

Giornata di studio su:

La biodiversità nel terreno agrario

Firenze, 19 novembre 2010

MARCO NUTI*, ANDREA SQUARTINI**, PAOLO NANNIPIERI***,
MANUELA GIOVANNETTI*, MAURIZIO PAOLETTI****

La biodiversità nel terreno agrario

I. LA BIODIVERSITÀ MICROBICA NEL TERRENO AGRARIO

La diversità biologica può essere definita come l'insieme delle specie animali, vegetali e microbiche, del loro materiale genetico ed ereditario in relazione agli ecosistemi ai quali appartengono. Essa comprende pertanto la diversità sia degli ecosistemi che quella delle specie e genetica in funzione del tempo, nel senso evolutivo del termine, e dello spazio, inteso questo come distribuzione biogeografica.

La diversità degli ecosistemi definisce, secondo l'accezione comune, il numero e l'abbondanza degli habitat delle comunità biotiche e degli ecosistemi all'interno dei quali gli organismi viventi si trovano ed evolvono, mentre la biodiversità a livello biologico, cioè delle specie e soprattutto genetica, è più complessa da definire. La prima comprende infatti il numero e l'abbondanza di "specie" presenti in una determinata area, là dove il termine "specie" indica l'insieme di individui capaci, attraverso incrocio, di dare una progenie fertile composta da individui morfologicamente simili. Ciò evidentemente non si applica agli organismi che si moltiplicano per via asessuale, cioè ai batteri, ai lieviti e ai microfunghi filamentosi (ad esempio *Deuteromycotina*, comunissimi microfunghi terricoli) capaci di moltiplicazione per via vegetativa, ai virus e alle particelle subvirali (per quanto questi ultimi due gruppi non siano formati da veri e propri "organismi" dotati di replicazione autonoma del proprio

* Dipartimento di Biologia delle Piantе Agrarie, Università di Pisa

** Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Padova

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

**** Dipartimento di Biologia, Università di Padova

materiale genetico). Pertanto per i microrganismi non dotati di riproduzione sessuale si deve applicare l'accezione di "specie" propria di questo gruppo, peraltro assai vasto e tipico dell'ambiente terricolo.

Ne consegue che la biodiversità microbica può essere intesa come numero di individui assegnati ai vari *taxa* e la loro distribuzione tra i diversi raggruppamenti. Questa definizione può essere oggi allargata fino ad abbracciare la diversità di individui assegnati a raggruppamenti anche inferiori al livello di *bio-var*, *serovar* o *patovar*, mediante l'uso di tecniche analitiche avanzate (genomiche, proteomiche, trascrittomiche, metabolomiche) o metodi *high throughput*. Questi approcci consentono lo studio delle cellule sia a livello genomico che proteomico mediante "imaging" informazionale *in vivo* e si applicano molto bene anche allo studio della biodiversità funzionale dei microrganismi (sia cellule che comunità microbiche) nei confronti di ecosistemi complessi quale è il suolo (Nuti et al., 2008). In effetti, un grammo di suolo può essere assimilato a un'immensa biblioteca biochimica che produce le più svariate istruzioni genetiche. Queste istruzioni sono state presenti per quasi 4 miliardi di anni sulla Terra e probabilmente il suolo contiene la maggior parte della biodiversità non ancora descritta su questo pianeta (basti pensare che c'è sufficiente DNA in 1 grammo di suolo per una lunghezza di 1,598 km; Trevors, 2010). Risultati recenti, basati su approcci sia coltura-dipendenti che coltura-indipendenti indicano chiaramente che la diversità microbica del terreno è più elevata di quanto precedentemente immaginato (Tiedje et al., 1999), con comunità batteriche costituite da milioni di differenti sequenze di 16S rRNA. Rimane comunque da chiarire se sia la ridondanza funzionale oppure una molteplicità di nicchie ecologiche e di meccanismi adattativi a determinare la composizione delle comunità batteriche terricole (Zul et al., 2007).

La stima della densità delle comunità microbiche è stata oggetto di numerosi studi (Maier et al., 2000; Metting, 1993; Sylvia et al., 2005; Trevors and Cook, 1992; Van Elsas et al., 2007): i batteri eterotrofi aerobi sono stimati, come cellule coltivabili, a 10^6 per grammo di terreno (peso secco), i batteri totali 10^{10} , gli attinobatteri 10^8 , i microfunghi 10^6 , le microalghe 10^6 e i protozoi 10^5 , mentre le effettive dimensioni genomiche nel suolo sono di 4.7Mb per i batteri e 6.3 per campione (Raes et al., 2007). Il numero di specie microbiche note e di quelle stimate è rispettivamente di 69.000 e 1.500.000 per i funghi, 3.000 e ignota per i batteri e 5.000 e 130.000 per i virus. Pertanto è noto solo il 4-5% delle specie microbiche, a fronte del 67-81% delle specie di alghe, briofite e piante vascolari (Coleman e Whitman, 2005). I metodi per descrivere e valutare la biodiversità dei microrganismi del terreno consistono in metodi di osservazione *in situ*, metodi basati sulla coltivabilità e metodi

basati sull'analisi del DNA (Nuti et al., 2008; Mocali e Benedetti, 2010). Ma ancor più della consistenza numerica o ponderale (ca. tre tonnellate di microrganismi per ettaro nei climi temperati), il ruolo delle comunità microbiche terricole è fondamentale nei cicli biogeochimici, nel determinare la qualità del suolo e nel promuovere la produttività delle piante. E questa biodiversità funzionale è a sua volta dipendente dal “volano” costituito dalla sostanza organica, nel senso che quando quest'ultima è uguale o superiore al 3.5% la scomparsa o l'inattivazione di una popolazione microbica non determinano la scomparsa della funzione, potendo quest'ultima essere mutuata da un'altra popolazione. Al di sotto del valore soglia anzidetto, la mutazione non si verifica e la funzione viene a mancare. La biodiversità microbica fluttua nel terreno in quantità e qualità più in dipendenza di parametri locali che delle distanze geografiche (Ranjard et al., 2010), principalmente in funzione del pH, della conducibilità elettrica, del tipo di suolo, dalla gestione agronomica, presenza ed età delle piante presenti (Coleman and Whitman, 2005). La biodiversità microbica è influenzata altresì dal trasferimento orizzontale di geni, che consente l'acquisizione o la perdita di caratteri tra ceppi della stessa specie, tra specie diverse e tra generi diversi anche appartenenti a gruppi fisio-tassonomici lontani tra loro.

