

*“ Rare sono le persone che usano la mente.
Poche coloro che usano il cuore e uniche coloro che usano entrambi.”*
Rita Levi Montalcini

Dedicata
AI MIEI NONNI
*Al loro ricordo e
a quanto di loro mi porto con me*

INDICE

Riassunto.....	4
Abstract.....	6
Introduzione.....	8
1. Metagenomica:	
vantaggi e limitazioni nello studio del suolo.....	8
2. Suoli estremi e cambiamenti ambientali.....	10
3. Suoli estremi: effetti del fuoco nel suolo.....	11
4. Il DNA extracellulare nel suolo.....	16
5. Suoli estremi:.....	18
effetti della contaminazione antropica da metalli pesanti nel suolo	
6. Scopo del lavoro.....	21
7. PRIMA PARTE: Effetto del fuoco sulle proprietà microbiologiche di un suolo forestale.	
7.1 Materiali e Metodi.....	24
7.1.1 Area di campionamento.....	24
7.1.2 Caratterizzazione molecolare delle comunità microbiche del suolo.....	30
7.1.2.1 Estrazione sequenziale del DNA dal suolo.....	31
7.1.2.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA.....	32
7.1.2.3 Amplificazione del DNA tramite PCR.....	33
Nested Approach 16s rDNA PCR	
Nested Approach 18s rDNA PCR	
7.1.2.4 Caratterizzazione elettroforetica dei profili.....	40
Amplificati tramite DGGE	
16s rDNA DGGE	
18s rDNA DGGE	
7.1.2.5 Analisi statistica dei profili elettroforetici.....	41
7.1.2.6 Analisi delle attività enzimatiche.....	42
7.1.2.7 Analisi statistica.....	42
/2 Risultati.....	43
7.3 Discussioni e Conclusioni.....	55
7.4 Studio preliminare sugli aggregati di un suolo forestale bruciato.....	66
7.4.1 Materiali e Metodi.....	66

7.5 Risultati.....	71
7.6 Discussioni e Conclusioni.....	80
/7 Obiettivi raggiunti e linee di studio future.....	84
8. SECONDA PARTE: Suoli contaminati da metalli pesanti	
8.1 Sito sperimentale di Slagnas- Svezia.....	87
8.2 Materiali e Metodi.....	87
8.2.1 Area di campionamento.....	87
8.2.2 Caratterizzazione molecolare delle comunità microbiche del suolo.....	88
8.2.2.1 Estrazione del DNA totale dal suolo.....	88
8.2.2.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA.....	89
8.2.2.3 Amplificazione del DNA tramite PCR.....	90
16s rDNA PCR	
Nested Approach 18s rDNA PCR	
8.2.2.4 Caratterizzazione elettroforetica dei profili amplificati Tramite DGGE.....	90
16s rDNA DGGE	
18s rDNA DGGE	
8.3 Risultati.....	91
8.4 Discussioni e Conclusioni.....	96
8.5 Sito minerario di Brunita- Cartagena La Union Spagna	
8.6 Materiali e Metodi.....	98
8.6.1 Area di campionamento.....	98
8.6.2 Caratterizzazione molecolare delle comunità100 microbiche del suolo	
8.6.2.1 Estrazione del DNA dal suolo.....	100
8.6.2.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA.....	101
8.6.2.3 Amplificazione del DNA tramite PCR.....	101
Nested Approach 16s rDNA PCR	
Nested Approach 18s rDNA PCR	
8.6.2.4 Caratterizzazione elettroforetica dei profili amplificati Tramite DGGE.....	101
16s rDNA DGGE	
18s rDNA DGGE	
8.7 Risultati.....	102
8.8 Discussioni e Conclusioni.....	108

8.9 Obiettivi raggiunti e linee di studio future.....	111
9. Appendice.....	112
10.Bibliografia.....	121

RIASSUNTO

La biodiversità dei microrganismi del suolo, in virtù della varietà dei processi chimico-metabolici coinvolti, ha un ruolo importante nel mantenere gli ecosistemi in uno stato funzionalmente efficiente.

Col termine “Metagenomica” si intende l’analisi delle sequenze di DNA ottenute direttamente dall’ambiente. Nel caso della metagenomica del suolo si definisce la sequenza nucleotidica di genomi di tutti gli organismi diversamente presenti.

L’approccio al metagenoma richiede una dettagliata conoscenza delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche di un suolo; non è alternativo agli altri, ma li integra e fornisce una base per affrontare la piena comprensione dei processi che regolano l’ecologia del suolo.

In questo lavoro sono stati scelti due casi studio di suoli in condizioni estreme, analizzati applicando l’approccio sperimentale metagenomico: suolo forestale percorso da incendio e suolo contaminato da metalli pesanti.

L’impatto del fuoco sull’ecosistema suolo è stato solo di recente considerato in relazione alla sua rilevanza sulla risposta degli ecosistemi forestali.

Questo studio propone di valutare l’effetto del fuoco sulla diversità della comunità microbica e l’attività di un suolo forestale tramite screening molecolare (PCR-DGGE) del DNA estratto. Per quanto riguarda il fingerprinting del DNA, è stata analizzata sia la frazione di DNA intracellulare (iDNA) che extracellulare (eDNA) del suolo, considerando le importanti implicazioni ecologiche ed evolutive del DNA extracellulare nel suolo (*Horizontal Gene Transfer*).

Il fingerprinting genetico (DGGE) condotto sulle frazioni di eDNA e di iDNA ha mostrato dei cambiamenti sulla struttura delle comunità microbiche del suolo, indotte dal fuoco. Questi cambiamenti sono stati più evidenti per i funghi che per batteri, suggerendo che le comunità microbiche fungine sono più sensibili al fuoco, ma sono anche in grado di rispondere prontamente ai cambiamenti indotti dall’incendio. Le linee di studio future prevedono di combinare tali dati con quelli relativi al cDNA derivante dal pool di RNA totale del suolo ed anche con analisi di espressione di geni che codificano per la beta-glucosidasi e proteasi, al fine di valutare l’impatto del fuoco sulle

caratteristiche microbiologiche del suolo, anche in termini di attività funzionale e metabolica .

In una seconda parte del lavoro, lo stesso suolo bruciato è stato studiato valutando l'effetto del fuoco sugli aggregati del suolo che rappresentano la sua unità strutturale di base, forniscono microhabitat speciali e vengono assunti per proteggere sia la materia organica del suolo che il microbiota contro gli effetti negativi di condizioni ambientali difficili.

Per valutare l'effetto protettivo sul microbiota del suolo e sul DNA del suolo, sono state ottenute per setacciatura a secco, dalla frazione < 2 mm, tre differenti classi di aggregati: 1-0,5 mm, 500-100 µm e <100 µm.

Tutte le classi di aggregati sono state valutate sia in termini di biomassa microbica (iDNA *double strand*) che di struttura delle comunità microbiche, batteriche e fungine.

Per valutare l'effetto dell'ossidazione e dell'alta temperatura sul DNA del suolo, anche in questo caso è stato analiticamente discriminato il metagenoma del suolo nella frazione di eDNA e di iDNA mediante estrazione sequenziale del DNA e fingerprinting genetico comparativo (PCR-DGGE) delle due frazioni di DNA considerate.

Il *fine-tuning DNA analyses* evidenzia l'effetto protettivo a livello delle varie classi dimensionali degli aggregati, non solo sulla frazione di iDNA ma anche di eDNA, ponendo particolare attenzione verso quest'ultima che potrebbe rappresentare un aspetto ecologico importante legato alla ripresa e alla conservazione della biodiversità dopo un evento di disturbo come un incendio.

Nel secondo caso studio di suoli in condizioni estreme, è stata valutata nel tempo la funzionalità di due differenti suoli, recuperati tramite fitostabilizzazione assistita: un suolo collocato nel distretto minerario Cartagena –La Union (Spagna) ed un suolo del Nord della Svezia, vicino Slagnas.

Tramite fingerprinting genetico comparativo (PCR-DGGE) è stata valutata la frazione di DNA totale (tDNA) in entrambi i suoli, così da avere un quadro descrittivo della struttura delle popolazioni microbiche, batteriche e fungine, subito dopo il trattamento e dopo qualche anno, osservando in entrambi i casi, un cambiamento nella struttura delle comunità microbiche a livello dei suoli trattati che fa presupporre come questi ultimi tendano probabilmente verso un nuovo equilibrio ecologico post trattamento, possibilmente più complesso e dinamico del precedente.

Per capire l'effettiva efficienza di questa tecnica di fitostabilizzazione assistita, dovranno essere pianificati periodicamente ulteriori monitoraggi per seguire nel lungo periodo l'andamento di questi suoli.

ABSTRACT

The biodiversity of soil microorganisms, due to the variety of chemical and metabolic processes involved, has an important role in maintaining ecosystems in a functionally efficient state.

The term "metagenomics" is used for the analysis of DNA sequences obtained directly from the environment. The term "soil metagenomics" is used for the nucleotide sequence of all genomes organisms otherwise present. The metagenomics approach requires a detailed knowledge of chemical, physical and biological soil properties and provides a basis for understanding the processes that govern the soil ecology.

In this work have been chosen two soils extreme conditions studies case, using the experimental metagenomic approach: burned forest soil and contaminated soil by heavy metals.

The fire impact on the soil ecosystem was only recently considered in relation to its relevance on the response of forest ecosystems.

The aim of this study is to evaluate the fire effect on the microbial community diversity and the activity of a forest soil through molecular screening (PCR - DGGE) of soil extracted DNA.

As regards the DNA fingerprinting, it has been analyzed both the intracellular DNA (iDNA) and extracellular (eDNA) soil fraction, considering the important ecological and evolutionary implications of soil extracellular DNA (Horizontal Gene Transfer) .

The genetic fingerprinting (DGGE) conducted on eDNA and iDNA fractions showed changes on the soil microbial community structure induced by fire. These changes were more evident for the fungi than for bacteria, suggesting that the microbial fungal communities are more susceptible to fire, but they are also able to respond quickly to changes due to fire. The future study/research lines expect to combine these data with the ones of cDNA arising from the total soil RNA pool. The study of soil microbial activity has been implemented by expression analysis of beta-glucosidase- and protease-

encoding genes in order to value the fire impact on soil microbiological characteristics, also in functional and metabolic activity terms.

In the second part of the work, the same burned soil has been studied by evaluating the fire effect on soil aggregates, which are their soil basic structural unit, they provide special microhabitats and protect the soil organic matter and the soil microbiota against the negative effects of extreme environmental conditions.

To assess the protective effect on the soil microbiota and on the soil DNA, from the fraction < 2 mm were obtained by dry sieving three different aggregates classes: 1-0,5 mm, 500-100 µm and < 100 µm.

All aggregates classes were evaluated both in terms of microbial biomass (iDNA double strand) and structure of microbial, bacterial and fungal communities.

To assess the effect of oxidation and high temperature on the soil DNA, also in this case has been analytically discriminated the soil metagenome in the eDNA and iDNA soil fractions by sequential extraction of DNA and comparative genetic fingerprinting (PCR - DGGE) of the two soil DNA fractions considered.

The fine-tuning DNA analysis showed the protective effect at the level of the different size of aggregates, not only on the iDNA, but also on the eDNA fraction, by paying particular attention to the soil edNA fraction, that could be a significant environmental aspect related to the biodiversity recovery and conservation after fire.

In the second study about soil extreme conditions, it was evaluated during the time the functionality of two different soils, after a phytostabilization assisted intervention.

The first sampling area is in Cartagena -La Union (Spain) and the second area is in northern Sweden, near Slagnäs.

Through the comparative genetic fingerprinting (PCR - DGGE) it was evaluated the total DNA fraction (tDNA) in both soils, that showed a change in the treated soil microbial communities structure in both analyzed conditions.

The soils probably tend to a new ecological post-treatment balance possibly more complex and dynamic: the actual technique effectiveness will be tested through further monitoring in the long time.

INTRODUZIONE

1. Metagenomica: vantaggi e limitazioni nello studio del suolo.

Nel suolo è rappresentato oltre il 95% della biodiversità dell'intero pianeta. In un grammo di suolo infatti vivono milioni di microrganismi, molti dei quali ancora sconosciuti.

La biodiversità dei microrganismi del suolo, in virtù della varietà dei processi chimico-metabolici coinvolti, ha un ruolo importante nel mantenere gli ecosistemi in uno stato funzionalmente efficiente. L'equilibrio che si instaura nell'ecosistema microbico del suolo, dovuto alla stabilizzazione delle interrelazioni funzionali tra i vari microrganismi, si riflette positivamente sulle piante e, conseguentemente, sulla comunità animale.(Nannipieri et al., 2002).

Lo studio della diversità microbica del suolo comporta non poche difficoltà legate soprattutto al fatto che solo l'1% della popolazione microbica del suolo è coltivabile e quindi isolabile e caratterizzabile.

In passato, nell'impossibilità di disporre di strumenti analitici idonei si sono studiate le comunità microbiche in relazione alle funzioni da esse svolte individuando dei marcatori metabolici che potessero essere correlati a gruppi funzionali. L'avvento delle tecniche molecolari ha consentito di caratterizzare la diversità microbica in termini di ricchezza ed abbondanza in base all'estrazione del DNA aprendo frontiere conoscitive immense.

Col termine "Metagenomica" si intende l'analisi delle sequenze di DNA ottenute direttamente dall'ambiente. Nel caso della metagenomica del suolo si definisce la sequenza nucleotidica dei genomi di tutti gli organismi diversamente presenti. La catalogazione ed analisi dei genomi microbici di un ambiente è attualmente la base scientificamente più avanzata per poterne studiare le funzioni e sfruttarne le potenzialità applicative. Finora la metagenomica è stata applicata ad ambienti relativamente semplici o particolarmente specializzati, tuttavia lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento rende adesso possibile anche il completo sequenziamento del Metagenoma del Suolo, che da un punto di vista microbiologico è certamente l'ambiente più complesso. Una delle maggiori sfide per la metagenomica del suolo è quella di sviluppare metodi per definire l'eterogeneità ed il dinamismo delle comunità microbiche nel tempo e nello spazio (Rolf D.,

2005). Nonostante considerevoli progressi nella caratterizzazione delle comunità microbiche tramite la “random sequencing” (Venter, J.C et al., 2004), è necessario ottenere ulteriori miglioramenti delle tecniche di sequenziamento associato all’utilizzo di strumenti bioinformatici per analizzare l’enorme quantità di dati prodotti, combinato anche con una riduzione dei costi di sequenziamento, per ottimizzare la tecnica metagenomica applicata allo studio del suolo: per questo esplorare un metagenoma è uno sforzo sia scientifico che tecnologico. (Rolf., 2005).

In quest’ottica vanno anche considerati altri due punti di criticità legati all’applicazione di questo approccio sperimentale: la rappresentatività del campionamento e l’estrazione del DNA dal suolo.

Nel primo caso con il campionamento va ottenuto un campione di suolo sufficientemente rappresentativo dell’area oggetto di studio, così da avere un’adeguata “fotografia” della diversità microbica totale, nel campione analizzato. (Elshahed et al., 2008).

Nell’altro caso il metodo di estrazione del DNA dal suolo, diretto o indiretto, presenta contrastanti vantaggi e svantaggi in termini di qualità e quantità del DNA estratto (Robe et al., 2003), per cui c’è una continua ricerca per ottimizzare i protocolli esistenti al fine di ottenere rese estrattive migliori.

La conoscenza del metagenoma del suolo viene utilizzata per studiarne la fertilità, i cicli biogeochimici, oppure trovare nuove vie per il biorisanamento, o scoprire geni per la produzione di nuovi antibiotici o altri prodotti biotecnologici.

L’approccio al metagenoma richiede una dettagliata conoscenza delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo; non è alternativo agli altri, ma li integra e fornisce una base per affrontare la piena comprensione dei processi che regolano l’ecologia del suolo.

In questo lavoro sono stati scelti due casi studio di suoli in condizioni estreme: suolo contaminato da metalli pesanti e suolo forestale percorso da incendio.

In entrambi i casi studio è stato applicato l’approccio sperimentale metagenomico, al fine di valutare la biodiversità e le caratteristiche biologiche di questo particolare tipo di ecosistema, valutando gli eventuali cambiamenti nella distribuzione e struttura delle comunità microbiche dopo l’evento di disturbo nell’ecosistema suolo, così da definire azioni di ripristino volte al recupero e alla ripresa dei suoli oggetto di studio.

2.Suoli estremi e cambiamenti ambientali

Considerando che la diversità, l'abbondanza e l'attività dei microrganismi nel suolo sono vincolate dalle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche dell'ambiente in cui vivono, risulta di particolare importanza lo studio di questi sistemi che può fornire informazioni sulla risposta dei microrganismi del suolo al disturbo e al cambiamento ambientale.

Condizioni estreme esistono in ecosistemi naturali in tutto il mondo: alcuni organismi del suolo possono tollerare condizioni estreme in ambienti caldi terrestri, in suoli ghiacciati, in condizioni di acidità e salinità.

Queste forme di vita microbiche estreme riescono a sopravvivere in ambienti considerati impraticabili, potremmo dire sterili nel senso che nessun'altra forma di vita può svilupparsi.

Le dimensioni e la densità di una popolazione è influenzata da diversi fattori che differiscono da un gruppo di organismi ad un altro. In generale, ad esempio, possiamo dire che l'intervallo di pH per uno sviluppo ottimale di alcuni batteri è compreso tra 6,5–7,5 ma esistono gruppi che si riproducono in ambienti acidi con pH anche minore di 4,5. Un pH acido rappresenta un fattore limitante per lo sviluppo della prima popolazione batterica considerata perché non permetterebbe la loro crescita e sopravvivenza.

