informazioni di contesto. Queste riguardano dati sulla vicinanza genomica tra geni, su geni derivati da eventi di fusione, sui profili filogenetici, su dati di coespressione e altre informazioni disponibili riguardanti gli specifici geni individuati.

La grande quantità di dati che deriva dal lavoro di annotazione del metagenoma può risultare di difficile gestione dal punto di vista interpretativo e sembra quindi utile provare a sviluppare strumenti bioinformatici adatti a muoversi tra questi dati e capaci di indicare la loro connessione. Uno strumento simile è stato implementato presso il nostro laboratorio allo scopo di legare insieme, in un unico ambiente, tutte le informazioni genomiche (o metagenomiche) con quelle relative alla omologia di sequenza, alle reti regolative, ai dati della letteratura scientifica corrispondente, alla descrizione delle vie metaboliche e alle informazioni fenotipiche e infine ai metadati relativi al campionamento. Uno schema di questo programma è riportato nella figura 2.

#### ASSEGNAZIONE TASSONOMICA

Con l'assegnazione tassonomica delle sequenze, l'analisi del metagenoma si allontana definitivamente dalle analisi comuni anche al sequenziamento di genomi di singole specie. Il metagenoma è composto dall'insieme di molte specie diverse e quindi un primo obiettivo dell'analisi deve essere quello di identificare e quantificare il maggior numero possibile delle specie presenti nel campione. Questa operazione si sovrappone e completa l'analisi della comunità fatta in fase di pre-sequenziamento e si basa sull'identificazione di sequenze di marcatori filogenetici conservati tra i quali in primo luogo gli rRNA (RNA ribosomali) 16S e 23S, ma anche geni quali *recA* (codificante la proteina della ricombinazione e della riparazione del DNA), la proteina EF-Tu (fattore di allungamento della sintesi proteica), HSP70 (proteina indotta dallo stress di calore), il gene *rpoB* (subunità della RNA polimerasi). Tutte le sequenze di geni presenti nel metagenoma, possono essere allineate con quelle corrispondenti nelle banche dati e utilizzate per costruire degli alberi filogenetici che consentono di indicare la specie o il genere da cui la sequenza proviene.

Le maggiori limitazioni a quest'operazione sono dovute alla incompletezza e parzialità della banca dati anche per quanto riguarda questi marcatori filogenetici, alla frammentazione delle sequenze presenti nel dataset metagenomico

che rende arduo l'allineamento necessario alla produzione di alberi filogenetici, al fatto che solo una piccola parte del dataset metagenomico contiene i marcatori filogenetici menzionati, escludendo di fatto dall'assegnazione le specie rappresentate da altri geni.

L'operazione che cerca di classificare le sequenze metagenomiche come appartenenti allo stesso genoma, e quindi allo stesso ceppo o alla stessa specie, viene definita "in scatolamento" (*binning*) e costituisce il complemento all'assegnazione tassonomica nella descrizione della comunità metagenomica.

Gli approcci al binning sono di due tipi: un primo metodo si basa ancora una volta sulla omologia delle sequenze metagenomiche con quelle delle banche dati. In questo caso i problemi sono simili a quelli che si sono ricordati prima per i marcatori tassonomici. Un secondo approccio è invece basato sulla ricerca di caratteristiche particolari delle sequenze metagenomiche che le associno tra loro e a un gruppo tassonomico. Queste caratteristiche della composizione delle sequenze producono degli speciali contrassegni nelle sequenze stesse (*signature*) che le fanno distinguere come appartenenti a un particolare genoma. In particolare il contrassegno di solito più utilizzabile è la frequenza con cui si presentano determinati oligonucleotidi.

In generale il successo del binning dipende in gran parte dalla qualità dell'assemblaggio; infatti, se ogni contig deriva da un singolo genoma, in un grande contig è più probabile trovare sequenze di geni conservati o sequenze contrassegno con le quali attribuire l'identità all'intero frammento.

Mettendo insieme i risultati dell'annotazione, dell'assegnazione tassonomica basata sui marcatori filogenetici, e quelli del binning, si può cercare di dare un quadro della composizione della comunità microbica del campione metagenomico, definire la presenza di specie dominanti, e fare supposizioni ragionevoli sulla natura dei processi metabolici svolti dalla comunità stessa.

A conclusione di questo paragrafo va sottolineato come in una comunità microbica complessa come quella del suolo la quantità di ceppi, specie e generi differenti sia enorme e solo una altrettanto grande potenza di calcolo può essere in grado di trattare convenientemente i dati di sequenza per arrivare a una descrizione adeguata della comunità e della sua funzionalità.

#### ANALISI DEI SINGOLI GENI

Come accennato alla fine del paragrafo precedente, la complessità delle comunità microbiche del suolo può precludere, almeno in alcuni casi, una de-

scrizione che non sia approssimativa della comunità e quindi rischiare di non raggiungere le conclusioni desiderate.

Tuttavia, la natura dei genomi microbici, con la loro alta densità di geni, fa sì che anche in un metagenoma molto frammentato con un basso livello di assemblaggio, ogni singolo contig, per quanto piccolo, può contenere abbastanza informazione da riuscire a identificare il gene da esso codificato. Questo consente un tipo di analisi diverso, ma altrettanto utile ai fini della comprensione del funzionamento della comunità: l'analisi dei singoli geni. In questo tipo di analisi le funzioni putative, svolte dai singoli geni identificati sulle sequenze mediante le operazioni di annotazione, costituiscono la base della descrizione di una comunità, indipendentemente dalla possibilità o meno di attribuire il gene a un determinato gruppo tassonomico. In qualche modo in questo approccio la comunità è vista come un insieme, un aggregato, all'interno del quale non conta l'identità dei singoli componenti ma solo la loro funzionalità. La frequenza con cui una particolare funzione genica viene riscontrata nella comunità è direttamente un'indicazione della rilevanza ecologica che quella funzione ha nella comunità. Determinati progetti metagenomici, tesi a studiare certe specifiche funzioni come per esempio il ciclo dell'azoto o quello della zolfo, possono essere focalizzati solamente a evidenziare i geni relativi a quelle funzioni e in questo caso l'approccio sui singoli geni è l'unico applicato. Quest'approccio si presta particolarmente allo studio comparativo tra comunità, per mettere in evidenza differenze funzionali dovute a specifiche situazioni ambientali.

## CONCLUSIONE

La produzione e l'analisi delle sequenze metagenomiche è oggi una realtà molto importante e costituisce un pezzo significativo di tutto lo sforzo di sequenziamento svolto a livello internazionale. Il metagenoma del suolo rappresenta, a causa della complessità delle sue comunità microbiche, la sfida più grande non solo dal punto di vista della produzione delle sequenze ma anche e soprattutto per quanto riguarda la possibilità di un'analisi soddisfacente. Solo con il contributo di importanti progressi a livello bioinformatico, adeguati e paragonabili a quelli già realizzati a livello di produzione delle sequenze, si riuscirà nel futuro a dominare questo campo di ricerca fondamentale per lo studio del suolo e per l'agricoltura in generale.

## RIASSUNTO

La metagenomica sta diventando un approccio di studio sempre più utilizzato anche in laboratori di ricerca medio-piccoli e la metagenomica del suolo, sicuramente l'ambiente microbico più complesso, può essere oggi oggetto di progetti di ricerca. Può essere perciò importante in questa fase cercare di illustrare quali siano le procedure necessarie al corretto svolgimento di un progetto metagenomico.

La prima fase è quella di pre-sequenziamento, nella quale sono definiti gli obiettivi del progetto e la sua estensione, entrambe correlate alla potenza di sequenziamento e di analisi computazionale che si può mettere in gioco. Nel pre-sequenziamento deve anche essere compresa una valutazione della complessità della comunità microbica che si studia, perché a questa sono connesse anche le decisioni riguardanti tutte le fasi successive del progetto.

La seconda fase è quella del campionamento durante il quale deve essere compiuto il massimo sforzo per preservare la qualità del DNA; in questa fase si raccolgono anche i cosiddetti "metadati" e si procede a collezionare campioni supplementari di suolo per ulteriori possibili analisi.

La fase del sequenziamento è quella nella quale si producono effettivamente le sequenze di DNA, questa dipende in modo determinante dalla piattaforma tecnologica usata per il sequenziamento, in particolare di quale sistema di ultima generazione dispone il progetto.

La fase successiva prevede l'assemblaggio delle sequenze ottenute in insiemi continui più possibile lunghi detti contig. La qualità dell'assemblaggio può risultare decisiva in alcuni progetti metagenomici e può richiedere l'impiego di una notevole potenza di calcolo.

La fase dell'annotazione è quella nella quale si cerca di attribuire un nome alle sequenze assemblate, cioè se ne indica la funzione presunta; a questo punto il lavoro metagenomico comincia a mostrare i suoi frutti in termini di descrizione della comunità microbica.

Oltre all'annotazione la metagenomica del suolo richiede anche una fase in cui le sequenze vengono attribuite a specifici gruppi tassonomici; l'assegnazione tassonomica si basa sulla presenza di marcatori filogenetici e fornisce un quadro delle specie che svolgono un ruolo primario nella comunità. Infine, per il completamento dell'analisi metagenomica, si deve anche procedere all'analisi di singoli geni; questa volta, in modo indipendente dalla loro appartenenza a un particolare gruppo tassonomico, l'identificazione di singoli geni contribuisce a dare importanti informazioni sui processi che si svolgono nella comunità del suolo.

I progetti di metagenomica del suolo sono in realtà una sfida notevole, tuttavia grazie agli eccezionali sviluppi della tecnologia e della bioinformatica, possono essere oggi affrontati e dare un grande contributo alla scienza del suolo.

## ABSTRACT

Metagenomic projects are becoming increasingly accessible also to medium and small size laboratories and even the metagenomics of soil, that is the more complex of the microbial environments, is currently under investigation. It is important at this point to

present a short account of the procedures involved in the metagenomic project with the aim to give a general picture of the most relevant steps necessary to proceed through in order to set up a successful research work.

Steps, in chronological order, are: Pre-sequencing issues involving the extent and the scope of the project which in turn are linked with the availability of sequencing and analysis power; this step also includes the evaluation of the complexity of the soil community to be investigated and its connections with the following steps of the project.

The second step is the sampling procedure, where much of the effort should be put in the quality of the DNA to be extracted and purified, but including also the gathering of metadata referred to the sampling site and the collection of supplementary samples for securing the possibility of further analysis.

Sequencing is the step when DNA sequences are actually generated, for which the approach is strongly related to the type of technological platform available, particularly which of the next-generation sequencing machines will be used.

After sequencing the obtained sequences should be assembled into continuous stretches, as long as possible, called contigs. The quality of assembly could be critical for the success of certain metagenomic projects and could require a very powerful computational effort.

Annotation is the step when the assembled sequences are named, that is they are attributed to some function. This is when results finally come out from the sequencing work and the microbial communities start to be described.

Beyond annotation the soil metagenomic project should also include the step of taxonomic attribution of the sequences, that is based on the occurrence of phylogenetic markers and give a picture of the species playing a major role in the community functioning. The completion of the metagenomic analysis finally includes the recognition and analysis of single genes that could be unrelated to the taxonomic position of the species to which the gene belongs, but nevertheless can give important information on the processes of the soil community.

Any soil metagenomic project is indeed a tremendous challenge, however, thanks to the astounding progresses in technology and bioinformatics, it can be afforded and greatly contribute to the soil science.

#### LETTURE CONSIGLIATE

METZKER M. L. (2010): *Sequencing technologies - the next generation*, «Nature Review Genetics», 11, pp. 31-46.

HUSON D.H., AUCH A.F., QI J., SCHUSTER S.C. (2007): *MEGAN analysis of metagenomic data*, «Genome Research», 17, pp. 377-386.

KAKIRDE K.S., PARSLEY L.C., LILES M.R. (2010): *Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics*, «Soil Biology & Biochemistry», 42, pp. 1911-1923.

KUNIN V., COPELAND A., LAPIDUS A., MAVROMATIS K., HUGENHOLTZ P. (2008): *A bioinformatician's guide to metagenomics*, «Microbiology and Molecular Biology Reviews», 72, pp. 557-578.

MOCALI S., BENEDETTI A. (2010): *Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology*, «Research in Microbiology», 161, pp. 497-505.



# DNA extraction from soil

## I. INTRODUCTION

One gram of soil represents an immense biochemical gene library producing diverse genetic instructions, which is present on Earth since almost 4 billion years. There are sufficient DNA in 1 g of soil to extend over a distance of 1,598 km. However, this is certainly an underestimate for fertile soils.

It is relevant to consider that soils present some of the most difficult challenges to the development of suitable extraction and purification procedures. The complex matrix of soil harbours a variety of substances that inhibit the activity of polymerases and restriction enzymes or interfere with hybridization and detection methods (Steffan et al., 1988; Demeke and Adams, 1992; Tsai and Olson, 1992). It is noticeable that even if several published protocols exist for NA extraction from soil, they markedly diverge even for the purification step and there is no agreement as to the most effective method of purification and none of these has been shown to be robust and general enough to be accepted by the scientific community as a standard protocol (Schneegurt et al., 2003).

Relevant to underline are the consequences of DNA extraction and purification methods on the information about microbial diversity and community structures (e.g. ribotype number and abundance) obtained by molecular analyses as for example genetic fingerprinting techniques.

\* *DiPSA University of Florence*

## 2. DNA EXTRACTION FROM SOIL

### 2.1 *Soil sampling strategy*

A relevant aspect that could influence the results of nucleic acid (NA) based analysis to study the soil microbial community structure and activity is related to the sampling strategy in terms of representativity.

Soil is a structured, heterogeneous, discontinuous system characterized by the domination of the solid phase with organisms living in discrete microhabitats called *hot spots*, representing a small proportion (generally lower than 5%) of the overall available space (Nannipieri et al., 2003). The chemical, physical and biological characteristics of these microhabitats differ both in space and time. The consideration of these aspects together with those related to soil characteristics (texture, pH, etc.) are essential to plan an efficient sampling strategy (Remenant et al., 2009; Hirsch et al., 2010).

Soil sampling, transport, storage and treatment (i.e. drying and sieving) prior to extraction is important for those interested in studying the microbial ecology of native communities in order to maintain the *representativity of the samples*, avoiding any alteration.

Soil sampling physically disrupts the soil structure in a way that can alter its microbial community. Furthermore, the storage of samples in refrigerator (4°C), even for few hours, can cause shifts in the microbial community structure (Tien et al., 1999).

Archiving recommendations (Boone et al., 1999; Campbell et al., 2009; Hirsch et al., 2010) indicate that air-dried soils can be stored at room temperature for an indeterminate length of time, depending upon the intended use. However fresh soils that are to be archived should be stored at -20°C or, better, -80°C, immediately after initial molecular evaluation to possibly reduce subsequent DNA degradation.

One of the challenging aspects of soil sampling in the field is to limit contamination of the samples but, even if sterile materials are used, the accumulation of exogenous material and consequentially exogenous organisms, for example by windblown and/or flooding, is practically inevitable.

### 2.2 *DNA extraction methods*

Two approaches have been developed for extracting nucleic acids from soil: the *direct extraction* by cell lysis and the *indirect extraction* by cell extraction

from soil and successive DNA extraction from cells. The cell lysis and the successive DNA extraction and purification procedures are in common of both extraction strategies.

### 2.2.1 Direct DNA extraction

The disruption of the microbial cell wall is the first step leading to the release of nucleic acids from microbes. The efficiency of this step is influenced by cell wall characteristics that depend on the type of microorganisms (bacteria, fungi), the strains (gram positive, gram negative bacteria), the metabolic status ("k" and "r" strategy; growth or stationary phase; spore), the size (microbacteria and spore), morphology (rods, cocci), and the location of bacteria in soil (free or attached to soil particles and /or inside microstructures).

Currently, four types of cell lysis (membrane disruption) strategies are used, alone or in combination: (i) *physical*-, (ii) *mechanical*-, (iii) *chemical*- and (iv) *enzymatic* cell lysis.

The most commonly used *physical* cell lysing methods are thermal shock, like freezing–thawing, freezing–boiling (Degrange and Bardin, 1995; More et al., 1994; Tsai et al., 1991), mortar mill grinding under liquid nitrogen (Volossiouk et al., 1995; Zhou et al., 1996), ultrasonication and microwave treatment (Orsini and Romano-Spica, 2001).

The *mechanical* cell lysing methods are based on *bead beating*. This method, although it does not give the best yield and quality of DNA molecules, is capable to obtain higher numbers of bands on DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) gels with respect to other lysing methods (de Liphay et al., 2000).

The *chemical* cell lysing methods are based on the use of chemicals, including a range of compounds which are used to permeabilise and thus to enhance enzymatic attacks and/or physical rupture (Nandakumar et al., 2000). The specificity (at strain or species level) for some of these compounds is possibly a problem and their effects may also depend on the growth rate of the cells (Watt and Clarke, 1994). The most commonly used chemical to lyse bacterial cells is the detergent sodium dodecyl sulfate (SDS), which dissolves the hydrophobic components of cell membranes. Detergents have often been used in combination with heat-treatment and with chelating agents such as EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), Chelex 100 (Herron and Wellington, 1990; Jacobsen and Rasmussen, 1992) and diverse Tris buffer or sodium phosphate buffers (Krsek and Wellington 1999). The choice of the buffer is a compromise between quantity and quality of extracted DNA.

Several commercial kits are available for extracting DNA from soil (Ultra Clean Soil DNA kit, MoBio; FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for soil, BIO101; etc.). FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit is based on a mechanical lysis with ceramic and silica beads in a bead-beater (FastPrep Instrument), that efficiently lyses all microorganisms including eubacterial spores, endospores and gram-positive bacteria. A rich bibliography is available on the comparison of various soil DNA extraction kits (Martin-Laurent et al., 2001).

#### 2.2.1.1. Pre-lysis treatments

Several authors have reported that lysis efficiency is negatively correlated with the clay, humic substances and also with the Fe-Al oxy/hydroxy content of soil. To avoid these limitations and thus to increase the DNA extraction yields and to reduce the number of requested DNA purification steps, several pre-lysis treatments have been proposed (Frostegard et al., 1999; Pietramellara et al., 2001; Takada-Hoshino and Matsumoto, 2004; He et al., 2005; Dong et al., 2006; Lakay et al., 2007; Saeki et al., 2008; Ceccherini et al., 2009; Saeki and Sakai, 2009).