Ancora molto lavoro, quindi: «All species of microorganisms in the multitude of diverse soils on the Earth have not been identified nor their genomes sequenced. We are still at the early stages of knowledge in this area» (Trevors, 2010).

2. LA BIODIVERSITÀ BATTERICA DEL SUOLO: APPROCCI METAGENOMICI

Le specie del microbiota tellurico costituiscono l'incognita di un'equazione di difficile soluzione. Il compito risulta particolarmente arduo specialmente per il vasto contingente dei procarioti, per i quali il concetto stesso di specie non trova univoca definizione. Contrariamente agli organismi oggetto di studi botanici o zoologici, i confini della specie batterica, che effettua riproduzione asessuata senza incrocio, non possono risultare da test di interfecundità e richiedono pertanto definizioni arbitrarie di natura alternativa. Attualmente la convenzione che condiziona l'appartenenza di organismi alla stessa specie impone un'omologia di sequenza dell'rRNA ribosomale maggiore del 97.5% e ibridizzazione tra DNA totali di almeno il 70%.

Con tali premesse è possibile tentare un approccio al censimento in oggetto, la cui notevole complessità appare fin dal primo tentativo di analisi. In un

solo grammo di suolo sono infatti tipicamente presenti circa un miliardo di cellule batteriche vive, appartenenti, secondo le stime di minima, ad alcune migliaia di diverse specie (Torsvik et al., 2002). La maggior parte di esse è a tutt'oggi sconosciuta alla biologia a causa del diffuso fenomeno di non-coltivabilità in vitro che riguarda oltre il 99% delle specie batteriche ambientali e che ne impone lo studio *in situ* e la caratterizzazione con metodi indiretti e indipendenti dall'isolamento in coltura pura. I batteri, la cui biomassa varia nel range da 30 a 500 grammi per metro quadrato, condividono l'ambiente suolo con le altre componenti viventi di funghi (da 60 a 100 g/m²), alghe (da 0.5 a 10 g/m²), protozoi (da 5 a 20 g/m²) nematodi (da 0.1 a 0.3 g/m²), artropodi (da 0.2 a 0.5 g/m²) e anellidi (da 0,5 a 200 g/m²) (Andrè et al., 2001; Lavelle & Sapsin, 2002). La vita nel suolo contribuisce alla genesi e alla strutturazione dello stesso e ne influenza fortemente l'ospitalità nei confronti delle specie vegetali. Sia la produttività che la salute delle piante coltivate e la distribuzione delle fitocenosi naturali sono funzionalmente condizionate dalle interazioni con i microrganismi del terreno, in cui i determinanti più significativi risultano essere le presenze di microrganismi mutualisti o patogeni dei vegetali (Klironomos, 2002). Oltre al ruolo chiave nella degradazione e nel riciclo della sostanza organica del pianeta, i microrganismi sono parte attiva sia nella produttività primaria, che nella decomposizione della sostanza organica. La loro ubiquità, versatilità metabolica e le strategie di sopravvivenza li rendono una corporazione di vasto successo nel governare sviluppo e stabilità del nostro ambiente fisico. Basti ricordare che la biomassa microbica totale del pianeta eguaglia nella stima quella delle piante, per un valore intorno a 10¹² tonnellate.

Diversi studi hanno contribuito a far luce sul problema della stima del numero di specie. Oltre ai citati approcci basati sulle cinetiche di riassociazione (Torsvik et al., 2002), sono stati introdotti indici per la stima del numero totale di specie della comunità basati sulla rarità dei filotipi e sulla frequenza dei "doppioni" nel campionamento (Curtis et al., 2002). Una importante introspezione ecologica è stata inoltre fornita dalla combinazione di più metodiche molecolari che hanno permesso di definire la diversa equipartizione catabolico-funzionale del terreno agrario rispetto ai suoli naturali (Lynch et al., 2004). Studi comparativi di diversi terreni hanno inoltre dimostrato come il suolo coltivato mantenga, in termini di comunità batteriche, una "memoria lunga" e che, anche in caso di abbandono delle pratiche di coltivazione, la transizione verso una struttura della comunità di tipo non agrario richieda tempi di oltre 25 anni (Buckley e Schmidt, 2001).

Un altro degli aspetti presi in considerazione dall'ecologia microbica è stato rivolto a verificare in quale misura esistano barriere biogeografiche che

possano opporsi alla presunta ubiquitarietà e cosmopolitismo delle specie batteriche. I risultati mostrano un sorprendente livello di specificità locale; in un confronto tra quattro suoli tra nord e sud-America, solo il 4.1% delle specie sono state riscontrate in tutti e quattro i casi (Fulthorpe et al., 2008).

Ma nonostante gli sforzi sinora compiuti dalla comunità scientifica, il suolo, anche quello più prossimo, resta per molti aspetti un ambiente ampiamente inesplorato. L'altissima diversità biologica e la conseguente complessità fisiometabolica, rendono questo substrato un luogo la cui conoscenza richiede tecniche nuove a elevato potere di risoluzione. L'approccio metagenomico, in grado di leggere, ordinare e confrontare altissimi numeri di sequenze estraibili dal sistema, si propone come una strada che oggi, grazie al recente sviluppo delle tecnologie necessarie, è divenuta percorribile. L'indagine metagenomica consiste nella lettura della globalità del DNA estratto da un determinato habitat, e appartenente alle molteplici specie ivi presenti. Lo studio del metagenoma non è stato ancora compiutamente applicato ad ambienti complessi come il suolo, la cui ricchezza di diversità ben lo configura come oggetto di studio ideale per questa nuova metodologia. Infatti anche soltanto pochi anni addietro nelle prime ricerche rivolte alla metagenomica del suolo (Soloviev et al., 2004; Tringe et al., 2005) lo sforzo di sequenziamento totale non superava i 100M, corrispondenti a 1/10 della resa di una singola corsa dei nuovi protocolli dei cosiddetti sequenziatori "Next Generation".

