

STEFANO MOCALI¹

Lo studio del microbiota del suolo

¹ Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Centro di ricerca Agricoltura e Ambiente (CREA AA), Firenze

PREMESSA

Era il 2000 quando iniziai il mio Dottorato di ricerca in «Scienze del suolo e climatologia» dal titolo “Studio della diversità microbica in suoli concimati con cuoio idrolizzato”, presso l'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante (ISNP) di Roma, diretto dal prof. Paolo Sequi. Non avevo mai conosciuto il prof. Sequi prima di allora ma la sua fama lo precedeva e quando il prof. Paolo Nannipieri me lo presentò, capii subito di essere di fronte a una persona fuori dal comune. Nonostante avessi una Laurea in Scienze Biologiche con indirizzo biomolecolare e una tesi di microbiologia ambientale, il prof. Sequi – insieme alla dott.ssa Anna Benedetti – mi introdusse nel mondo del suolo e dei fertilizzanti, e fu capace di trasmettermi subito la passione per un mondo che avrebbe cambiato la mia vita per sempre. In quegli anni, infatti, il prof. Sequi ebbe l'intuito di intravedere nella microbiologia, nelle biotecnologie e nella biologia molecolare delle competenze strategiche su cui l'istituto avrebbe dovuto puntare per essere competitivo nella scienza del suolo degli anni a venire. E fu così che mi venne chiesto di allestire il primo laboratorio di ecologia microbica e molecolare dell'ISNP, dandomi la possibilità di iniziare un percorso scientifico affascinante e ricco di sfide che prosegue ancora oggi. Tra le varie cose, mi venne affidata la realizzazione di un volume specifico da inserire nella collana di metodi analitici per l'agricoltura, promossa e sostenuta dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali e dall'Osservatorio Nazionale Pedologico e coordinata dal prof. Sequi (fig. 1). L'opera, nata nell'ambito delle attività della Società Italiana della Scienza del Suolo (SISS) grazie al contributo della dott.ssa Anna Benedetti e del dott. Nerino Miclaus, era un elemento funzionale ad altri due volumi tematicamente affini già presenti nella collana e

già pubblicati ufficialmente: i *Metodi di analisi microbiologica del suolo* (2002) e i *Metodi di analisi biochimica del suolo* (2004). I tre volumi, pur avendo una loro autonomia e identità, costituiscono ancora oggi un compendio prezioso nello studio della microbiologia del suolo. Se da una parte, infatti, lo sviluppo e l'applicazione delle tecniche molecolari hanno rivoluzionato lo studio della biodiversità microbica e la definizione delle teorie ecologiche del suolo, ciò non significa che tutte le altre tecniche o metodologie analitiche “tradizionali” siano necessariamente diventate obsolete o inutili, anzi. Ogni tecnica ha i suoi vantaggi e i suoi difetti e solo una sapiente combinazione di strategie e tecniche diverse può consentire di ottenere il maggior numero di informazioni relative a (Myrold and Nannipieri, 2014).

LA BIODIVERSITÀ DEL SUOLO

Negli ultimi decenni l'uso eccessivo di fitofarmaci e prodotti chimici in agricoltura ha spesso provocato danni alla fertilità del suolo e all'ambiente, con un costo ambientale elevato, oggi non più sostenibile. Perciò è quanto mai urgente e necessario promuovere un cambiamento nel modo in cui produciamo e consumiamo cibo. Per fare ciò bisogna tenere presente che il suolo è un organismo vivente complesso e dinamico considerato un fattore essenziale per la vita e la sostenibilità del nostro pianeta. È una risorsa non rinnovabile di cui la gran parte delle funzioni e servizi ecosistemici è garantita da miliardi di minuscoli organismi che convivono e interagiscono tra loro, promuovendo e garantendo le principali funzioni del suolo. Si stima che la biodiversità del suolo rappresenti circa il 25% della biodiversità dell'intero pianeta e che un grammo di suolo possa ospitare miliardi di batteri, con oltre 50.000 specie diverse (FAO, 2020). Un ruolo fondamentale è svolto proprio dai microrganismi, un'incredibile biomassa “invisibile” che vive in ogni tipo di ecosistema, compreso l'uomo, e che è responsabile del mantenimento dei servizi ecosistemici del suolo, garantendo così la salute delle piante, degli animali e dell'uomo. Ad esempio, questi ecosistemi microbici complessi, denominati collettivamente *microbioti*, svolgono un ruolo centrale non solo per la fertilità del suolo e la nutrizione delle piante ma anche per lo stoccaggio del carbonio nel suolo, il ciclo dei nutrienti, il turnover della sostanza organica, il flusso dei gas serra, la decontaminazione di acqua e suolo, il mantenimento della struttura del suolo e anche per rappresentare un'enorme patrimonio genetico dalle potenzialità biotecnologiche ancora tutte da esplorare. Si stima, infatti, che di tutta la biodiversità del suolo ne conosciamo meno del 1% (FAO, 2020). Tale conoscenza, frenata a lungo da limitazioni di carattere tecnico-metodo-