Se qualche elemento essenziale è poco disponibile o qualche caratteristica ambientale è oltre i limiti della tollerabilità, non è possibile che avvenga una crescita della popolazione, anche se tutte le altre necessità sono soddisfatte. I batteri che vivono nelle regioni antartiche prosperano in intervalli ottimali di temperatura fra i -7°C e -20°C , mentre i batteri termofili che vivono in prossimità delle sorgenti termali si riproducono alla temperatura di 90°C . Rispetto alla presenza di ossigeno nell'ambiente, molti procarioti sono anaerobi facoltativi, cioè possono ottenere energia per vivere sia attraverso la respirazione cellulare che con la fermentazione. Altri (anaerobi obbligati) possono vivere solo con la fermentazione e, di conseguenza, la loro crescita è inibita dalla presenza di ossigeno nell'ambiente; all'altro estremo troviamo gruppi aerobi obbligati che sono incapaci di sopravvivere per prolungati periodi in assenza di ossigeno. Di fatto i cambiamenti naturali e indotti dall'uomo, possono rappresentare nuovi ambienti estremi e sfide ambientali per molti organismi.

I microrganismi del suolo, attraverso diverse attività metaboliche, sono i principali protagonisti dei cicli biogeochimici (Balser et al., 2001).

Le attività metaboliche dei microrganismi possono essere alterate da diversi cambiamenti ambientali e globali, come quelli climatici, e variazioni delle attività microbiche possono indurre cambiamenti nella decomposizione e mineralizzazione dell'azoto, nello stoccaggio del carbonio organico ed altri processi importanti dell'ecosistema.(Carreiro et al., 2000; Sinsabaugh et al., 2002; Sowerby et al.,2005).

Particolarmente l'impatto che il cambiamento climatico ha sulla biodiversità del suolo è dovuto al fatto che l'attività e la composizione delle comunità microbiche del suolo, sono sensibili a due fattori regolati dal clima: umidità e temperatura.

Un incremento di temperatura a seguito del cambiamento climatico, influenza la respirazione microbica del suolo che è un importante fattore che modula la decomposizione complessiva della sostanza organica ed il processo di stoccaggio del carbonio.(Mandal S e Neenu S., 2012).

Gli agenti esterni che provocano l'induzione di un disturbo a livello dell'ecosistema suolo, sono sia di tipo naturale, come siccità, incendi, inondazioni, erosione idrica ed eolica, sia di tipo antropico, come le pratiche agronomiche per l'uso e la gestione del territorio, lo smaltimento di rifiuti tossici e l'attività estrattiva.

3.Suoli estremi: effetti del fuoco nel suolo

Il fuoco mostra nelle foreste e nei boschi, ed in numerose località del mondo, una presenza ricorrente anno dopo anno, con un'intensità devastatrice in continua ascesa. (Corpo Forestale dello Stato, 2010).

Oggi non vi è paesaggio naturale e vegetale che non sia stato modellato più o meno intensamente dal fuoco.

I vasti e frequenti incendi forestali degli ultimi anni, uniti alla irregolarità delle precipitazioni, possono aggravare i rischi di desertificazione.

Tale pericolo è presente in tutta la parte Sud dell'area mediterranea e comincia a interessare anche la parte Nord ed a preoccupare seriamente gli organismi internazionali, poiché minaccia i programmi di riforestazione e di utilizzazione delle risorse forestali.

Quindi gli incendi sono un rischio grave e diffuso in molti ecosistemi forestali soprattutto per cause antropiche di natura volontaria e dolosa, ma anche in minor parte, per cause naturali, quali la siccità estiva, i temporali e

la combustibilità della vegetazione, per cui il clima e l'andamento stagionale giocano un ruolo fondamentale nel predisporre una situazione di favore allo scoppio dell'incendio: periodi di non pioggia e di alte temperature, determinano condizioni di estrema pericolosità.(Corpo Forestale dello Stato,2010).

Sebbene in alcuni ecosistemi, il fuoco è un fattore ecologico e naturale, la continua frequenza degli incendi, in primis boschivi, costituisce un grave problema ambientale, non solo a causa della distruzione della vegetazione, ma anche per la degradazione che può essere indotta nel suolo come conseguenza del cambiamento a livello delle sue proprietà (Cerdà e Mataix – Solera., 2009).

Il fuoco può influenzare negativamente le proprietà chimiche, fisiche, mineralogiche e biologiche del suolo (Certini., 2005).

I fattori che determinano l'alterazione delle proprietà del suolo, sono la gravità e l'intensità dell'incendio, compromettendo il funzionamento dell'intero ecosistema (Certini.,2005), venendo meno la disponibilità di nutrienti, la capacità di trattenere l'acqua, il carbonio organico, la stabilità degli aggregati, e l'idrofobicità che sono solo alcune proprietà del suolo che possono essere significativamente alterate con l'esposizione al fuoco.

(Certini., 2005).

Una bassa intensità del fuoco non comporterà cambiamenti irreversibili nell'ecosistema, ma può aumentare l'idrofobicità. (Certini.,2005).

Incendi di bassa intensità, come quelli prescritti, vale a dire controllati, sono comunemente anche di bassa gravità, in quanto sono utilizzati essenzialmente per ridurre l'accumulo di necromassa e vengono applicati durante specifiche condizioni meteorologiche, proprio per evitare che sfocino in incendi di alta gravità.

Le alterazioni arrecate al suolo da questo tipo di incendio, normalmente sono solo transitorie.

Mentre incendi intensi, come quelli estivi, in genere hanno effetti negativi sul suolo (Certini., 2005).

I principali effetti della forte intensità del fuoco comportano una perdita di sostanza organica e di nutrienti attraverso la volatilizzazione, la lisciviazione e l'erosione, l'alterazione delle caratteristiche qualitative e quantitative delle comunità microbiche e il deterioramento della struttura del suolo che influisce direttamente sulla stabilità degli aggregati (Mataix Solera and Cerdà, 2009), che sono il risultato dell'organizzazione del suolo minerale e

delle particelle organiche. Il rapporto tra stabilità degli aggregati e proprietà del suolo è stato ampiamente studiato (Tisdall e Oades., 1982; Rengasamy et al., 1984). È evidente che i fattori biotici e abiotici sono coinvolti nei processi di aggregazione del suolo che sono parametri chiave nel fornire informazioni sullo stato di salute del suolo. (Mataix - Solera et al., 2010).

Gli effetti del fuoco sugli aggregati del suolo sono stati studiati da diversi ricercatori (Cerdà, 1993; Cerdà et al., 1995; Andreu et al., 2001; Mataix-Solera et al., 2002; Mataix-Solera e Doerr, 2004; Varela, 2007; Arcenegui et al., 2008; Llovet et al., 2009; Jordán et al., 2011), sia tramite incendi prescritti in campo (Josa et al., 1994; García-Oliva et al., 1999; Mataix-Solera, 1999; Campo et al., 2008), sia in esperimenti in laboratorio in forni a muffola (Guerrero et al., 2001; García-Corona et al., 2004; Marcos et al., 2007; Zavala et al., 2010) o utilizzando la fiamma ossidrica (Llovet et al., 2008), evidenziando delle discrepanze circa l'effetto del fuoco sugli aggregati.

L'aumento di temperatura può di fatto causare cambiamenti nelle proprietà delle argille, ma comporta soprattutto un'alterazione a livello dell'attività biologica. (Mataix-Solera et al., 2009).

A causa della bassa conduttività termica del suolo minerale, lo spessore di suolo interessato direttamente dall'incendio sono i primi 2-3 cm.

Lo stato della superficie del suolo è fondamentale per i cicli idrologici e biogeochimici nella fase post incendio: la riduzione della copertura vegetale comporta cambiamenti a livello del regime termico del suolo.

Alcuni autori hanno studiato gli effetti del fuoco nel suolo, sotto diversi aspetti: Raison (1979) e più recentemente Duran (2008), hanno posto particolare attenzione alle conseguenze dell'incendio sull'azoto.

Il fuoco stimola il ciclo dell'azoto. Il calore permette il rilascio dell'azoto organico attraverso la combustione della sostanza organica nel suolo, aumentando i tassi di nitrificazione del suolo.

Il carbone assorbe i fenoli, tossici per i batteri nitrificanti. Duran., 2008 ha affermato che l'azoto disponibile aumenta notevolmente tra uno e cinque anni dopo l'incendio nei siti bruciati.

DeBano (1981, 2000) e Doerr et al., (2000) hanno invece studiato l'effetto del fuoco sull'idrorepellenza del suolo.

Il fuoco determina la creazione di strati idrofobici, diminuendo l'infiltrazione dell'acqua ed incrementando l'erosione del suolo da deflusso delle acque (Almendros et al., 1990; DeBano et al., 1976).

Neary et al., (1999) e più recentemente Certini (2005) hanno definito i punti generali sull'effetto del fuoco sulle proprietà fisiche, chimiche, mentre Shakesby e Doerr (2006) hanno effettuato studi sull'effetto del fuoco a livello delle caratteristiche idrologiche e geomorfologiche.

La combustione di materia organica aumenta con l'aumento della temperatura: questa combustione provoca una riduzione o completa rimozione del materiale organico sulla superficie del suolo e nei suoi orizzonti superiori. (Certini., 2005).

La materia organica è un fattore chiave per il suolo: ha un'influenza diretta o indiretta sulle sue caratteristiche fisico – chimiche ed è quella più influenzata dal fuoco, in termini sia di contenuto che di composizione (González-Pérez et al., 2004; Certini et al., 2011).

Anche il fosforo è influenzato dalla gravità del fuoco: è evidenziato un picco iniziale dopo l'incendio, dopodiché ci sarebbe una forte diminuzione a causa della mancanza di P organico nel terreno. L'iniziale incremento della disponibilità di fosforo è dovuta alla combustione del fosforo organico (Kutiel., 2007).

Pochi invece sono gli studi relativi all'effetto del fuoco sulla biologia del suolo. (Mataix-Solera et al., 2009).

La produttività del suolo e il ciclo dei nutrienti sono influenzati dalla quantità e dall'attività dei microrganismi, che sono i componenti chiave nel mantenimento della fertilità del suolo (Jenkinson e Ladd, 1981).

Gli effetti diretti del fuoco sulla microbiologia del suolo dipendono principalmente dalla gravità dell'incendio, legata al comportamento del fuoco, al tipo di terreno e alle particolari condizioni del suolo durante la propagazione del fuoco, nonché dalle condizioni ambientali post incendio, ed essenzialmente dalla sua intensità e durata. (Hartford e Frandsen.,1992); (Mataix- Solera et al., 2009).

L'importanza dei microrganismi del suolo per la conservazione e la gestione della diversità biologica dopo l'incendio è di fondamentale importanza.

L'impovertimento della biodiversità non solo riduce le risorse genetiche, ma riduce anche la produttività degli ecosistemi e ne altera la capacità di tamponamento contro eventi di disturbo (Naeem et al., 1994).

Ciascuno di questi fattori ha una gamma di effetti a seconda del tipo di microrganismo considerato (Widden e Parkinson 1975; Bisset e Parkinson 1980, Dunn et al.,1985; Bartoli et al.,1991; Vázquez et al.,1993; Acea e Carballas.,1996; Pietikäinen et al., 2000).

L'effetto diretto ed immediato dell'incendio sulla microbiologia del suolo è normalmente una riduzione della biomassa microbica.

Molti autori hanno riscontrato un effetto negativo sui microrganismi subito dopo il passaggio del fuoco (Meiklejohn, 1955; Ahlgren 1965; Dunn et al., 1979; Theodorou e Bowen 1982; Deka e Mishra, 1983), in particolare sui funghi (Wright e Bollen 1961; Ahlgren e Ahlgren, 1965; Widden e Parkinson, 1975; Tiwari e Rai, 1977).

Diversi esperimenti sono stati condotti in laboratorio per valutare l'effetto dell'aumento della temperatura sui microrganismi del suolo.

In generale temperature intorno ai 70°-80°C uccidono molti microrganismi che sono più sensibili al riscaldamento rispetto ad altri. (Klopatek et al., 1988; Pattinson et al., 1999).

Ciardi (1998) ha trovato una forte diminuzione di ATP quando il terreno è ad una temperatura di 60°C, mentre a temperature di 115 e 150°C i microrganismi sono quasi completamente scomparsi (Ciardi et al., 1998).

Mentre un breve riscaldamento di 50-60°C è in grado di stimolare la germinazione di spore fungine (Bollen, 1969).

Molti microrganismi sono in grado di sopravvivere come spore termoresistenti (Alexander et al., 1967), come il fungo *Neosartorya fischeri* sopravvive al fuoco e diventa dominante nella fase post incendio (Bartoli et al., 1991), in quanto le sue ascospore sono termotolleranti e la loro germinazione è stimolata dallo stress termico (Warku e Baker., 1963).

L'effetto del calore è fortemente legato alle temperature e alla durata del riscaldamento.

Raison (1979) ha visto che temperature superiori a 127°C sono sufficienti per sterilizzare il terreno.

Gli effetti del fuoco sui microrganismi del suolo variano molto: questo è da attribuirsi a diversi fattori che operano contemporaneamente, quali l'umidità del suolo, la profondità del campionamento, la gravità ed intensità dell'incendio ed i tempi di campionamento post incendio (Mataix-Solera et al., 2009).

Tuttavia altri autori come Labeda et al., (1975), hanno dimostrato che anche un'esposizione a 160°C per 3 ore non è sufficiente per la completa sterilizzazione dei microrganismi del suolo.

La maggior parte delle indagini riguardanti gli effetti del fuoco sulla microbiologia del suolo, sono concentrati sulle variazioni e sull'attività della

biomassa microbica totale e sulle misurazioni delle attività enzimatiche (Mataix –Solera et al., 2009).

Mentre invece esistono ben pochi studi sulle conseguenze della struttura microbica in seguito al passaggio del fuoco (Bergner et al.,2004; D’ascoli et al.,2005).

Per questo risulta particolarmente importante porre più attenzione allo studio degli effetti del fuoco sulle proprietà microbiologiche del suolo.

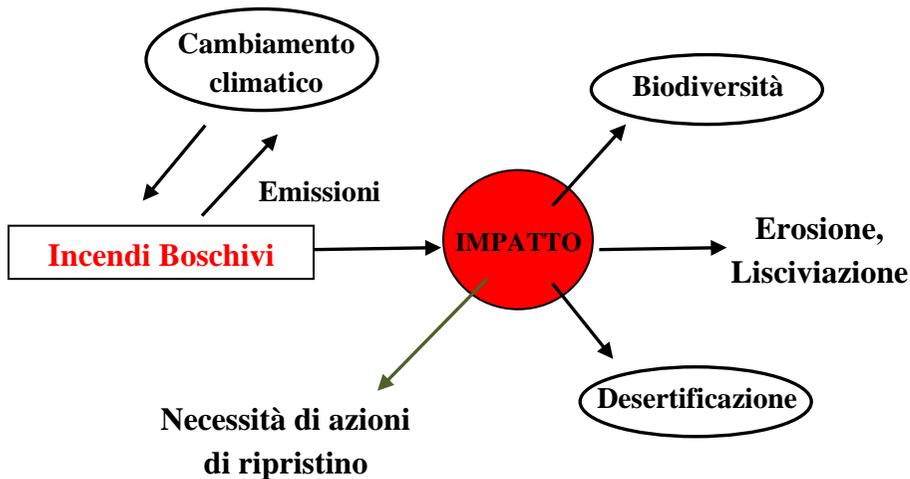


Fig.1 Gli effetti degli incendi sulle foreste e sul suolo

4.II DNA extracellulare nel suolo

Ottenere informazioni sempre più dettagliate sulla struttura delle comunità microbiche in seguito ad un evento di disturbo come quello del passaggio del fuoco, a livello dell’ecosistema suolo, permetterà di avere maggiori conoscenze utili per pianificare azioni di ripristino e di salvaguardia della biodiversità microbica edafica, vista l’importanza che riveste.

A tal proposito lo studio del DNA extracellulare (eDNA) nel suolo, ha dato negli ultimi anni, interessanti risultati che fino ad oggi, non erano stati

ampliati allo studio di un suolo particolarmente disturbato, come può essere quello bruciato.

L'eDNA nel suolo rappresenta una fonte potenziale di materiale genetico nell'ambiente che può essere acquisita attraverso il processo della trasformazione (de Vries and Wackernagel, 2002) (Duggan et al., 2000) (Smalla and Sobecky, 2002), (Pietramellara et al., 1997) (Ceccherini et al., 2003). Tuttavia l'eDNA è una fonte di carbonio, di fosforo e azoto per i microrganismi terrestri ed acquatici (Finkel and Kolter 2001) (Matsui et al., 2003) (Dell'Anno et al., 2002). Si è accertato di recente che il 65% del DNA presente negli oceani si trova nei sedimenti profondi e circa il 90% di questo è eDNA, riserva di N e di P organico per i microrganismi marini (Dell'Anno and Danovaro, 2002). L'eDNA è anche una fonte di nucleotidi extracellulari utili per la sintesi *ex novo* di DNA microbico (Franchi et al., 1999). Si pensa che l'eDNA abbia svolto un ruolo nell'origine della vita e nell'evoluzione. (Franchi et al., 1999) (Agnelli et al., 2004). Oggi si pensa che l'eDNA svolga un ruolo importante nella formazione di biofilm batterico come quello di *Pseudomonas aeruginosa*. L'eDNA dei biofilms sarebbe quantitativamente più importante del DNA cellulare (Steinberger and Holden , 2002). L'uso di OGM nella pratica agronomica ha reso lo studio di eDNA ancor più importante perché tramite il processo di trasformazione il DNA transgenico rilasciato nel suolo può essere inglobato nel genoma della microflora del suolo. Infine si è dimostrato che l'eDNA può spostarsi nel suolo in seguito al movimento dell'acqua in favore o contro gradiente di gravità (Ceccherini et al., 2007). Perciò l'informazione genetica extracellulare si può muovere e raggiungere microrganismi separati nello spazio e nel tempo dal punto in cui la molecola di eDNA è stata rilasciata.

5.Suoli estremi: effetti della contaminazione antropica da metalli pesanti nel suolo

La contaminazione antropica ambientale è l'immissione o il prelievo di materia o energia da un ecosistema in conseguenza di attività umane quali agricoltura, industrializzazione, urbanizzazione, attività civili, sfruttamento di risorse naturali, tali da modificare temporaneamente o in modo persistente una o più caratteristiche chimico-fisiche originarie e disponibilità e qualità delle risorse (Vighi e Bacci, 1998).