La sfida della complessità trova nel suolo un'ideale palestra per misurare i limiti delle nuove tecnologie. Al tempo stesso grande importanza riveste la conoscenza che potrà essere estratta dal suolo, che costituisce l'interfaccia tra il substrato del pianeta, le comunità dei viventi e l'atmosfera. Tale posizione vede il terreno quale filtro principale della produttività agraria nonché mediatore dei processi globali di trasformazione ed emissione, le cui ricadute climatico-ambientali sono di primario interesse. Allo stesso tempo il suolo costituisce ancora una "scatola nera" dagli aspetti in larga misura oscuri. I microrganismi sono i responsabili della trasformazione del 97% della materia ed energia che attraversano il sistema. Ma nonostante tale abbondanza, quel miliardo di cellule batteriche vive presenti per singolo grammo di suolo e appartenenti a migliaia di specie diverse, adottano fisiologie e strategie ecologiche che, come già ricordato, rendono vano, in oltre il 99% dei casi, il tentativo di coltivarle su substrati in vitro e isolarne ceppi in coltura pura. Sfuggendo quindi ai metodi descrittivi previsti dalla microbiologia classica, i microrganismi del pianeta terra sono rimasti per la stragrande maggioranza praticamente sconosciuti all'uomo fino ai recenti sviluppi delle tecniche biomolecolari che permettono di confrontarne l'identità con metodi di analisi della sequenza

del DNA indipendenti dalla coltivazione delle cellule (Tyson et al., 2004). E ancora oggi solo la punta di un iceberg di microbiodiversità sembra essere apparsa, come dimostrato dal costante aumento delle nuove sequenze nelle banche dati. L'approccio metagenomico ad alta resa potrà in questo senso consentire di estrarre dall'habitat suolo la massima quantità di informazione nascosta. Il metodo potrà infatti rivelare non solo i geni indicativi della identità delle specie presenti, quali i determinanti dell'RNA ribosomale, ma anche una vasta serie di geni metabolici rivelatori del quadro enzimatico dominante. Grazie ai sequenziatori ad alta resa la caratterizzazione può inoltre essere oggi completata tramite l'analisi dell'espressione genica effettuata mediante sequenziamento del cDNA, che consente di individuare le vie metaboliche maggiormente espresse e definire il ruolo dei singoli microorganismi (Leininger et al., 2006).

I risultati di studi metagenomici prospettano notevoli ricadute per l'avanzamento delle conoscenze in campo agrario. In futuro risulterà infatti di particolare interesse correlare i risultati di tali analisi con lo stato dei suoli in esame per quanto riguarda ogni altro parametro monitorabile con tecniche complementari in termini chimico-fisici, biologici, vegeto-produttivi e sanitario-fitopatologici. Ed è proprio intorno alla necessità di un approccio integrato multidisciplinare che ruotano i progetti di ricerca congiunti il cui ampio respiro unisce le competenze di discipline quali biochimica e fisica del suolo, batteriologia ambientale, micologia, fitopatologia, zoologia degli invertebrati, botanica ed ecologia. I dati risultanti da approcci metagenomici integrati necessiteranno inoltre successivamente di una attenta interpretazione in chiave biologico-ecoambientale dei risultati del sequenziamento, i cui dati potranno essere messi in diretta relazione con gli aspetti fenotipici del suolo e dell'habitat in oggetto permettendo la reciproca validazione. Tale integrazione tra lettura del metagenoma e osservazione diretta delle componenti biotiche e abiotiche del sistema, rappresenta un ideale traguardo di integrazione multisettoriale delle conoscenze per una più profonda comprensione del nostro ambiente e del suolo che ne governa la produttività.

3. LA DIVERSITÀ BIOCHIMICA DEL SUOLO E APPROCCI PROTEOMICI

La enzimologia del suolo si è sviluppata nella seconda metà del novecento. L'ampiezza della relativa bibliografia è testimoniata dal fatto che tre libri (Burns, 1978; Kiss et al., 1998; Burns e Dick, 2002) e numerose rassegne sono state dedicate all'argomento. Il successo delle determinazioni di attivi-

tà enzimatica è dovuto al fatto che tali determinazioni sono rapide, di facile esecuzione, sensibili alle variazioni di condizioni ambientali e di pratiche agronomiche e differenziano il terreno rizosferico da quello non rizosferico. Inoltre i saggi enzimatici sono stati messi a punto con terreni di diverse proprietà.

In genere esiste una relazione tra contenuto di biomassa microbica del suolo e attività enzimatica di tipo costitutivo. Le attività enzimatiche aumentano con il contenuto di sostanza organica del suolo e quindi con la fertilizzazione organica.

Diversi saggi sono disponibili per determinare l'attività enzimatica del suolo (Tabatabai, 1994). Tra le attività enzimatiche maggiormente determinate abbiamo le attività ureasica, protesica, β -glucosidasi, cellulasi, xilanasica, invertasi, arilsulfatasi, deidrogenasi, catalasi, fosfatasi acida e alcalina. In genere queste attività enzimatiche sono determinate per avere delle indicazioni sui cicli dei principali nutrienti della pianta. La interpretazione è, tuttavia, problematica. Tipico è il caso degli effetti di inquinanti organici come i fitofarmaci che possono avere effetti diretti e indiretti. Ad esempio, un fitofarmaco può inibire un determinato enzima ma tale effetto può essere mascherato dalla crescita di microorganismi che usano il fitofarmaco come fonte di nutrienti oppure dalla crescita di microorganismi resistenti che usano i residui cellulari di quelli uccisi dal fitofarmaco (Nannipieri, 1994; Nannipieri et al., 2002). Inoltre i saggi enzimatici determinano attività enzimatiche potenziali poiché sono effettuati in condizioni ottimali di pH, temperatura e substrato e con sospensioni liquide di terreno mentre *in situ* raramente le condizioni per l'attività enzimatica sono ottimali e il terreno è in genere non sommerso dall'acqua (Nannipieri, 1994). Un altro problema che rende difficile la interpretazione delle misure di attività enzimatica è il fatto che sia l'attività degli enzimi extracellulari stabilizzati dalle particelle del suolo che quella dei rispettivi enzimi intracellulari contribuiscono al valore determinato. Poiché l'attività degli enzimi intracellulari ma non quella degli enzimi extracellulari stabilizzati dalla particelle è in relazione alle variazioni di attività microbica, le determinazioni di attività enzimatica del suolo possono non dipendere dalle variazioni di attività microbica (Nannipieri et al., 2002). Si è cercato di separare il contributo dei due tipi di attività enzimatica con diversi metodi ma nessuno di quelli proposti è risultato efficace (Nannipieri et al., 2002).