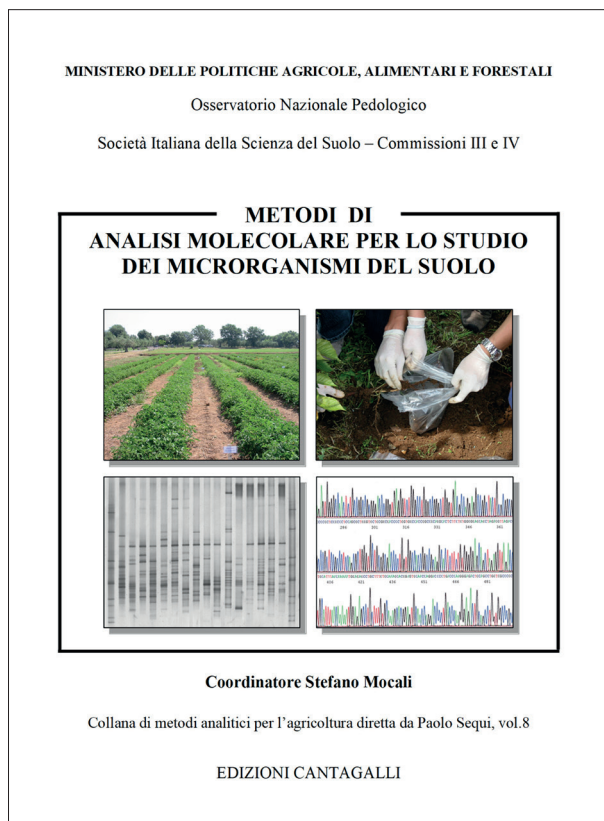


Fig. 1 *Il volume dei "Metodi di analisi molecolare per lo studio dei microrganismi del suolo", Collana di metodi analitici per l'agricoltura diretta da Paolo Sequi, vol. 8, Edizioni Cantagalli, 2010 (ISBN: 978-88-8272-760-4)*

logico, sta aumentando vertiginosamente negli ultimi anni grazie soprattutto all'utilizzo di tecniche molecolari e alle moderne tecniche "omiche". Grazie a queste metodologie, oggi è possibile esplorare nel dettaglio la composizione e le funzioni del microbiota del suolo e poter così promuovere opportune pratiche agricole e/o interventi finalizzati alla valorizzazione della biodiversità del suolo, alla sostenibilità delle produzioni, alla protezione del suolo e alla tutela del territorio.

L'AVVENTO DELLE TECNICHE "OMICHE"

Attualmente la maggior parte degli studi di ecologia microbica ricorrono all'utilizzo di tecniche di sequenziamento massivo (Next-Generation Sequencing, NGS) per l'analisi di geni target filogenetici (es. 16S rRNA e ITS) o funzio-

nali (es. *amoA*, *nifH*, ecc.). Per gli studi di carattere funzionale si utilizzano sempre più spesso anche tecniche metagenomiche (es. *shotgun sequencing*).

