

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 ( $1\text{ Gbp} = 10^9$  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 microrganismi 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 microrganismi 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., PARSLEY 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.