Gli enzimi extracellulari possono essere adsorbiti dai minerali o essere inglobati dalle molecole umiche diventando resistenti all'attacco proteolitico e alla denaturazione termica. Si è ipotizzato che le idrolasi siano circondate da

una rete di molecole umiche con pori abbastanza larghi da permettere il passaggio dei substrati e dei prodotti della reazione ma non quello delle proteasi (Burns et al., 1972). Questa ipotesi sembra confermata dal fatto che complessi umo-ureasici e umo-fosfatasici estratti dal suolo e con peso molecolare elevato erano più resistenti alla degradazione proteolitica e alla denaturazione termica di quelli con peso molecolare minore (Nannipieri et al., 1978; 1988; 1996). Si è anche ipotizzato che gli enzimi extracellulari stabilizzati giocano un ruolo importante nella ecologia microbica (Burns, 1982). La presenza di questi enzimi porta alla formazione di prodotti che possono funzionare come composti che spingono le cellule microbiche verso il substrato e/o attivano i microorganismi stessi. La cellula microbica non può rilasciare in continuo enzimi che catalizzano l'idrolisi di substrati organici non solo perché il substrato può non essere presente, ma anche se lo fosse, l'enzima rilasciato può essere adsorbito dalle particelle del suolo o degradato da microorganismi opportunisti.

L'uso della biologia molecolare ha permesso di aumentare le nostre conoscenze sulla diversità microbica e sulla espressione genica del suolo. Purtroppo, raramente gli studi classici di biochimica del suolo coinvolgono anche l'uso di tecniche molecolari che nel caso delle attività enzimatiche può fornire indicazioni delle popolazioni microbiche che sintetizzano gli enzimi oggetto della determinazione. Il primo studio che ha unito i due approcci è stato quello di Metcalfe et al. (2002). Vennero usati primers specifici per geni codificanti un gruppo di chitinasi. Si osservò che l'aggiunta di reflui organici al suolo aumentava l'attività chitinasica ma diminuiva la diversità delle chitinasi.

Lo studio proteomico del suolo è necessario per completare il monitoraggio della espressione genica. Inoltre la determinazione delle proteine sintetizzate dalle cellule microbiche attive del suolo può servire a isolare marker proteici di stress microbico e di funzionalità microbica e può portare a scoprire nuove proteine (Nannipieri, 2006). Infatti la maggior parte dei microorganismi che vivono nel suolo sono sconosciuti essendo la percentuale coltivabile in laboratorio, e quindi analizzabile, inferiore al 10% del totale. Lo studio delle proteine extracellulari stabilizzate dalle particelle del suolo può fornire indicazioni sui meccanismi che hanno portato a tale stabilizzazione e può fornire indicazioni di passati eventi microbici (Nannipieri, 2006). Nel nostro laboratorio sono in corso studi di proteomica del suolo di parcelle contaminate da metalli pesanti e soggetti a vari tecniche di risanamento. Le proteine purificate sono state separate mediante elettroforesi 2D; quindi le bande proteiche sono state rimosse dal gel e le relative proteine solubilizzate e sottoposte alla digestione triptica. Poi

la sequenza aminoacidica di questi peptidi è stata determinata mediante spettrometria di massa. Successivamente avvalendosi di database si è proceduto al riconoscimento delle proteine. Nelle acque di dilavamento di parcelle soggette al biorisanamento si osservano proteine che non sono presenti nelle acque di dilavamento provenienti dai suoli inquinati.

Le ricerche future oltre che determinare l'espressione di geni codificanti gli enzimi che contribuiscono all'attività enzimatica in oggetto dovrebbero mettere a punto dei metodi idonei a visualizzare la presenza di enzimi extracellulari stabilizzati e quella di enzimi intracellulari attivi nella matrice del suolo.

4. LA BIODIVERSITÀ DEI FUNGHI MICORRIZICI

Le simbiosi micorriziche sono associazioni simbiotiche mutualistiche che si instaurano tra la maggior parte delle piante terrestri (90%) e un gran numero di funghi del suolo (circa 6.000 specie). I funghi micorrizici sono componenti fondamentali della fertilità biologica del suolo, capaci di regolare la produttività primaria aumentando l'accesso delle piante ai nutrienti limitanti, come fosforo e azoto. Tra i diversi tipi di funghi micorrizici, i più importanti sono quelli arbuscolari (*Glomeromycota*) che entrano in simbiosi con circa l'80% delle piante, e con la maggior parte delle piante agrarie, dai cereali ai legumi, dagli alberi da frutto agli ortaggi, fino a colture industriali come cotone, tabacco, caffè, cacao, albero della gomma (Smith e Read, 1997). La biodiversità dei funghi micorrizici arbuscolari (MA) è importante ai fini del funzionamento e mantenimento della biodiversità degli ecosistemi vegetali, come dimostrato da un elegante esperimento in microcosmo, in cui all'aumento del numero di specie di funghi MA corrispondeva un aumento della biomassa delle specie vegetali presenti (van der Heijden et al., 1998).

Molti studi hanno dimostrato che le lavorazioni, l'erosione, l'uso di fertilizzanti chimici, pesticidi ed erbicidi producono effetti negativi sulla composizione delle specie di funghi MA nel suolo: solo le specie più tolleranti sono capaci di sopravvivere e moltiplicarsi, e possono continuare a esercitare i loro effetti positivi sulle piante ospiti (Helgason et al., 1998). Per questo motivo sono sorte, in vari laboratori in tutto il mondo, collezioni di funghi MA *ex-situ*, in condizioni colturali ben definite e molto diverse da quelle dei luoghi di origine. Poiché tali condizioni colturali possono determinare la sopravvivenza solo dei ceppi più adatti alle condizioni edafiche e ambientali che si realizzano nelle collezioni, è stato proposto di conservare i funghi MA anche *in situ*, in luoghi protetti come i parchi e le riserve naturali (Turrini et al., 2008).