Il suolo reagisce alla contaminazione antropica rispetto ai comparti ambientali idrico e atmosferico, in modo differente per le proprietà dei suoi costituenti che reagiscono con i contaminanti organici, inorganici e biologici quasi sempre tamponandone gli effetti acuti.

Il legame tra componenti reattive organo-minerali del suolo ed inquinanti riducono la loro biodisponibilità e mobilità con generale attenuazione della tossicità verso gli organismi.

Gli inquinanti organici che raggiungono il suolo provengono dalle attività antropiche: pesticidi, idrocarburi alifatici aromatici rilasciati da industrie, inceneritori e traffico veicolare, policlorobifenili e diossine.

Questa classe di inquinanti può essere modificata nella struttura molecolare e nella composizione chimica dall'attività microbica.

Su questi inquinanti la componente biotica del suolo è quella che influisce maggiormente: l'utilizzo di microrganismi capaci di degradare composto organici persistenti in siti contaminati, è descritto da Ho et al., 2000.

Gli inquinanti inorganici che interessano il suolo sono invece gli elementi in traccia, gli alogenuri, amianto, cianuro, leghe, ed elementi radioattivi, il quale destino nel suolo dipende dalle proprietà dell'inquinante, dal tipo di suolo, dal regime climatico e in modo variabile, dall'attività microbica.

L'accumulo degli elementi in traccia si verifica quando la velocità di ingresso nel suolo supera quella di fuoriuscita e l'entità dell'accumulo dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del suolo.

Stigliani (1992) definì i suoli contaminati da elementi in traccia come "bombe chimiche ad orologeria" pronte a rilasciare grandi quantità di inquinanti nella biosfera, idrosfera ed atmosfera alla proporzionale variazione delle proprietà chimiche, fisiche e biologiche del suolo.

Gli elementi in traccia che più frequentemente hanno determinato l'inquinamento del suolo sono As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb,

Sn, V, Zn. Alcuni elementi non svolgono funzioni biologiche note e sono in genere tossici a bassissime concentrazioni, a causa di fenomeni di sostituzione di elementi essenziali o per formazione di radicali superossido o per la loro elevata affinità verso i gruppi tiolici delle proteine con seguente interferenza nelle reazioni biochimiche. (Payne et al., 1998).

L'arricchimento della pedosfera di metalli pesanti è dovuto principalmente alla deposizione secca ed umida dell'atmosfera, causata dalle emissioni industriali e civili e per i suoli ad uso agricolo, dalla fertilizzazione chimica e dall'uso dei fanghi di depurazione come ammendanti e fertilizzanti.

Per cui gli elementi in traccia (TECS) rappresentano una costante minaccia per gli ecosistemi del suolo, ostacolando la crescita delle piante e riducendone la sua funzionalità.

In primo luogo riducono la biomassa e l'attività microbica per la scomparsa delle specie sensibili (Giller et al., 1998), l'inibizione della mineralizzazione della sostanza organica e delle attività enzimatiche (Tyler et al., 1989) con seguente rallentamento dei cicli biogeochimici.

Ure e Davidson (2002), con il termine "speciazione" definiscono il processo che porta ad identificare e quantificare le frazioni di elementi in traccia nel suolo.

Vari protocolli di estrazione con un singolo solvente, con coppie o estrazioni con vari solventi, sono normalmente utilizzati per valutare lo stato degli elementi in traccia nei suoli contaminati e per prevenire i rischi nel tempo e nello spazio, a loro legati. (Peijnenburg et al., 2007)

Una tecnica annoverata per far fronte a fenomeni di inquinamento antropico, in cui vengono impiegate piante e/o ammendanti, è la fitostabilizzazione a lungo termine.

Tecnica normalmente applicata *in situ* che prevede l'immobilizzazione degli elementi in traccia in forme non mobili e non biodisponibili, anche se non riduce la quantità di inquinanti presenti nel suolo, intervenendo pertanto sulla ripartizione degli elementi in traccia riducendone la frazione scambiabile e solubile. (Vassilev et al., 2004).

In un suolo con elevata tossicità la fitostabilizzazione può essere assistita dall'uso di additivi che riducano l'eccesso di elementi in traccia in soluzione attraverso processi geochimici, come l'adsorbimento, la precipitazione, lo scambio di legante e le reazioni redox (Mench et al., 2000).

Spesso combinando più additivi si recuperano le caratteristiche del suolo per la crescita delle piante, come la neutralizzazione del pH, la disponibilità di nutrienti, il miglioramento della struttura (Vangronsveld et al., 1996).

Come riportato da Lombi et al., 2003; Adriano et al., 2004; Mench et al., 2006; Kumpiene et al., 2008, sono diversi e differenti gli additivi utilizzati per l'immobilizzazione *in situ* degli elementi in traccia, in base al loro effetto sulla mobilità degli elementi, pH e struttura del suolo, e in funzione della rivegetazione che si vuole ottenere, nonché in base alla loro reperibilità locale e loro costo.

La letteratura riporta diversi esempi relativi all'efficacia della stabilizzazione assistita (Geebelen et al., 2006; Hamon et al., 2002; Vangronsveld et al., 1995).

Lo scopo dell'applicazione di questa tecnica è quello di portare un incremento della funzionalità del suolo ed un ripristino delle funzioni ecosistemiche, favorendo il recupero della biodiversità vegetale, animale e microbica, come riportato da Mench et al., 2006; Renella et al., 2008; Kumpiene et al., 2009; Ascher et al., 2009).

Tecnica quindi che non riduce il contenuto totale degli elementi in traccia ma tenta di attenuare in modo naturale i loro effetti negativi. e verificare l'effettiva ripresa della funzionalità del suolo trattato.

La funzionalità del suolo è influenzata in modo negativo dalla sua contaminazione e tossicità e le proprietà biochimiche possono essere utilizzate come precoci indicatori dell'impatto della contaminazione, in quanto la loro risposta anticipa gli effetti più visibili quali la perdita di fertilità o la variazione del contenuto di sostanza organica (Dick, 1994).

Informazioni meno approfondite sono disponibili sulla funzionalità dei suoli contaminati e recuperati tramite tecniche di fitobonifica.

Questa carenza è probabilmente dovuta alla minore disponibilità di dati a causa dell'esiguità delle sperimentazioni e del tempo trascorso dalla messa a punto delle tecniche *in situ*, nonché dalle poche conoscenze di fondo sulla modalità di colonizzazione del suolo da parte dei microrganismi.

Conseguentemente a ciò, questa tecnica necessita di un monitoraggio per valutare la stabilizzazione nel tempo e verificare l'effettiva ripresa della funzionalità del suolo trattato, quindi definire gli eventuali interventi per evitare il rilascio di elevate quantità di elementi in traccia dai suoli trattati.

6.SCOPO DEL LAVORO

Effetto del fuoco sulla componente microbiologica di un suolo forestale

Relativamente all'effetto dell'incendio sulle proprietà biologiche del suolo, ad oggi, la letteratura non riporta sufficienti studi che illustrino in modo più dettagliato questo tipo di aspetto, così come invece risulta nel caso degli effetti che l'incendio provoca sulle proprietà chimico-fisiche del suolo.

Le nozioni sull'argomento ad oggi, sono molto contrastanti tra loro e necessitano di ulteriori studi che supportino le tesi già presenti e diano un ulteriore e valido contributo scientifico per poter capire meglio questo tipo di aspetto, considerando l'importanza che i microrganismi hanno nel funzionamento dell'ecosistema suolo, come già espressamente riportato in precedenza.

Questo è quanto è emerso anche nel corso dell'ultimo Congresso Internazionale di settore, FESP 2013, al quale ho partecipato con il contributo "*Wildfire effects on forest soil microbial community structure assessed by comparative molecular analyses of DNA (extracellular vs. intracellular) and RNA.*" (sessione poster), riportando i risultati preliminari di parte del lavoro oggetto del mio Dottorato di Ricerca.

Identificando i potenziali ed effettivi effetti negativi post incendio, è possibile di conseguenza intraprendere azioni di mitigazione, di riabilitazione e di ripristino.

Questo studio è suddiviso in due parti.

In una prima parte, alla luce delle suddette considerazioni, l'obiettivo principale è stato quello di esaminare l'effetto del fuoco sulla diversità delle comunità microbiche batteriche e fungine in un suolo forestale, tramite screening molecolare.

Sono stati scelti due tempi di campionamento:

- Tre giorni dopo l'incendio.
- 10 mesi dopo l'incendio.

Tramite fingerprinting genetico è stata valutata la frazione di DNA totale, suddivisa e studiata nelle sue due frazioni: DNA intracellulare (iDNA) e DNA extracellulare (eDNA), allo scopo di ottenere informazioni aggiuntive sul metagenoma di questo suolo, ed avere un quadro descrittivo della struttura delle popolazioni microbiche pre incendio (suolo non bruciato con stesse caratteristiche pedoclimatiche di quello bruciato) e post incendio di

maggior dettaglio, soprattutto considerando anche l'importanza ecologica dello studio dell'eDNA come riportato da Ascher et al., 2007.

In una seconda parte lo stesso suolo è stato studiato valutando l'effetto del fuoco sugli aggregati del suolo.

Gli aggregati sono l'unità strutturale di base del suolo, definiscono microhabitat speciali e proteggono sia la materia organica del suolo che il microbiota da effetti negativi in condizioni ambientali difficili, come può essere il passaggio del fuoco.

Per valutare questo effetto protettivo sulla microflora del suolo e sul DNA del suolo, sono stati ottenuti per setacciatura a secco, dalla frazione di 2 mm, 3 differenti classi di aggregati:

- 1-0,5mm
- 500-100 µm
- <100µm

Tutte le classi di aggregato sono state valutate in termini di biomassa microbica (iDNA double strand) e di struttura delle comunità microbiche.

Per valutare l'effetto di ossidazione e dell'alta temperatura sul DNA del suolo, anche in questo caso è stato analiticamente discriminato il metagenoma del suolo nella frazione di eDNA e di iDNA mediante estrazione sequenziale e fingerprinting genetico comparativo (PCR-DGGE) delle due frazioni di DNA considerate.

Primo Monitoraggio di due esperimenti condotti tramite fitostabilizzazione assistita sulla componente microbiologica di suoli contaminati da metalli pesanti.

In questo secondo caso studio di suoli in condizioni estreme, si vuole valutare nel tempo la funzionalità di due differenti suoli, recuperati tramite fitostabilizzazione assistita: un suolo del distretto minerario Cartagena –La Union (Spagna) ed un suolo del Nord della Svezia, vicino Slagnas.

In entrambi i casi di studio è stato effettuato un primo monitoraggio per testare l'efficienza della fitostabilizzazione assistita e valutarne gli effetti sulla modalità di colonizzazione del suolo trattato da parte dei microrganismi, confrontando due differenti momenti di campionamento: subito dopo la fitostabilizzazione assistita e dopo alcuni anni, in modo da definire se nel tempo l'applicazione di questa tecnica provoca un miglioramento del suolo da un punto di vista funzionale, oppure non determina alcuna variazione.

Tramite fingerprinting genetico comparativo (PCR-DGGE) è stata valutata la frazione di DNA totale (tDNA) in entrambi i suoli, così da avere un quadro descrittivo della struttura delle popolazioni microbiche, batteriche e fungine, nei due momenti temporali considerati sopra.

PRIMA PARTE

EFFETTO DEL FUOCO SULLE PROPRIETA' MICROBIOLOGICHE DI UN SUOLO FORESTALE

7.1 MATERIALI E METODI

7.1.1 Area di campionamento e schema sperimentale

L'area di studio percorsa da incendio è localizzata ad Orentano (Lu), (Fig.2, 3) 30 km ad est di Pisa, Toscana, Italia centrale. Il substrato arboreo è costituito da bosco misto di roverella e pino marittimo (*Quercus pubescens* e *Pinus pinaster*) e un sottobosco a prevalenza di felce comune e rovo (*Pteridium aquilinum* e *Rubus spp*). Il suolo è classificato come *endoskeletalric Acrisols Plinthic* secondo la base di riferimento mondiale per le risorse del suolo (IUSS Working Group WRB, 2006).

L'area bruciata nel Luglio del 2011 è relativamente piccola, 3,3 ha, e l'intensità dell'incendio è classificata come medio- alta, basandosi sulla scala delle intensità del fuoco (Chafer et al., 2004).

L'area bruciata è stata comparata ad un'area non bruciata adiacente, considerata come bosco di controllo, simile per caratteristiche pedoclimatiche alla precedente.



Fig.2 Area di studio, Orentano, Toscana, Italia.

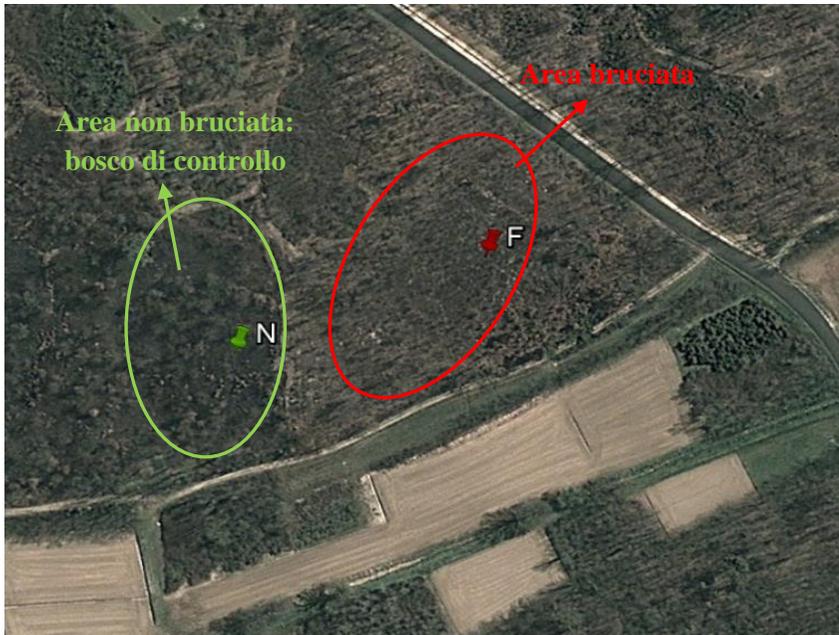


Fig.3 Foto aerea dell'area bruciata rispetto all'area non bruciata, Orentano (LU).



Fig.4 Il bosco adiacente all'area bruciata al momento del campionamento.



Fig.5 *L'area bruciata ad Orentano come si presentava al momento del campionamento, 3 giorni dopo l'incendio.*



Fig.6 *L'area bruciata ad Orentano al momento del campionamento 10 mesi dopo l'incendio.*

Il campionamento nell'area colpita da incendio è stato effettuato su quattro transetti paralleli ognuno lungo 20 metri, a distanza di 5 m l'uno dall'altro, dove sono state effettuate 5 buche ogni 5 metri, per ogni lato, e sono stati prelevati campioni di suolo a profondità di 0-2,5cm (strato di suolo interessato dall'incendio) e 5-10 cm (strato di suolo non interessato dall'incendio), dopo aver rimosso e a sua volta prelevato, lo strato superficiale organico combusto (Fig.7).

Nell'area attigua non colpita da incendio (Fig.3), è stato effettuato un ulteriore campionamento su due strisce lunghe 10 metri dove sono state aperte rispettivamente 5 buche ed effettuato il campionamento alle profondità precedentemente riportate.

I campioni di suolo sono stati trasportati in laboratorio in ghiaccio e stoccati in freezer a -20° C, prima di essere sottoposti a vagliatura con setaccio a 2mm.

Il primo campionamento è stato effettuato 3 giorni dopo l'incendio (Fig.4), mentre il secondo 10 mesi dall'incendio (Fig.5), dopo un periodo di tempo sufficiente perché si ripristinasse parte della copertura vegetale antecedente il passaggio del fuoco. Lo schema di tutti i campioni è riportato in tabella 1.

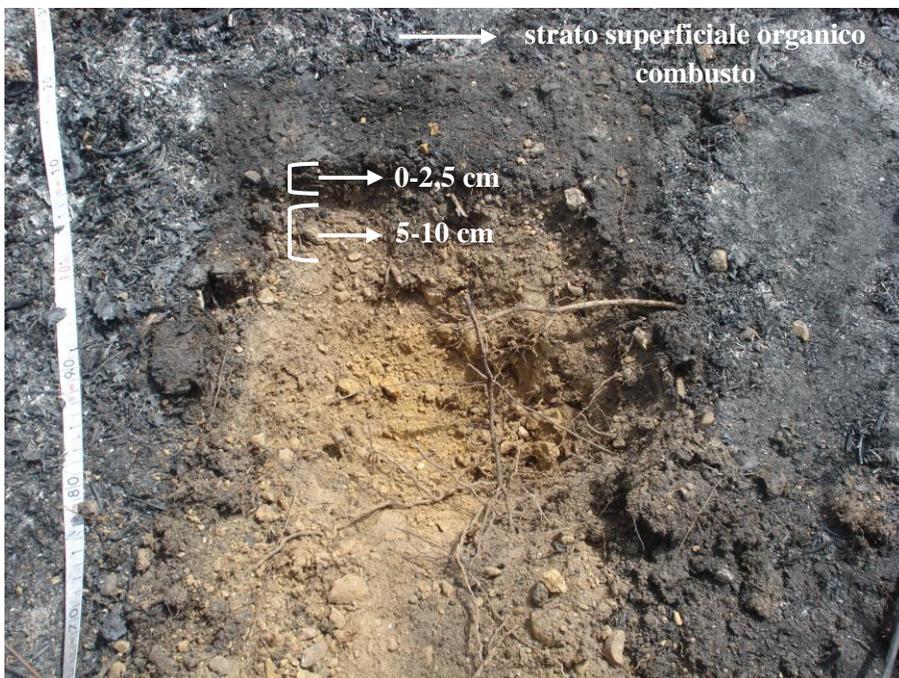


Fig.7 Apertura buca per prelievo campioni di suolo.