To determine the sensitivity of the selected direct extraction method of DNA from soil Schneegurt et al. (2003) proposed an efficient assay based on the seeding of soil samples prior to the extraction with known amounts of selected bacteria that contain a kanamycin-resistance gene abundant in nature, verifying the presence in the extracted solution and then calculating the correspondent number of cells. From the comparison between the initially added cells and those determined after DNA extraction it is possible to determine the efficiency of the selected direct soil DNA extraction method.

#### 2.2.1.2. DNA purification

There are several strategies to purify nucleic acids (NA) (for review see Robe et al., 2003). The choice of the purification method depends on the soil type, on the presence of (co-extracted) contaminants, but also on the goal of the investigation, considering one crucial fact: the higher the number of performed purification steps, the higher the risk of losses of target NA.

Moreover, care should be taken during the whole process of sample handling to avoid that contamination by exogenous substrates as dust, pollen, glove powder, etc., that could exert inhibitory effects on downstream NA analysis (Wilson, 1997).

To avoid DNA degradation after its extraction from cells, the inactiva-

tion of nucleases is a crucial step within the purification procedure, with reagents like Guanidine isothiocyanate ( $C_2H_6N_4S$ ), Aurintricarboxylic acid (ATA,  $C_{22}H_{14}O_9$ ), *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA,  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) and Formamide + NaCl. ATA is reported by several authors as the most efficient DNase and proteinase inhibitor (Hallick et al., 1977; Marstorp and Witter, 1999).

Concerning DNA contaminants, the main ones for prokaryotic DNA are represented by its constitutional molecules such as proteins and polysaccharides, eukaryotic DNA, RNA, and by soil components such as clay minerals and humic acids (Pietramellara et al., 2007). These contaminants could interfere with successive molecular techniques such as PCR-based methods (Tebbe and Vahjen, 1993; Robe et al., 2003). The inhibition of Taq polymerase by co-extracted contaminants could be overcome by adding bovine serum albumin (BSA) to the PCR reaction mixture. The magnesium concentration of the PCR reaction mix was also carefully standardized as it may fluctuate according to primer combination and sample source (Kreder, 1996).

### 2.2.2 Indirect DNA extraction

Despite several commercial kits for direct DNA extraction from soil, no one is available for indirect DNA extraction from soil. This discrepancy is confirmed by the low number of available protocols for indirect DNA extraction from soil.

As already mentioned above, the indirect DNA extraction method is characterized by dispersion of soil particles and separation/extraction of the cells from soil particles through their sedimentation velocities, followed by lysis of extracted cells and DNA purification. Pioneers of this strategy have been Faegri et al. (1977) and Torsvik and Goksoyr (1978).

#### 2.2.2.1. Dispersion of soil particles

To obtain an optimal cell extraction from soil, the dispersion of the soil sample by physical and/or chemical methods is fundamental. This is a crucial step due to the presence of a relevant part of the bacterial community bound on soil particles and/or located inside soil aggregates. Fundamental is also the preservation of the integrity of extracted bacterial cells (Robe et al., 2003). One of the most relevant aspects that characterises the indirect extraction of soil DNA is related to the yield of extracted DNA and to its representativity

of the bacterial community. These aspects generally represent the main disadvantage with respect to the direct extraction approach.

*Physical dispersion* methods have been tested, like waring blender (Faegri et al., 1977; Bakken and Lindahl, 1995), sonication (Ramsay, 1984), mild dispersal by shaking (Turpin et al., 1993), and rotating pestle (Lindahl and Bakken, 1995), with the former and the latter approach found to be the most efficient ones for large and small scale extraction, respectively (Lindahl and Bakken, 1995).

*Chemical dispersal* methods have often been used in combination with mechanical methods (Lindahl and Bakken, 1995). Cation exchange resins (Chelex 100) have proven to be efficient for soil dispersion (Jacobsen and Rasmussen, 1992). Other chemical agents utilized to separate bacterial cells from soil particles are sodium cholate and sodium deoxycholate that interact with bacterial lipopolysaccharides (McDonald, 1986), *polyethylene glycol* (PEG) and *sodium dodecylsulfate* (SDS) that dissolve hydrophobic material, polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) which removes humic acids (Steffan et al., 1988), hexametaphosphate, and finally distilled water.

#### 2.2.2.2. Cell extraction from soil

The extraction of intact cells prior to cell lysis and nucleic acid extraction is attractive because it reduces the problems related to contamination by interfering co-extracted substances (humus) and losses of nucleic acids by sorption to soil colloids; drawbacks of the indirect approach are a low extraction efficiency, and that they are complex and thus time consuming.

Robe et al. (2003) pointed out the risk of loss of bacteria present in clusters or attached to soil particles during the low speed centrifugation. An alternative method based on cell buoyant density was proposed by Bakken (1985) that permits to discriminate bacteria by density gradient centrifugation utilizing a multi-gradient media such as Percoll, Metrizamide, Sucrose and Ny-codenz, with the latter providing the best results (Pillai et al., 1991; Unge, 1999; Berry et al., 2003). This technique is also capable to eliminate organic and mineral particles, characterized by a greater density respect to bacterial cells, permitting the recovery of a relatively clean bacterial fraction as compared to low speed centrifugation methods (Lindahl and Bakken, 1995).

Another cell-soil separation technique is the immunomagnetic capture, based on the capture of microbial cells by microscopic magnetic beads coated with monoclonal or polyclonal antibodies (Morgan et al., 1991; Fluit et al., 1993; Porter, 1998).

However it is important to underline that the yield and quality of extracted cells depend on the choice of the most suitable method according to the soil characteristics.

#### 2.2.2.3. DNA extraction and purification

The extraction of DNA from cells previously isolated from soil (indirect extraction) and its successive purification methods are similar to those above reported for the direct DNA extraction from soil, but with differences coming from managing a pure cell suspension, permitting a higher lysis efficiency and a marked reduction of the required purification steps due to a drastic reduction of organic and inorganic debris. Theoretically, only organic debris mainly composed by cell wall residues and DNA constitutional molecules (proteins, polysaccharides and lipids) should be present.

#### 2.2.3 Comparative evaluation of direct and indirect DNA extraction methods

The bacterial fraction recovered from soil represents only 25–50% of the total endogenous bacterial community, whereas with the direct extraction it has been assumed to recover more than 60% of the total bacterial DNA (More et al., 1994). There is no *perfect* extraction method and the definition of an optimal strategy requests a comprehensive description of soil, a limited co-extraction of extracellular and eukaryotic DNA, the definition of target organisms (the whole community or a specific taxon or group of taxons) and their sensitivity to lysis procedures due to physical characteristics (cell wall composition) and/or addressing in soil (free or attached to soil particles and inside inner sample aggregates), and is evaluated in terms of quantity and quality (molecular weight and purity) of the extracted DNA.

The capacity to appreciate the efficiency of the selected extraction methods seems to vary in relation to the selected method of analysis. Martin-Laurent et al. (2001), characterizing the soil microbial community by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA), evidenced that both abundance and apparent members of the bacterial community were affected by the selected extraction method. In contrast, Courtois et al. (2001), using hybridization of the PCR amplified 16S rDNA gene, did not find significant differences in the spectrum of diversity resulting from the used extraction strategies.

Concerning the main advantage of direct DNA extraction with respect to

indirect extraction, related to higher yield and representativity of the total soil microbial community, seems to be reduced.

Some interesting improvements in culture methods have recently been made (Balestra and Misaghi, 1997; Kaeberlein et al., 2002). For example, Zengler et al. (2002) proposed an impressive method based on the combination of single-cell encapsulation and flow cytometry (or fluorescence-activated cell sorting, FACS) that enabled cells to grow with nutrients that are present at environmental concentrations, and detected microdroplets containing microcolonies of so far uncultured microorganisms.

A very promising strategy to improve our capacity to cultivate microorganisms was proposed by Bomar et al. (2011) that hypothesized to utilize the High-throughput sequencing of RNA transcripts (RNA-seq) of uncultured microorganisms to characterize their metabolisms in order to design an appropriate medium for their cultivation.

#### 2.2.4. DNA extraction for the meta-genomic approach

The DNA size (molecular weight) remains limitative for functional meta-genomic approaches where the exploration of gene clusters and biosynthetic pathways through cosmid and bacterial artificial chromosome (BAC) cloning requires DNA larger than 200 kb. Regarding cloning Gabor et al. (2003) have evaluated the efficiency of DNA extracted from soil by a direct and an indirect extraction method, based on protocols of Zhou et al. (1999) and Holben et al. (1988), respectively. The results clearly evidenced that even if the direct extraction method yielded higher amounts of DNA with respect to the indirect extraction method, the representativity in terms of richness and evenness was similar between the two extraction methods with a significant reduction of the amount of co-extracted eukaryotic DNA. These considerations became more significative to increase the efficiency of the indirect DNA extraction method as reported by Duarte et al. (1998) in order to reach the theoretical maximum cell extraction from different soils by a method based on shaking with gravel in pyrophosphate buffer.

Several authors have reported that embedding soil or bacteria in agarose plugs prior to bacterial lysis permits to recover DNA fragments of high molecular weight (HMW). This approach was used to establish libraries of BAC clones containing large DNA fragments from several non-cultivable bacteria from environmental samples.

Concerning indirect DNA extraction from soil, Liles et al. (2008) pro-

posed an integrated approach combining centrifugation based cell separation from soil particles with low melting agarose plug lysis, purification and pulsed field gel electrophoresis (PFGE), to determine the molecular weight of DNA fragments.

Regarding direct DNA extraction from soil, Yu et al. (2008) set up a direct cell lysis within soil-embedded agarose plugs, along with a double-size selection that permits an isolation of pure and HMW DNA without the need of any further purification.

Both extraction strategies generated pure and HMW DNA ranging from 0.1 to 1 Mb, resulting adequate for further molecular cloning procedures and the construction of soil fosmid and BAC metagenomic libraries.

#### 2.2.5. Determination of amount and quality of extracted DNA

DNA can be quantified spectrophotometrically at 260 nm (Sambrook et al., 1989). It is relevant to note that 260 nm adsorption by UV spectrophotometer detects the amount of nucleotide in solution so do not give direct information on the amount of double strand DNA (dsDNA).

The DNA purity index (IP) can be determined by calculating the absorbance ratio of 260 nm and 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) in terms of protein contamination, and 260 nm and 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) in terms of contaminants such as carbohydrates, ethanol, humic acids. Optimal IP values are within the range of 1.8 and 2.0. It is relevant to note that IP is not an absolute parameter for DNA purity but it is based on the PCR amplificability of the extracted DNA. The level of NA purification degree request is strictly dependent on the different molecular methods utilized to analyse the NA like methods based on PCR or enzyme digestion (Steffan et al., 1988) with high purity request for the successful application of the former technique.

The DNA quantification by fluorometer measurements is based on the specific binding of fluorochromes to dsDNA. In the following paragraph some of the commonly used fluorochromes are described.

A specific reagent for primary aldehydes of the type R-CH<sub>2</sub>-CHO is the 3,5 diamino-benzoic acid 2HCl (DABA 2HCl) (Lien and Knutsen, 1976). The antibiotic mithramycin specifically reacts with guanine (dsDNA) but the binding efficiency decreases in presence of nucleoproteins, showing less sensibility with respect to DABA 2HCl. Bisbenzimidazole H33258 (Hoechst) has a high specificity to adenine and thymine base pairs of the dsDNA molecule (Paul and Mayers, 1982).

A very efficient fluorochrome is the YO-PRO 1 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon USA); its sensitivity has been found to be more than 400 fold greater than Hoechst 33258. As this fluorochrome binds DNA as well as RNA, their amounts in the same sample can be quantified only after subsample pretreatments with RNase or DNase, respectively, or by measuring the fluorescence of the same sample before and after nuclease treatments (Torsvik et al., 1995).

These fluorochromes, due to specific adsorption to base pairs, specifically detect dsDNA, but do not allow the assessment of the purity of DNA. However they are less sensible to the presence of contaminants in the DNA quantification with respect to the UV technique.

The determination of the molecular integrity and weight of DNA molecules is made by different gel electrophoresis techniques. Small, medium and large DNA molecules can be qualitatively analysed by agarose gel electrophoresis (AGE), capillary electrophoresis (CE), and pulse field gel electrophoresis (PFGE), respectively.

### *2.3 Conclusions and future perspectives*

The choice of the DNA extraction method severely affects the picture of the microbial diversity present in a soil sample (Frostegard et al., 1999; Krsek et al., 1999; Martin-Laurent et al., 2001; Schneegurt et al., 2003; He et al., 2005; Sagova-Mareckova et al., 2008; Thakuria et al., 2008; Ascher et al., 2009), moreover de Liphay et al. (2004) reported how DNA extraction method also influence functional diversity. Philippot et al. (2010) with the intent to ensure comparable data proposed, with support of the French Standards Association and the French Environment and Energy Management Agency, in 2006 to the International Organization for Standardization (ISO) the standardization of a direct soil DNA extraction. The request was rapidly recognized by ISO members so that the ISO 11063 soil quality method to directly extract DNA from soil samples is now being prepared by the Technical Committee ISO/TC 190, Subcommittee SC4, Biological methods. The standard was developed based on the publication made by Martin-Laurent et al. (2001) by different laboratories from seven countries. Six soils collected in different European Countries. It was also decided that since DNA purification is dependent on soil type, only the actual DNA extraction step, which is likely to generate the main differences between methods, would be subject to standardization.

No standardization has been planned for the next future regarding indirect soil DNA extraction; this lack is justified by the paucity of so far available methods of indirect soil DNA extraction.

Concerning the standardization we have to consider the risk to seriously limit the main request of metagenomic approaches, that to obtain the whole genome present in soil. A risk that actually could be partially overcome by combining direct and indirect approaches and also by choosing the most adequate methods within the two extraction categories.

#### RIASSUNTO

Il recente sviluppo delle tecniche molecolari basate sull'analisi del DNA per studiare le comunità microbiche del suolo, anche la frazione non coltivabile, ha richiesto un grande sforzo per aumentare l'efficienza delle metodiche estrattive con l'intento di ottenere DNA di buona qualità e rappresentativo dell'intera comunità dei microrganismi che abitano il suolo. Nel presente articolo è criticamente riassunto lo stato dell'arte dei sistemi di estrazione del DNA dal suolo.

#### ABSTRACT

The recent develop of molecular techniques based on the DNA analysis to study the soil microbial community, even the unculturable fraction, has request a great effort to increase the efficiency of the extraction methods in order to obtain DNA of good quality and representative of the whole microbial community inhabiting soil. Here are critically summarized the state of the art of the DNA extraction from soil.

#### BIBLIOGRAPHY

- ASCHER J., CECCHERINI M.T., PANTANI O.L., AGNELLI A., BORGOGNI F., GUERRI G., NANNIPIERI P., PIETRAMELLARA G. (2009): *Sequential extraction and genetic fingerprinting of a forest soil metagenome*, «Applied Soil Ecology», 42, pp. 176-181.
- BAKKEN L.R. (1985): *Separation and purification of bacteria from soil*, «Appl. Environ. Microbiol.», 49, pp. 1482-1487.
- BAKKEN L.R., LINDAHL V. (1995): *Recovery of bacterial cells from soil*, in J.D. Van Elsas, J.T. Trevors (Eds.), *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 9-27.
- BALESTRA G.M., MISAGHI I. J. (1997): *Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity*, «J. Microb. Methods», 30, pp. 111-117.
- BERRY O., GLEESON D.M., SARRE S.D. (2003): *Microsatellite DNA markers for New Zealand skinks*, «Conserv Genet», 4 pp. 411-414.

- BOMAR L., MALTZ M., COLSTON S., AND GRAF J. (2011): *Direct culturing of microorganisms using metatranscriptomic*, «mBio», 2 (2): e00012-11. doi:10.1128/mBio.00012-11.
- BOONE R.D., GRIGAL D.F., SOLLINS P., AHRENS R.J., ARMSTRONG D.E. (1999): *Soil sampling, preparation, archiving, and quality control*, in Robertson GP, Coleman DC, Bledsoe CS, Sollins P (eds), *Standard soil methods for long-term ecological research*, Oxford University Press, New York, NY, pp. 3-28.
- CAMPBELL J.H., CLARK J.S., ZAK J.C. (2009): *PCR-DGGE comparison of bacterial community structure in fresh and archived soils sampled along a Chihuahuan desert elevational gradient*, «Microb. Ecol.», 57, pp. 261-266.
- CECCHERINI M.T., ASCHER J., AGNELLI A., BORGOGNI F., PANTANI O.L. AND PIETRAMELLARA G. (2009): *Experimental discrimination and molecular characterization of the extracellular soil DNA fraction*, «Antonie van Leeuwenhoek Journal of General and Molecular Microbiology», 96, pp. 653-657.
- COURTOIS S., FROSTEGARD A., GORANSSON P., DEPRET G., JEANNIN P., SIMONET P. (2001): *Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation*, «Environ. Microbiol.», 3, pp. 431-439.
- DEGRANGE V., BARDIN R. (1995) : *Detection and counting of nitrobacter populations in soil by PCR*, «Appl. Environ. Microbiol.», 61, pp. 2093-2098.
- DE LIPTHAY J.R., JOHNSEN K., AAMAND J., TUXEN N., ALBRECHTSEN H.J., BJERG P.L. (2000): *Continuous exposure of pesticides in an aquifer changes microbial biomass, diversity and degradation potential*, Groundwater 2000, Copenhagen, 6-8 June, 2000, in Bjerg, P.L., Engesgaard, P. & Krom, T.D. (eds), *Proceedings of the International Conference on Groundwater Research*, pp. 157-158.
- DE LIPTHAY J.R., JOHNSEN K., ALBRECHTSEN H., ROSENBERG P., AAMAND J. (2004): *Bacterial diversity and community structure of a sub-surface aquifer exposed to realistic low herbicide concentrations*, «FEMS Microbiol Ecol», 49, pp. 59-69.
- DEMEKE T., ADAMS R.P. (1992): *The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR*, «Biotechniques», 12, pp. 332-334.
- DONG D.X., YAN A., LIU H.M., ZHANG X.H. and XU Y.Q. (2006): *Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate*, «J Microbiol Meth», 66, pp. 217-222.
- DUARTE G.F., ROSADO A.S., SELDIN L., KEIJZER-WOLTERS A.C., VAN ELSAS J.D. (1998): *Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community*, «J. Microbiol. Methods», 32, pp. 21-29.
- FAEGRI A., TORSVIK V.L., GOKSOYR J. (1977): *Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique*, «Soil Biol. Biochem.», 9, pp. 105-112.
- FLUIT A.C., TORENSMA R., VISSER M.J., AARSMAN C.J., POPPELIER M.J., KELLER B.H., KLAPWIJK P., VERHOEF J. (1993): *Detection of Listeria monocytogenes in cheese with magnetic immuno-polymerase chain reaction assay*, «Appl. Environ. Microbiol.», 59, pp. 1289-1293.
- FROSTEGARD A., COURTOIS S., RAMISSE V., CLERC S., BERNILLON D., LE GALL F., JEANNIN P., NESME X., SIMONET P. (1999): *Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils*, «Appl. Environ. Microbiol.», 65, pp. 5409-5420.
- GABOR E.M., DE VRIES E.J. AND JANSSEN D.B. (2003): *Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods*, «FEMS Microbiol Ecol», 44, pp. 153-163.