Esistono numerose tecnologie molecolari applicate all'ecologia microbica in genere e molte di queste appartengono alle cosiddette "omiche". Tutto ciò che è *omico* è spesso richiamato nel linguaggio anglosassone dal suffisso *omics* (es. *genomics*, *transcriptomics*, *proteomics*, *metabolomics*, ecc.), a indicare lo studio simultaneo di tutte le molecole d'interesse presenti in un determinato organismo. Ad esempio, genetica e genomica non sono la medesima cosa: la genetica guarda al singolo gene, la genomica a tutti i geni dell'organismo. Di conseguenza, gli studi "meta-omici" (es. *metagenomica*, *metatrascrittomica*, ecc.) consentono le analisi di tutti geni, trascritti, proteine ed eventuali metaboliti presenti in un determinato campione come, nel nostro caso, il suolo. Non è certo questo il contesto per descriverle tutte in modo esaustivo ma è importante comprenderne le basi concettuali e sostanziali. Come sempre accade, anche le tecniche molecolari più avanzate hanno pregi e difetti e – se male utilizzata – anche la tecnica più potente può risultare inefficace. Tutto dipende dal contesto in cui stiamo lavorando e soprattutto qual è la domanda a cui cerchiamo di dare una risposta.

In generale gli approcci molecolari si possono dividere in due grandi categorie: i) a formato aperto o ii) a formato chiuso (Zhou et al. 2015), come illustrato in figura 2.

- Tecnologie a formato aperto: ci si riferisce a tecnologie il cui risultato sperimentale potenziale non può essere previsto prima di eseguire l'analisi stessa. Pertanto, di solito non è necessario avere informazioni "a priori" sulla comunità microbica di interesse e consentono di scoprire nuovi geni, molecole, vie metaboliche, taxa, ecc.
- Tecnologie a formato chiuso: si intendono quelle tecnologie il cui potenziale range dei risultati sperimentali finali sono già definiti prima di eseguire l'analisi. In questo caso è necessario disporre di informazioni "a priori" perché le molecole e le sonde utilizzate per l'analisi sono note.

Il sequenziamento NGS di DNA e RNA è l'ideale per caratterizzare la biodiversità microbica e per scoprire nuovi geni mentre la metagenomica consente di assegnare funzioni a geni precedentemente sconosciuti o senza funzioni assegnate. Ad esempio, campioni di DNA/RNA possono essere estratti dal suolo e preparati per il sequenziamento di un gene target (*target gene sequencing*, TGS), per l'analisi metagenomica (*shotgun metagenome sequencing*, SMS) e/o per l'analisi metatrascrittomica (*metatranscriptome sequencing*, MTS) (fig. 2a). In alcuni casi, invece, può essere più utile confrontare la presenza o l'e-