L'esatta identificazione dei funghi MA, fondamentale per la comprensione della loro biodiversità, si è basata per molti anni sulla morfologia delle spore prodotte dal micelio extraradicale (forma, colore e dimensioni delle spore, struttura della loro parete, attacco ifale) e in base a essa sono state formalmente descritte circa 200 specie diverse, la cui consistenza tassonomica e filogenetica è stata confermata anche da studi molecolari (Schüßler et al., 2001).

Negli ultimi 20 anni, attraverso metodi molecolari basati sulla PCR è stato possibile identificare i funghi MA direttamente dal DNA estratto dalle radici delle piante micorrizate, permettendo di riconoscere i simbionti realmente presenti e attivi *in planta* e aprendo la strada agli studi finalizzati alla selezione degli endofiti più infettivi ed efficienti (Giovannetti e Avio, 2002).

Tuttavia, l'identificazione tassonomica a livello di specie non è sufficiente per descrivere la grande diversità biologica esistente nei funghi MA. Entro ciascuna specie i diversi ceppi fungini mostrano reazioni diverse rispetto a parametri ambientali come pH, temperatura, presenza di fertilizzanti chimici, insetticidi, erbicidi, fungicidi. Poiché tali parametri possono interferire con il ciclo vitale dei funghi MA, influenzando la germinazione delle spore, la crescita del micelio, la capacità di colonizzazione delle radici, l'efficienza e la produzione di spore da parte del micelio extraradicale, la loro conoscenza è importante ai fini della utilizzazione dei funghi MA in agricoltura.

Nei nostri laboratori sono iniziate da tempo ricerche sulla biodiversità funzionale dei funghi MA: in un recente lavoro abbiamo dimostrato che esiste una corrispondenza tra le caratteristiche della struttura della rete miceliare extraradicale di alcuni funghi MA e la crescita delle piante che con essi stabiliscono una simbiosi micorrizica: per esempio, la specie fungina con la più bassa densità di interconnessioni nel micelio risultava quella meno efficiente dal punto di vista dello sviluppo di piante di medica e dell'assorbimento di macronutrienti come fosforo e azoto (Avio et al., 2006).

La consapevolezza della presenza di reti fungine che si estendono dalla radice micorrizata al suolo circostante ha stimolato i ricercatori a porsi domande sulla possibilità di fusioni tra reti originate da piante diverse e da individui fungini diversi. Solo recentemente è stato possibile visualizzare e studiare le reti micorriziche e dimostrare che esse sono realmente in grado di stabilire connessioni tra gli apparati radicali di piante appartenenti a specie, generi e famiglie diversi, contribuendo così a costituire quella che la rivista scientifica «Nature» ha definito *wood wide web*, una rete fungina di estensione indefinitamente grande, che mette in comunicazione un gran numero di piante viventi nella stessa comunità vegetale (Giovannetti et al., 2004; 2008).



Fig. 1 I gruppi di meso-macrofauna del suolo più facilmente raccolti in vari paesi del mondo con semplici scavi e smistamento manuale dei campioni

5. I PICCOLI ANIMALI DEL SUOLO, UN MONDO SEMISCONOSCIUTO MA FONDAMENTALE

È curioso che a 200 anni dalla nascita di Charles Darwin il cui l'ultimo libro del 1881 è dedicato ai lombrichi (Darwin, 1881) e a 356 anni dalla pubblicazione di Vincenzo Tanara (Tanara, 1644), agronomo bolognese che indica come misura della fertilità del suolo «gli animaletti che vivono nella sua pinguetudine» che attirano «corvi storni e piche» quando s'ara, ancor oggi in molti trattati sui suoli non compaia la parola lombrichi o anche invertebrati del suolo.

Il suolo non è una struttura minerale solamente ma un interfaccia tra organismi viventi e materiali minerali e gli invertebrati comprendono una rilevante biomassa (fig. 1).

È stato osservato anzi che alcune componenti quali i grandi lombrichi scavatori o gli anecici sono gli «ingegneri del suolo» quindi responsabili dei lineamenti più determinanti del suolo quali: pH, colore, sostanza organica, nutrienti, biodiversità, in sintesi, fertilità (Paoletti, 1999a). La specie studiata da Darwin nel suo giardino a Down era tra queste, *Lumbricus terrestris* (Paoletti, 1999b).



Figg. 2, 3 Nelle foreste di nubi tropicali le epifite contengono vere e proprie sacche di suolo, in Amazonia soprattutto le bromelie contengono suoli e ricca biodiversità (Paoletti et al., 1991)

Ma sappiamo che cos'è un suolo? Nella foresta tropicale umida (ad esempio le foreste di nubi in Amazzonia o in Guaiana o sulle Ande) e in qualche foresta temperata (ad esempio l'*Olympic Penninsula*, nello stato di Washington) suolo e organismi del suolo sono dislocati in sacche sospese tra i rami e le epifite, nel cavo degli alberi e tra le foglie delle bromelie. E talora queste sacche pensili sono più ricche di nutrienti e biodiversità del suolo calpestabile (Paoletti et al., 1991) (fig. 2 e 3).

Quindi suolo non è solo quello su cui abitualmente camminiamo.

Ma quale è la biodiversità complessiva del suolo? È in gran parte da descrivere! Gran parte degli acari, protozoi, nematodi e microinsetti ma anche di grossi invertebrati quali i lombrichi di vaste zone tropicali, e non solo, è in gran parte da descrivere. In un metro quadrato di foresta di faggio in Germania circa mille sono le specie di invertebrati nel suolo (Paoletti, 1999b)! Quante specie nella Pianura Padana, in campi di mais e in relitti di bosco pianiziale? Probabilmente da 1000 a 3000 specie e di queste sappiamo qualcosa solo di un 10-20% (Paoletti, 1988)!

Ma quali servizi pratici può offrire la biodiversità degli organismi invertebrati del suolo? Ecco di seguito alcuni esempi per tutti.