Tempo di campionamento	Profondità campionamento	Tipo di suolo	Nome dei campioni
3 giorni dopo incendio	0-2,5 cm	Non Bruciato- (Controllo)	<u>C1</u> (A,B,C,D)
3 giorni dopo incendio	5-10 cm	Non Bruciato- (Controllo)	<u>C2</u> (A,B,C,D)
3 giorni dopo incendio	Strato superficiale	Bruciato	<u>S1</u> (A,B,C,D)
3 giorni dopo incendio	0-2,5 cm	Bruciato	<u>B1</u> (A,B,C,D)
3 giorni dopo incendio	5-10 cm	Bruciato	<u>B2</u> (A,B,C,D)
10 mesi dopo incendio	Strato superficiale	Bruciato	<u>S1P</u> (A,B,C,D)
10 mesi dopo incendio	0-2,5 cm	Bruciato	<u>B1P</u> (A,B,C,D)
10 mesi dopo incendio	5-10 cm	Bruciato	<u>B2P</u> (A,B,C,D)

Tab.1 Schema nominativo di tutti i campioni studiati, per tempo di campionamento, profondità di campionamento e tipo di suolo (bruciato e di controllo), con repliche di campo.

7.1.2 Caratterizzazione molecolare delle comunità microbiche del suolo

7.1.2.1 Estrazione del DNA dal suolo

Estrazione sequenziale del DNA extracellulare (eDNA) e del DNA intracellulare (iDNA).

Ottimizzazione del protocollo per un suolo bruciato.

L'estrazione dell'eDNA dal suolo con tampone alcalino Na_2HPO_4 0,12 M, pH 8 è basata sul protocollo di Ogram et al., (1987) che è stato adattato ed ottimizzato per il suolo (Ceccherini et al., 2007).

Partendo dal protocollo di base di Ceccherini et al., (2007) sono state apportate ulteriori modifiche per adattarlo al suolo bruciato, viste le difficoltà iniziali nell'utilizzo del suddetto protocollo a causa del forte assorbimento del tampone sul suolo bruciato.

Quindi sono state effettuate diverse prove per riuscire a trovare un adeguato volume di tampone alcalino che evitasse l'assorbimento del suolo e che al tempo stesso permettesse un adeguato e sufficiente movimento orizzontale di tutto il suolo all'interno dei tubini posti nello shaker, fondamentale per la buona riuscita dell'estrazione dell'eDNA.

Per cui i campioni di suolo (0,5 g) sono stati lavati con 1 ml di tampone alcalino, anziché 500 μl iniziali, in eppendorf da 2ml ed incubati a temperatura ambiente per 30 minuti in uno shaker orizzontale: dopo aver centrifugato a 4°C per 15 minuti a 14.000 rpm, il surnatante è stato raccolto in un nuovo tubo.

L'estrazione è stata ripetuta sul suolo residuo per altre due volte, effettuando lavaggi con 500 μl di tampone alcalino, evitando l'utilizzo del vortex per risospendere il suolo nel tampone, onde evitare scosse troppo forti che potrebbero compromettere la buona riuscita dell'estrazione: i surnatanti sono stati riuniti nello stesso tubo per poi passare alla fase di purificazione del DNA estratto, tramite procedura *GeneClean*[®] (BIO 101), che prevede l'uso di una resina a scambio anionico.

Il protocollo BIO 101 è stato modificato trattando il DNA legato alla resina "Binding Matrix" tre volte con Guanidine Thyocinate 5.5M, prima di sottoporlo ai lavaggi con SEWS (Salt Ethanol Wash Solution), per purificare

ulteriormente il DNA, così da assicurare maggior successo nell'amplificazione tramite PCR.

Sul PELLET del suolo residuo proveniente dall'estrazione dell'eDNA è stato estratto il DNA intracellulare (iDNA), come riportato da Ascher et al., (2009).

Nel caso dell'estrazione sequenziale, nella fase di purificazione, sono stati implementati i lavaggi con SEWS da due a quattro, così da assicurare maggior successo nell'amplificazione tramite PCR, visto il particolare suolo su cui ho lavorato.

7.1.2.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA estratto

Quantificazione spettrofotometrica

Per conoscere il grado di purezza (assenza di contaminanti co-estratti quali proteine, polisaccaridi o fenolo introdotto con la purificazione), i campioni sono stati analizzati tramite *Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer* (Picodrop, UK).

Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli acidi nucleici.

Inoltre l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

- $\lambda = 230$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati complessi e fenoli;
- $\lambda = 280$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento delle proteine;
- $\lambda = 320$ nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento specifico.

Noti questi valori è possibile:

- determinare la concentrazione di DNA (o RNA) mediante la formula concentrazione $[\text{ng}/\mu\text{l}] = (A_{260} - A_{320}) \times \text{fd} \times \text{fc}$ dove fd è il fattore di diluizione e fc è il coefficiente di estinzione molare medio che dipende dalla natura dell'acido nucleico.

Acido nucleico	fc [ng/μl]
DNA ds	50
DNA ss	33
RNA ss	40

- stimare il grado di purezza del DNA (o RNA) in funzione di contaminazioni da carboidrati complessi e da proteine; buoni indici di purezza di acidi nucleici (DNA, RNA) devono avere il rapporto $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2$ e $A_{260}/A_{230} = 1,8 - 2,2$.

Tutti i campioni sono stati quantificati tramite spettrofotometro, prelevando 3 μl di eDNA e di iDNA da ognuno, con la possibilità di poterlo recuperare dopo la lettura, senza avere cross-contaminazioni tra letture consecutive, grazie all'utilizzo dell'apposito puntale.

Quantificazione fluorimetrica

La concentrazione degli acidi nucleici è stata misurata con il fluorimetro (*Qubit Fluorometer*[™], Invitrogen, Molecular Probes, USA), che permette di effettuare misure di fluorescenza tramite l'uso di fluorofori. È stato utilizzato il kit per l'analisi del DNA, *Quant-iT*[™] *dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, USA).

I principali vantaggi nell'utilizzo della fluorescenza rispetto ad altre misure di assorbimento sono la sensibilità e l'accuratezza in quanto il segnale di fluorescenza parte da un background pari a zero, e la specificità per il DNA a doppia elica (dsDNA).

L'intensità della fluorescenza è linearmente proporzionale alla concentrazione dell'analita. Per determinare la concentrazione emessa da ogni campione analizzato occorre effettuare la calibrazione dello strumento con due standard forniti dalla casa produttrice in modo da ottenere una curva di riferimento.

Ogni campione di eDNA e di iDNA è stato quantificato anche tramite l'utilizzo di questa tecnica, utilizzando 10 μl di eDNA e 2 μl di iDNA cadauno.

Tecnica elettroforetica

Le rese d'estrazione e la qualità, in termini di maggiore o minore degradazione del DNA estratto, sono state definite mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% , contenete bromuro d'etidio (10 mg/ml), un colorante fluorescente che assorbe nell'UV ed emette una luce rosso – arancio nel visibile a 590 nm e che contenendo un gruppo planare, si intercala tra le basi del DNA, rendendolo visibile.

La corsa di ogni gel d'agarosio è durata 60 minuti a 100V.

7.1.2.3 Amplificazione del DNA estratto tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)

Messa a punto di un Protocollo per la 16rDNA PCR applicato ad un suolo bruciato: Approccio “Nested” PCR .

1° PCR primers P0 / P6.

2° PCR primers 341f gc/ 534r

Per l'amplificazione del DNA estratto, dato il basso numero delle sequenze geniche “ target”, è stato necessario applicare e metter a punto ex novo un approccio di NESTED PCR che prevede due PCR consecutive (Fig.8).

La prima PCR è stata effettuata con primers universali per gli eubatteri, P0 e P6 (Marchesi et al., 1998) che sono specifici per le posizioni 27 e 1492 del 16S rDNA della regione variabile V6; con questa amplificazione si genera un amplicone di 1465 bp, utilizzando 80 ng di DNA stampo.

<u>Mix per un campione</u>	<u>Concentraz. iniziale</u>	<u>Volume (µl)</u>
H ₂ O UHQ		20,5
P0f	[10 µM]	2
P6r	[10 µM]	2
Buffer (con MgCl ₂)	[10X]	5
BSA	[5mg/ml]	10

dNTP mix	[10 µM] ciascuno	2
TAQ Dream	[5U/µl]	0,5
DNA STAMPO	[10 ng/µl]	8
Mix finale		42
Volume finale		50
H ₂ O UHQ		11,625
gc341f	[10 µM]	0,625
UNI534r	[10 µM]	0,625
Buffer (con MgCl ₂)	[10X]	5
BSA	[5mg/ml]	10
dNTP mix	[10 µM] ciascuno	0,625
TAQ Dream	[5U/µl]	0,5
DNA STAMPO	[10 ng/µl]	6
Mix finale		19
Volume finale		25

Tab.2 *Mix di reagenti delle due PCR.*

Il prodotto della 1° PCR è stato successivamente amplificato mediante una seconda PCR con i primers gc 341f, al quale è legato un *gc clamp* di 40 bp, e UNI 534r, regione V3 (Garbers et al., 2004) che produce un amplicone di 200 bp, utilizzando 6 µl del prodotto della 1° PCR.

La miscela delle due reazioni di PCR, è riassunta in Tab.2

Le due PCR sono state eseguite con il termociclatore Biorad. La prima PCR con primers P0 e P6, ha previsto una denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti, seguita da 2 cicli di denaturazione, ibridazione ed estensione a 95°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto, ed altri due cicli di denaturazione, ibridazione ed estensione a 95°C per 30 secondi, 57°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto. Successivamente sono stati effettuati ulteriori 22 cicli della stessa durata e alle stesse temperature delle precedenti, tranne quella di ibridazione a 54°C con un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.

I cicli delle due PCR sono riassunti in Tab.3.

1°PCR P0/P6	T °C	Durata .minuti	N°cicli
Denat.iniziale	94	3	1
Denaturazione	95	30sec	2

Ibridazione	60	30sec	
Estensione	72	1	
Denaturazione	95	30 sec	2
Ibridazione	57	30 sec	
Estensione	72	1	
Denaturazione	95	30 sec	21
Ibridazione	54	30sec	
Estensione	72	1	
Estensione finale	72	7	1
2°PCR gc 341f/534r	T °C	Durata .minuti	N°cicli
Denat.iniziale	94	4	1
Denaturazione	94	30 sec	
Ibridazione	54	1	
Estensione	72	1	35
Estensione finale	72	5	1

Tab.3 Cicli della 16srDNA Nested PCR con Primers P0 e P6/ gc341f e UNI 534r.

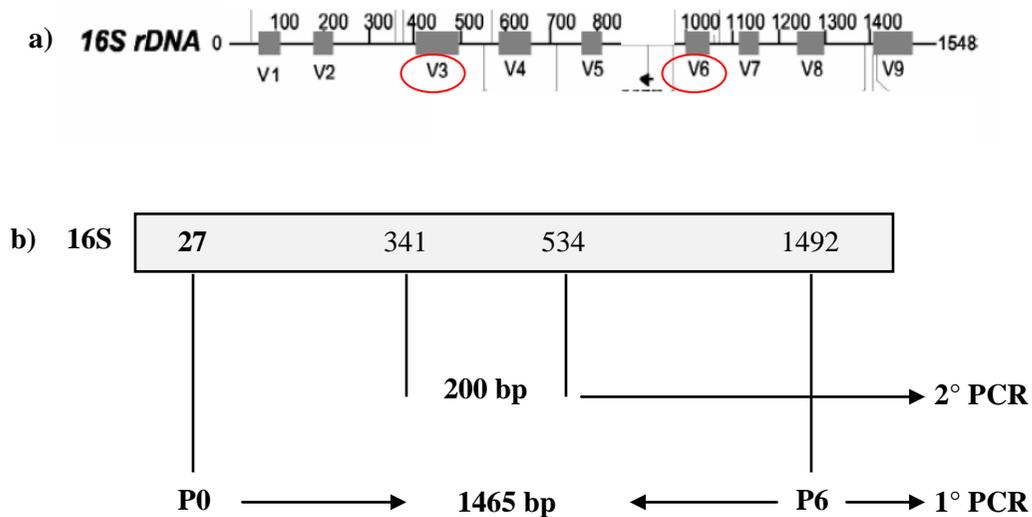


Fig.8 a) Rappresentazione delle regioni del 16S. b) Schema della 16S rDNA PCR Nested.

Approccio “Nested” PCR per l’amplificazione del 18S rDNA.

1° PCR primers NS1 f / NS8r

2° PCR primers Ef4f / NS3 gc r

La composizione delle comunità fungine nel suolo è stata determinata mediante la PCR del 18S rDNA con primers universali specifici per i funghi. E’ stata effettuata una NESTED PCR sul 18S rDNA fungino (Fig.9).

La prima PCR è stata effettuata su 40 ng di DNA stampo, utilizzando i primers NS1f/NS8r (Kowalchuk, 1999) (Tab.4), che amplificano quasi l’intero 18S rDNA generando ampliconi di dimensioni pari a 1.7 kb (kilobasi). Di seguito 2 µl di questi ampliconi, per la frazione di iDNA, mentre 6 µl per la frazione di eDNA, della prima PCR, sono stati sottoposti ad una seconda PCR con primers EF4f/ NS3 GC r (Brodie et al., 2003), che produce ampliconi di 564 bp ai quali viene aggiunto un “ GC clamp”, così da avere un campione idoneo per la DGGE.

Mix (per 1 campione)	Conc.iniziale	V [µl]	
H ₂ O UHQ		24,48	
Primer NS1	[10 µM]	2	
Primer NS8	[10 µM]	2	
Buffer (con MgCl ₂)	[10x]	5	
BSA	[500 µg/ml]	10	
dNTPs	[10 mM]cad.	2	
TAQ Dream	[5 U/µl]	0,52	
Mix finale		46	
DNA stampo	[10ng/µl]	4	
V finale		50	
		iDNA	eDNA
H ₂ O UHQ		36,24	32,24
Primer EF4 f	[10 µM]	2	2
Primer NS3 GC r	[10 µM]	2	2
Buffer (con MgCl ₂)	[10x]	5	5
dNTPs	[10 mM]cad	2	2

TAQ Dream	[5 U/ μ l]	0,76	0,76
Mix finale		48	46
DNA stampo		2	6
V finale		50	50

Tab.4 *Mix di reagenti delle due PCR, ottimizzato per la frazione di eDNA.*

I cicli delle due PCR sono riportati in Tab.5.

CICLO1^a PCR	T° C	Durata (minuti)	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94	2	1
Denaturazione	94	1	30
Ibridazione	50	1	
Estensione	72	1,5	
Estensione finale	72	5	1
	15	∞	

CICLO 2^a PCR			
Denaturazione iniziale	94	3	1
Denaturazione	94	1	10
Ibridazione	60	1	
Estensione	72	1	
Denaturazione	94	1	15
Ibridazione	50	1	
Estensione	72	2	
Estensione finale	72	5	1
	16	∞	

Tab.5 *Cicli delle due PCR.*

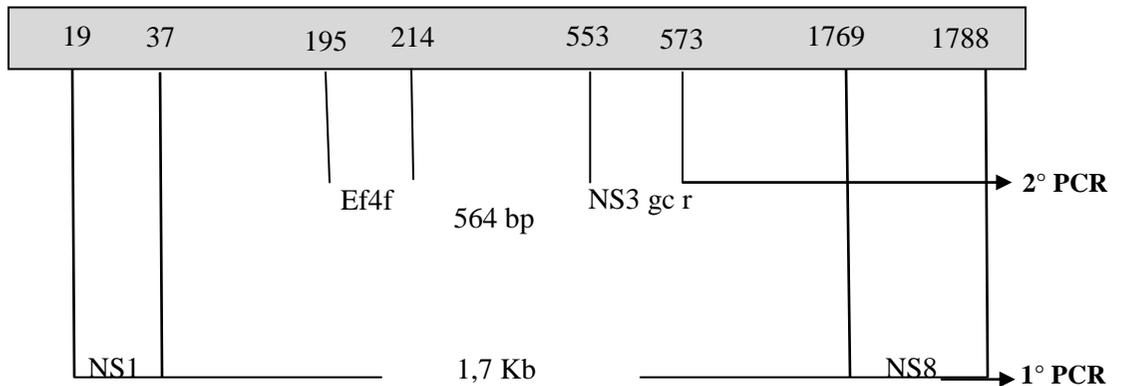


Fig.9 Schema della 18S rDNA PCR Nested.

Approccio "Nested" PCR per Archea.

1° PCR primers PRA 46f / PREA 1100 r

2° PCR primers PARCH 340 f gc / PARCH 519 r

Per amplificare gli Archea, è stato condotto un esperimento pilota in cui in un primo momento è stato applicato un approccio diretto, con primers PARCH 519 f e ARCH 915 gc r (Muyzer et al., 1993): questa coppia di primers amplifica per frammenti di 369 bp. Nel prodotto di PCR sono però risultati degli aspecifici, per cui, è stato scelto un approccio di Nested PCR per cercare di ovviare al problema, utilizzando le coppie di primers PRA 46f- PREA 1100 r (Reisenbach et al., 1992) e PARCH 340fgc- PARCH 519r (Ovreas et al., 1997).

7.1.2.4 Caratterizzazione elettroforetica dei profili amplificati mediante DGGE

16srDNA DGGE

18srDNA- DGGE

Gli amplificati sono stati caratterizzati tramite elettroforesi su gradiente denaturante di tipo chimico (DGGE), effettuata utilizzando il Sistema Ingeny. 100 ng di ogni amplificato sono stati caricati su gel verticale all'8% (p/v) (16srDNA-DGGE) e 6% (18srDNA-DGGE) di acrilamide (acrilamide, N,N'-metilenbisacrilamide, p/p, 37.5:1) con gradiente denaturante lineare di tipo "top filling" con concentrazioni di agenti denaturanti crescenti dalla sommità verso il fondo, che copriva l'intervallo 45% - 70% per la 16s rDNA- DGGE e 45% - 60% per la 18srDNA- DGGE (dove il 100% di capacità denaturante è data da una soluzione 7M di urea e 40% v/v di formamide deionizzata).

La corsa elettroforetica è durata 18 h a temperatura e voltaggio costanti, 60 °C e 80V, 58°C e 85V rispettivamente per la 16sDGGE e per la 18sDGGE, in tampone TAE 0,5 X (16sDGGE) e TAE 1X (18sDGGE).