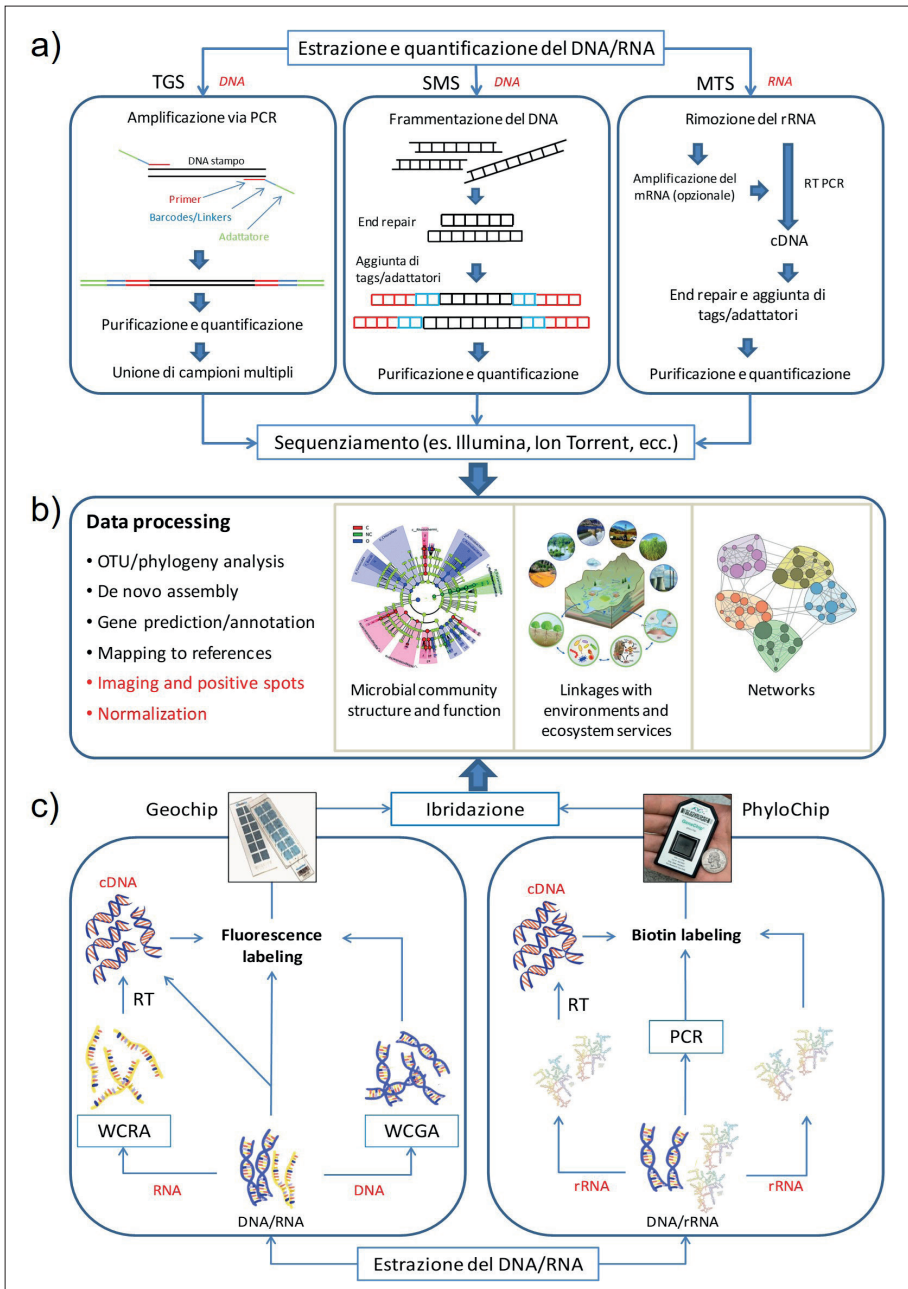


Fig. 2 Schema riepilogativo delle principali tecnologie molecolari a formato aperto (a), chiuso (c) ed elaborazione dei dati (b) (tratto da Zhou et al., 2015)

spressione di geni e funzioni note. In tali casi si può ricorrere a microarray specifici per lo studio delle funzioni e composizione delle comunità microbiche del suolo (es. Geochip, Phylochip): il DNA/RNA viene estratto, marcato e fatto ibridare direttamente sul chip. Nel caso in cui la quantità di DNA/RNA fosse insufficiente per l'analisi, il campione viene preventivamente amplificato mediante WCGA (whole-community genome amplification) o WCRA (whole-community RNA amplification) (fig. 2c).

ATTIVITÀ RECENTI E PROSPETTIVE FUTURE

In questi ultimi anni, gli studi di ecologia e biodiversità microbica del suolo che ho condotto col gruppo di ricerca del CREA Agricoltura e Ambiente hanno continuato a percorrere la strada tracciata a suo tempo dal prof. Sequi e dalla dott.ssa Benedetti, riuscendo a recitare – nel nostro piccolo – un ruolo di primo piano nel panorama nazionale e internazionale. Ad esempio, numerosi studi condotti in ambito vitivinicolo e dei suoli dei vigneti (soprattutto nell'area del Chianti Classico), hanno portato evidenze sul ruolo determinante della biodiversità microbica del suolo nel garantire la qualità e la sostenibilità delle produzioni, nella definizione di “terroir”, e nel legame tra vino e territorio (Vadour et al., 2015; Mocali et al., 2020; Giffard et al., 2022).

Nel 2017 abbiamo partecipato all'Earth Microbiome Project (EMP), una gigantesca ricerca partecipata da 160 istituti di ricerca e oltre 500 scienziati di tutto il mondo nata per cercare di catalogare tutta la biodiversità microbica del pianeta, i cui risultati sono stati pubblicati sulla prestigiosa rivista “Nature” (Thompson et al., 2017).