Nel 1979 vaste colture di mais in monosuccessione nelle bonifiche della bassa pianura veneta sono state improvvisamente attaccate da un parassita che precedentemente era noto soprattutto in colture in serra, il ragnetto rosso (*Tetranychus urticae*), che poi si è documentato essere potenzialmente controllato da una miriade di predatori. In questa occasione tre specie nuove di una famiglia di acari predatori (*Laelapidae*), mai segnalata come possibile agente di controllo del ragnetto rosso, furono scoperte assieme ad altri acari *Phytoseiidae*. Un piccolo coleottero stafilinide mai segnalato in Italia (*Oligota flavicornis*) fu anche indicato come deterrente potenziale "locale" di tale pernicioso acaro (Ragusa e Paoletti, 1985; Paoletti e Lorenzoni, 1989). Lavorazioni del suolo, tenore di sostanza organica, presenza di siepi, boschetti e incolti influenzano la presenza di questi utili predatori polifagi che passano qualche tratto della loro vita nel suolo (Paoletti e Gomiero, 2007).

La zona orientale del Collio e l'area classica del prosecco hanno ambedue una specie endemica di lombrichi profondi scavatori e di grandi dimensioni scoperti alla fine del '800 da Achille Tellini e ritrovati solamente in decenni recenti dallo scrivente. Sono rispettivamente *Octodrilus mima* ed *Eophila tellinii*, gli artefici principali dei suoli di queste aree in cui un uso intensivo del territorio e dei vigneti tende a farli scomparire. Pratiche intelligenti di agricoltura biologica possono mantenere gli effetti positivi di queste specie chiave (fig. 4). Gli Isopodi terrestri, carabidi, lombrichi, pseudoscorpioni e altri or-

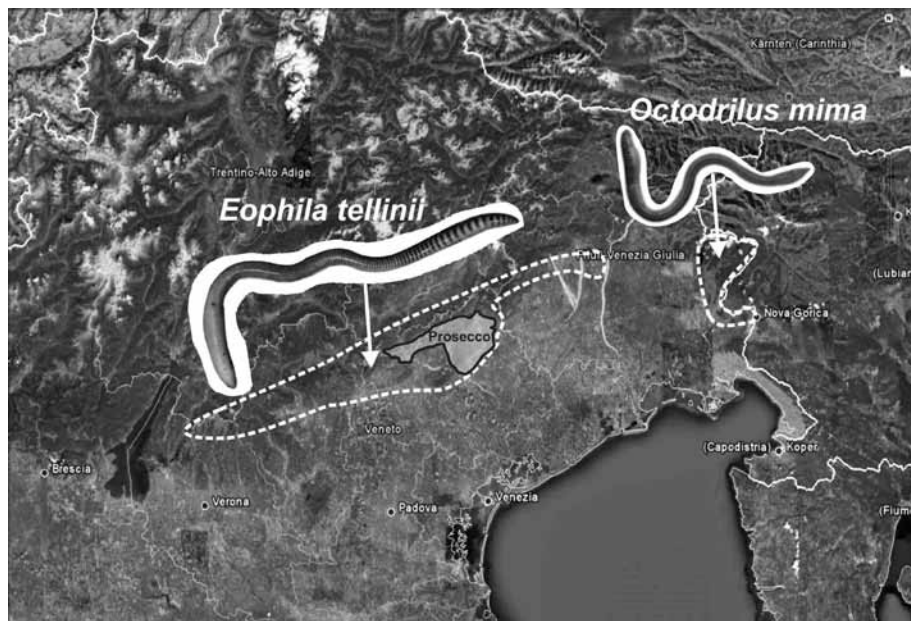


Fig. 4 Due grandi lombrichi, profondi scavatori, sono endemici di aree che includono produzioni specializzate di vini. Nel Collio vive «*Octodrilus mima*» che misura da 20 a 40 cm di lunghezza; nell'area classica del prosecco troviamo «*Eophila tellinii*», che misura fino a 80 cm di lunghezza. Queste due specie hanno caratterizzato i suoli di queste zone e vanno in ogni maniera favorite nel loro lavoro con appropriate tecniche culturali

ganismi invertebrati del suolo possono essere impiegati come utili bioindicatori di biodiversità e di sostenibilità degli ambienti agrari (Paoletti, 1999a). Parecchi invertebrati del suolo come lombrichi, termiti e formiche vengono estesamente utilizzati come cibo da varie popolazioni tropicali incluse quelle amazzoniche e rappresentano quindi un modello di impiego sostenibile della foresta e dei suoli (Paoletti, 2005; Paoletti et al., 2000). E la chitina che un tempo si riteneva indigeribile da parte dell' uomo si è dimostrata essere digeribile da parte di un enzima specializzato (Musumeci e Paoletti, 2008).

RIASSUNTO

La diversità biologica può essere definita come l'insieme delle specie animali, vegetali e microbiche, del loro materiale genetico ed ereditario in relazione agli ecosistemi ai quali appartengono. Essa comprende pertanto la diversità sia degli ecosistemi che quella delle

specie e genetica in funzione del tempo, nel senso evolutivo del termine, e dello spazio, inteso questo come distribuzione bio-geografica. Vi è infine la biodiversità funzionale, elemento essenziale per comprendere e governare la produzione agraria a partire dalla matrice nella quale essa ha sede, il terreno. In questo lavoro di rassegna vengono presi in considerazione i vari aspetti della biodiversità nel terreno agrario: la biodiversità microbica, quella batterica valutata attraverso approcci metagenomici, quella fungina con particolare riguardo alle simbiosi micorriziche, quella enzimatica e biochimica, quella infine della micro- e meso-fauna che tanta importanza riveste nel turnover della sostanza organica nel terreno agrario.