Al termine della corsa il gel è stato visualizzato con SYBR Green I (diluito 1:10000 con TAE 0,5X e TAE 1X rispettivamente per 16sDGGE e 18sDGGE), che legandosi agli acidi nucleici li rende visibili assorbendo luce UV ed emettendo nel visibile a 520 nm.

In ogni gel oltre ai campioni è stato inserito anche un DNA "marker", DNA Ladder Plus (10kb-80 bp), cioè un riferimento comune per la corsa elettroforetica.

I gel sono stati acquisiti mediante l'acquisitore di immagini Bio-Rad.

Sono stati preparati 4 gel in totale, due gel per la 16srDNA-DGGE per le frazioni di iDNA e di eDNA, e due gel per la 18srDNA-DGGE sempre per le frazioni di iDNA e di eDNA, come riportato in Fig. 10.

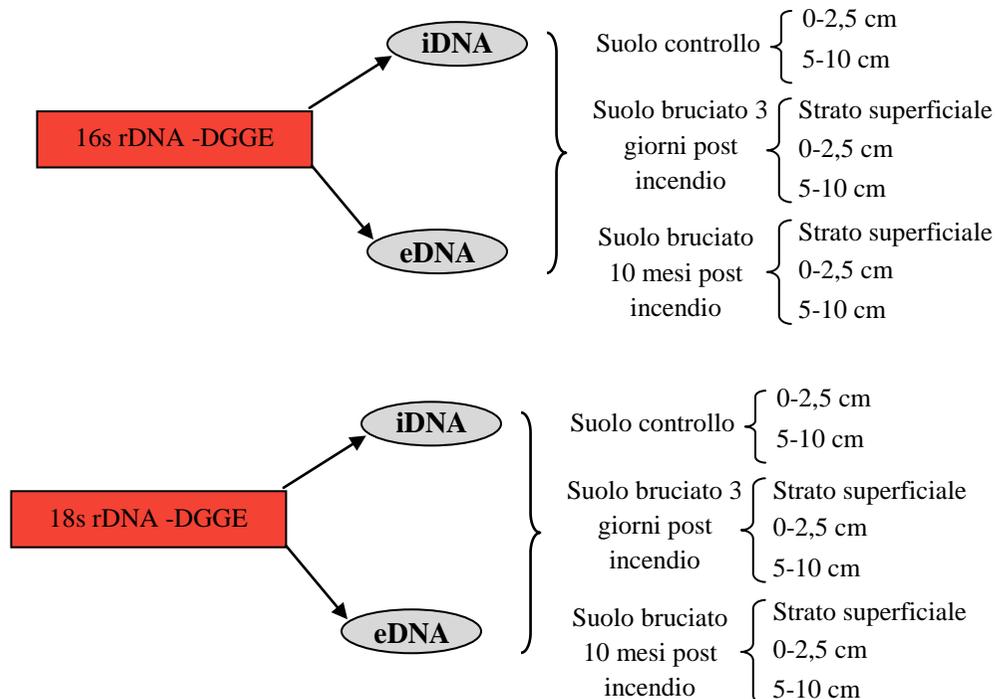


Fig.10 Schema riassuntivo delle 16srDNA-DGGE e delle 18srDNA-DGGE dei campioni di suolo studiati.

7.1.2.5 Analisi statistica dei profili elettroforetici

Le similarità tra comunità batteriche o comunità fungine di campioni diversi possono essere determinate calcolando i coefficienti di similarità (Sørensen, 1948; Nakatsu et al., 2000) che si basano sul numero di bande in comune tra due campioni; due bande si considerano uguali quando mostrano le stesse caratteristiche elettroforetiche nel gel di poliacrilamide (Nakatsu et al., 2000). Per procedere al calcolo del coefficiente di similarità si conta il numero delle bande per ogni gel. Poi si confrontano gel di due diversi campioni considerando il numero di bande in comune (a), quelle presenti soltanto nel gel 1 (b) e quelle presenti solamente nel gel 2 (c). Quindi si calcola l'indice di similarità: nella mia tesi è stato scelto quello di Dice: $2a / 2a + b + c$.

I profili dei gel sono stati analizzati con il programma *Quantity one*[®] che permette di effettuare un'analisi statistica dei gel, consentendo di valutare le differenze tra i vari profili elettroforetici con formazione di un dendrogramma che tiene conto della similarità tra i diversi campioni.

E' stato in particolare usato l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis), nella CLUSTER ANALYSIS, con opzione del programma che consente di valutare non solo la posizione delle bande nel gel, ma anche la loro intensità, ambedue usate come parametro per creare i cluster.

Da un punto di vista concettuale il funzionamento del programma è basato sulle diverse sequenze: considerando n il loro numero, d_{ij} sono le distanze tra i e j raggruppate in grappoli. Un grappolo (cluster) contiene un certo numero di punti e la distanza tra due grappoli si definisce come la media delle distanze dei punti dei due grappoli. Cioè per due clusters A e B la distanza è data da:

$$D_{AB} = 1 / (|A| + |B|) \cdot \sum_{i \in A, j \in B} d_{ij}$$

All'inizio abbiamo n clusters, ognuno costituito da un punto; il programma individua i due clusters più vicini (A e B) e quindi raggruppa A e B in un nuovo grappolo che quindi contiene A e B; quindi viene calcolata la distanza tra il nuovo cluster e gli altri clusters ed infine la procedura termina quando si rimane con un solo cluster.

Si tratta quindi di un semplice algoritmo che valuta da un insieme di numeri le distanze tra tutti gli elementi del campione, ottenendo così un secondo insieme di numeri che può essere visualizzato usando un grafico a pettine (dendrogramma). L'aspetto positivo del dendrogramma è la sua semplice lettura ed interpretazione; infatti questo grafico è di semplice leggibilità e permette di valutare visivamente il grado di similarità tra gruppi comunque selezionati secondo criteri di raggruppamento coerenti.

Il grado di affinità delle repliche delle comunità batteriche e fungine dei profili di gel DGGE è determinato da un modello di regressione logica che oscilla dal 95% al 100%, ciò significa che il limite di tolleranza è pari al 5%. Le repliche che risultano essere < 95% sono da considerarsi diverse.

7.1.2.6 Analisi delle attività enzimatiche

Gli enzimi selezionati dal suolo sono: fosfatasi acida, arilsolfatasi, fosfatasi alcalina, beta-glucosidasi e leucina amminopeptidasi (Tab.6a-6b).

Sono stati estratti dal suolo secondo il protocollo di Fornasier e Margon., 2007. 0,5 g di terreno sono stati posti in provette da microcentrifuga da 2 ml con 1,25 mL di una soluzione contenente 4% lisozima, e perle di vetro. Le provette sono state sottoposte a bead-beating utilizzando un mulino Retsch 400, a 30 colpi al secondo per 3 minuti, poi centrifugato a 20.000 g per 5 minuti. Il surnatante contenente gli enzimi desorbiti è stato dispensato in 384 pozzetti di micropiastre con tampone appropriato per quantificare fluorometricamente le attività enzimatica utilizzando come fluorescente il 4-metil-umbelliferyl-(MUF) e 4 amido-7-metil-coumarine (AMC).

L'estrazione di ogni enzima per ogni campione è avvenuta in ed i risultati sono espressi in nanomoli di MUF (o AMC) $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ di suolo secco.

ENZIMA	SUBSTRATO	CICLO
β - glucosidasi (β - gl)	Cellulosa	C
<u>Leucina a.peptidasi (Leu)</u>	Peptidi	N
Arilsolfatasi (Aryl)	Esteri solforati	S
Fosfatasi acida (Acp)	Esteri fosforici	P
Fosfatasi alcalina (Akp)	Esteri fosforici	P

Tab.6 a *Enzimi idrolitici e substrato e ciclo di appartenenza.*

7.1.2.7 Analisi statistica

E' stata condotta sul DNA estratto dai campioni di suolo (eDNA vs. iDNA) l'analisi della varianza (ANOVA), utilizzando R 2.14.1 (Project for Statistical Computing-Open Source Software).

mentre l'analisi statistica sulle attività enzimatiche è stata condotta con il programma PermutMatrix in cui i dati sono stati analizzati e visualizzati tramite un approccio grafico definito da Eisen (Eisen et al., 1998).

7.2 RISULTATI

Analisi qualitativa e quantitativa del DNA estratto

In Fig.16 a, sono riportati i profili di DNA intracellulare (iDNA) e di DNA extracellulare (eDNA) estratto da suolo bruciato e suolo di controllo a differenti profondità di campionamento, mentre in Fig. 16b sono mostrati i profili delle stesse frazioni di DNA, campionate dopo 10 mesi dall'incendio.

In Fig. 16a da un punto di vista qualitativo, le bande poste in alto nel gel rappresentano DNA ad alto peso molecolare ($> 10\text{kb}$), nelle due frazioni di DNA studiate, sia a profondità 0-2,5 cm (B1) che 5 -10 cm (B2). Fa eccezione lo strato superficiale (S1) in cui non si riscontra DNA da gel d'agarosio.

In B1, frazione di eDNA e di iDNA, il DNA sembra più degradato.

Nel suolo di controllo, non bruciato, il DNA è ad alto peso molecolare sia a profondità 0-2,5 cm (C1) che 5-10 cm (C2), per entrambe le frazioni di DNA analizzate. C2 frazione di eDNA risulta avere DNA più degradato.

Da un'analisi semiquantitativa, dettata dal grado di fluorescenza delle bande, dove ad una maggiore intensità corrisponde una più elevata quantità di DNA, emerge che la frazione di iDNA è più abbondante di quella di eDNA, come riportato in Fig.17, in cui sono riportate le quantità di DNA (intra ed extra), espresse in μg DNA per g di suolo secco.

In Fig. 16b sono riportati i profili delle due frazioni di DNA estratto da suolo bruciato dopo 10 mesi dall'incendio. In tal caso il DNA, nelle due frazioni, non appare degradato e per ogni profondità, si rileva DNA ad alto peso molecolare ($> 10\text{ kb}$), sia per iDNA che per eDNA. Anche in questo caso l'analisi semiquantitativa mette in evidenza una maggiore quantità di iDNA rispetto ad eDNA, come poi confermato dall'analisi quantitativa (Fig.17), in cui le quantità di eDNA a dieci mesi dall'incendio subiscono un leggero aumento rispetto a tre giorni dopo il passaggio del fuoco.

Da un punto di vista quantitativo non c'è una differenza significativa nelle diverse condizioni di campionamento e profondità, per la frazione di iDNA, mentre c'è una significativa differenza, seppur al limite, per profondità (tra 0-2,5 e 5-10 cm), nelle quantità di eDNA. (Fig.17).

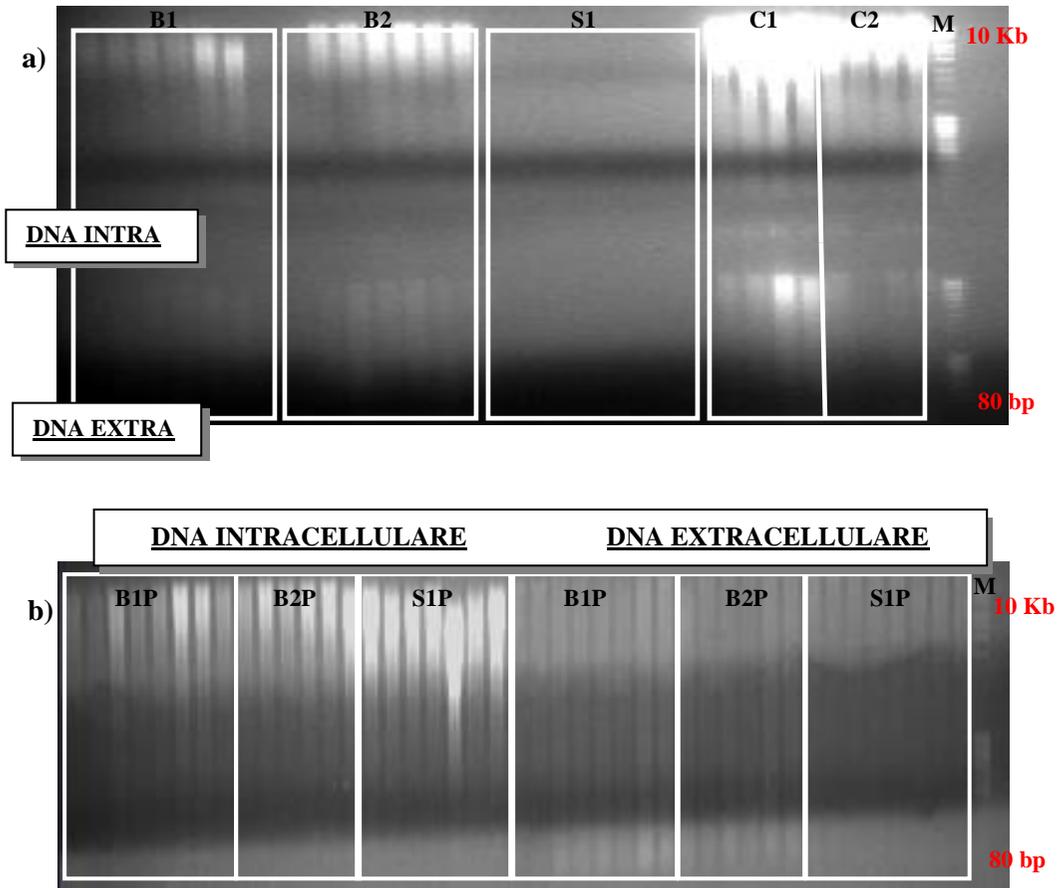


Fig. 16 a) DNA intracellulare e DNA extracellulare estratto da suolo bruciato (B1,B2,S1) e da suolo di controllo (C1,C2) 3 giorni dopo l'incendio. **b)** DNA intracellulare e DNA extracellulare estratto da suolo bruciato 10 mesi dopo l'incendio (B1P,B2P,S1P). Il volume di DNA (intra ed extra) caricato su entrambi i gel all'1% di Agarosio, è di 10 μ l con 2 μ l di BBF (6X). L'elettroforesi è stata condotta a 100V per 60 minuti. M MassRuler™ DNA Ladder Plus (10 kb-80 bp).

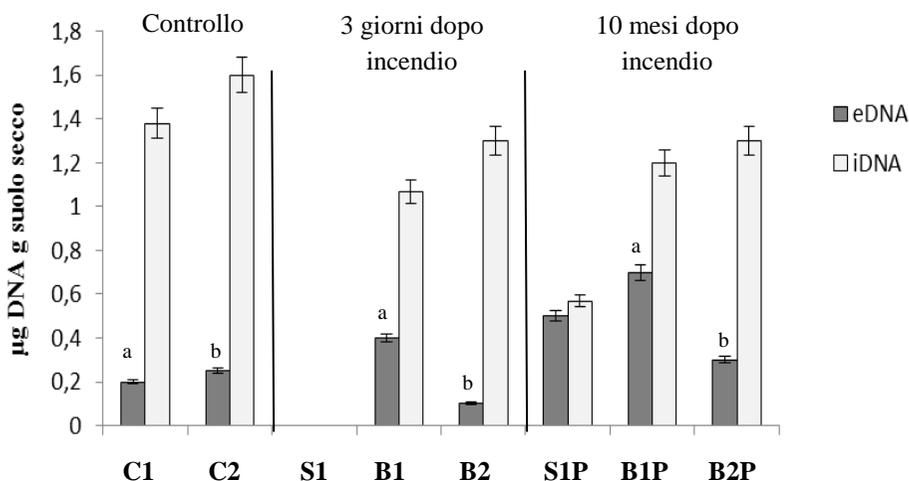


Fig. 17 Contenuto di DNA intracellulare (iDNA) ed extracellulare (eDNA) estratti da suolo di controllo (C1,C2), da suolo bruciato 3 giorni dopo l'incendio (S1,B1,B2) e dieci mesi dopo l'incendio (S1P, B1P,B2P). I valori sono relativi alle medie di quattro repliche (a,b,c,d) e le barre indicano le deviazioni standard relative al valore della media di quattro repliche (n= 4). Le lettere indicano la significativà statistica per $p < 0,05$.

Campioni	iDNA			eDNA	
	[ng/µl]	A260/280	A260/230	A260/280	A260/230
C1	6,2	1,8	0,06	1,9	0,06
C2	7,3	1,8	0,04	1,7	0,4
S1	0	<u>1,4</u>	0,05	1,8	0,5
B1	3,1	<u>1,5</u>	0,03	1,7	0,03
B2	3	1,7	1	1,9	1
S1P	0,7	<u>1,4</u>	0,9	2	0,09
B1P	4,5	1,8	0,8	1,8	0,8
B2P	5,2	1,9	0,8	1,6	0,7

Tab.7 Valore dei rapporti di assorbimento del DNA estratto nelle differenti condizioni di studio, nelle due frazioni di DNA studiate. Concentrazioni di iDNA ds[ng/µl], considerato come indice di biomassa microbica.

Un altro punto su cui porre l'attenzione è l'analisi del grado di purezza degli acidi nucleici estratti, in particolare modo da suolo bruciato.

Questo parametro rappresenta un fattore molto importante nelle tecniche come la PCR. Esso è stato valutato attraverso la misura dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm per tutto il suolo estratto e anche 230 nm. I rapporti calcolati hanno permesso di valutare il grado di contaminazione degli estratti, da proteine (A260/A280) e acidi umici (A260/A230). Come riportato in Tab.7, i valori A260/A280 del DNA estratto sia da suolo di controllo che da bruciato nei due differenti momenti di campionamento, sono risultati tendenzialmente buoni, indicando l'assenza di contaminazione da parte di materiale proteico. Non sono particolarmente buoni per S1, B1 e S1P (iDNA). Inferiori al valore limite di 1,5 i rapporti A260/A230, denotano invece una contaminazione da acidi umici nei campioni: valori che in ogni caso non hanno compromesso il buon esito delle amplificazioni del DNA tramite PCR, senza ricorrere ad ulteriori steps di purificazione del DNA.