- HALLICK R.B., CHELM B.K., GRAY P.W., OROZCOM E.M. (1977): *Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation*, «Nucleic Acids Res», 4, pp. 3055-3064.
- HE J., XU Z., HUGHES J. (2005): *Pre-lysis washing improves DNA extraction from a forest soil*, «Soil Biol. Biochem.», 37, pp. 2337-2341.
- HERRON P.R., WELLINGTON E.M.H. (1990): *New method for extraction of Streptomyces spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and non sterile soil*, «Appl. Environ. Microbiol.», 56, pp. 1406-1412.
- HIRSCH P.R., MAUCLINE T.H., CLARK I.M. (2010): *Culture independent molecular techniques for soil microbial ecology*, «Soil Biology and Biochemistry», 42, pp. 878-887.
- HOLBEN W.E., JANSSON J.K., CHELM B.K., TIEDJE J.M. (1988): *DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community*, «Appl. Environ. Microbiol.», 54, pp. 703-711.
- JACOBSEN C.S., RASMUSSEN O.F. (1992): *Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin*, «Appl. Environ. Microbiol.», 58, pp. 2458-2462.
- KAEBERLEIN T., LEWIS K. AND EPSTEIN S.S. (2002): *Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment*, «Science», 296, pp. 1127-1129.
- KREADER C.A. (1996): *Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein*, «Applied and Environmental Microbiology», 62, pp. 1102-1106.
- KRSEK M., WELLINGTON E.M. (1999): *Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil (In Process Citation)*, «J. Microbiol. Methods», 39, pp. 1-16.
- LAKAY F.M., BOTHA A., PRIOR B.A. (2007): *Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils*, «J Appl Microbiol», 102, pp. 265-273.
- LIEN T., KNUTSEN G. (1976): *Fluorometric determination of DNA in Chlamydomonas*, «Anal Biochem», 74, pp. 560-566.
- LILES M.R., WILLIAMSON L.L., RODBUMRER J., TORSVIK V., GOODMAN R.M., HANDELSMAN J. (2008): *Recovery, purification, and cloning of high-molecularweight DNA from soil microorganisms*, «Applied and Environmental Microbiology», 74, pp. 3302-3305.
- LINDAHL V., BAKKEN L.R. (1995): *Evaluation of methods for extraction of bacterial from soil*, «FEMS Microbiol. Ecol.», 16, pp. 135-142.
- MARSTORP H., WITTER E. (1999): *Extractable dsDNA and product formation as measures of microbial growth in soil upon substrate addition*, «Soil Biol. Biochem.», 31, pp. 1443-1453.
- MARTIN-LAURENT F., PHILIPPOT L., HALLET S., CHAUSSOD R., GERMON J.C., SOULAS G., CATROUX G. (2001): *DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods*, «Appl. Environ. Microbiol.», 67, pp. 2354-2359.
- MCDONALD R.M. (1986): *Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation*, «Soil Biol. Biochem.», 18, pp. 399-406.
- MORE M.I., HERRICK J.B., SILVA M.C., GHIORSE W.C., MADSEN E.L. (1994): *Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment*, «Appl. Environ. Microbiol.», 60, pp. 1572-1580.
- MORGAN J.A.W., WINSTANLEY C., PICKUP R.W. AND SAUNDERS J.R. (1991): *Rapid immunocapture of Pseudomonas putida cells from lake water by using bacterial flagella*, «Applied and environmental Microbiology», 57, pp. 503-509.

- NANDAKUMAR M.P., NANDAKUMAR R., MATTIASSON B. (2000): *Fluorimetric quantification of intracellular lactate dehydrogenase during fermentation using flow injection analysis*, «Biotechnol. Lett.», 22, pp. 1453-1457.
- NANNIPIERI P., ASCHER J., CECCHERINI M.T., LANDI L., PIETRAMELLARA G., RENELLA G. (2003): *Microbial diversity and soil functions*, «European Journal of Soil Science», 54, pp. 655-670.
- ORSINI M., ROMANO-SPICA V. (2001): *A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples*, «Lett. Appl. Microbiol.», 33, pp. 17-20.
- PAUL J.H., MYERS B. (1982): *Fluorometric determination of DNA in aquatic microorganisms by use of Hoechst 33258*, «Appl. Environ. Microbiol.», 43, pp. 1393-1399.
- PHILIPPOT L., ANDERSSON S.G.E., BATTIN T.J., PROSSER J.I., SCHIMEL J.P., WHITMAN W.B., HALLIN S. (2010): *The ecological coherence of high bacterial taxonomical ranks*, «Nature Reviews Microbiology», 8, pp. 523-529.
- PIETRAMELLARA G., FRANCHI M., GALLORI E., NANNIPIERI P. (2001): «Biol. Fertil. Soils», 33, pp. 402-409.
- PIETRAMELLARA G., ASCHER J., CECCHERINI M.T., NANNIPIERI P., WENDEROTH D. (2007): *Adsorption of pure and dirty bacterial DNA on clay minerals and their transformation frequency*, «Biol. Fertil. Soils», 43, pp. 731-739.
- PILLAI S.D., JOSEPHSON K.L., BAILEY R.L., GERBA C.P., PEPPER I.L. (1991): *Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences*, «Appl. Environ. Microbiol.», 57, pp. 2283-2286.
- PORTER R.D. (1998): *DNA transformation*, «Methods Enzymol.», 167, pp. 703-712.
- RAMSAY A.J. (1984): *Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography*, «Soil Biol. Biochem.», 16, pp. 457-481.
- REMANANT B., GRUNDMANN G.L., JOCTEUR-MONROZIER L. (2009): *From the micro-scale to the habitat: assessment of soil bacterial community structure as shown by soil structure directed sampling*, «Soil Biol. Biochem.», 41, pp. 29-36.
- ROBE P., NALIN R., CAPELLANO C., VOGEL T.A., SIMONET P. (2003): *Extraction of DNA from soil*, «European Journal of Soil Biology», 39, pp. 183-190.
- SAEKI K., SAKAI M. (2009): *The influence of soil organic matter on DNA adsorptions on andosols*, «Microbes Environ», 24, pp. 175-179.
- SAEKI K., MORISAKI M., SAKAI M. (2008): *The effects of hydrogen peroxide and acid oxalate treatments on DNA adsorption on soils*, «Microbes Environ», 23, pp. 353-355.
- SAGOVA-MARECKOVA L., CERMAK L., NOVOTNA J., PLHACKOVA K., FORSTOVA, J., KOPECKY, J. (2008): *Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics*, «Appl Environ Microbiol», 74, pp. 2902-2907.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SCHNEEGURT M.A., DORE S.Y., KULPA C.F. Jr. (2003): *Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology*, «Current Issues in Molecular Biology», 5, pp. 1-8.
- STEFFAN R.J., GOKSOYR J., BEJ A.K., ATLAS R.M. (1988): *Recovery of DNA from soils and sediments*, «Appl. Environ. Microbiol.», 54, pp. 2908-2915.
- TAKADA-HOSHINO Y., MATSUMOTO N. (2004): *An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly absorb DNA*, «Microbes Environ», 19, pp. 13-19.
- TEBBE C.C., VAHJEN W. (1993): *Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast*, «Appl. Environ. Microbiol.», 59, pp. 2657-2665.

- THAKURIA D., SCHMIDT O., MAC SIÚRTÁIN M., EGAN D., DOOHAN F.M. (2009): *Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses*, «Soil Biol. Biochem.», 40, pp. 1390-1403.
- TIEN C.C., CHAO C.C., CHAO W.L. (1999): *Methods for DNA extraction from various soils: a comparison*, «J. Appl. Microbiol.», 86, pp. 937-943.
- TORSVIK V.L., GOKSOYR J. (1987): *Determination of bacterial DNA in soil*, «Soil Biol. Biochem.», 10, pp. 7-12.
- TORSVIK V.L., DAAE F.L., GOKSOYR J. (1995): *Extraction, purification, and analysis of DNA from soil bacteria*, in J.D. Van Elsas, J.T. Trevors (Eds.), *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1995, pp. 29-48.
- TSAI Y.L., OLSON B.H. (1991): *Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments*, «Appl. Environ. Microbiol.», 57, pp. 1070-1074.
- TSAI Y.L., PARK M.J., OLSON B.H. (1991): *Rapid method for direct extraction of mRNA from seeded soils*, «Appl. Environ. Microbiol.», 57, pp. 765-768.
- TURPIN P.E., MAYCROFT K.A., ROWLANDS C.L., WELLINGTON E.M. (1993): *An ion-exchange based extraction method for the detection of salmonellas in soil*, «J. Appl. Bacteriol.», 74, pp. 181-190.
- UNGE A., TOMBOLINI R., MØLBAK L., JANSSON J.K. (1999): *Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual gfp-luxAB marker system*, «Appl. Environ. Microbiology», 65, pp. 813-821.
- VOLOSSIOUK T., ROBB E.J., NAZAR R.N. (1995): *Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms*, «Appl. Environ. Microbiol.», 61, pp. 3972-3976.
- WATT S.R., CLARKE A.J. (1994): *Role of autolysins in the EDTA-induced lysis of Pseudomonas aeruginosa*, «FEMS Microbiol Lett», 124, pp. 113-119.
- WILSON I.G. (1997): *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*, «Appl. Environ. Microbiol.», 63, pp. 3741-3751.
- YU Y., ZHANG H., TIAN F., BACON L., ZHANG Y., ZHANG W., SONG J. (2008) : *Quantitative evaluation of DNA methylation patterns for ALVE and TVB genes in a neoplastic disease susceptible and resistant chicken model*, PLoS One 3: e1731.
- ZENGLER K., TOLEDO G., RAPPÉ M., ELKINS J., MATHUR E.J., SHORT J.M., KELLER M. (2002): *Cultivating the uncultured*, «Proc. Natl. Acad. Sci», USA 99, 15681-15686.
- ZHOU G., CHEN Y., ZHOU L., THIRUNAVUKKARASU K., HECHT J., CHITAYAT D., GELB B., PIRINEN S., BERRY S.A., GREENBERG C.R., KARSENTY G., LEE B. (1999): *CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia*, «Hum Mol Genet», 8, pp. 2311-2316.
- ZHOU J., BRUNS M.A., TIEDJE J.M. (1996): *DNA recovery from soils of diverse composition*, «Appl. Environ. Microbiol.», 62, pp. 316-322.



## Metagenomica nella rizosfera: il ruolo dei nematodi

### INTRODUZIONE

La pianta è una fonte di sostentamento essenziale per il biota del suolo. Attraverso il materiale organico derivante dalla parte aerea, che costituisce la lettiera, e quello derivante dalle radici, essudati radicali, cellule in disfacimento e mucigel, la pianta regola l'abbondanza e la distribuzione degli organismi edafici. Attraverso l'essudazione radicale, la regione del suolo immediatamente intorno alle radici si arricchisce di molecole a basso peso molecolare e carboidrati facilmente degradabili, fornendo le basi per una complessa rete trofica comprendente batteri, funghi, protozoi, nematodi e microartropodi (Viketoft et al., 2005). Questa regione del suolo è stata definita nel 1904 con il termine rizosfera e il suo spessore dipende sostanzialmente dalla struttura del suolo e dalla specie vegetale. Nella rizosfera avvengono le principali trasformazioni legate ai cicli biogeochimici degli elementi e al riciclo dei nutrienti, e viene considerata come una componente essenziale per il mantenimento e la funzionalità dell'ecosistema suolo. La rizosfera inoltre presenta una notevole resistenza agli stress abiotici e meccanici dovuti a erosione e inondazioni (Jeffery et al., 2010).

I nematodi sono probabilmente il gruppo di animali più abbondanti e che ha riscosso maggior successo nel corso dell'evoluzione, affermandosi in tutti gli ambienti sia acquatici che terrestri (Khan e Kim, 2007). Sono piccoli organismi vermiformi che occupano una posizione centrale all'interno della catena trofica del suolo dove ne occupano tutti i livelli e dove sono coinvolti, direttamente o indirettamente, in numerosi processi ecologici. Nel suolo i ne-

\* *Centro di ricerca per le Colture Industriali, CRA-CIN, Bologna*

\*\* *Centro di ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia, CRA-ABP, Firenze*

matodi possono condurre una vita libera, cibandosi di batteri, funghi o altri nematodi, oppure possono vivere come parassiti di piante o animali. I vari gruppi trofici rispondono in maniera diversa alle diverse condizioni ambientali e alle diverse pratiche agronomiche. Anche le proprietà chimiche e fisiche del suolo contribuiscono nel determinare la diversità sia tassonomica che funzionale della comunità nematodica. Per tale ragione la fauna nematodica risulta essere un buon indicatore nel predire gli effetti sull'agroecosistema delle diverse pratiche agricole e gestioni del suolo (Sanchez-Moreno et al., 2008).

L'identificazione dei nematodi è stata fino a ora principalmente basata sulla microscopia ottica, lasciando le analisi ecologiche sulla comunità del suolo spesso ambigue e superficiali. Una identificazione classica a livello di specie, genere, famiglia, necessita di un elevato livello di conoscenza delle caratteristiche morfologiche di ciascun gruppo e molto tempo per poter ottenere risultati affidabili. Vi è poi il problema che spesso l'identificazione della specie sia possibile solo quando l'individuo si trova allo stadio di adulto, attraverso il riconoscimento di speciali strutture maschili e/o femminili, che rappresenta solo una piccola percentuale dell'intera comunità (Floyd et al., 2002; Donn et al., 2008; Chea et al., 2010). Pertanto i nematodi sono stati da sempre considerati tra gli organismi più difficili da identificare.

Le tecniche di biologia molecolare rappresentano un metodo alternativo alla caratterizzazione classica della biodiversità della fauna nematodica del suolo. L'utilizzo di queste tecniche ci permette di definire dei profili biologici specifici evitando la necessità di coltivare comunità complesse, riducendo il tempo di indagine e la necessità di competenze tassonomiche specifiche (Donn et al., 2008). L'applicazione di tecniche basate sull'amplificazione PCR alla comunità nematodica del suolo ha permesso di risolvere diverse ambiguità morfologiche mettendo in luce l'esistenza di una sorprendente biodiversità e di affascinanti relazioni tra i vari organismi abitanti la rizosfera (Cardon e Gage, 2006; Porazinska et al., 2009). Recentemente l'analisi metagenomica applicata al mondo dei procarioti ha permesso di espandere le conoscenze di questi microrganismi di diversi ordini di grandezza e similamente l'analisi metagenomica applicata ai nematodi offrirà la possibilità di espandere enormemente la nostra conoscenza di un'altra componente importante del biota del suolo (Porazinska et al., 2009).

## I NEMATODI

I nematodi costituiscono un gruppo importante di metazoi, sono organismi vermiformi, non segmentati, hanno un corpo cilindrico o fusiforme, rotondo



Fig. 1 *Nematode fitoparassita Bursaphelencus* (foto di T. Irdani)

in sezione trasversale e sono generalmente trasparenti (fig. 1). Essi sono diffusi in pressoché tutti gli ambienti compatibili con la vita, ma sono stati isolati anche da ambienti estremi: artici e desertici. Si stima che al phylum dei nematodi appartengano da 1 a 10 milioni di specie diverse e di queste circa 25.000 sono state descritte in letteratura (Dieterich e Sommer, 2009; Jeffery et al., 2010). Nel suolo i nematodi sono considerati tra i più abbondanti organismi animali sia per ricchezza di specie che per abbondanza, e si suppone possano superare il milione di individui per metro quadro (Dieterich e Sommer, 2009; Porazinska et al., 2009; Jeffery et al., 2010). In questo ambiente essi occupano un'ampia varietà di nicchie ecologiche vivendo soprattutto come parassiti o predatori, oppure presentando esigenze trofiche non ben precisate (onnivori).

I nematodi sono considerati specie chiave nell'ecosistema suolo essendo implicati in processi come la decomposizione della sostanza organica e il riciclo dei nutrienti. Influiscono sulla composizione della comunità edafica nutrendosi di microrganismi e facilitandone la dispersione (adesi sulla loro superficie o in forma vitale all'interno del loro intestino). Con la loro attività i nematodi contribuiscono a modificare la struttura, stabilità e regime idrico (porosità) del suolo (Chen et al., 2010; Jeffery et al., 2010). Sono organismi importanti nella catena trofica del suolo dove ne occupano tutti i livelli, si nutrono di specie vegetali, cellule batteriche e ife fungine e possono a loro volta essere fonte di cibo per animali a un livello trofico superiore. In base alla disponibilità di cibo o allo stadio di crescita (giovanile o adulto) alcune specie di nematodi (onnivori) possono nutrirsi di diverse fonti alimentari. *Dorylaimus* può agire come predatore e mediante un grosso dente cavo bucare altri organismi animali e succhiarne il contenuto, oppure, quando la prima fonte di sostentamento viene a mancare, nutrirsi di batteri e funghi (Jeffery et al., 2010). I nematodi batteriofagi e fungivori del suolo svolgono un ruolo fondamentale nel controllo della microflora edafica e nel riciclo dei nutrienti. In certi ecosistemi è stato visto che questo gruppo di nematodi contribuisce per valori superiori al 40% alla mineralizzazione dei nutrienti stimolando la crescita vegetale (Horiuchi et al., 2005).