ABSTRACT

Biological diversity can be defined as the number and type of animal, plant, and microbial species along with their genetic material, in relation to the ecosystems which they belong to. Hence the term biodiversity embraces both ecosystem diversity and species and genetic diversity as a function of time, namely evolution-wise, and of space, namely bio-geographic distribution. Least, but not last, there is the functional biodiversity, essential concept enabling the understanding and management of agricultural productivity from its very start, i.e. the soil matrix in which it takes place. In this work the biodiversity is critically reviewed in its various components: microbial, bacterial as assessed through metagenomic approaches, fungal biodiversity with particular emphasis for mycorrhizae, biochemical and enzymatic biodiversity, and the one of micro- and meso-fauna, very relevant for the organic matter turnover in soil.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRÉ H., DUCARME X., ANDERSON J.M., BEHAN-PELLETIER V., CROSSLEY D.A. JR., KOEHLER H.H., PAOLETTI M.G., WALTER D.E., LEBRUN P. (2001): *Skilled eyes are needed to study soil's richness*, «Nature», 409, pp. 761.
- AVIO L., PELLEGRINO E., BONARI E., GIOVANNETTI M. (2006): *Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks*, «New Phytologist», 172, pp. 347-357.
- BURNS R.G. (1978): *Soil Enzymes*, Academic Press, London.
- BURNS R.G. (1982): *Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology*, «Soil Biology and Biochemistry», 14, pp. 423-427.
- BURNS R.G., DICK R.P. (2002): *Enzymes in the Environment*, Activity, Ecology and Applications. Marcel Dekker, New York.
- BURNS R.G., PUKITE A.H., McLAREN A.D. (1972): *Concerning the location and persistence of soil urease*, «Soil Science Society of America Proceedings», 36, pp. 308-311.
- BUCKLEY D.H., SCHMIDT T.M. (2001): *The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation*, «Microbial Ecology», 42, pp. 11-21.
- CURTIS T.P., SLOAN W.T., SCANNELL J.W. (2002): *Estimating prokaryotic diversity and its limits*, «Proc. Nat Acad. Sci.», 99, pp. 10494-10499.

- DARWIN C. (1881): *The Formation of vegetable mould through the Action of Worms with Observations of their Habits*, Murray, London p. 326.
- FULTHORPE R.R., ROESCH L.F.W., RIVA A., TRIPLETT E.W. (2008): *Distantly sampled soils carry few species in common*, «The ISME Journal», 2, pp. 901-910.
- GIOVANNETTI M. (2008): *Structure, extent and functional significance of belowground arbuscular mycorrhizal networks*, in *Mycorrhiza*, a cura di Varma A., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 59-72.
- GIOVANNETTI M., AVIO L. (2002): *Biotechnology of arbuscular mycorrhizas*, in *Applied Mycology and Biotechnology*, vol. 2, *Agriculture and Food Production*, a cura di Khachatourians G. G. e Arora D. K., pp. 275-310.
- GIOVANNETTI M., SBRANA C., AVIO L., STRANI P. (2004): *Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks*, «New Phytologist», 164, pp. 175-181.
- HELGASON T., DANIELL T.J., HUSBAND R., FITTER A. H., YOUNG J. P. W. (1998): *Ploughing up the wood-wide web?*, «Nature», 374, p. 431.
- HILL G.T., MITKOWSKI N.A., ALDRICH-WOLFE A.L., EMELE L.R., JURKONIE D.D., FICKE A., MALDONADO-RAMIREZ S., LYNCH S.T., NELSON E.B. (2000): *Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities*, «Applied Soil Ecology», 15, pp. 25-36.
- KISS S., PASCA D., DRAGAN-BULARDA M. (1998): *Enzymology of Disturbed Soils*, «Development in Soil Science», 26, Elsevier, Amsterdam.
- KLIRONOMOS J.N. (2002): *Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities*, «Nature», 417, pp. 67-70.
- LAVELLE P., SAPIN A.V. (2002): *'Soil ecology'*, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.
- LEININGER S., URICH T., SCHLOTER M., SCHWARK L., QI J., NICOL G.W., PROSSER J.I., SCHUSTER S.C., SCHLEPER C. (2006): *Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils*, «Nature», 442, pp. 806-809.
- LYNCH J.M., BENEDETTI A., INSAM H., NUTI M.P., SMALLA K., TORSVIK V., NANNIPIERI P. (2004): *Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants*, «Biology and Fertility of Soils», 40, pp. 363-385.
- MAIER R.M., PEPPER I.L., GERBA C.P. (2000): *Environmental microbiology*, Academic Press, Usa.
- METCALFE A.C., KRSEK M., GOODAY G.W., PROSSEER J.L., WELLINGTON E.M. (2002): *Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture*, «Applied and Environmental Microbiology», 68, pp. 5042-5050.
- METTING F.B. (1993): *Structure and physiological ecology of soil microbial communities*, in Metting F.B. (Ed.), *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*, Marcel Dekker, Usa, pp. 3-25.
- MOCALI S., BENEDETTI A. (2010): *Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology*, «Research in Microbiology», 161, pp. 497-505.
- MUSUMECI S. AND PAOLETTI M.G. (2008): *Chitin-Chitinase Binomium: emerging Issues*, Nova Science Pub., N.Y. Usa, p. 457.
- NANNIPIERI P. (1994): *The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution*, in C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta, P.R. Grace (Eds), *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*, CSIRO, Melbourne East, pp. 238-244.
- NANNIPIERI P. (2006): *Role of stabilized enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics*, in P. Nannipieri, K. Smalla (Eds.), *Soil Biology*, vol. 8, *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, Springer Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 75-94.