Nel 2019 riusciamo a ottenere il coordinamento del progetto H2020 EXCALIBUR “Exploiting the multifunctional potential of belowground biodiversity in horticultural farming” (Grant n.817946, <https://excaliburh2020.eu/en/>), con lo scopo di valorizzare al meglio le potenzialità della biodiversità del suolo in orticoltura, attraverso l'utilizzo di bioinoculi microbici multifunzionali, per promuovere la nutrizione e la difesa di piante di pomodoro, fragola e melo. L'obiettivo è quello di fornire strumenti concreti e indicazioni precise agli agricoltori su come gestire al meglio i propri suoli per rispondere alle diverse tipologie di problemi causati da stress biotici/abiotici. Il principio è che nessuna azienda è uguale a un'altra: ognuna ha i propri sistemi colturali, una condizione pedoclimatica diversa, con un suolo caratterizzato da una biodiversità nativa tipica di quel luogo. Perciò non esiste una soluzione unica per qualsiasi problema. Il progetto EXCALIBUR propone di adottare una strategia basata sull'utilizzo di bioinoculi microbici formulati e applicati in funzione del problema rilevato,

della tipologia di suolo e – soprattutto – della biodiversità nativa del suolo di interesse. La tematica dei bioinoculi e dei prodotti a base di consorzi microbici in generale desta grandissimo interesse per le potenzialità che possono avere tali prodotti nel sostenere la nutrizione e le strategie di biocontrollo in agricoltura (Baldi et al., 2021; Canfora et al., 2021), anche alla luce del nuovo Regolamento Ue 2019/1009 sui fertilizzanti entrato in vigore nel luglio 2022.

Un'altra attività di grande rilevanza è quella relativa al coordinamento del progetto europeo MINOTAUR “Modeling and mapping soil biodiversity patterns and functions across Europe” finanziato nel 2021 nell'ambito del programma EJP SOIL - Towards climate-smart sustainable management of agricultural (Grant n. 862695, <https://ejpsoil.eu/soil-research/minotaur>). L'obiettivo di tale progetto è di fare il punto sulla biodiversità funzionale del suolo a livello europeo e, sulla base dei dati raccolti, individuare i bioindicatori più adatti per il monitoraggio dei suoli europei. Gli indicatori selezionati saranno utilizzati per realizzare mappe e modelli previsionali capaci di aiutare gli agricoltori ad adottare pratiche agronomiche sostenibili ed efficaci nel rispondere ai cambiamenti climatici. Al tempo stesso, il progetto si propone di valutare – se possibile – i range e gli eventuali valori soglia di tali indicatori, al di sopra o al di sotto dei quali un suolo possa definirsi “sano” o “non-sano” come richiesto dalla nuova “Soil mission” dell'European Green Deal (Montanarella e Panagos, 2021). Circa la metà dei 17 obiettivi di sviluppo sostenibile (SDG) stabiliti dal programma d'azione dell'Agenda 2030, sottoscritto nel settembre 2015 dai governi dei 193 Paesi membri dell'ONU per il bene dell'intero pianeta (<https://unric.org/it/agenda-2030/>), dipende dal suolo e dalla sua diversità genetica e funzionale. Questo rafforza ancora di più il ruolo della biodiversità del suolo come elemento cardine indispensabile nel concetto di “One Health”, contribuendo a una nuova prospettiva integrata della salute degli organismi viventi (Trinh et al., 2018).

RINGRAZIAMENTI

Le attività brevemente riportate in questo testo non sarebbero state possibili senza il supporto degli amici e dei colleghi con cui ho trascorso questi ultimi 20 anni di lavoro, a Roma e a Firenze. Un ringraziamento particolare va anche al prof. Paolo Nannipieri e alla dott.ssa Anna Benedetti per avermi sempre sostenuto, anche e soprattutto nei momenti difficili. Ma il ringraziamento maggiore va alla mia famiglia, per il supporto e la pazienza che hanno sempre mostrato nei miei confronti e senza i quali non sarei riuscito a superare le numerose difficoltà di questo lavoro meraviglioso.