I nematodi predatori rappresentano circa il 5% della comunità nematodica del suolo e appartengono a 4 gruppi tassonomici: *Mononchidae*, *Dorylaimidae*, *Dyplogasteridae* e *Aphelenchidae*. Ciascun gruppo presenta una specifica strategia alimentare, nutrendosi di una più o meno ampia varietà di organismi. Sono dotati un caratteristico apparato boccale o di un dente cavo che viene utilizzato per bucare le prede e succhiarne il contenuto (Khan e Kim, 2007). I nematodi predatori sono potenziali agenti di biocontrollo di specie animali fitoparassite. Le caratteristiche fondamentali da ricercare per scopi di biocontrollo sono efficienza nella predazione, un ciclo vitale breve e un tasso elevato di riproduzione, fattori che aiutano un predatore a mantenere alta la sua popolazione a differenza di molti fitoparassiti che posseggono un ciclo vitale lungo (30-40 giorni; Khan e Kim, 2007). Il gruppo dei *Mononchidae* si è dimostrato efficiente nella riduzione di popolazioni di fitoparassiti quali *Tylenchulus semipenetrans*, *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne incognita* ma risulta molto suscettibile alle fluttuazioni ambientali, ha un basso tasso di riproduzione, un ciclo di vita lungo e cannibalismo che ne limitano fortemente l'impiego (Khan e Kim, 2007). I predatori dorilamidi e diplogasteridi sono molto selettivi ed efficienti nella ricerca delle prede suggerendo la presenza di attrattori chemiotattici e per questo promettenti agenti di biocontrollo. In

particolare il gruppo dei *Dorylaimidae* risulta il miglior candidato in quanto ampiamente e abbondantemente distribuito nel suolo (Khan e Kim, 2007). Esistono tuttavia dei meccanismi di resistenza che permettono alle prede di difendersi dai predatori come una spessa cuticola (*Hoplolaimus*), una matrice gelatinosa (*Meloidogyne*), secrezioni tossiche (*Helicotylenchus*) e rapidi movimenti ondulatori del corpo (*Rhabditis*) (Khan e Kim, 2007).

Molti taxon di nematodi del suolo rappresentano una delle più grandi fonte di stress biotico per le piante agrarie causando ogni anno ingenti perdite economiche stimate intorno agli 80 miliardi di dollari (Holterman et al., 2009). I danni provocati alle colture possono essere diretti, dovuti alle lesioni e alle alterazioni che i nematodi arrecano agli organi vegetali, o indiretti che derivano dalla capacità dei nematodi di disseminare e inoculare nelle piante funghi, batteri o virus patogeni (Marinari Palmisano e Irdani, 1996). I nematodi che si cibano di radici o di altre parti della pianta (fitofagi) sono i maggiori e diretti responsabili della riduzione della performance vegetale, facilitano inoltre la successione ecologica di altre comunità nematodiche come i fitoparassiti che invadono l'apparato radicale (Mck Bird, 2004; Bonkowski et al., 2009; Dieterich e Sommer, 2009). I nematodi fitoparassiti sono pesti cosmopolite, attaccano sia gli organi aerei che quelli ipogei, compresi bulbi e tuberi, dove si nutrono a spese delle pianta (Barker et al., 1994). Essi hanno un'azione devastante, riducendo la funzionalità della pianta e di conseguenza la produttività della coltura e il valore di mercato del prodotto finale. Le specie fitoparassite possono essere distinte in ectoparassite, che si nutrono dall'esterno, ed endoparassite, che penetrano entro gli organi della pianta. Le prime (*Paratrichodorus*, *Hirschmaniella*) sono provviste di uno stiletto boccale, protrattile, cavo all'interno e connesso direttamente con l'esofago, che inseriscono nei tessuti della pianta succhiandone il contenuto. Le dimensioni e la forma dello stiletto variano a seconda del nematode, per esempio *Trichodorus* si nutre di cellule epidermiche e ha uno stiletto corto mentre *Xiphinema* o *Longidorus* presentano uno stiletto molto più lungo e possono penetrare negli strati più profondi della corteccia radicale (Bonkowski et al., 2009). Le specie endoparassite appartenenti alla famiglia dei *Tylenchidae* sono la causa della maggior parte dei danni a livello economico delle colture agrarie, e in particolare le specie appartenenti ai generi *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera* che inducono modificazioni nel tessuto vegetale con la formazione di sofisticate strutture con cui alimentarsi: galle (fig. 2) o cisti (Mck Bird, 2004; Dieterich e Sommer, 2009). Quasi tutte le specie sono polifaghe e hanno una cerchia più o meno ampia di piante ospiti, condizione questa che ne favorisce la persistenza nel suolo. Negli intervalli fra colture o, in condizioni

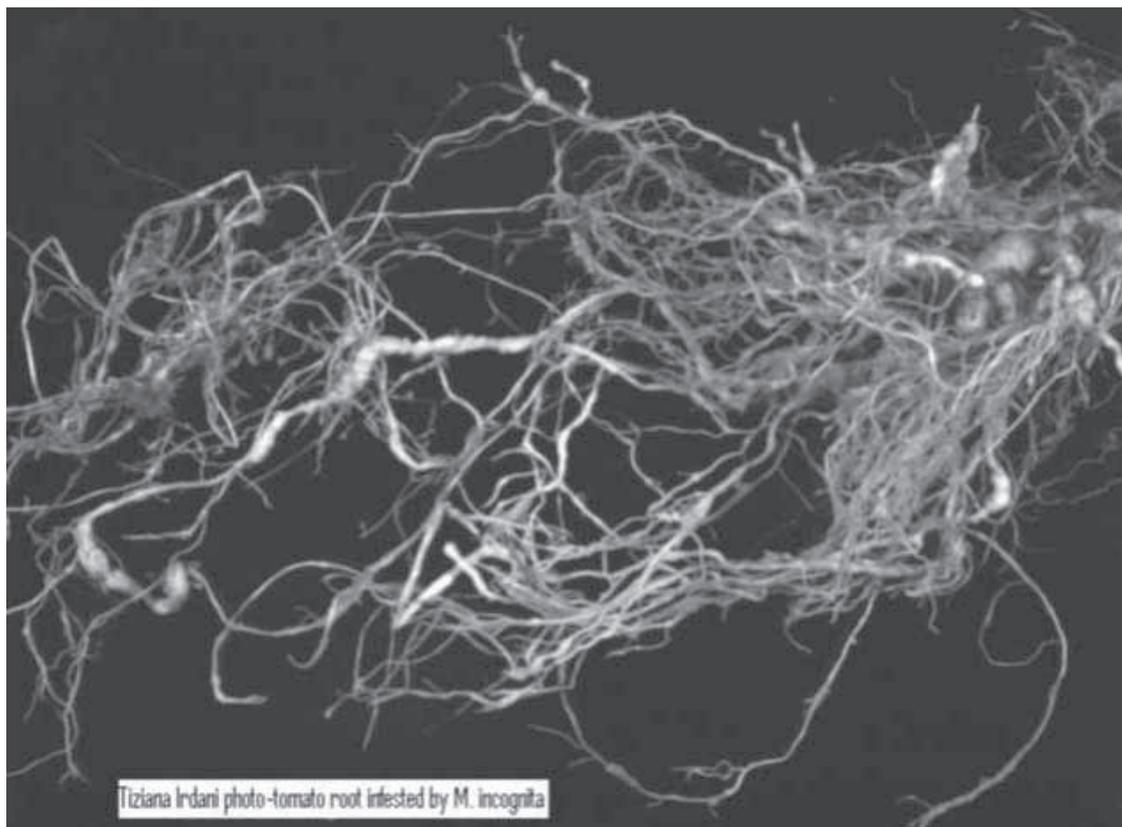


Fig. 2 Radici di pomodoro infestate da *M. incognita* (foto di T. Irdani)

ambientali avverse, molte specie sopravvivono all'interno di piante spontanee o, entro parti di piante rimaste nel terreno, avvalendosi spesso di una notevole capacità di resistere in uno stato di quiescenza al disseccamento, agli estremi termici e all'inedia.

Le interazioni che intercorrono a livello della rizosfera tra nematode fitoparassita e pianta ospite, sono alla base di un complesso scambio di segnali tra i due organismi (Bais et al., 2004). Per trovare le radici e iniziare a invaderle i nematodi fitoparassiti vengono attratti chemiotatticamente da gradienti di concentrazione di specifiche molecole secrete dalle radici oppure da determinanti specifici delle superfici radicali (Bonkowski et al., 2009). Una volta localizzata la regione vegetale da invadere entrano nella radice secernendo un'ampia varietà di molecole enzimatiche (cellulasi, pectinasi, estensine) che degradano e attaccano specificatamente il tessuto ospite. Inizialmente si riteneva che questa capacità di degradare le pareti cellulari vegetali dipendesse dalla presenza di batteri cellulolitici simbiotici mentre in realtà circa un decina di anni fa, è stato scoperto che i nematodi fitoparassiti sono in grado di produrre e secernere cellulasi, unico caso a tutt'oggi messo in luce nel regno animale. Dalla identificazione della prima cellulasi di origine nematodica a

ora sono stati identificati numerosi altri enzimi degradanti la parete vegetale (Mitreva et al., 2009; Dietrich e Sommer, 2009). Tutte le cellulasi scoperte all'interno della famiglia *Tylenchidae* appartengono a una sola famiglia di glicosil-idrolasi, e una vasta gamma di batteri del suolo possiede questo tipo di cellulasi. La similarità riscontrata tra i geni nematodici codificanti per tali cellulasi e quelli appartenenti a organismi batterici e l'assenza di questi enzimi degradativi in nematodi a vita libera, ha portato la comunità scientifica a ipotizzare che questi geni possano essere stati acquisiti nel corso dell'evoluzione da batteri del suolo mediante un meccanismo di trasferimento genico orizzontale (Dietrich e Sommer, 2009). Il meccanismo di trasferimento genico orizzontale (Horizontal Gene Transfer, HGT) è frequente tra batteri e archea, mentre è un evento reputato piuttosto raro se avviene tra individui procarioti ed eucarioti o all'interno degli stessi eucarioti (Mitreva et al., 2009). L'acquisizione via HGT richiede un contatto fisico tra donatore e ricevente che può essere raggiunto per esempio mediante una relazione trofica o ospite-simbionte. Tale meccanismo di acquisizione genica rimane però incerto ma potrebbe essere una chiave dell'adattamento dei nematodi al parassitismo vegetale (Dietrich e Sommer, 2009).

Molti nematodi endoparassiti una volta penetrati all'interno della radice inducono un sostanziale cambiamento nel pattern di espressione genica della pianta e la formazione di strutture vegetali specializzate (per esempio le cellule giganti indotte dall'infezione di *M. incognita*) caratterizzate da un'intensa attività metabolica che provvedono al nutrimento del nematode (Bonkowski et al., 2009). Tuttavia le piante non subiscono passivamente l'invasione del nematode ma hanno evoluto strategie difensive atte a respingere i nematodi, così mentre i nematodi sintetizzano molecole ad azione litica nei confronti della parete delle cellule vegetali, stimolano contemporaneamente la pianta a sintetizzare altre molecole endogene con azione litica nei confronti delle cellule nematodiche (Bonkowski et al., 2009).

#### LA RIZOSFERA E LE INTERAZIONI PIANTA - NEMATODE - MICROORGANISMO

Per anni ci siamo limitati a considerare la fauna della rizosfera solo come deleteria perché legata esclusivamente all'insorgere di malattie nella piante coltivate, mentre la connessione tra radici vegetali e comunità nematodica è più complessa che una semplice relazione tra produttori e consumatori. La fauna del suolo influisce positivamente sulla fertilità del suolo e la mineralizzazione dei nutrienti stimolando la produzione primaria (Huhta, 2007). Dal

canto loro le radici giocano un ruolo attivo nel difendere se stesse dall'attacco di organismi erbivori e mediante il rilascio di essudati radicali orchestrano le complesse interazioni che si svolgono nella rizosfera (Bonkowski et al., 2009; Napoli et al., 2008). Le specie vegetali agiscono direttamente e indirettamente sul numero, composizione e funzionalità della comunità batterica così come sulla fauna nematodica: la pianta rilascia essudati che stimolano la crescita dei batteri, la cui abbondanza richiama batteriofagi che cibandosi di batteri contribuiscono al rilascio di sostanze nutritive utili per la crescita vegetale (Viketoft et al., 2005; Bonkowski et al., 2009). La specie vegetale o l'appartenenza di questa a un particolare gruppo funzionale (graminacee, leguminose ecc. ecc.) è comunque un elemento determinante per l'abbondanza e composizione delle comunità nematodiche (Viketoft et al., 2005).

I nematodi batteriofagi sono implicati nell'avvicinamento dei batteri alle radici e nella dispersione di questi nella rizosfera, infatti molti batteri non sono mobili, ma anche quelli mobili possono percorrere distanze molto limitate. Molte cellule batteriche o ife fungine possono essere trasportate adese alla cuticola mucillagginosa dei nematodi e inoltre i batteriofagi possono defecare il 30-60% dei batteri ingeriti in forma attiva, proteggendo i batteri da condizioni ambientali avverse. Studi recenti hanno mostrato come questo meccanismo di veicolo dei batteri sia implicato nell'instaurarsi della simbiosi leguminosa-*Rhizobium*. Le radici della leguminosa liberano composti volatili (per esempio dimetil-sulfide) che attraggono chemiotatticamente i nematodi batteriofagi facilitando un'eventuale dispersione di rhizobi ingeriti o adesi, nelle vicinanze delle radici (Horiuchi et al., 2005). Altre evidenze hanno suggerito un ruolo significativo dei nematodi fungivori sul successo della simbiosi pianta-funghi micorrizici arbuscolari (Viketoft et al., 2005).

La dimensione e la forma della cellula batterica giocano un ruolo fondamentale nella scelta del cibo da parte del nematode batteriofago. La differenza nel consumare una particolare specie batterica piuttosto che un'altra dipende principalmente dalle dimensioni dell'apparato boccale del nematode, dal numero di batteri ingeriti e dalla capacità del batteriofago di digerire la preda. Certi taxon di nematodi possiedono una cuticola sclerotizzata nella porzione terminale del bulbo che viene utilizzata per ridurre il cibo, attraverso questo amminutamento i nematodi possono nutrirsi di batteri altrimenti indigeribili (Bonkowski et al., 2009). Numerose evidenze hanno comunque messo in luce il fatto che i nematodi batteriofagi presentino spiccate preferenze per specie batteriche piuttosto che altre. Nel corso dell'evoluzione i batteri hanno messo in atto sofisticate strategie fisiche e chimiche per difendersi dall'attacco dei batteriofagi, come la produzione di tossine o la formazione di biofilm (Bonkoswski et al., 2009). La

capacità dei batteri rizosferici di organizzarsi in biofilm è regolata da un meccanismo dipendente da segnali chimici e dalla densità della comunità batterica (quorum sensing). Di conseguenza i nematodi hanno evoluto meccanismi che gli consentono di evitare popolazioni batteriche con individui che producono tossine e di percepire i segnali di quorum sensing, imparando così a evitare colonie batteriche ben-difese (Bonkowski et al., 2009). Anche i nematodi fungivori possono presentare preferenze alimentari, e i funghi micorrizici sembrano essere i meno prelibati (Bonkowski et al., 2009). Inoltre i nematodi possono rappresentare una fonte di cibo per la comunità fungina, le ife di *Drechsleria anchonia* formano una specie di lazo con il quale catturano i nematodi, dopo di che il fungo penetra nel suo ospite assorbendo nutrienti utili per la sua crescita e riproduzione (Jeffery et al., 2010).

Molti composti organici volatili (VOC) vengono rilasciati dalle radici vegetali per attirare chemiotatticamente nematodi entomopatogeni. Questo meccanismo di difesa all'attacco di insetti erbivori sembra essere ampiamente distribuito nel regno vegetale e risulta una promettente strategia di lotta biologica (Bonkowski et al., 2009). Per esempio numerose specie vegetali, tra cui il mais, rilasciano  $\beta$ -cariofillene, sesquiterpene biciclico naturale che attrae specificatamente le larve di nematodi *Heterorhabditis megidis*, nemici delle larve di Diabrotica. Questi nematodi conducono la maggior della loro vita all'interno delle cavità di questo insetto ospite e possono trasportare nel loro intestino batteri simbiotici appartenenti al genere *Photorhabdus*. Una volta entrati nell'ospite i nematodi rilasciano il batterio che si moltiplica velocemente fornendo cibo essenziale per la crescita e riproduzione del nematode e portando di conseguenza alla morte dell'insetto (Boff et al., 2001).

Il ruolo dei nematodi nell'induzione di malattie di patogeni del suolo è ampiamente dimostrato e più frequentemente ci troviamo davanti a interazioni sinergiche in cui l'associazione tra nematode e patogeno può risultare in un maggiore danno (effetto additivo) rispetto a quello determinato dal parassita o patogeno presi da soli (Back et al., 2002). Le ferite all'apparato radicale provocate dai nematodi, sia ecto che endoparassiti, durante il loro processo di infezione sono le maggiori responsabili della diffusione e dell'insorgere di malattie di origine fungina. Il primo caso registrato di interazione nematode-fungo è stato quello tra *Fusarium oxysporum* e *Meloidogyne* spp. nella rizosfera di piante di cotone; successivamente la stessa interazione è stata rilevata in altre piante tra cui alfa-alfa, cece, fagiolo, fava, lenticchia, pomodoro, caffè e banana (Back et al., 2002). I funghi approfittano delle micropunture create dallo stiletto o dai canali di infezione, per penetrare e colonizzare la radice (Back et al., 2002). I nematodi ectoparassiti come *Belonolaimus* e *Trichodorus*

sono stati raramente descritti in interazione sinergica con funghi patogeni e questo probabilmente è dovuto al loro tipo di alimentazione che causa danni minori all'apparato radicale vegetale mentre *Xiphinema* e *Longidorus*, provvisti di un lungo stiletto, sono implicati nella trasmissione di numerose malattie di origine virale (Back et al., 2002). Un altro interessante meccanismo è offerto dalle femmine di endoparassiti sia galligeni che formanti cisti, che provocano la formazione di fessure della galla o nella ciste in modo da consentire la fecondazione da parte dei maschi. Queste fessure sembrano facilitare la penetrazione di funghi opportunisti consentendogli di superare la corteccia e raggiungere più facilmente i tessuti radicali interni (Back et al., 2002).