Analisi delle attività enzimatiche

Dalla Fig.18 si evince che le attività enzimatiche tra le profondità 0-2,5 cm e 5-10 cm, sono differenti indipendentemente dalle condizioni di campionamento: suolo non bruciato, bruciato dopo 3 giorni e dopo 10 mesi.

Alla profondità di 5-10 cm si rileva una minore attività enzimatica rispetto alla profondità di 0-2,5 cm.

Si riscontra un'elevata attività enzimatica nel suolo non bruciato, rispetto al suolo bruciato 3 giorni e 10 mesi dopo l'incendio.

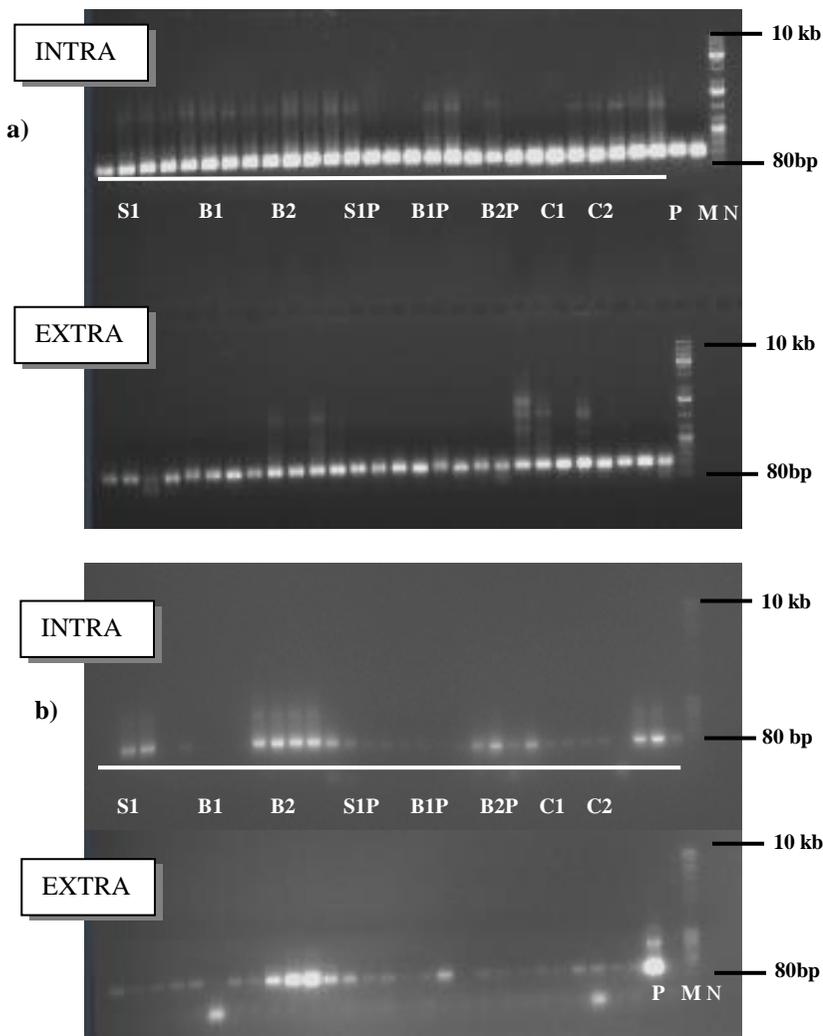
La fosfatasi acida (AcP) è più alta nel suolo bruciato dopo 3 giorni, rispetto alle altre condizioni (suolo non bruciato e bruciato dopo 10 mesi).

Dopo 10 mesi dall'incendio, a profondità 0-2,5 cm, risulta alta l'attività della fosfatasi alcalina (Alk), della leucina (Leu) e piuttosto bassa la β -glucosidasi, mentre sono decisamente basse le attività enzimatiche di arilsulfatasi e fosfatasi acida: si tende a ripristinare la situazione delle attività enzimatiche prima dell'incendio. Differente situazione invece a profondità di 5-10 cm, dopo 10 mesi, in cui tutte le attività enzimatiche risultano sempre basse.

Amplificazione 16S - 18S rDNA ed Archea.

L'amplificazione del 16S rDNA, tramite l'applicazione dell'approccio di Nested PCR, messo a punto per un suolo bruciato, ha generato un prodotto pulito per l'assenza di bande aspecifiche, della lunghezza di 200 bp per ogni suolo analizzato. (Fig.19 a).

Nel caso dell'amplificazione del 18S rDNA l'approccio Nested PCR ha permesso di ottenere un amplicone adeguato per ogni campione, pari a 564 bp. (Fig.19 b). L'applicazione del protocollo di Nested PCR utilizzato per l'amplificazione degli Archea su suolo bruciato, ha permesso di amplificare soltanto una parte di campioni. Tuttavia gli ampliconi ottenuti non hanno dato un prodotto sufficientemente adeguato per essere utilizzato nelle successive analisi molecolari (DGGE).



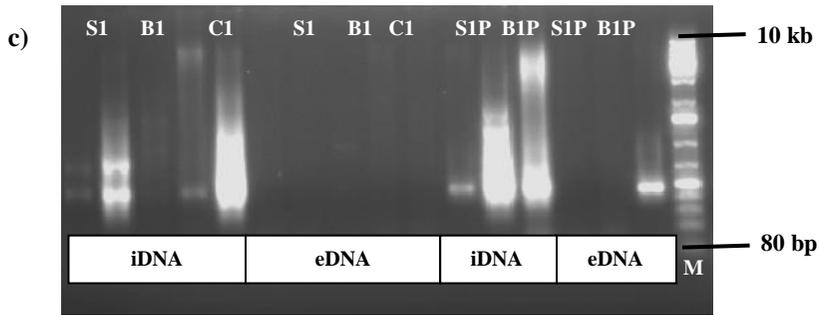


Fig.19 a) Amplificazione della 16S rDNA PCR tramite approccio Nested. **b)** Amplificazione della 18S rDNA PCR tramite approccio Nested. Entrambi i gels d'agarosio all' 1% mostrano gli ampliconi generati tramite la seconda PCR, per la frazione di DNA intracellulare ed extracellulare. P controllo positivo, N negativo, M Mass RulerTM Ladder Plus (10 kb-80 bp). Caricati per ogni gel e frazione di DNA, 5 μ l DNA e 1 μ l BBF (6X). Corsa 100V, 60 minuti. **c)** Gel d'agarosio all'1,5% generato dalla seconda PCR dell'approccio Nested per Archea. M Mass RulerTM Ladder Plus (10 kb-80 bp). Caricati per ogni gel e frazione di DNA, 5 μ l DNA e 1 μ l BBF (6X). Corsa 100V, 60 minuti.

Analisi dei profili elettroforetici da DGGE

20 a)

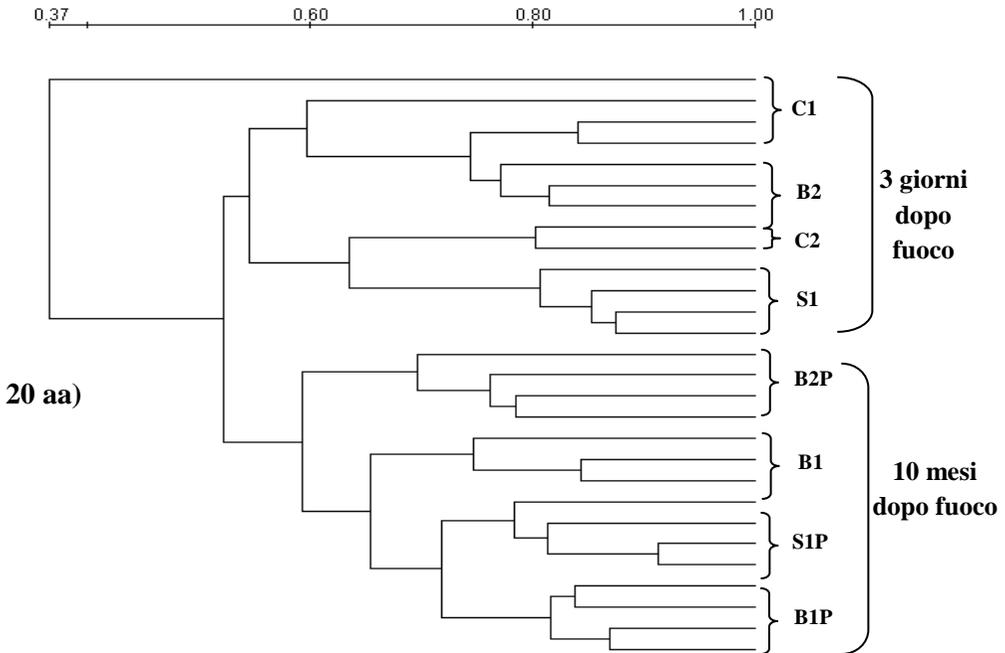
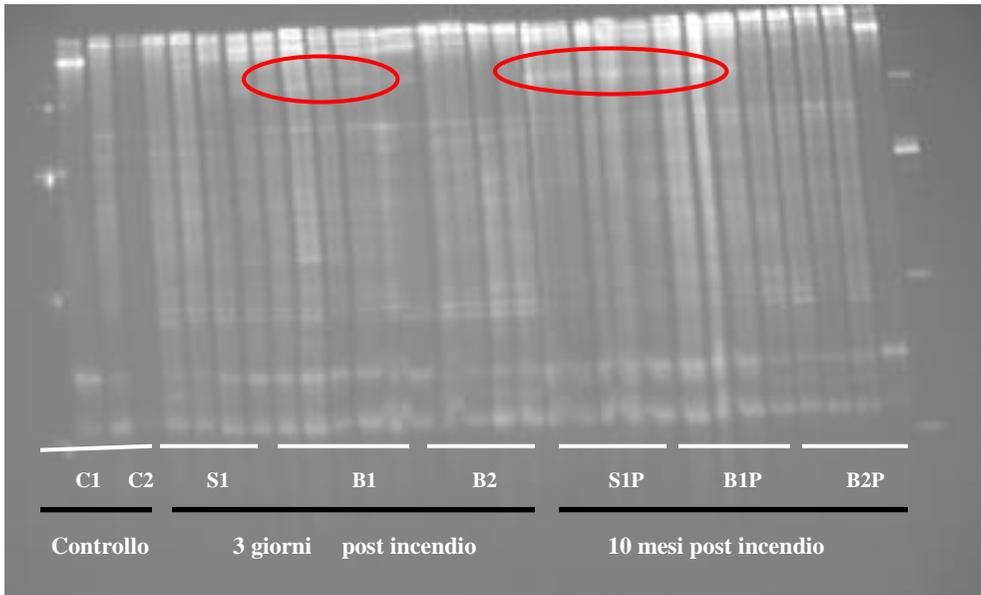


Fig. 20 a) Profilo elettroforetico della 16 srDNA DGGE relativa alla frazione di iDNA, condotta sulle comunità microbiche batteriche su suolo di controllo (C) a

profondità 0-2,5 cm (1) e a 5-10 cm (2), e su suolo bruciato, strato superficiale (S1), a profondità 0-2,5 cm (B1), 5-10 cm (B2) 3 giorni post incendio e dieci mesi dopo alle stesse profondità (S1P, B1P, B2P). **20 aa)** Similarità genetica di tipo batterico tra suolo di controllo e suolo bruciato alle diverse profondità e tempi di campionamento, relativa alla frazione di iDNA.

20 b)

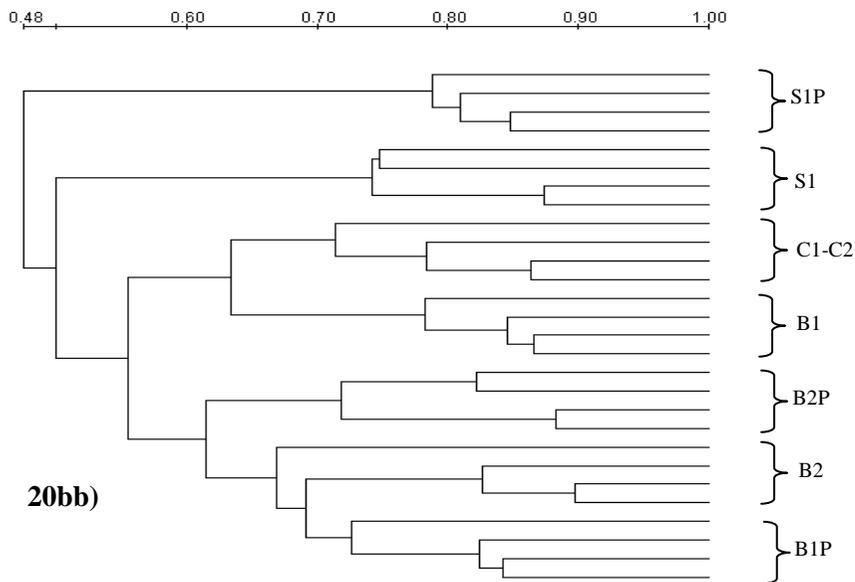
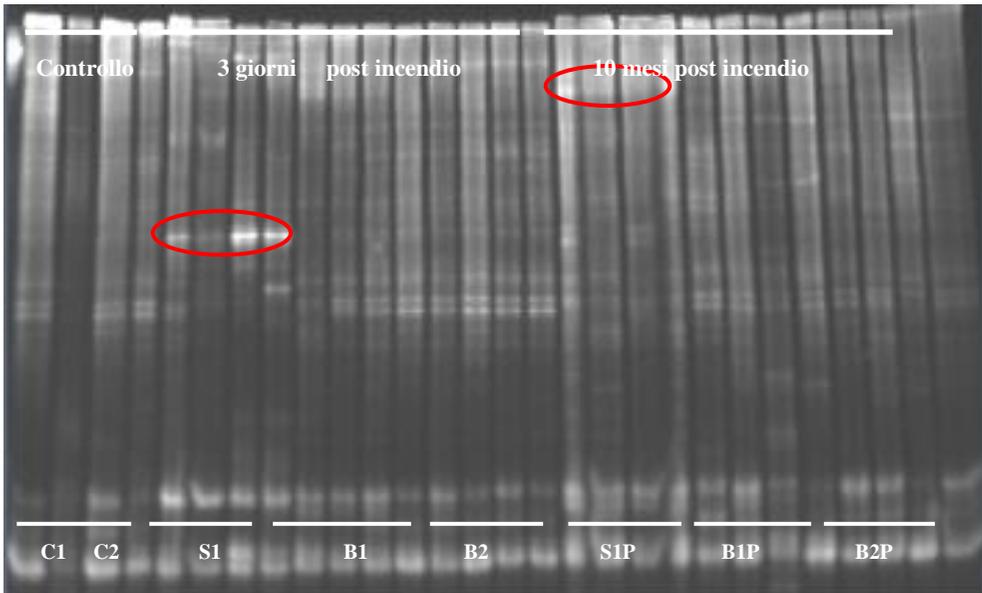
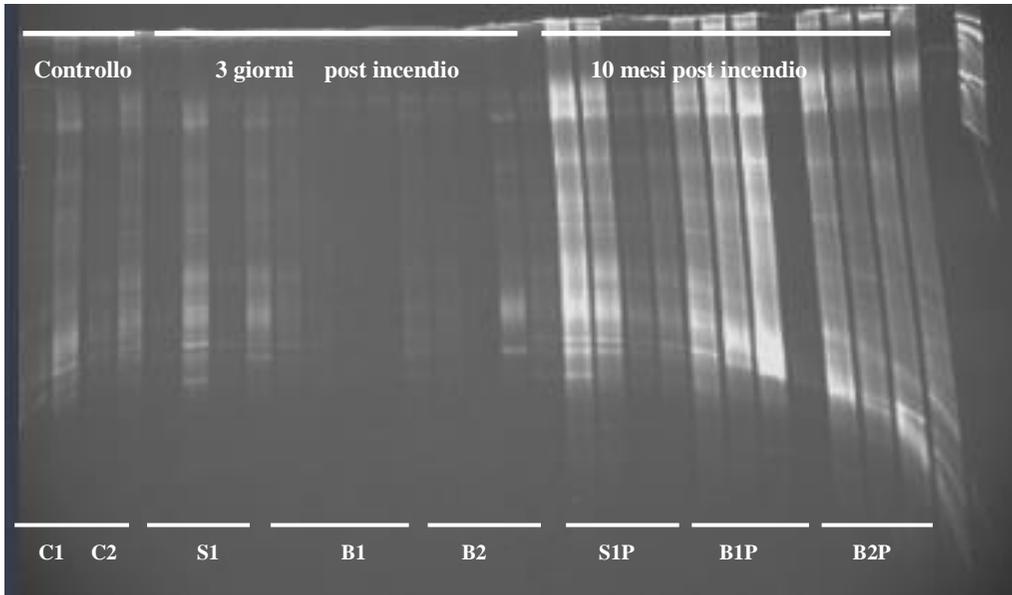
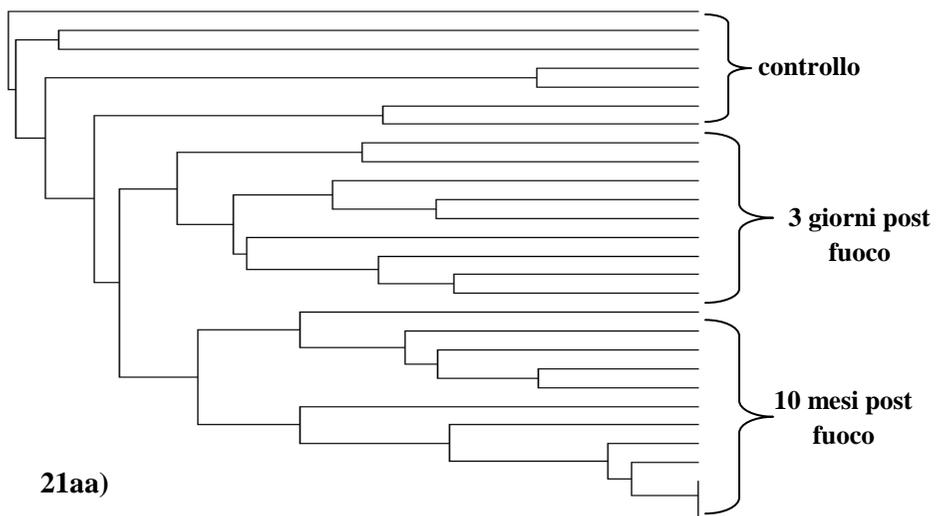


Fig. 20 b) Profilo elettroforetico della 16 srDNA DGGE relativa alla frazione di eDNA, condotta sulle comunità microbiche batteriche su suolo di controllo (C) a profondità 0-2,5 cm (1) e a 5-10 cm (2), e su suolo bruciato, strato superficiale (S1), a profondità 0-2,5 cm (B1), 5-10 cm (B2) 3 giorni post incendio e dieci mesi dopo alle stesse profondità (S1P, B1P, B2P). 20 bb) Similarità genetica di tipo batterico tra suolo di controllo e suolo bruciato alle diverse profondità e tempi di campionamento, relativa alla frazione di eDNA.