RIASSUNTO

Il suolo è un organismo vivente complesso e dinamico considerato un fattore essenziale per la vita e la sostenibilità del nostro pianeta. È una risorsa non rinnovabile di cui la gran parte delle funzioni e servizi ecosistemici è garantita da miliardi di minuscoli organismi, il cosiddetto *microbiota del suolo*, il cui ruolo ecologico è spesso sottovalutato. Si stima che il suolo contenga circa 1/4 di tutta la biodiversità del pianeta di cui però ne conosciamo meno del 1%. Tale conoscenza sta aumentando vertiginosamente negli ultimi anni grazie all'utilizzo di tecniche molecolari e alle moderne tecniche "omiche", consentendo così di promuovere opportune pratiche agricole e/o interventi finalizzati alla valorizzazione della biodiversità del suolo, alla sostenibilità delle produzioni, alla protezione del suolo e alla tutela del territorio.

ABSTRACT

Soil is a complex and dynamic living organism, considered an essential factor for the life and sustainability of our planet. It is a non-renewable resource which most of the ecosystem functions and services it provides are guaranteed by billions of tiny organisms, the so-called soil microbiota, whose ecological role is often underestimated. It is estimated that the soil contains about 1/4 of all the planet's biodiversity, of which we know less than 1%. Recently, this knowledge is dramatically increasing thanks to the use of molecular techniques and modern "omics" techniques, thus making possible to promote appropriate agricultural practices and/or initiatives aimed at enhancing soil biodiversity, sustainability of production, soil and land protection.

BIBLIOGRAFIA

- BALDI E., GIOACCHINI P., MONTECCHIO D., MOCALI S., ANTONIELLI L., MASOERO G., TOSELLI M. (2021): *Effect of biofertilizers application on soil biodiversity and litter degradation in a commercial apricot orchard*, «Agronomy», 11 (6), 1116.
- CANFORA L., COSTA C., PALLOTTINO F., MOCALI S. (2021): *Trends in soil microbial inoculants research: a science mapping approach to unravel strengths and weaknesses of their application*, «Agriculture», 11 (2), 158.
- FAO, ITPS, GSBI, SCBD e EC (2020): *State of knowledge of soil biodiversity - Status, challenges and potentialities*, Report 2020, FAO, Rome (Italy).
- GIFFARD B., WINTER S., GUIDONI S., NICOLAI A., CASTALDINI M., CLUZEAU D., ... & LEYER I. (2022): *Vineyard Management and Its Impacts on Soil Biodiversity, Functions, and Ecosystem Services*, «Frontiers in Ecology and Evolution», 10.
- MYROLD D.D., NANNIPIERI P. (2014): *Classical techniques versus omics approaches*, in *Omics in soil Science*, a cura di: P. Nannipieri, G. Pietramellara, e G. Renella, Caster Academic Press, Norfolk, UK, pp. 179-187.
- MOCALI S. (2010): *Metodi di analisi molecolare per lo studio dei microrganismi del suolo*,

- Collana di metodi analitici per l'agricoltura diretta da Paolo Sequi, vol. 8, Edizioni Cantagalli, Siena.
- MOCALI S., KURAMAE E.E., KOWALCHUK G.A., FORNASIER F., PRIORI S. (2020): *Microbial functional diversity in vineyard soils: sulfur metabolism and links with grapevine plants and wine quality*, «Frontiers in Environmental Science», volume 8, 75.
- MONTANARELLA L., PANAGOS P. (2021): *The relevance of sustainable soil management within the European Green Deal*, «Land use policy», 100, 104950.
- THOMPSON L.R., SANDERS J.G., MCDONALD D., AMIR A., LADAU J., LOCEY K.J., [...], NAVAS-MOLINA J.A. (2017): *A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity*, «Nature», 551, 7681.
- TRINH P., ZANEVELD J.R., SAFRANEK S., RABINOWITZ P.M. (2018): *One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review*, «Frontiers in Public Health», 6, 235.
- VAUDOUR E., COSTANTINI E., JONES G.V., MOCALI S. (2015): *An overview of the recent approaches to terroir functional modelling, footprinting and zoning*, «Soil Discussions», 1 (1), pp. 287-312.
- ZHOU J., HE Z., YANG Y., DENG Y., TRINGE S.G., ALVAREZ-COHEN L. (2015): *High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats*, «MBio», 6 (1), e02288-14.