- NANNIPIERI P., CECCANTI B., CERVELLI S. AND SEQUI P. (1978): *Stability and kinetic properties of humus-urease complexes*, «Soil Biology and Biochemistry», 10, pp. 143-147.
- NANNIPIERI P., CECCANTI B. AND BIANCHI D. (1988): *Characterization of humus-phosphatase complexes extracted from soil*, «Soil Biology and Biochemistry», 20, pp. 683-691.
- NANNIPIERI P., SEQUI P. AND FUSI P. (1996): *Humus and enzyme activity*, in A. Piccolo (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*, Elsevier, Amsterdam, pp. 293-328.
- NANNIPIERI P., KANDELER E. AND RUGGIERO P. (2002): *Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil*, in R.G. Burns, R.P. Dick (Eds), *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*, Marcel Dekker, New York, pp. 1-33.
- NUTI M., AGNOLUCCI M., TOFFANIN A., DEGL'INNOCENTI S. (2008): *La biodiversità microbica del suolo*, in B. Biavati e C. Sorlini (Eds.), *Microbiologia agroambientale*, vol. 2, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 163-193.
- PAOLETTI M.G. (1988): *Soil invertebrates in cultivated and uncultivated soils in North-East Italy*, «Redia», 71, pp. 501-563.
- PAOLETTI M.G. (1999a): *Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability*, «Agriculture, Ecosystems & Environment», 74, pp. 1-18.
- PAOLETTI M.G. (1999b): *The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators*, «Agriculture, Ecosystems & Environment», 74, pp. 137-156.
- PAOLETTI M.G. (2005): *Ecological Implications of minilivestock. Insects, rodents, frogs and snails*, Science Publishers Inc., Enfield, New Hampshire, Usa, p. 648.
- PAOLETTI M.G. AND LORENZONI G.G. (1989): *Agroecology patterns in Northeastern Italy*, «Agriculture Ecosystems and Environment», Elsevier, Amsterdam, 27, pp. 139-154.
- PAOLETTI M.G., STINNER B.R., STINNER D., BENZING D. AND TAYLOR R. (1991): *Diversity of Soil fauna in the canopy of Neotropical rain forest*, «Journal of Tropical Ecology», 7, pp. 373-383.
- PAOLETTI M.G., DUFOUR D.L., CERDA H., TORRES F., PIZZOFEERRATO L. AND PIMENTEL D. (2000): *The importance of leaf- and litter-feeding invertebrates as sources of animal protein for the Amazonian Amerindians*, «Proceedings of the Royal Society London», B. 267, pp. 2247-2252.
- PAOLETTI M.G. E GOMIERO T. (2007): *L'importanza di un approccio integrato per la valutazione delle agroenergie: il caso della biodiversità*, in M.G. Paoletti e T. Gomiero, *Agroenergie per lo sviluppo rurale. Scenari a Confronto*, Veneto Agricoltura, Tipografia T. Zaramella, Selvazzano, pp. 13-24.
- PAOLETTI M.G., THOMSON L.J. AND HOFFMANN A.A. (2007): *Using Invertebrate Bioindicators to Assess Agricultural Sustainability in Australia: Proposals and current practices*, «Australian J. of Experimental Agriculture», 47, pp. 379-478.
- RAGUSA S. AND PAOLETTI M.G. (1985): *Phytoseiid Mites of Corn and Soybean Agroecosystem in the low-lying Plain of the Veneto (N.E. Italy)*, «Redia», 68, pp. 69-89.
- RAES J., KORBEL J.O., LERCHER M.J., VON MERING C., BORK P. (2007): *Prediction of effective genome size in metagenomic samples*, «Genome Biol.», 8, R10.
- RANJARD L., LEJON DPH., MOUGEL C., SCHEHRER L., MERDINOGLU D. AND CHAUSOUD R. (2003): *Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities*, «Environmental Microbiology», 5, pp. 1111-1120.
- RANJARD L., DEQUIEDT S., JOLIVET C., SABY N.P.A., THIOULOUSE J., HARMAND J., LOISEL P., RAPAPORT A., FALL S., SIMONET P., JOFFRE R., CHEMIDLIN-PREVOST BOURE N., MARON P.A., MOUGEL C., MARTIN M.P., TOUTAIN B., ARROUAYS D., LEMANCEAU

- P. (2010): *Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative*, «Agron. Sustain. Dev.», 30, pp. 359-365.
- SCHUSSLER A., SCHWARZOTT D. AND WALKER C. (2001): *A new phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution*, «Mycological Research», 105, pp. 1413-1421.
- SYLVIA D.M., FUHRMANN J.J., HARTEL P.G., ZUBERER D.A. (2005): *Principles and applications of soil microbiology*, 2nd edn., Pearson, Usa, p 640.
- SMITH S. E., READ D.J. (1997): *Mycorrhizal symbiosis*, Academic Press, London.
- SOGIN M.L., MORRISON H.G., HUBER J.A., MARK WELCH D., HUSE S.M., NEAL P.R., ARRIETA J.M., HERNDL G.J. (2006): *Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"*, «Proc Natl Acad Sci U S A», 103, pp. 12115-12120.
- SOLOVYEV P.M., RUBIN V.V., ROKHSAR E.M. AND BANFIELD D.S. (2004): *Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment*, «Nature», 428, pp. 37-43.
- TABATABAI, M.A. (1994): *Soil enzymes*, in Weaver R.W., Angle S., Bezdicsek D., Smith S., Tabatabai M.A., Wollum A. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties*, «Soil Science Society of America Journal», Madison, WI, pp. 775-833.
- TANARA V. (1644): *L'economia del Cittadino in Villa*, (X edizione, 1731, Giuseppe Bortoli, Venezia), p. 15.
- TORSVIK V., ØVREÅS, L. AND THINGSTAD T.F. (2002): *Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics and controlling factors*, «Science», 296, pp. 1064-1066.
- TREVORS, J.T. (2010): *One gram of soil: a microbial biochemical gene library*, «Antonie van Leeuwenhoek», 97, pp. 99-106.
- TREVORS J.T, COOK S. (1992): *A comparison of plating media and diluents for enumeration of aerobic bacteria in a loam soil*, «J Microbiol Meths», 14, pp. 271-275.
- TRINGE S.G., VON MERING C., KOBAYASHI A., SALAMOV A.A., CHEN K., CHANG H.W., PODAR M., SHORT J.M., MATHUR E.J. AND DETTER J.C. (2005): *Comparative metagenomics of microbial communities*, «Science», 308, pp. 554-557.
- TYSON G.W., CHAPMAN J., HUGENHOLTZ P., ALLEN E.E., RAM R.J., RICHARDSON P.M., SOLOVYEV V.V., RUBIN E.M., ROKHSAR D.S. AND BANFIELD J.F. (2004): *Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment*, «Nature», 428, pp. 37-43.
- TURRINI A., AVIO L., BEDINI S., GIOVANNETTI M. (2008): *In situ collection of endangered arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean UNESCO Biosphere reserve*, «Biodiversity and Conservation», 17, pp. 643-657.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., KLIRONOMOS J.N., URSIC M., MOUTOGLIS P., STREITWOLF-ENGEL R., BOLLER T., WIEMKEN A. AND SANDERS I.R. (1998): *Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity*, «Nature», 396, pp. 69-72.
- VAN ELSAS J.D., JANSSON J.K., TREVORS J.T. (Eds.) (2007): *Modern soil microbiology II*, CRC Press-Taylor and Francis, Boca Raton, p. 646.
- ZUL D., DENZEL S., KOTZ A. AND OVERMANN J. (2007): *Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity?*, «Applied and Environmental Microbiology», 73, pp. 6916-6929.