21a)



0,16 0,40 0,60 0,80 1,00



21aa)

Fig. **21a**) Profilo elettroforetico della 16 srDNA DGGE relativa alla frazione di eDNA, condotta sulle comunità microbiche batteriche su suolo di controllo (C) a profondità 0-2,5 cm (1) e a 5-10 cm (2), e su suolo bruciato, strato superficiale (S1), a profondità 0-2,5 cm (B1), 5-10 cm (B2) 3 giorni post incendio e dieci mesi dopo alle stesse profondità (S1P, B1P, B2P). **21aa**) Similarità genetica di tipo batterico tra suolo di controllo e suolo bruciato alle diverse profondità e tempi di campionamento, relativa alla frazione di eDNA.

21b)

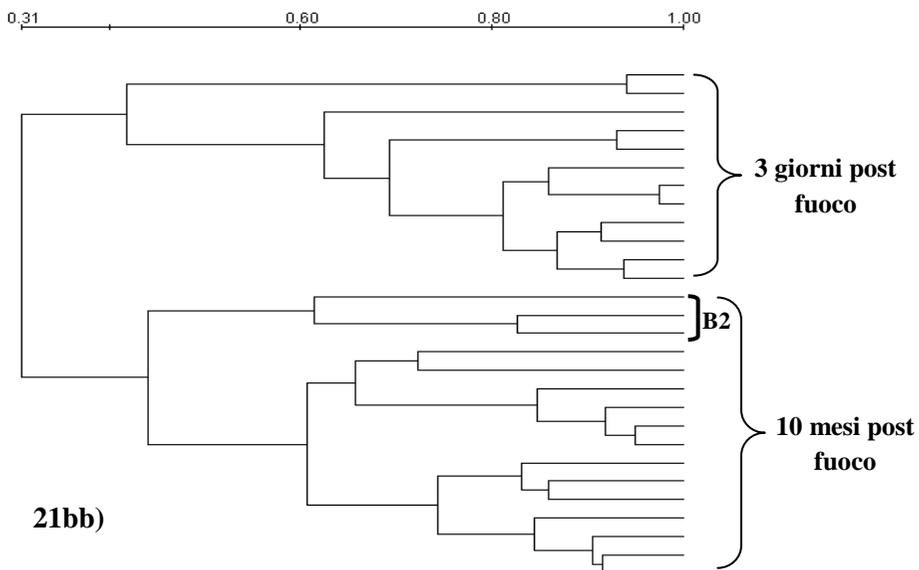
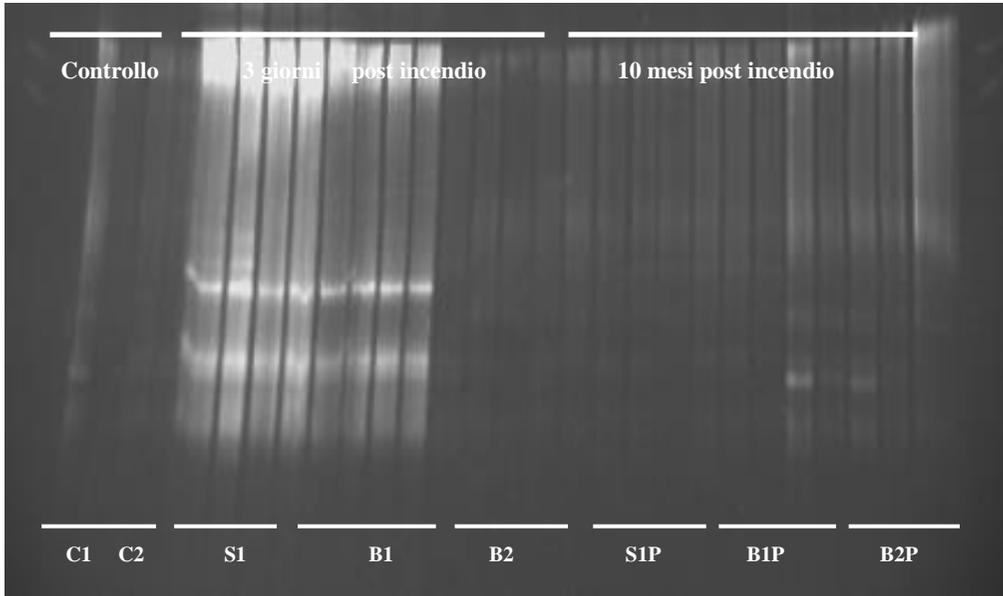


Fig. 21b) Profilo elettroforetico della 18 srDNA DGGE relativa alla frazione di eDNA, condotta sulle comunità microbiche fungine su suolo di controllo (C) a profondità 0-2,5 cm (1) e a 5-10 cm (2), e su suolo bruciato, strato superficiale (S1), a profondità 0-2,5 cm (B1), 5-10 cm (B2) 3 giorni post incendio e dieci mesi dopo alle stesse profondità (S1P, B1P,B2P). 21 bb) Similarità genetica di tipo fungino tra suolo di controllo e suolo bruciato alle diverse profondità e tempi di campionamento, relativa alla frazione di eDNA.

Le cluster analisi dei profili elettroforetici relativi ai suoli oggetto di questo studio, analizzano le due frazioni di DNA, extra ed intra, nelle differenti condizioni di campionamento, vale a dire il suolo di controllo(non bruciato), il suolo bruciato dopo 3 giorni dall'incendio e dopo dieci mesi, alle differenti profondità (strato superficiale, 0-2,5 cm e 5-10 cm) come riportato precedentemente nello schema riassuntivo di Fig. 10.

Relativamente all'indagine della comunità batterica nella frazione di iDNA, la cluster analisi ha evidenziato due principali raggruppamenti. Il primo gruppo, con un indice di similarità del 57 % circa contiene tutte le repliche di suolo campionato 3 giorni dopo l'incendio, fatta eccezione per i campioni a profondità B1 (0-2,5 cm) che si trova all'interno del secondo gruppo ed ha una similarità > del 60 % con i campioni di suolo S1P e B1P (rispettivamente 0-2,5 cm e 5-10 cm): queste tre condizioni si differenziano da tutti gli altri campioni, compreso il suolo di controllo, per la presenza di bande aggiuntive ed intense rispetto agli altri campioni. Tra i due raggruppamenti principali c'è una similarità > del 50%.

Nel caso della frazione di eDNA, l'analisi delle comunità batteriche mette in evidenza invece quattro cluster principali. S1P ed S1 si differenziano dagli altri per la presenza di bande caratteristiche aggiuntive che non si ritrovano negli altri campioni. Tra S1P ed il resto del dendrogramma c'è una similarità del 48% , mentre tra il secondo gruppo (S1) ed il terzo gruppo (controllo e B1) c'è una similarità del 50%. Maggiore similarità si riscontra tra quest'ultimo gruppo ed il quarto cluster (B2P,B2, B1P), pari al 55%.

L'indagine sulla frazione di iDNA sulla comunità microbica fungina ha evidenziato due raggruppamenti principali: il primo relativo al suolo

campionato 3 giorni dopo l'incendio ed il secondo 10 mesi dopo l'incendio. Tra i due cluster c'è una similarità molto bassa, < al 20%.

Anche nel caso della frazione di eDNA, l'analisi dei profili elettroforetici relativi ai suoli analizzati, mette in evidenza due raggruppamenti principali: suolo bruciato 3 giorni dopo l'incendio (in questo cluster sono compresi anche i campioni di suolo non bruciato) e 10 mesi dopo, tra i quali si ha una similarità del 30%. In più si mettono in evidenza per S1 e B1 le stesse bande caratteristiche che non si trovano negli altri campioni, così come in B1P e B2P vi sono bande aggiuntive che non si hanno nelle altre situazioni.

7.3 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

I microrganismi del suolo sono fondamentali per la regolazione dei cicli biogeochimici negli ecosistemi terrestri, in quanto sono responsabili, insieme alla fauna del suolo, della decomposizione di quasi tutti i composti biologici (Nannipieri et al. 2003). La rilevanza dei microrganismi del suolo per la conservazione e la gestione della diversità biologica dopo il passaggio del fuoco è di fondamentale importanza, considerando anche la loro funzione chiave, quale essere indicatori della qualità del suolo e di tutto l'intero ecosistema (Mataix Solera et al., 2009).

È noto che la perdita di biodiversità non solo riduce le risorse genetiche ma riduce anche la produttività degli ecosistemi ed anche la loro capacità di ripresa contro un evento di disturbo (Naeem et al., 1994).

Gli Effetti del fuoco sui microrganismi del suolo possono variare notevolmente.

Il fattore più importante che influenza i microrganismi del suolo sembra essere la gravità dell'incendio che è determinata da caratteristiche come l'intensità e la durata, le condizioni meteorologiche (i.e., temperatura, umidità relativa, precipitazioni antecedenti l'incendio, vento) topografia e caratteristiche della fiamma (Ahlgren and Ahlgren 1960, Raison 1979, Chandler et al. 1983, Pritchett and Fisher 1987), dal tipo di suolo e da condizioni microclimatiche che si creano in precise situazioni. Le variazioni spaziali di questi fattori implicano una distribuzione eterogenea del fuoco, del suo andamento e quindi della sua gravità.

I suoli bruciati spesso appaiono come una sorta di mosaico in cui si hanno sia aree con effetti di minor entità che aree in cui l'impatto del fuoco sul suolo ha avuto una maggiore gravità. (Rab 1996).

Per cui molti aspetti vanno considerati nell'approcciarsi allo studio degli effetti sulla componente biologica dopo il passaggio del fuoco.

Purtroppo la letteratura ad oggi presente, non è particolarmente ricca di studi relativi a questo preciso argomento, o perlomeno vi sono molte lacune conoscitive, per cui in questa parte del mio lavoro ho voluto affrontare questo aspetto, ancora poco conosciuto e piuttosto complesso ma che potrebbe e dovrebbe dare risposte utili per capire meglio le strategie di conservazione della biodiversità del suolo dopo un evento di disturbo così d'impatto come può essere un incendio.

Ho voluto discriminare la frazione del DNA totale, nelle due frazioni da cui è costituito, iDNA ed eDNA, al fine di poter acquisire eventuali maggiori informazioni di dettaglio sia in termini di qualità e di quantità del DNA estratto da suolo, sia per ciò che concerne i possibili cambiamenti strutturali nelle comunità microbiche in un suolo incendiato, rispetto ad un suolo di controllo (non bruciato) e lo stesso suolo bruciato ma a distanza di quasi un anno, considerando anche l'analisi di alcune attività enzimatiche per cercare di avere un quadro conoscitivo più ampio, relativo alla qualità del suolo dopo un evento di disturbo.

Nel caso del suolo bruciato, nei due differenti tempi di campionamento, a tre giorni e a dieci mesi dall'incendio, la scelta di voler studiare tre livelli distinti di profondità, distinguendo tra strato superficiale combusto, tra profondità 0-2,5 cm e 5- 10 cm che rispettivamente rappresentano lo strato di suolo che è stato sicuramente interessato dal fuoco e quello che invece, normalmente dovrebbe non subire particolari effetti da parte del passaggio del fuoco, ha cercato di far ulteriormente più luce sull'effettiva profondità a cui il fuoco arriva ad influenzare la componente biologica del suolo.

La qualità del DNA estratto, in entrambe le frazioni, (iDNA ed eDNA) è risultata ad alto peso molecolare (> 10 kb), in ogni situazione considerata e non appare degradato, fatta eccezione per lo strato superficiale B1 di eDNA e di iDNA, dove evidentemente la molecola di DNA durante l'incendio non è stata sufficientemente protetta dai colloidi del suolo, viste le alte temperature raggiunte (intorno 300°C). Abbastanza evidente di conseguenza come in S1, dopo 3 giorni dall'incendio, non vi sia traccia di iDNA né di eDNA, sia in termini qualitativi che quantitativi. Per cui le alte temperature hanno

compromesso la qualità del DNA, in entrambe le frazioni, ma solo a livello della profondità 0-2,5 cm che normalmente è interessata dal passaggio del fuoco, per cui questo dato dà un'ulteriore conferma di quale sia la profondità del suolo che è interessata effettivamente dal passaggio del fuoco. Alla stessa profondità, dopo quasi un anno dall'evento, la qualità del DNA estratto risulta buona sia nel caso dell'iDNA che dell'eDNA.

I metodi di laboratorio per la quantificazione della biomassa microbica si basano principalmente sulla misurazione delle componenti presenti nei microrganismi (cioè, carbonio mediante fumigazione-Estrazione: CMIC), o sulla base di misurazioni fisiologiche (ATP, SIR: substrato respirazione indotta) (Mataix Solèra et al., 2009).

La biomassa microbica è l'intero pool di microrganismi presenti nel suolo. Generalmente, la biomassa microbica totale è composta da batteri e funghi.

In base a diversi fattori, come il pH del suolo, la biomassa fungina contribuisce dal 30 all'80% del totale della biomassa microbica del suolo, ed è generalmente maggiore della biomassa batterica, visto che i funghi hanno una sensibilità al calore superiore rispetto ai batteri, per cui una diminuzione della loro biomassa microbica dovuta all'incendio è normale ed è riportata in molti studi (Mataix Solèra et al., 2009).

In questo caso ho considerato come indice di biomassa microbica l'iDNA *ds.*(Tab.7).

L'effetto diretto immediato del fuoco sui microrganismi del suolo normalmente è la riduzione della sua biomassa microbica, addirittura in casi estremi alcuni suoli possono arrivare alla completa sterilizzazione. Diversi autori del resto hanno riportato studi sugli effetti assolutamente negativi sui microrganismi immediatamente dopo il passaggio del fuoco, (Meiklejohn 1955, Ahlgren and Ahlgren 1965, Dunn et al. 1979, Theodorou and Bowen 1982, Deka and Mishra 1983), in particolar modo sui funghi. (Wright and Bollen 1961, Ahlgren and Ahlgren 1965, Widden and Parkinson 1975, Tiwari and Rai 1977).

Nel mio studio la biomassa microbica è più bassa nel suolo bruciato che non in quello di controllo: subito dopo il passaggio del fuoco è molto bassa, per avere poi un leggero incremento dopo quasi un anno dall'evento. Non si riscontrano determinanti differenze tra i due livelli di profondità considerati, sia nel suolo bruciato e campionato nei due differenti tempi, così come nel suolo di controllo.

Raison (1979) ha rilevato che temperature superiori a 127° C potrebbero sterilizzare il terreno: sicuramente il suolo oggetto del mio studio, non è stato sterilizzato, per quanto le temperature raggiunte siano state ben superiori a 127°C, anche se i risultati non indicano un'elevata biomassa microbica.

Comunque sia non c'è una significativa differenza nell'iDNA ds tra il suolo di controllo e il suolo bruciato dopo 10 mesi, per cui evidentemente la biomassa microbica immediatamente dopo il passaggio del fuoco (a 3 giorni dall'incendio), ha subito un leggero calo, soprattutto a profondità 0-2,5 cm, per poi ritornare verso le condizioni iniziali pre incendio.

L'effetto sterilizzante del calore è fortemente legato alle temperature, ma anche la durata del riscaldamento è fondamentale.

Dunn et al. (1985) hanno dimostrato che l'effetto congiunto del calore e dell'umidità del suolo, agiscono insieme per determinare la morte dei microrganismi del suolo, dopo il passaggio del fuoco.

In questo senso ci sono molti risultati divergenti tra loro, questo perché diversi fattori operano allo stesso tempo: umidità del terreno, profondità di campionamento del suolo, gravità dell'incendio e tempi di campionamento post-incendio.

Non solo, ma ognuno di questi aspetti ha un range di influenza precisa che dipende anche dal tipo di microrganismo considerato. (Widden and Parkinson 1975,

Bisset and Parkinson 1980, Dunn et al. 1985, Bartoli et al. 1991, Vázquez et al. 1993, Acea and Carballas 1996, Pietikäinen et al. 2000).

Molti studi in letteratura sono relativi ad esperimenti effettuati in laboratorio oppure in campo ma seguendo la pratica del fuoco prescritto, per cui con temperature e durata dell'incendio controllate. Queste condizioni discostano molto da quelle di un incendio, così definito, "wildfire", cioè naturale, omettendo in tale sede la natura dolosa o meno dell'evento, ma soffermandosi solo all'aspetto relativo alla sua gravità e conseguenza più o meno dannosa a livello dell'ecosistema suolo, anche se va citato che Fritze et al. 1993, hanno trovato un'immediata diminuzione della biomassa microbica anche dopo un incendio prescritto.

Per cui non ogni situazione va considerata a sé, in quanto molteplici sono gli aspetti che contribuiscono o meno alla sterilizzazione del suolo e di conseguenza alla presenza o assenza di biomassa microbica.

Nello studio che ho condotto, da un punto di vista quantitativo la frazione di iDNA non ha differenze significative né per tempi né per profondità di

campionamento, mentre invece la frazione di eDNA risulta significativamente maggiore a profondità 0-2,5 cm rispetto a 5-10 cm, essendo comunque presente una certa quantità di eDNA ad entrambe le profondità. E' noto come l'eDNA possa persistere nel suolo dopo l'adsorbimento da parte dei colloidali organici ed inorganici (Pietramellara et al., 2001; Nielsen et al., 2004).