#### I NEMATODI COME INDICATORI DELLA QUALITÀ DEL SUOLO

I nematodi possono essere molto sensibili alle perturbazioni e ai cambiamenti ambientali e la struttura e funzionalità della comunità nematodica del suolo variano in risposta all'uso del suolo, all'arricchimento di nutrienti a seguito di fertilizzazione organica o minerale, alla coltivazione, al drenaggio, alla composizione ed età della comunità vegetale, alle introduzioni di sostanze tossiche come metalli pesanti o idrocarburi policiclici aromatici. I nematodi rappresentano pertanto uno strumento diagnostico importante per la misura dei cambiamenti dello stato biotico e funzionale del suolo (Neher, 2001; Neher et al., 2005; Donn et al., 2008; Chen et al., 2010).

I nematodi del suolo presentano particolari caratteristiche che li rendono ottimi bioindicatori offrendo numerosi vantaggi al loro utilizzo rispetto alla microflora edafica: occupano una posizione centrale, una o due grandezze più in alto, nella catena trofica del suolo; possono essere raggruppati in diversi gruppi trofici, la cui distribuzione riflette i vari stadi successionali dell'ambiente in cui vivono; hanno un tempo di generazione più lungo (da giorni a anni) rispetto ai microrganismi metabolicamente attivi (da ore a giorni) rendendo la popolazione più stabile nel tempo e non fluttuante in relazione ai flussi effimeri di nutrienti; hanno una cuticola permeabile che gli permette di rispondere rapidamente a un'ampia varietà di sostanze inquinanti; molti taxa hanno la capacità di sopravvivere per lungo tempo in una forma inattiva (cisti e criptobiosi) in modo da superare condizioni ambientali sfavorevoli; al contrario alcune specie (*Dorylaimidae*) non hanno uno stadio di resistenza e pertanto risultano molto sensibili ai cambiamenti ambientali (Neher, 2001); sono ubiquitari e certe specie sono gli ultimi animali a scomparire in suoli disturbati e/o inquinati; (Neher, 2001). Inoltre nei nematodi sono

state identificate numerose proteine “heat shock” altamente conservate, la cui espressione aumenta notevolmente in caso di esposizione a condizioni di stress come elevate temperature, metalli pesanti o composti organici tossici, e che possono essere utilizzate come biomarker (Neher, 2001).

Gli indici basati sulla biodiversità ci permettono di caratterizzare la comunità nematodica e di determinare gli effetti su questa degli stress ambientali (Viketoft et al., 2005; Dupont et al., 2008). Indici come quelli che determinano richness, similarità (Jaccard, Sørensen) o diversità (Shannon-Weiner, Simpson) sono molto popolari perché facili da determinare, ma presentano dei limiti per una loro ampia diffusione nella valutazione delle qualità del suolo. Si ottengono dalla somma delle proporzioni dei vari gruppi tassonomici senza considerare il peso qualitativo di ciascun taxon. Per esempio suoli con il 100% di specie native o il 100% di specie esotiche possono avere lo stesso valore di diversità, ma presentare caratteristiche di qualità e salute completamente diverse. L'indice di maturità (Maturity Index, MI) sviluppato per i nematodi terrestri, e successivamente esteso anche a quelli marini o di sedimenti salmastri, ha dimostrato una migliore capacità di discriminare le diverse condizioni ecologiche del suolo su scala regionale (Neher, 2001; Sanchez-Moreno et al., 2008). L'indice di maturità si basa sul principio che differenti taxon, per le loro caratteristiche innate, hanno una diversa sensibilità allo stress, pratica agronomica, specie vegetale e tipo di suolo. Una sequenza successionale nematodica può essere interrotta a vari livelli da una semplice pratica agronomica come per esempio l'applicazione di fertilizzanti o pesticidi. La composizione e funzionalità di una comunità nematodica riflette pertanto la storia delle perturbazioni a cui è stata sottoposta e valori bassi di MI sono indicativi di un minor disturbo dell'ambiente (Neher, 2001; Neher et al., 2005). L'evoluzione e l'utilizzo dell'indice di maturità (MI) lo include tra gli indici più comunemente utilizzati in campo agronomico, utile anche per una valutazione di ambienti naturali come le praterie, pascoli e foreste. Nonostante i suoi utili attributi, MI presenta comunque dei limiti come la necessità di una buona conoscenza della tassonomia dei nematodi e come il fatto che i nematodi possano mostrare delle preferenze alimentari conducendo a risultati che non sempre rispecchiano a pieno la sequenza degli agenti di disturbo (Neher, 2001).

#### METODI MOLECOLARI PER L'ANALISI DELLE COMUNITÀ DI NEMATODI

Si stima che le specie di nematodi attualmente descritte rappresentino solo il 5% delle specie realmente esistenti nel suolo. La diversità dei nematodi nel

suolo è ancora essenzialmente sconosciuta questo perché l'identificazione morfologica a livello di specie presenta difficoltà tecniche dovute all'enorme abbondanza di specie, alla piccola taglia dell'organismo e alla necessità di competenze tassonomiche specializzate. La sola identificazione morfologica comunque non può essere sufficiente a descrivere la comunità nematodica del suolo dato che si basa su un esiguo numero di individui scelti a caso. È quindi necessario lo sviluppo di un sistema di riconoscimento più potente, applicabile a livello di taxon, gruppo, genere e specie (Floyd et al., 2002). Le tecniche di biologia molecolare vengono sempre più utilizzate per l'identificazione dei nematodi, portando a notevoli progressi nella tassonomia dei nematodi del suolo. Numerose tecniche di fingerprinting possono essere applicate alla caratterizzazione della biodiversità delle diverse comunità di nematodi del suolo, consentendo di ottenere informazioni ecologiche rilevanti. La Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) risulta utile anche in un contesto ecologico, come per differenziare batteriovori strettamente correlati non distinguibili a livello morfologico (Van Der Knaap et al., 1993; Foucher et al., 2004; Chen et al., 2010). La Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) è stata utilizzata con successo nello studio di comunità di nematodi sia marini che terrestri (Waite et al., 2003; Foucher et al., 2004; Okada e Oba; 2008). Nella DGGE regioni specifiche del DNA (generalmente regioni variabili del 18S rDNA) vengono amplificate e separate mediante un gel di elettroforesi con gradiente di denaturazione; contando il numero di bande si ottengono informazioni sul numero di gruppi nematodici presenti mentre l'intensità delle bande può essere interpretata come abbondanza dei vari gruppi rispetto alla totalità della comunità (Foucher et al., 2004; Chen et al., 2010). La tecnica T-RFLP utilizza un prodotto di amplificazione fluorescente analizzabile e quantificabile mediante sequenziatore automatico, può essere progettata selezionando le combinazioni enzimatiche adatte a separare i vari taxon nematodici, utilizzando librerie geniche presenti nei vari database pubblici (Donn et al., 2008; Hermann et al., 2008). Il risultato è che ogni picco del profilo può essere considerato come un taxon nematodico, l'inclusione di uno standard interno in ciascun campione permette la comparazione tra profili diversi (Chen et al., 2010). Il maggior vantaggio di questa tecnica è rappresentato dalla possibilità di utilizzare plate format di 96 o 384 pozzetti che insieme a software di analisi sofisticati, la rende una tecnica high-throughput per rapide analisi permettendo estesi studi a scopi di monitoraggio (Chen et al., 2010).

La Real-time PCR è molto più rapida, specifica e sensibile della PCR convenzionale. È stata ampiamente utilizzata per la quantificazione di specie nematodiche di particolare importanza agronomica come i nematodi fitoparassiti

che formano cisti nella patata (*Globodera*; Chen et al., 2010). I risultati sono velocemente analizzabili e facilmente interpretabili rispetto a dati di tipo morfologico, rappresentando una alternativa conveniente specialmente se si ha disposizione poco materiale da analizzare (Chen et al., 2010). Jones et al. (2006) utilizzano la microscopia ottica in combinazione con Real-time PCR, dimostrando una chiara correlazione tra risultati ottenuti dai metodi convenzionali basati su caratteristiche morfologiche e metodi molecolari. Risultati simili sono stati ottenuti da Hamilton et al. (2009), paragonando dati di sequenziamento del DNA con dati ottenuti da un approccio tradizionale basato sulla microscopia ottica. Esistono errori per ciascun metodo è quindi chiaro che un approccio combinato fornisce una visione più affidabile dell'intera comunità e risulta uno strumento importante nel processo di transizione da una identificazione di tipo morfologico a futuri scenari molecolari (Chen et al., 2010).

Con il termine "DNA-Barcode" si intende un codice genetico con cui ottenere un nuovo tipo di catalogazione e definizione degli organismi viventi. Il DNA barcoding è una tecnica applicabile a tutti gli organismi viventi basata sul sequenziamento di un piccolo frammento di genoma, nucleare e/o mitocondriale, che fornisca informazioni a livello di specie o informazioni filogenetiche tali da permettere una identificazione tassonomica del campione biologico (Chen et al., 2010). Le possibilità di utilizzo del DNA barcoding sono numerose e attraverso l'uso di primer universali per i nematodi si può studiare la biodiversità nematodica dei vari ambienti terrestri, consentendo una rapida e facile identificazione sia di un individuo, sia di sequenze isolate direttamente dall'ambiente. Questo approccio molecolare può essere applicato a nematodi a tutti gli stadi di sviluppo, sia larva che adulto (Donn et al., 2008). Hamilton et al. (2009) hanno estratto il DNA direttamente dal suolo e utilizzato primer specifici per lo studio della diversità di comunità di micro e meso-fauna, capaci di catturare gruppi di fauna abbondanti come nematodi, collemboli, acari, tardigradi, enchitreidi e, sebbene i nematodi restino suddivisi esclusivamente all'interno della due principali unità tassonomiche (Chromadorea e Enoplea), hanno fornito una risoluzione tassonomica sufficiente a descrivere la struttura della comunità della fauna del suolo.

L'efficienza di questa tecnica dipende dall'identità della regione genica analizzata. La maggior parte delle ricerche svolte sui nematodi marini o terrestri, hanno utilizzato una regione del gene per l'rRNA 18S, che offre il vantaggio di un esteso database disponibile nel web. Il primo passo per la identificazione di specifici taxon all'interno di popolazioni miste è appunto la costruzione di un discreto e affidabile database di informazioni genetiche. Idealmente ciascuna sequenza di DNA contenuta nel database dovrebbe essere accompagnata anche

da una adeguata descrizione del campione dal quale la sequenza deriva (Powers, 2004). Numerosi progetti di sequenziamento di genomi e/o regioni specifiche del genoma nematodico hanno portato allo sviluppo di estesi database pubblici (WormBase, <http://wormbase.org>, Bieri et al., 2007; Nematode.net, <http://www.nematode.net>, Wylie et al., 2004; NemATOL, <http://nematol.unh.edu/>; Comprehensive Phytopathogen Genome Resource CPRG, <http://cpgr.tigr.org/index.html>; NEMrRNA, <http://www.nemamex.ucr.edu>; Subbotin et al., 2007; NEMBASE <http://www.nematodes.org>; PPNEMA, <http://www.ppnema.uniba.it>, Rubino et al., 2008). Tuttavia le informazioni contenute nei database sono ancora insufficienti a permettere una identificazione estesa della specie mediante rRNA 18S, ma attraverso la costruzione di alberi filogenetici si può valutare la possibile appartenenza a un taxon di un campione sconosciuto (Floyd et al., 2002; Powers, 2004). Questi database sono però fortemente arricchiti di taxa riferiti a patogeni vegetali (Giorgi et al., 2002) o animali mentre sono ancora scarse le risorse che riguardano i nematodi a vita libera, che comprendono la maggior parte della nematofauna del suolo. Un campione di suolo (100 gr) può contenere 50-100 differenti specie di nematodi diverse e migliaia di individui a tutti gli stadi di sviluppo (Powers, 2004). I dati provenienti dalle sequenze del DNA sono il cuore della rivoluzione genomica in biologia e il numero dei taxon di nematodi a vita libera classificati è in continuo aumento (Porazinska et al., 2009).

Il prossimo passo sarà quello di applicare le nuove tecniche di sequenziamento high-throughput (tipo pirosequenziamento) che forniscono l'opportunità di generare una grande quantità di basi sequenziate in breve tempo e a basso costo. I recenti progressi tecnologici di clonaggio e sequenziamento hanno reso sempre più facile l'applicazione delle tecniche molecolari a un maggior numero di organismi che altrimenti sarebbe stato difficile studiare (Green Tringe e Rubin, 2005). È ora possibile estrarre il DNA dagli organismi direttamente nel loro ambiente come tessuti vegetali, e clonarlo all'interno di vettori producendo delle librerie eterogenee contenenti popolazioni miste a livello di specie o di ceppo. Di conseguenza i dati contenuti in queste librerie forniscono una ricchezza di informazioni sulle dinamiche interne alla comunità come per esempio riguardo l'interazione tra le specie e ai processi di selezione (Green Tringe e Rubin, 2005). Questi approcci sono ben applicabili agli studi di comunità di nematodi (Chen et al., 2010).

Porozinska et al. (2009) hanno utilizzato un approccio metagenomico per determinare primer che meglio potessero rappresentare la comunità nematodica del suolo e i cui prodotti di amplificazione potessero poi essere utilizzati successivamente con metodi di sequenziamento high-throughput. Hanno creato due distinti campioni metagenomici in modo da valutare la scelta dei primer e

delle regioni di DNA target scelte (gene per rRNA 18S) evidenziando due possibili vantaggi: l'alto livello di ripetibilità dell'analisi qualitativa della comunità nematodica e il minimo errore di sottostima della diversità nematodica.

#### RIASSUNTO

La biodiversità presente all'interno del biota suolo è essenziale per la funzionalità dell'intero ecosistema e gli invertebrati ne costituiscono una componente fondamentale il cui ruolo, nella formazione e trasformazione del suolo, è ben riconosciuto. I nematodi sono probabilmente il gruppo di animali più abbondanti nel suolo dove ne occupano diversi livelli trofici. Possono condurre una vita libera, cibandosi di batteri funghi o altri nematodi, oppure possono vivere come parassiti di piante o animali. Si stima che le specie di nematodi attualmente descritte rappresentino solo il 5% delle specie realmente esistenti nel suolo. Questa discrepanza è dovuta probabilmente alle limitazioni dei metodi analitici convenzionali basati principalmente sul riconoscimento mediante microscopia ottica. L'avvento delle tecniche molecolari può contribuire allo studio dell'ecologia dei nematodi mettendo in luce la loro grande diversità in natura.

#### ABSTRACT

The below-ground diversity is essential for above-ground ecosystem function and the soil invertebrates are a key component of soil biota. Nematodes occupy a central position in the soil food web and are correlate, directly or indirectly, with ecological processes such as nitrogen cycling and plant growth. Nematodes are among the most numerous and diverse soil organisms occurring in all soil on the globe. They can live in waterfilms around soil particles, consuming bacteria, fungi or other nematodes or can live mainly as parasite of plants and animals. It has been estimated that the currently described Nematoda represents less than 5% of the total number of species. The discrepancy between "know" and estimated species richness may be partially due to the limitations of analytical techniques such as light microscopy. Application of molecular techniques and the development of DNA sequence-based approaches have led to considerable progresses in nematode identification, revealing a larger diversity. The metagenomics approach aimed to nematodes has the potential to greatly expand our understanding of this component of the microbiota.

#### BIBLIOGRAFIA

- BACK M.A., HAYDOCK P.P.J., JENKINSON P. (2002): *Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens*, «Plant Pathology», 51, pp. 683-697.
- BAIS H.P., PARK S.W., WEIR T.L., CALLAWAY R.M., VIVANCO J.M. (2004): *How plants communicate using the underground information superhighway*, «Trends in Plant Science», 9, pp. 26-32.

- BARKER K.R., HUSSEY R.S., KRUSBERG L.R., BIRD G.W., DUNN R.A., FERRIS H., FERRIS V.R. ET AL. (1994): *Plant and soil nematodes: societal impact and focus for the future*, «Journal of Nematology», 26, pp. 127-137.
- BIERI T., BLASAR D., OZERSKY P., ANTOSHECHKIN I., BASTIANI C., CANARAN P., CHAN J., CHEN N. ET AL. (2007): *WormBase: new content and better access*, «Nucleic Acids Research», 35, pp. D506-D510.
- BOFF M.I.C., ZOON F.C., SMITS P.H. (2001): *Orientation of Heterorhabditis megidis to insect hosts and plant roots in a Ytubes and olfactometer*, «Entomologia Experimentalis et Applicata», 98, pp. 329-337.
- BONKOWSKI M., VILLENAVE C., GRIFFITHS B. (2009): *Rhizosphere fauna: functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots*, «Plant and Soil», 321, pp. 213- 233.
- CARDON Z.G., GAGE D.J. (2006): *Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective*, «Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics», 37, pp. 459- 488.
- CHEN X.Y., DANIELL T.J., NEILSON R., O'FLAHERTY V., GRIFFITHS B.S. (2010): *A comparison of molecular methods for monitoring soil nematodes and their use as biological indicators*, «European Journal of Soil Biology», 46, pp. 319-324.
- DIETERICH C., SOMMER R.J. (2009): *How to become a parasite-lessons from the genomes of nematodes*, «Trends in Genetics», 25, pp. 203-209.
- DONN S., GRIFFITHS B.S., NEILSON R., DANIELL T.J. (2008): *DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies*, «Applied Soil Ecology», 38, pp. 20-26.
- DUPONT S.T., FERRIS H., VAN HORN M. (2008): *Effects of cover crop quality and quantity on nematode-based soil food webs and nutrient cycling*, «Applied Soil Ecology», 41, pp. 157-167.
- FLOYD R., ABEBE E., PAPERT A., BLAXTER M. (2002): *Molecular barcodes for soil nematode identification*, «Molecular Ecology», 11, pp. 839-850.
- FOUCHER A.L.J.L., BONGERS T., NOBLE L.R., WILSON M.J. (2004): *Assessment of nematode biodiversity using DGGE of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil*, «Soil Biology & Biochemistry», 36, pp. 2027-2032.
- GIORGI C.D., VERONICO P., DE LUCA F., NATILLA A., LANAVE C., PESOLE G. (2002): *Structural and evolutionary analysis of the ribosomal genes of the parasitic nematode Meloidogyne artiellia suggests its ancient origin*, «Molecular and Biochemical Parasitology», 124, pp. 91-94.
- GREEN TRINGE S., RUBIN E.M. (2005): *Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples*, «Nature Review», 6, pp. 805-814.
- HAMILTON H.C., STRICKLAND M.S., WICKINGS K., BRADFORD M.A., FIERER N. (2009): *Surveying soil faunal communities using a direct molecular approach*, «Soil Biology and Biochemistry», 41, pp. 1311-1314.
- HERMANN E., GAUTHERON N., ALABOUVETTE C., STEINBERG C. (2008): *Fingerprinting methods to approach multitrophic interactions among microflora and microfauna communities in soil*, «Biology and Fertility of Soils», 44, pp. 975-984.
- HORIUCHI J., PRITHIVIRAL B., BAI H.P., KIMBALL B.A., VIVANCO J.M. (2005): *Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria*, «Pianta», 222, pp. 848-857.
- HUHTA V. (2007): *The role of soil fauna in ecosystems: a historical review*, «Pedobiologia», 50, pp. 489-495.
- HOLTERMAN M., KARSSSEN G., VAN DEN ELSSEN S., VAN MEGEN H., BAKKER J., HELDER

- J. (2009): *Small Subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light on relationships among some high-impact plant-parasitic nematodes and the evolution of plant feeding*, «Phytopathology», 99, pp. 227-235.
- JEFFERY S., GARDI C., JONES A., MONTANARELLA L., MARMO L., MUCO L., RITZ K., PERES G., RÖMBKE J., VAN DER PUTTEN W.H. (2010): *European atlas of soil biodiversity*, Edito da European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- JONES K.L., TODD T.C., BEAM J.L.W., COOLON J.D., BLAIR J.M., HERMAN M.A. (2006): *Molecular approach for assessing responses of microbial-feeding nematodes to burning and chronic nitrogen enrichment in a native grassland*, «Molecular Ecology», 15, pp. 2601-2609.
- KHAN Z., KIM Y.H. (2007): *A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes*, «Applied Soil Ecology», 35, pp. 370-379.
- MARINARI PALMISANO A., IRDANI T. (1996): *Nematodi negli ecosistemi forestali*, «Atti Giornate Fitopatologiche», 1, pp. 253-260.
- MCK BIRD D. (2004): *Signaling between nematodes and plants*, «Current Opinion in Plant Biology», 7, pp. 372-376.
- MITREVA M., SMANT G., HELDER J. (2009): *Role of horizontal gene transfer in the evolution of plant parasitism among nematodes*, «Methods in Molecular Biology», 532, pp. 517-535.
- NAPOLI C., MELLO A., BONFANTE P. (2008): *Dissecting the rhizosphere complexity: the truffle-ground study case*, «Rendiconti Lincei», 19, pp. 241-259.
- NEHER D.A. (2001): *Role of nematodes in soil health and their use as indicators*, «Journal of Nematology», 33, pp. 161-168.
- NEHER D.A., WU J., BARBERCHECK M.E., ANAS O. (2005): *Ecosystem type affects interpretation of soil nematode community measures*, «Applied Soil Ecology», 30, pp. 47-64.
- OKADA H., OBA H. (2008): *Comparison of nematode community similarities assessed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and by morphological identification*, «Nematology», 10, pp. 689-700.
- POWERS T. (2004): *Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes*, «Annual Review of Phytopathology», 42, pp. 367-383.
- PORAZINSKA D.L., GIBLIN-DAVIS R.N., FALLER L., FARMERIE W., KANZAKI N., MORRIS K., POWERS T.O., TUCKER A.E., SUNG W., THOMAS K. (2009): *Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity*, «Molecular Ecology Resource», 9, pp. 1439-1450.
- RUBINO F., VOUKELATOU A., DE LUCA F., DE GIORGI C., ATTIMONELLI M. (2008): *PP-NEMA: A Resource of Plant-Parasitic Nematodes Multialigned Ribosomal Cistrons*, «International Journal of Plant Genomics», 2008, pp. 1-5.
- SANCHEZ-MORENO S., SMUKLER S., FERRIS H., O'GEEN A.T., JACKSON L.E. (2008): *Nematode diversity, food web condition, and chemical and physical properties in different soil habitats of an organic farm*, «Biology and Fertility of Soil», 44, pp. 727-744.
- SUBBOTIN S.A., STURHAN D., VOVLAS N., CASTILLO P., TAMBE J.T., MOENS M., BALDWIN J.G. (2007): *Application of the secondary structure model of rRNA for phylogeny: D2-D3 expansion segments of the LSU gene of plant-parasitic nematodes from the family Hoplolaimidae Filipjev, 1934*, «Molecular Phylogenetics and Evolution», 43, pp. 881-890.
- VAN DER KNAAP E., RODRIGUEZ R.J., FRECKMAN D.W. (1993): *Differentiation of bacterial feeding nematodes in soil ecological-studies by means of arbitrarily-primed PCR*, «Soil Biology and Biochemistry», 25, pp. 1141-1151.

- VIKETOFT M., PALMBORG C., SOHLENIUS B., HUSS-DANEL K., BENGTSSON J. (2005): *Plant species effects on soil nematode communities in experimental grasslands*, «Applied Soil Ecology», 30, pp. 90-103.
- WAITE I.S., O'DONNELL A.G., HARRISON A., DAVIES J.T., COLVAN S.R., EKSCHMITT K., DOGAN H. ET AL. (2003): *Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of soil community DNA*, «Soil Biology and Biochemistry», 35, pp. 1165-1173.
- WYLIE T., MARTIN J.C., DANTE M., MITREVA M.D., CLIFTON S.W., CHINWALLA A., WATERSTON R.H., WILSON R.K., MCCARTER J.P. (2004): *Nematode.net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes*, «Nucleic Acids Research», 32, pp. D423-D426.

## La tecnologia del *MicroArray* fenotipico

### INTRODUZIONE

Il *fenotipo* è l'insieme dei caratteri che l'individuo manifesta: dipende dal suo genotipo, dalle interazioni fra geni e anche da fattori esterni. Lo studio dei caratteri fenotipici dei microrganismi viene tradizionalmente effettuato tramite esperimenti allestiti *ad hoc*, che hanno lo scopo di valutare la capacità del microrganismo di crescere in differenti condizioni e di rispondere a parametri ambientali. Il maggiore limite associato a questi approcci è la loro bassa "processività". Oggi grazie a un'evoluzione del sistema di identificazione microbica Biolog-ID, prodotto dall'azienda Biolog, è disponibile una tecnologia innovativa definita *MicroArray* fenotipico che offre la straordinaria possibilità di ottenere una rapida e ampia caratterizzazione fenotipica dei microrganismi permettendo di saggiare contemporaneamente fino a 2000 caratteri fenotipici quali l'utilizzazione di fonti di carbonio/energia, di fonti di azoto, di zolfo e di fosforo; la tolleranza al pH e agli osmoliti, la sensibilità a innumerevoli sostanze chimiche. Il *MicroArray* fenotipico fornisce quindi una descrizione fenotipica estremamente dettagliata delle caratteristiche funzionali di un microrganismo.

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico, come l'approccio Biolog-ID, si basa sull'impiego di micropiastre a 96 pozzetti ciascuno dei quali rappresenta un saggio fenotipico. L'esito del saggio viene valutato mediante lo sviluppo del colore dovuto al viraggio di un indicatore di potenziale redox, il violetto di tetrazolio; cellule metabolicamente attive creano le condizioni affinché il violetto

\* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, sezione di Microbiologia e Laboratorio Genexpress, Università degli Studi di Firenze

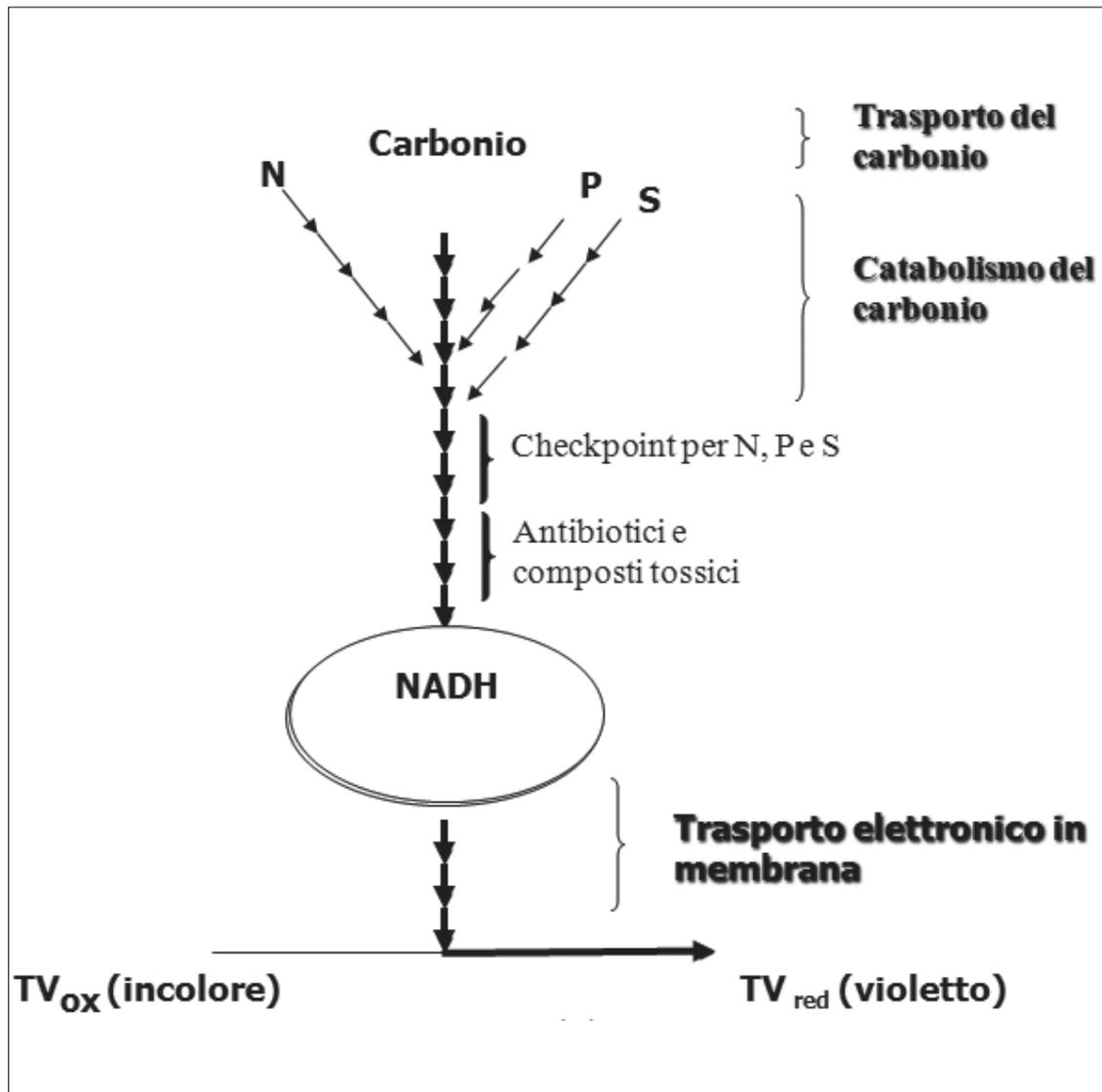


Fig. 1 Riduzione del violetto di tetrazolio. Il catabolismo di una fonte di carbonio volto alla produzione di NADH genera un flusso di elettroni che riducendo il violetto di tetrazolio (VT), determina lo sviluppo del colore viola. La velocità con cui si sviluppa il colore è direttamente correlata al metabolismo. Molte cellule riducono il catabolismo delle fonti di carbonio se non hanno sufficiente disponibilità di azoto (N), fosforo (P) e zolfo (S), consentendo di misurare il flusso del catabolismo delle fonti di azoto, fosforo e zolfo. Inoltre composti chimici che interferiscono con il metabolismo possono ridurre il flusso elettronico e quindi lo sviluppo di colore (da Bochner 2009, modificata)

di tetrazolio venga trasformato da una forma ossidata incolore in una forma ridotta di colore violetto (fig. 1).

Le micropiastre, una volta inoculate con una sospensione cellulare standardizzata, vengono incubate all'interno di un apparato denominato Omni-log che ha la duplice funzione di incubatore e di lettore di piastre. Lo stru-

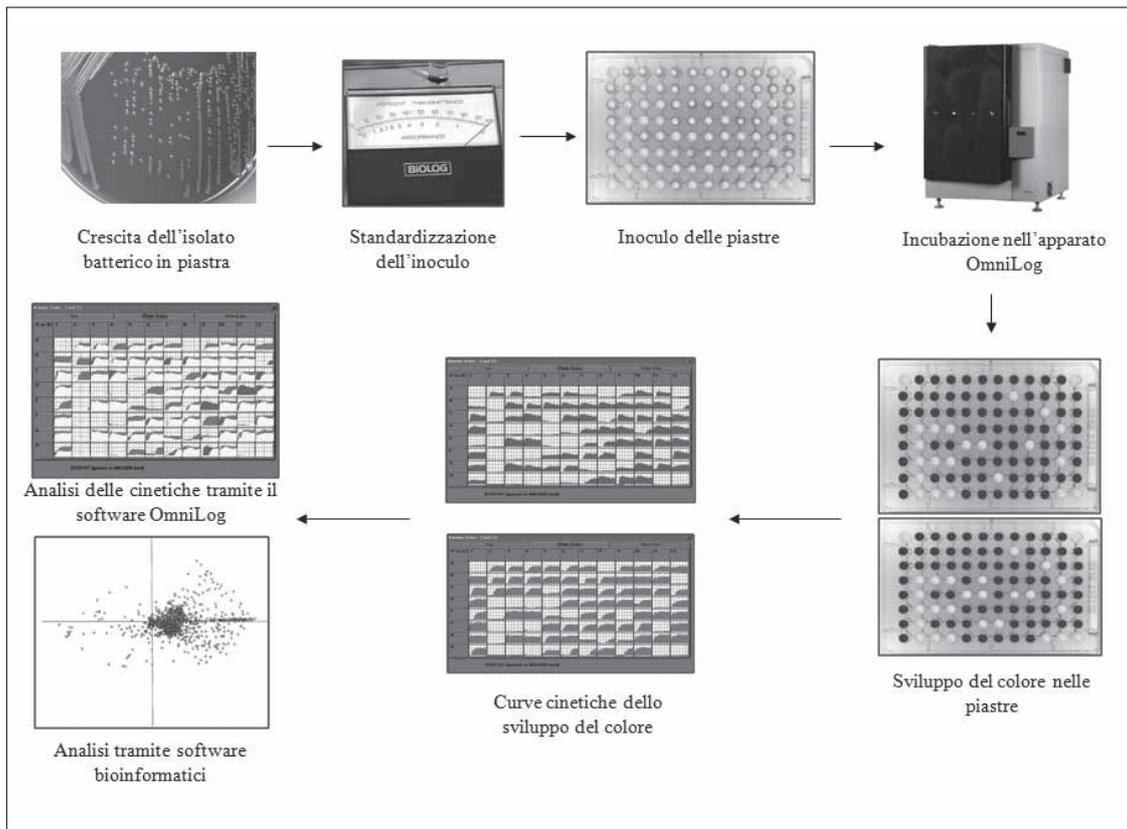


Fig. 2 Fasi sperimentali della tecnologia del MicroArray fenotipico. A partire dall'isolato batterico (o più in generale microbico) cresciuto in piastra, viene preparata una sospensione cellulare standardizzata da inoculare nei pozzetti delle micropiastre Biolog. Le micropiastre inoculate vengono incubate nell'apparato Omnilog che registra lo sviluppo del colore ogni 15 minuti tramite una fotocamera, il software associato trasforma i dati dello sviluppo del colore in curve cinetiche. Il software consente inoltre di paragonare le curve cinetiche ottenute da due esperimenti indipendenti. In alternativa i dati relativi alle cinetiche possono essere analizzati mediante software bioinformatici

mento acquisisce ogni 15 minuti l'immagine delle micropiastre e un software traduce i dati di intensità di colore ottenuti per ciascun pozzetto in curve cinetiche. Il software associato allo strumento Omnilog fornisce per ciascuna curva cinetica prodotta alcuni importanti parametri, come l'altezza media e l'area della curva, e permette di paragonare tra loro curve cinetiche ottenute in esperimenti diversi. Ad esempio volendo valutare l'effetto della temperatura sul fenotipo di un dato ceppo possono essere paragonate le curve cinetiche di due esperimenti condotti a temperatura diversa, o altrimenti volendo confrontare i fenotipi di due ceppi microbici si può procedere al confronto delle curve cinetiche ottenute per ciascun ceppo. In figura 2 è riportato uno schema delle fasi sperimentali della tecnologia del *MicroArray* fenotipico.

MICROPIASTRE PM	SAGGIO FENOTIPICO	NUMERO DEI SAGGI
PM01-PM02	Utilizzazione di fonti di carbonio	190
PM03	Utilizzazione di fonti di azoto	95
PM04	Utilizzazione di fonti di fosforo e zolfo	59 (fosforo), 35 (zolfo)
PM05-PM08	Utilizzazione di peptidi come fonte di azoto	285
PM09	Sensibilità agli osmoliti	96
PM10	Sensibilità al pH	96
PM11-PM20	Sensibilità a composti tossici	960

Tab. 1 *Saggi fenotipici delle micropiastre del MicroArray fenotipico attualmente commercializzate per lo studio di batteri*

Le micropiastre per ottenere il *MicroArray* fenotipico batterico sono riportate in tabella 1. Una dettagliata descrizione dei composti contenuti nelle piastre del *MicroArray* fenotipico può essere ottenuta dal sito web dell'azienda Biolog alla pagina <http://www.biolog.com/pmMicrobialCells.html>.

#### I VANTAGGI DI MISURARE LA RESPIRAZIONE INVECE DELLA CRESCITA

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico, come precedentemente descritto, usa un marcatore di potenziale redox per misurare la respirazione. Perché è stato scelto di misurare la respirazione invece della crescita? Ci sono almeno tre ragioni (Bochner 2009): la misurazione della respirazione è un metodo più sensibile rispetto alla crescita per misurare un fenotipo; la misurazione della respirazione consente la valutazione di più fenotipi, includendo anche quelli che non portano a crescita (ad esempio *E. coli* possiede una via per la utilizzazione del formiato, tramite una deidrogenasi, che può essere messa in evidenza mediante la misurazione della respirazione ma non attraverso la valutazione della crescita); tramite la misurazione della respirazione possono essere messi in evidenza fenotipi di cellule che non possono essere coltivate in axenicità (ad esempio ceppi appartenenti a *Coxiella burnetii* sono stati caratterizzati dopo recupero da cellule ospiti di mammifero rotte meccanicamente (Bochner et al., 2008).

Le principali limitazioni nell'impiego della tecnologia del *MicroArray* fenotipico sono legate allo studio di microrganismi che sono poco attivi o che crescono molto lentamente o che hanno esigenze colturali estreme. Tempi d'incubazione lunghi, specialmente in presenza di alte temperature, portano all'essiccamento dei pozzetti con cambiamento di concentrazione dei reagenti nei pozzetti e alterazione delle condizioni iniziali. Inoltre ad alte temperature il marcatore di potenziale redox può virare per cause abiotiche e a temperatu-

re superiori agli 80 °C la plastica delle piastre si può alterare. Elevate concentrazioni di sali nel mezzo, necessarie per la crescita di microrganismi alofili, possono interferire con la risposta del marcatore di potenziale redox portando a precipitazione dei reagenti. Anche alti o bassi valori di pH interferiscono con i saggi: nel primo caso si può avere la riduzione abiotica del marcatore di potenziale redox mentre nel secondo si può avere l'inibizione o anche il completo blocco della riduzione del marcatore di potenziale redox.

#### PERCHÉ DETERMINARE IL FENOTIPO IN MODO GLOBALE?

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico, al pari delle tecnologie del DNA microarray e della proteomica che consentono di saggiare il livello di espressione di migliaia di geni o proteine, è l'unica tecnologia ad alta processività che permette di misurare quantitativamente migliaia di fenotipi cellulari tutti in una volta. Se l'analisi molecolare (genomica e proteomica) consente di speculare sulle funzioni di geni e proteine senza alcuna garanzia che i cambiamenti siano davvero significativi per la cellula, la tecnologia del *MicroArray* fenotipico, tecnologia complementare alle precedenti, fornisce informazioni a livello cellulare (fig. 3). Quindi al pari delle altre tecnologie "omiche" la caratterizzazione dei microrganismi tramite il *MicroArray* fenotipico può essere definita fenomica.

La fenomica è stata applicata con successo a differenti campi della ricerca: dallo studio della funzione dei geni a studi di patogenicità e di epidemiologia, dallo studio della diversità biologica e della tassonomia dei batteri allo sviluppo di processi bioindustriali e in "system biology". Recentemente è stata proposta per applicazioni di tipo ecologico.

#### *Applicazioni nello studio della funzione dei geni*

L'approccio classico per studiare la funzione di un gene è quello di inattivarlo per poi verificare l'effetto di tale inattivazione sul fenotipo del microrganismo. Attraverso la comparazione delle cinetiche ottenute mediante la tecnologia del *MicroArray* fenotipico è possibile evidenziare differenze del mutante verso il ceppo selvaggio (fig. 4). Sono stati pubblicati numerosi esempi che documentano il successo dell'uso della tecnologia del *MicroArray* fenotipico per valutare l'effetto di una mutazione sul fenotipo di un microrganismo. Molti dei geni indagati hanno funzioni regolatorie (Pruess et al., 2003; Ka-

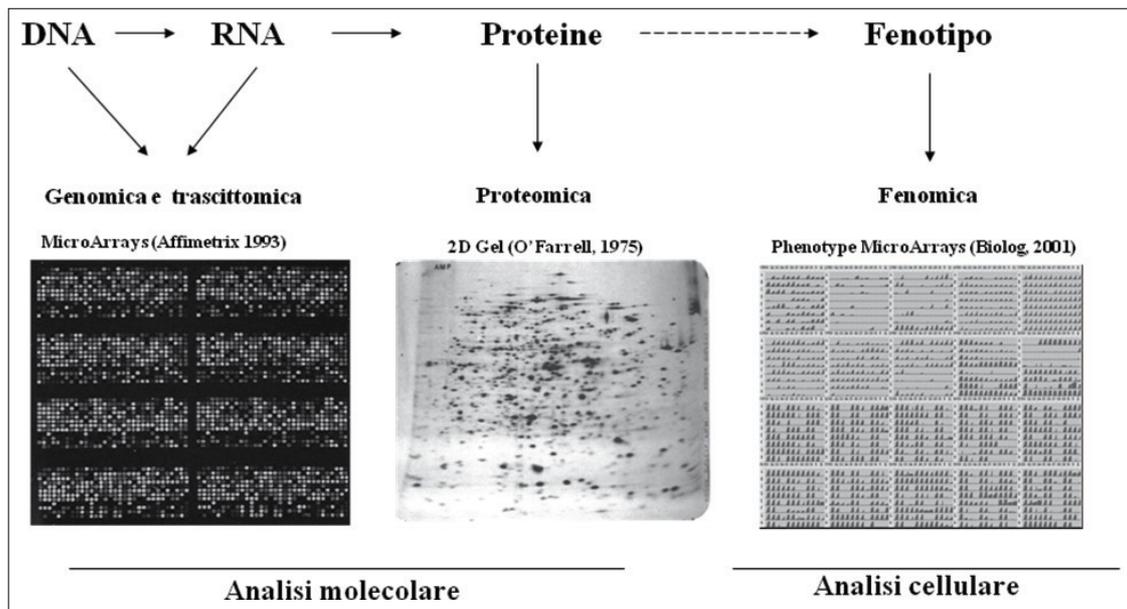


Fig. 3 La tecnologia dei DNA MicroArray e quella della proteomica, coadiuvate dalla crescente quantità di informazioni ottenute dall'attività di sequenziamento dei genomi, hanno permesso di approfondire le conoscenze sui meccanismi genetici coinvolti in molti processi cellulari in procarioti ed eucarioti. Queste tecnologie si basano sull'analisi globale di macromolecole fondamentali per la cellula quali DNA, RNA e proteine. Tuttavia in questo flusso di informazioni manca il passaggio finale che è la manifestazione fenotipica di variazioni evidenziate a livello genomico o proteomico. Vi è quindi la necessità di completare le informazioni ottenute dall'analisi molecolare con informazioni di tipo cellulare come quelle ottenute mediante l'applicazione della tecnologia del MicroArray fenotipico

patral et al., 2004; Shakarji et al., 2006; Jones et al., 2007; Li & Lu, 2007; Mascher et al., 2007; Bailey et al., 2008; Perkins & Nicholson, 2008; Zhang & Rainey, 2008,) o sono legati alla sintesi di enzimi (Koo et al., 2004; Van Dyk et al., 2004; Biswas & Biswas, 2005; Lee et al., 2005, 2007; von Eiff et al., 2006; Chen et al., 2007; Bailey et al., 2008). In alcuni casi tramite la tecnologia del *MicroArray* fenotipico è stato possibile attribuire un ruolo a geni a funzione sconosciuta (Chouikha et al., 2006; Erol et al., 2006; Loh et al., 2006; Viti et al., 2009).

### *Applicazioni nello studio della patogenicità e della epidemiologia*

Lo studio del fenotipo dei microrganismi patogeni riveste un'importanza cruciale nella comprensione della loro epidemiologia perché molto spesso a fronte di una similarità genetica molto elevata corrispondono differenze importanti di patogenicità. Un esempio è quello relativo agli studi condotti

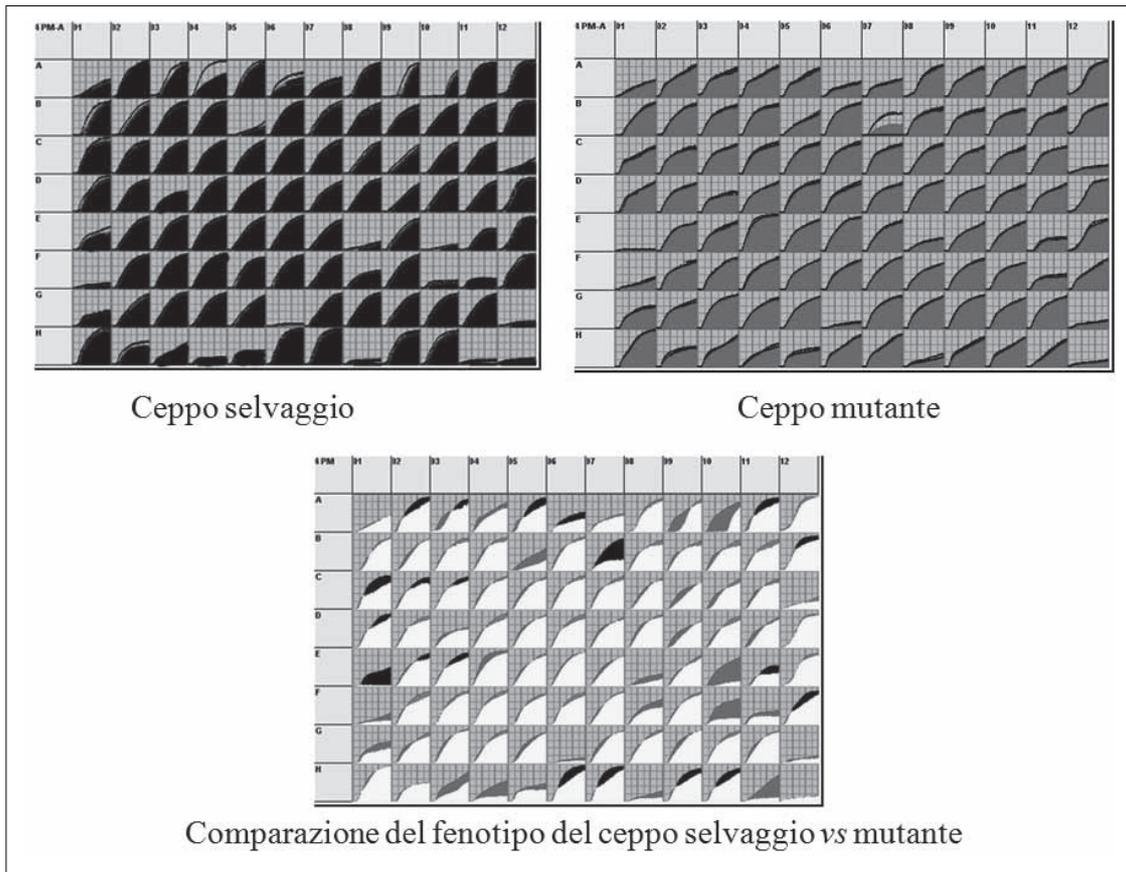


Fig. 4 Profili fenomici di due ceppi (batterici ceppo selvaggio vs mutante). Ogni riquadro corrisponde a un saggio fenotipico. I colori nero e grigio indicano rispettivamente le curve cinetiche del ceppo selvaggio e del mutante. Il colore bianco indica sovrapposizione delle curve cinetiche dei due ceppi.

su due ceppi di *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aventi un'identità genomica del 99,99 % ma peculiari proprietà patogenetiche: la tecnologia del *MicroArray* fenotipico ha mostrato, a fronte di mancanza di differenze rilevabili mediante metodi di tipizzazione genetica, differenze nei profili fenotipici che hanno fornito informazioni essenziali per individuare le basi genetiche di alcuni fattori di patogenicità (Guard-Boulin et al., 2004; Morale et al., 2005 e 2006). Oltre agli studi condotti su ceppi appartenenti al genere *Salmonella* molti altri gruppi di batteri patogeni sono stati analizzati mediante la tecnologia del *MicroArray* fenotipico tra i quali *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. syringae*, *Enterobacter* (adesso *Cronobacter*) *sakazakii*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* sp., *Coxiella burnetii*, e *Legionella pneumophila* (Bochner et al., 2008; Viti et al., 2008; Bochner 2009).

*Applicazioni nello studio della diversità e della tassonomia*

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico ha dato un importante contributo al miglioramento delle condizioni di coltivabilità di microrganismi recalcitranti alla crescita in laboratorio o che crescono lentamente. Tale tecnologia, infatti, permettendo di valutare l'attività di un microrganismo in 1920 condizioni differenti di crescita (ogni test può essere considerato una coltura di arricchimento differente), consente di individuare le condizioni migliori per la crescita di un microrganismo. La ditta Biolog, che commercializza il sistema del *MicroArray* fenotipico, ha sviluppato protocolli per l'analisi di più di 1000 specie batteriche. L'enorme quantità di dati fenotipici resi disponibili dalla messa a punto dei protocolli sono stati utilizzati a fini tassonomici per lo sviluppo del sistema di identificazione batterico universale per batteri Gram-positivi e Gram-negativi chiamato GEN III Micro-Plate. Il sistema consiste di 94 saggi selezionati sulla base delle risposte ottenute per tutti i gruppi batterici valutati sui 1920 saggi delle piastre del *MicroArray* fenotipico che sono risultati i più informativi ai fini tassonomici (Franco-Buff et al., 2008).

*Applicazioni per il miglioramento di processi biotecnologici*

L'approccio del *MicroArray* fenotipico, grazie all'elevata processività che lo contraddistingue, può fornire le informazioni necessarie per evidenziare le potenzialità di un microrganismo da applicare in processi biotecnologici. Per esempio il *MicroArray* fenotipico è stato utilizzato per migliorare la produzione di cellulasi, N-acetylglucosaminidasi, e chitinasi tramite funghi (Druzhi-nina et al., 2006; Seidl et al., 2006; Nagy et al., 2007) e proposto per la selezione di batteri da impiegare in processi di biorisanamento di ambienti contaminati (Viti et al., 2007).

*Applicazione nella system biology*

Lo sviluppo di sistemi ad alta processività per l'analisi dei fenomeni biologici ha permesso l'affermarsi di una nuova branca della biologia: la *system biology*. La *system biology* è una disciplina biologica che studia gli organismi viventi in quanto sistemi, in una ottica olistica anziché riduzionistica, unendo le conoscenze acquisibili tramite l'applicazione di approcci genomici, proteomici, trascrittomici e recentemente fenomici. Negli ultimi anni sono stati pubbli-

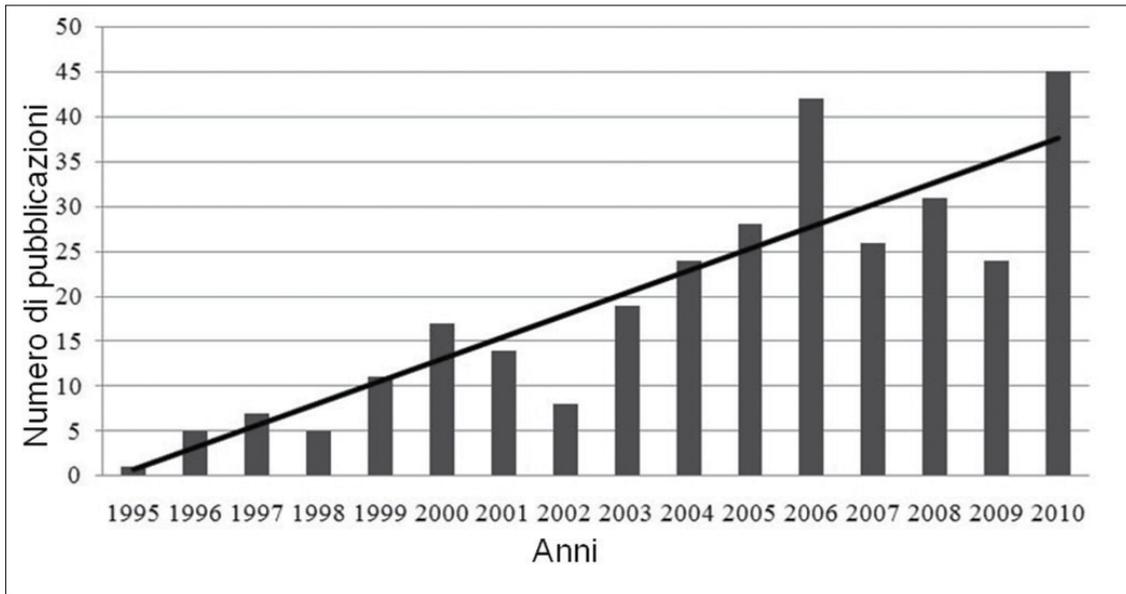


Fig. 5 Numero di pubblicazioni rilevate per gli anni 1995-2010 sulla banca dati Scopus impostando nella stringa di ricerca la parola "CLPP"

cati diversi lavori nei quali i dati ottenuti tramite l'approccio del *MicroArray* fenotipico sono stati utilizzati per valutare e migliorare i modelli elaborati per descrivere i sistemi biologici (Covert et al., 2004; Feist et al., 2007; Jones et al., 2007; Mols et al., 2007; Oh et al., 2007; Oberhardt et al., 2008).

#### *Applicazione in studi di ecologia microbica*

Un ampio ventaglio di tecnologie molecolari e non molecolari è stato utilizzato per lo studio dell'ecologia microbica, e l'approccio Community Level Physiological Profiling (CLPP), sistema che si basa sullo stesso principio del *MicroArray* fenotipico, è divenuto una delle più popolari tecniche non molecolari per la caratterizzazione e la rilevazione di alterazioni nelle comunità batteriche eterotrofe.

Il continuo incremento dell'uso della tecnologia CLPP per studi di tipo ambientale ed ecologico (fig. 5) è dato dalla possibilità di determinare in modo veloce ed efficiente l'utilizzo, da parte della comunità microbica del suolo, di fonti carbonio diverse (Garland, 1996a; Garland, 1996b; Insam et al., 1996; Hitzl et al., 1997; Glimm et al., 1997; Verschueren et al., 1997; Engelen et al., 1998; Konopka et al., 1998; Weber e Legge 2011).

La tecnica si basa sull'inoculazione, con sospensioni cellulari estratte dai suoli, di piastre a 96 pozzetti contenenti fonti di carbonio diverse e sulla successiva va-

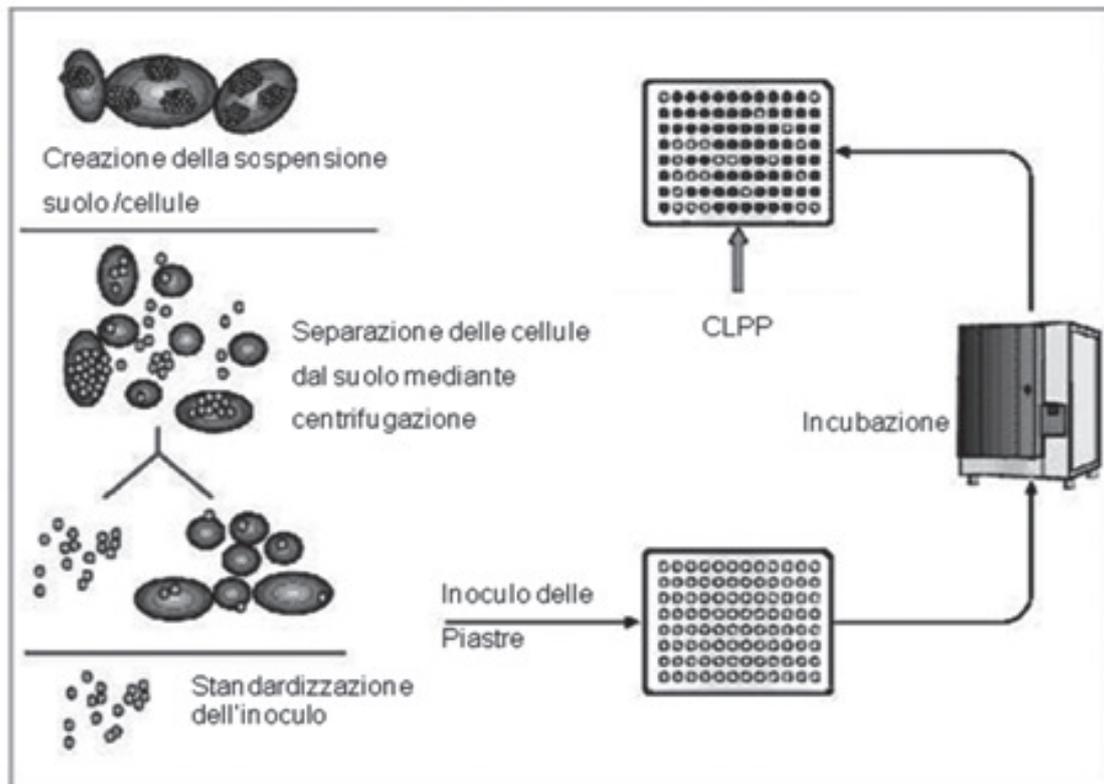


Fig. 6 Rappresentazione schematica delle fasi per l'ottenimento Community Level Physiological Profiling (CLPP)

lutazione, attraverso il controllo dello sviluppo del colore viola dovuto al viraggio dell'indicatore redox (fig. 6), dell'utilizzazione delle fonti di carbonio da parte dei microrganismi inoculati. Sebbene non sia chiaro come l'approccio CLPP possa essere utilizzato per ottenere informazioni sulla biodiversità e sulla funzionalità della microflora del suolo, questo approccio è considerato come uno dei più validi per stabilire se differenti campioni di suolo contengano comunità microbiche con profili metabolici uguali o distinti (Konopka et al., 1998).

Recentemente l'applicazione della tecnologia del *MicroArray* fenotipico è stata ipotizzata anche per lo studio dell'ecologia microbica (Salles et al., 2010). Fino ad oggi, per l'ottenimento dei CLPP sono state impiegate piastre che contengono un limitato numero di saggi fenotipici (da un minimo di 32 a un massimo di 95) basati esclusivamente sull'utilizzazione di fonti di carbonio. Pertanto la possibilità di aumentare in modo significativo i saggi fenotipici applicabili alla caratterizzazione delle comunità microbiche (oltre alle fonti di carbonio, include fonti di azoto, fonti di fosforo, fonti di zolfo, risposta a stress osmotici e di pH, sensibilità a centinaia di antibiotici, antimetaboliti, metalli pesanti etc.), procurerebbe un quadro molto più informativo sulle caratteristiche funzionali della

comunità microbiche rispetto alle tradizionali piastre fino ad oggi impiegate. Per raggiungere tale obiettivo uno sforzo importante dovrà essere fatto per stabilire le condizioni ottimali per l'applicazione della tecnologia del *MicroArray* fenotipico alla caratterizzazione delle comunità microbiche al fine di poter ottenere risultati riproducibili e poter sviluppare software statistici evoluti, così come è stato fatto per le analisi di tipo molecolare, che consentano l'analisi dell'enorme quantità di dati prodotti dalla tecnologia del *MicroArray* fenotipico. Inoltre, la possibilità di correlare i dati ottenuti dall'analisi fenomica con quelli ottenuti tramite approcci genomici e proteomici, consentirà la caratterizzazione di comunità microbiche complesse, come quelle del suolo, in un'ottica polifasica, così come oggi si rende necessario data la consapevolezza che ogni approccio utilizzato per studi di ecologia microbica presenta pregi e limiti.

#### RINGRAZIAMENTI

Gli Autori sono grati all'Ente Cassa di Risparmio di Firenze per il contributo dato per la realizzazione del laboratorio di Genomica, Proteomica e Fenomica Genexpress.

#### RIASSUNTO

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico consente di ottenere un ampio quadro sulle capacità metaboliche di una cellula fornendo informazioni su circa 2000 caratteri fenotipici (permette di saggiare caratteri fenotipici legati al catabolismo e alla biosintesi di composti del carbonio, dell'azoto, del fosforo e dello zolfo; alla presenza di osmoliti; agli effetti degli ioni e di un vasto spettro di composti chimici quali antibiotici, antimetaboliti, inibitori della respirazione e metalli pesanti; all'influenza del pH sulla crescita). I dati conseguibili tramite la tecnologia del *MicroArray* fenotipo, dando informazioni a livello cellulare, integrano e completano quelle ottenute tramite analisi di tipo genomico e/o proteomico. Sebbene questo approccio sia stato utilizzato per studiare microrganismi isolati, oggi c'è una reale possibilità di applicarlo allo studio delle comunità microbiche dei suoli. Gli usi di questa tecnologia per la caratterizzazione fenotipica globale dei microrganismi nei campi della microbiologia di base e applicata sono descritti e discussi.

#### ABSTRACT

Phenotype MicroArray technology gives a comprehensive scan of the physiology of the cell, testing about 2000 phenotypic characters (the main catabolic pathways in cells for carbon, nitrogen, phosphorus and sulphur, as well as biosynthetic pathways; osmotic and

ions effects on the cell; pH growth range and pH regulation; the sensitivity of the cell to a wide range of chemicals, including antibiotics, antimetabolites, toxic metals). The phenomic data obtained by Phenotype MicroArray technology is a very useful form of information that complements the current information obtained from biochemical and molecular analysis. Although this approach has been used to study isolated microorganisms, today there is a real possibility of using the technology of Phenotype MicroArray to the study of soil communities. The uses of this global phenotyping technology in basic and applied microbiology research are described.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BAILEY A.M., PAULSEN I.T. & PIDDOCK L.J. (2008): *RamA confers multidrug resistance in Salmonella enterica via increased expression of acrB, which is inhibited by chlorpromazine*, «Antimicrob Agents Ch», 52, pp. 3604-3611.
- BISWAS S. & BISWAS I. (2005): *Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by Streptococcus mutants*, «Infect Immun», 73, pp. 6923-6934.
- BOCHNER B.R. (2009): *Global phenotypic characterization of bacteria*, «FEMS Microbiol Rev», 33, pp. 1919-205.
- BOCHNER B.R., GIOVANNETTI L. & VITI C. (2008): *Important discoveries from analysing bacterial phenotypes*, «Mol Microbiol», 70, pp. 274-280.
- CHEN S., CUI S., McDERMOTT P.F., ZHAO S., WHITE D.G., PAULSEN I. & MENG J. (2007): *Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials*, «Antimicrob Agents Ch», 51, pp. 535-542.
- CHOUIKHA I., GERMON P., BRÉE A., GILOT P., MOULIN-SCHOULEUR M. & SCHOULER C. (2006): *A selC-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic Escherichia coli strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence*, «J Bacteriol», 188, pp. 977-987.
- COVERT M.W., KNIGHT E.M., REED J.L., HERRGARD M.J. & PALSSON B.O. (2004): *Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks*, «Nature», 429, pp. 92-96.
- DRUZHININA I.S., SCHMOLL M., SEIBOTH B. & KUBICEK C.P. (2006): *Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of Hypocrea jecorina*, «Appl Environ Microb», 72, pp. 2126-2133.
- EROL I., JEONG K.-C., BAUMLER D.J., VYKHODETS B., CHOI S.H. & KASPAR C.W. (2006): *H-NS controls metabolism and stress tolerance in Escherichia coli O157:H7 that influence mouse passage*, «BMC Microbiol», 6, pp. 72-83.
- FEIST A.M., HENRY C.S., REED J.L., KRUMMENACKER M., JOYCE A.R., KARP P.D., BROADBELT L.J., HATZIMANIKATIS V. & PALSSON B.Ø. (2007): *A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information*, «Mol Syst Biol», 3, pp. 121-138.
- FRANCO-BUFF A., GOMEZ V., OLENDER E., GADZINSKI G. & BOCHNER B.R. (2008): *Development of a new test panel for identification of both Gram-negative and Gram-positive bacteria*, ECCMID 2008, Barcelona.
- GARLAND J.L. (1996a): *Analytical approaches to the characterization of samples of microbial*

- communities using patterns of potential C source utilization*, «Soil Biol Biochem», 28, pp. 213-221.
- GARLAND J.L. (1996b): *Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities*, «Soil Biol Biochem», 28, pp. 213-221.
- GLIMM E., HEUER H., ENGELEN B., SMALLA K., BACKHAUS H. (1997): *Statistical comparison of community catabolic profiles*, «J. Microbiol Meth», 30, pp. 71-80.
- GUARD-BOULDIN J., GAST R.K., HUMPHREY T.J., HENZLER D.J., MORALES C. & COLES K. (2004): *Subpopulation characteristics of egg contaminating Salmonella enterica serovar Enteritidis as defined by the lipopolysaccharide O chain*, «Appl Environ Microb», 70, pp. 2756-2763.
- HITZL W., RANGGERS R., SHARMA S., INSAM H. (1997): *Separation power of the 95 substrates of the BIOLOG determined in various soils*, «FEMS Microbiol Ecol», 22, pp. 166-174.
- INSAM H., AMOR K., RENNER M., CREPAZ C. (1996): *Changes in functional abilities of microbial community during composting of manure*, «Microb Ecol», 31, pp. 77-87.
- JONES J., STUDHOLME D.J., KNIGHT C.G. & PRESTON G.M. (2007): *Integrated bioinformatic and phenotypic analysis of RpoN-dependent traits in the plant growth-promoting bacterium Pseudomonas fluorescens SBW25*, «Environ Microbiol», 9, pp. 3046-3064.
- KAPATRAL V., CAMPBELL J.W., MINNICH S.A., THOMSON N.R., MATSUMURA P. & PRUESS B.M. (2004): *Gene array analysis of Yersinia enterocolitica FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate*, «Microbiology», 150, pp. 2289-2300.
- KONOPKA A., OLIVER L., TURCO R.F. (1998): *The use of sole carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology*, «Microb Ecol», 35, pp. 103-115.
- KOO B.M., YOON M.J., LEE C.R., NAM T.W., CHOE Y.J., JAFFE H., PETERKOFKY A. & SEOK Y.J. (2004): *A Novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in Escherichia coli*, «J Biol Chem», 279, pp. 31613-31621.
- LEE C.-R., KOO B.-M., CHO S.-H., KIM Y.-J., YOON M.-J., PETERKOFKY A. & SEOK Y.-J. (2005): *Requirements of the dephospho-form of enzyme IIANtr for derepression of Escherichia coli K-12 ilvBN expression*, «Mol Microbiol», 58, pp. 334-344.
- LEE C.-R., CHO S.-H., YOON M.-J., PETERKOFKY A. & SEOK Y.-J. (2007): *Escherichia coli enzyme IIANtr regulates the K1 transporter TrkA*, «P Natl Acad Sci USA», 104, pp. 4124-4129.
- LI W. & LU C.-D. (2007): *Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in Pseudomonas aeruginosa*, «J Bacteriol», 189, pp. 5413-5420.
- LOH K.D., GYANESHWAR P., PAPADIMITRIOU E.M., FONG R., KIM K.-S., PARALES R., ZHOU Z., INWOOD W. & KUSTU S. (2006): *A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism*, «P Natl Acad Sci USA», 103, pp. 5114-5119.
- MASCHER T., HACHMANN A.-B. & HELMANN J.D. (2007): *Regulatory overlap and functional redundancy among Bacillus subtilis extracytoplasmic function s factors*, «J Bacteriol», 189, pp. 7500-7511.
- MOLS M., DE BEEN M., ZWIETERING M.H., MOEZELAAR R. & ABEE T. (2007): *Metabolic capacity of Bacillus cereus strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics*, «Environ Microbiol», 9, pp. 2933-2944.
- MORALES C.A., PORWOLLIK S., FRYE J.G., KINDE H., MCCLELLAND M. & GUARD-BOULDIN J. (2005): *Correlation of phenotype with the genotype of egg-contaminating Salmonella enterica serovar Enteritidis*, «Appl Environ Microb», 71, pp. 4388-4399.

- MORALES C.A., GAST R. & GUARD-BOULDIN J. (2006): *Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit rrfH of Salmonella enterica*, «FEMS Microbiol Lett», 264, pp. 48-58.
- NAGY V., SEIDL V., SZAKACS G., KOMOŃ-ZELAZOWSKA M., KUBICEK C.P. & DRUZHININA I.S. (2007): *Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of Trichoderma harzianum sensu stricto indicates superior chitinase formation*, «Appl Environ Microb», 73, pp. 7048-7058.
- OBERHARDT M.A., PUCHAŁKA J., FRYER K.E., MARTINS DOS SANTOS V.A. & PAPIN J.A. (2008): *Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa PAO1*, «J Bacteriol», 190, pp. 2790-2803.
- OH Y.K., PALSSON B.O., PARK S.M., SCHILLING C.H. & MAHADEVAN R. (2007): *Genome-scale reconstruction of metabolic network in Bacillus subtilis based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data*, «J Biol Chem», 282, pp. 28791-28799.
- PERKINS A.E. & NICHOLSON W.L. (2008): *Uncovering new metabolic capabilities of Bacillus subtilis using phenotype profiling of rifampin-resistant rpoB mutants*, «J Bacteriol», 190, pp. 807-814.
- PRUESS B.M., CAMPBELL J.W., VAN DYK T.K., ZHU C., KOGAN Y. & MATSUMURA P. (2003): *FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein aer*, «J Bacteriol», 185, pp. 534-543.
- SALLES J.F., MALLON C.A., İNCEOĞLU Ö., VAN ELSA J.D. (2010): *Ecological significance of resource utilization in microbial ecology*, in 2<sup>nd</sup> Florence Conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganisms The Environment, Agriculture, and Human Health, Firenze-Italy, September 13-15, p. 35.
- SEIDL V., DRUZHININA I.S. & KUBICEK C.P. (2006): *A screening system for C-sources enhancing beta-N-acetylglucosaminidase formation in Hypocrea atroviridis (Trichoderma atroviride)*, «Microbiology», 152, pp. 2003-2012.
- SHAKARJI L., MIKAEL L.G., SRIKUMAR R., KOBISCH M., COULTON J.W. & JACQUES M. (2006): *FhuA and HgbA, outer membrane proteins of Actinobacillus pleuropneumoniae: their role as virulence determinants*, «Can J Microbiol», 52, pp. 391-396.
- VAN DYK T.K., TEMPLETON L.J., CANTERA K.A., SHARPE P.L. & SARIASLANI F.S. (2004): *Characterization of the Escherichia coli AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve?*, «J Bacteriol», 186, pp. 7196-7204.
- VERSCHURE L., FIEVEZ L., VAN VOOREN L., VERSTRAETE W. (1997): *The contribution of individual population to the Biolog pattern of model microbial communities*, «FEMS Microbiol», 24, pp. 353-362.
- VITI C., BOCHNER B.R., GIOVANNETTI L. (2008): *Florence conference on phenotype microarray analysis of microorganisms - The environment, agriculture, and human health*, «Ann Microbiol», 58, pp. 347-349.
- VITI C., DECOROSI F., TATTI E. & GIOVANNETTI L. (2007): *Characterization of chromate-resistant and -reducing bacteria by traditional means and by a high-throughput phenomic technique for bioremediation purposes*, «Biotechnol Progr», 23, pp. 553-559.
- VITI C., DECOROSI F., MINI A., TATTI E., & GIOVANNETTI L. (2009): *Involvement of the oscA gene in the sulphur starvation response and in Cr(VI) resistance in Pseudomonas corrugata 28*, «Microbiology», 155, pp. 95-105.
- VON EIFF C., MCNAMARA P., BECKER K., BATES D., LEI X.-H., ZIMAN M., BOCHNER B.R., PETERS G. & PROCTOR R.A. (2006): *Phenotype MicroArray profiling of Staphylo-*

- coccus aureus *menD* and *hemB* mutants with the small-colony-variant phenotype, «J Bacteriol», 188, pp. 687-693.
- WEBER K.P. & LEGGE R.L. (2011): *Dynamics in the bacterial community-level physiological profiles and hydrological characteristics of constructed wetland mesocosms during start-up*, «Ecol Engin» 37, pp. 666-677.
- ZHANG X.-X. & RAINEY P.B. (2008): *Dual Involvement of CbrAB and NtrBC in the regulation of histidine utilization in Pseudomonas fluorescens SBW25*, «Genetics», 178, pp. 185-195.

Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nell'ottobre 2011