Questo potrebbe suggerire che l'eDNA comunque riesce a persistere nel suolo anche dopo il passaggio del fuoco, vista la sua presenza da un punto di vista quantitativo e, seppur degradato, anche qualitativo.

L'eDNA è una fonte di nucleotidi extracellulari utili per la sintesi *ex novo* di DNA microbico (Franchi et al., 1999), considerando anche il ruolo dell'eDNA nella formazione di biofilm batterico come quello di *Pseudomonas aeruginosa* oltre poi che l'eDNA dei biofilms sarebbe quantitativamente più importante del DNA cellulare (Steinberger et al., 2002).

Quest'aspetto, legato alla presenza di eDNA dopo il passaggio del fuoco, potrebbe rappresentare un aspetto ecologico importante legato alla ripresa e alla conservazione della biodiversità dopo un evento di disturbo come un incendio.

Ad oggi queste ipotesi non trovano nessun fondamento in letteratura, in quanto uno studio metagenomico di questo tipo, applicato ad un suolo forestale bruciato, è assolutamente da considerarsi *ex novo*, con i suoi punti di interesse ed anche quelli interrogativi che spesso caratterizzano i primi steps sperimentali di una ricerca di base.

Un altro aspetto che può dare ulteriori informazioni sulla qualità del suolo oggetto di studio, è l'analisi delle attività enzimatiche, in quanto quest'ultime sono importanti "sensori" che forniscono indicazioni sullo stato metabolico della popolazione microbica e sulle condizioni chimico-fisiche del suolo.

Gli enzimi si definiscono come indicatori del grado di alterazione del suolo (van Beelen e Doelman, 1997; Trasar-Cepeda et al., 2000).

L'attività di molti enzimi nel suolo aumenta con la temperatura fino a 60 - 70 °C per poi diminuire con un ulteriore aumento della temperatura dovuto a denaturazione termica.

La completa inattivazione degli enzimi avviene a 180 ° C, secondo Skujins 1967, Tabatabai e Bremner 1970.

Subito dopo gli incendi boschivi, molti autori hanno trovato valori più bassi nelle attività enzimatiche dei suoli bruciati (ASA et al. 1993, 1998 Carballas

et al. 1993; Eivazi e Bayan 1996; Hernández et al. 1997), a causa della scomparsa della vegetazione, della diminuzione della biomassa microbica, dei cambiamenti nelle proprietà del suolo (principalmente sostanza organica) e per la denaturazione termica diretta.

Nel mio studio sono stati analizzati cinque differenti enzimi: arilsolfatasi (Aryl), β -glucosidasi (β -gl), la fosfatasi acida (Acp), fosfatasi alcalina (Alk), e leucina (Leu), come riportato in Tab.6a.

In generale l'attività enzimatica nel suolo non bruciato risulta maggiore rispetto al suolo bruciato dopo 3 giorni dall'incendio, mentre dopo dieci mesi la situazione tende a ristabilirsi come pre incendio.

I dati relativi a tutte le attività enzimatiche analizzate, immediatamente dopo l'incendio (post 3 giorni), mettono in evidenza una bassa attività, tranne per l'Acp che risulta alta.

Un risultato che sembra differire dalla letteratura, in cui tendenzialmente si trovano bassi valori di Acp dopo un incendio, come afferma Staddon et al. 1998, in cui 4 anni dopo un fuoco prescritto, i valori di Acp risultano bassi, valori che sono legati ad un aumento del pH del suolo come conseguenza della deposizione di cenere.

Di fatto il pH del suolo oggetto di studio, è passato da 4,8 a 5,6 dopo l'incendio, per cui è certo aumentato ma è comunque rimasto all'interno di valori di bassa acidità. Si potrebbe spiegare così perché non c'è stato un netto aumento della Alk, e perché invece la Acp è alta.

La diminuzione della fosfatasi generalmente in suoli bruciati può essere dovuta anche all'effetto diretto del calore sull'enzima (Eivazi e Bayan 1996). SAA et al.,1933 hanno riportato che l'enzima fosfatasi è influenzato negativamente dalla severità dell'incendio, mentre Serrasolsas e Khanna., 1995 hanno riportato una diminuzione dell'attività della fosfatasi a temperature dai 60° ai 120° C.

L'attività della β -glucosidasi dopo l'incendio è bassa e questo risultato trova conferma in letteratura.

Le glucosidasi sono largamente presenti nel suolo e rappresentano gli enzimi chiave del ciclo del carbonio: idrolizzano la sostanza organica liberando residui glicosidici (glucosio) utilizzati dai microrganismi del suolo come fonte energetica.

I funghi sono importanti microrganismi che degradano la cellulosa nei suoli forestali (Acea e Carballas 1996); a causa della sensibilità dei funghi al calore, l'attività di enzimi come questo, il cui substrato è la cellulosa, sono

generalmente inferiori in suoli bruciati recentemente (Fioretto et al., 2002) che non in suoli non bruciati.

Secondo Boerner et al. (2005), alcuni enzimi come la Acp, sono regolati principalmente da fattori come il microclima e dalla chimica del suolo, mentre altri come le glucosidasi sono invece più regolate dalla disponibilità del substrato.

Eivazi e Bayan (1996) hanno trovato che in incendi controllati, ogni quattro anni oppure annuali, diminuisce la biomassa microbica e l'attività di numerosi enzimi (fosfatasi acida, β - glucosidasi ed arilsolfatasi), risultati che sono in linea con quelli ottenuti in questo studio, in quanto dopo dieci mesi dall'incendio l'attività degli enzimi sopra citati risulta essere molto bassa, mentre invece è alta l'attività di Alk e Leu.

Addirittura in ambiente mediterraneo, a sei anni di distanza da un incendio sono stati osservati valori più bassi di Acp e β - glucosidasi (Zornoza 2006). I valori ottenuti da questo studio, sono pressoché in linea con quelli presenti in letteratura.

A profondità 5-10 cm l'attività enzimatica è generalmente più bassa rispetto a 0-2,5 cm, per cui sembrano essere più influenzate dal fuoco le attività enzimatiche nello strato meno superficiale, come definisce ASA et al. 1998; e Yong - Mei et al. 2005, in cui osservano come il fuoco possa influenzare le attività enzimatiche del suolo non solo nello strato superiore, ma anche in quello inferiore.

La criticità nello studio delle attività enzimatiche del suolo è l'assenza di valori soglia universali che possano identificare la condizione di normalità in un sistema complesso come il suolo. Questa limitazione non consente l'immediata individuazione di una perturbazione intesa come scostamento dalla "condizione normale".

Sta di fatto che però le attività degli enzimi nel suolo aumentano sensibilmente con input di sostanza organica e disponibilità di substrati, mentre diminuiscono in presenza di disturbo antropico.

Anche in tal caso, nello studio delle attività enzimatiche di un suolo forestale bruciato, molti risultati presenti in letteratura differiscono tra di loro, questo è probabilmente sempre da attribuirsi ai molteplici fattori che concorrono a determinare la gravità di un incendio da cui derivano tutte le conseguenze del caso.

Fino ad oggi in letteratura, la maggior parte delle indagini riguardanti gli effetti del fuoco sul microbiota del suolo sono focalizzate sulle variazioni e

sull'attività della biomassa microbica totale, mentre le conseguenze sulla struttura delle comunità microbiche dopo il passaggio del fuoco, non sono state oggetto di molti studi. (Bergner et al, 2004 ; D' Ascoli et al, 2005).

Al fine di migliorare la valutazione molecolare sui cambiamenti indotti dal fuoco nelle comunità microbiche, in questo studio è stato effettuato un fingerprinting genetico comparativo tra eDNA ed iDNA della sequenza estratta dal metagenoma del suolo.

L'approccio di fingerprinting è suggerito per essere un potenziale strumento che possa aiutare ad aumentare la conoscenza circa l'impatto degli incendi sulla struttura delle comunità microbiche del suolo, fornendo le informazioni di base per la previsione e per un'adeguata pianificazione di strategie di gestione degli ecosistemi.

L'analisi comparativa di eDNA e di iDNA tramite fingerprinting genetico ha messo in evidenza patterns più complessi per le comunità microbiche batteriche, rispetto a quelle fungine, mostrando dei cambiamenti nella struttura delle comunità microbiche, assolutamente più pronunciate nei funghi rispetto ai batteri.

Infatti, il monitoraggio delle comunità batteriche in funzione del tempo e della profondità di campionamento, generalmente indica una condizione più stabile ed omogenea rispetto alle comunità microbiche fungine.

Nella 16s rDNA DGGE della frazione di iDNA, si evidenziano le stesse popolazioni batteriche caratteristiche in B1, S1P e B1P che non sono presenti nelle altre situazioni analizzate.

Anche nella 16s rDNA DGGE della frazione di eDNA si hanno popolazioni batteriche caratteristiche in S1 ed altre in S1P.

Dall'analisi descrittiva della frazione di iDNA e di eDNA, si mette in evidenza come le popolazioni batteriche dopo il passaggio del fuoco, non abbiano cambiato la loro struttura, benché si trovino bande caratteristiche in entrambe le frazioni studiate, né abbiano aumentato la loro richness.

Probabilmente questo risultato trova conferma dal fatto che spesso nel periodo subito dopo un incendio, si verifica un aumento di batteri dovuto alla deposizione di ceneri, che provoca un aumento del pH del suolo, e alla maggiore disponibilità di nutrienti, unito al fatto che i batteri hanno una capacità maggiore di utilizzare i composti organici solubili rilasciati dalla combustione della sostanza organica. (Jokinen et al., 2006).

Anche la minore competizione per diverse sostanze nutrienti può influenzare la proliferazione batterica nel breve periodo. (Bauhus et al.,1993), mentre nel

medio lungo periodo le popolazioni batteriche tendono a tornare alla condizione pre incendio, relativamente al ripristino della copertura vegetale. (Theodorou e Bowen 1982; Vazquez et al.,1993; Grasso et al., 1996; Mataix - Solera et al.,2002).

Completamente differente invece la situazione che emerge dall'analisi comparativa delle comunità microbiche fungine, in cui nella frazione di iDNA si ha un cambiamento nella struttura delle comunità microbiche ed aumento della phylotype richness (numero di bande presenti su DGGE gel), particolarmente marcato ed evidente 10 mesi dopo l'incendio ad entrambe le profondità del suolo, rispetto sia 3 giorni dopo l'incendio sia al suolo di controllo.

Nella 18s rDNA DGGE della frazione di eDNA, si ha sempre un cambiamento nella struttura delle comunità microbiche dopo l'incendio, soprattutto confrontando i due tempi di campionamento, per cui dopo 3 giorni e dopo 10 mesi dall'evento, nello strato superiore del suolo (0-2,5 cm) ma non un incremento della phylotype richness.

Questi cambiamenti nella struttura delle comunità microbiche, sono stati più evidenti per i funghi che per i batteri, suggerendo che le comunità microbiche fungine sono più sensibili al fuoco, ma anche in grado di rispondere prontamente ai cambiamenti subiti dall'ecosistema.

Alcuni autori riportano che i funghi sono sensibili ad alcuni composti tossici presenti nei suoli bruciati (Widden e Parkinson 1975 Fritze et al.1998), mentre altri affermano come i funghi siano negativamente influenzati da alcuni cambiamenti post-incendio a carico di specifiche frazioni organiche, come la cellulosa.

Una nota a sé va definita per l'analisi condotta sugli archea.

Questo gruppo di microrganismi normalmente è abitatore degli ambienti più estremi ed inospitali della Terra, tanto che i termofili possono svilupparsi a temperature ben superiori ai 100 °C.

Grazie all'applicazione di un approccio di Nested PCR, è stato possibile ottenere degli ampliconi soltanto per la frazione di iDNA, tuttavia non sufficientemente adeguati per essere utilizzati nelle successive analisi molecolari di fingerprinting genetico, probabilmente a causa della bassa frequenza della sequenza target.

Quanto emerge dallo studio condotto, la discriminazione tra la frazione di iDNA e di eDNA, ha fornito informazioni interessanti riguardo soprattutto la persistenza delle molecole di eDNA dopo il passaggio del fuoco e come dallo

studio comparativo di eDNA e di iDNA tramite fingerprinting genetico, si siano evidenziate delle popolazioni batteriche e fungine caratteristiche nelle due differenti frazioni di DNA nel suolo bruciato rispetto al controllo.

Lo studio del DNA extracellulare, viste tutte le sue implicazioni ecologiche, potrebbe essere un valido punto di partenza per meglio definire le dinamiche evolutive dei microrganismi dopo il passaggio del fuoco, soprattutto in un suolo forestale, vista l'importanza enorme e fondamentale dell'attivazione di azioni di ripristino e di salvaguardia delle foreste dagli incendi.

PRIMA PARTE

EFFETTO DEL FUOCO SULLE PROPRIETA' MICROBIOLOGICHE DI UN SUOLO FORESTALE

**STUDIO PRELIMINARE SUGLI AGGREGATI
DI UN SUOLO FORESTALE BRUCIATO**

7.4.1 MATERIALI E METODI

Il suolo utilizzato per questo tipo di esperimento deriva dagli stessi campionamenti effettuati per lo studio precedente.

Per cui l'area sperimentale è esattamente la stessa, con solite modalità e tempi di campionamento. In questo caso la profondità studiata è soltanto 0-2,5 cm: il motivo di questa scelta ricade nel fatto che, per il momento, ho voluto studiare soltanto gli aggregati del suolo alla profondità che è stata sicuramente interessata dal passaggio del fuoco. (Fig. 2, 3).

Sono state preparate delle aliquote di 5g di suolo <2 millimetri e poste in una pila di setacci all'interno di un setacciatore meccanico (Fig.23).

Sono state scelte tre classi dimensionali principali da confrontarsi con la porzione <2 mm che rappresenta il suolo di riferimento. A seguire un macro aggregato (1-0,5 mm) e due micro aggregati (500-100 μm , < 100 μm). Lo schema dei campioni è riportato in Fig. 22.

La setacciatura a secco è avvenuta ad una velocità di 200 oscillazioni al minuto, per 3 min, e alla fine sono stati pesati gli aggregati ottenuti. Il processo è stato ripetuto due volte per avere tre repliche per ciascun campione, necessarie per l'analisi statistica dei dati. (Sainju, 2006). Gli aggregati sono stati conservati a - 20°C per le successive analisi di laboratorio.

Campioni (0-2,5 cm)	Classe di Aggregato per ogni campione
AC (a,b,c) Suolo non bruciato	< 2mm
AB (a,b,c) Suolo bruciato dopo 3 giorni dall'incendio	1-0,5 mm
ABP (a,b,c) Suolo bruciato dopo 10 mesi dall'incendio	500- 100 μm
	< 100 μm

Fig. 22 Schema riassuntivo dei campioni.

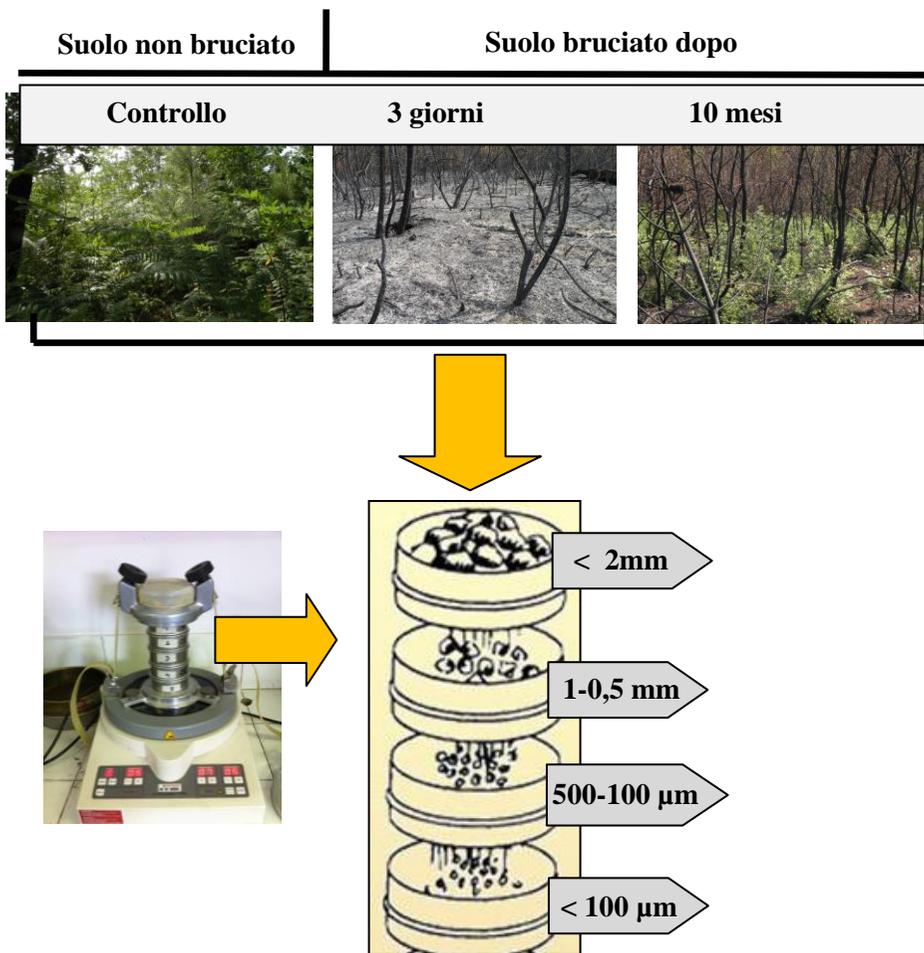


Fig. 23 *Rappresentazione schematica della pila di micro setacci utilizzata per ottenere le differenti classi dimensionali di aggregati dal suolo di controllo e dal suolo bruciato campionato dopo 3 giorni e dopo dieci mesi dall'incendio.*

Estrazione del DNA dal suolo

Estrazione sequenziale del DNA extracellulare (eDNA) e del DNA intracellulare (iDNA).

Anche su questi campioni di suolo, è stato applicato il protocollo di Ceccherini et al., (2007), ottimizzato per un suolo bruciato in questa tesi. Lo schema dell'estrazione sequenziale è riportato in Fig. 24.

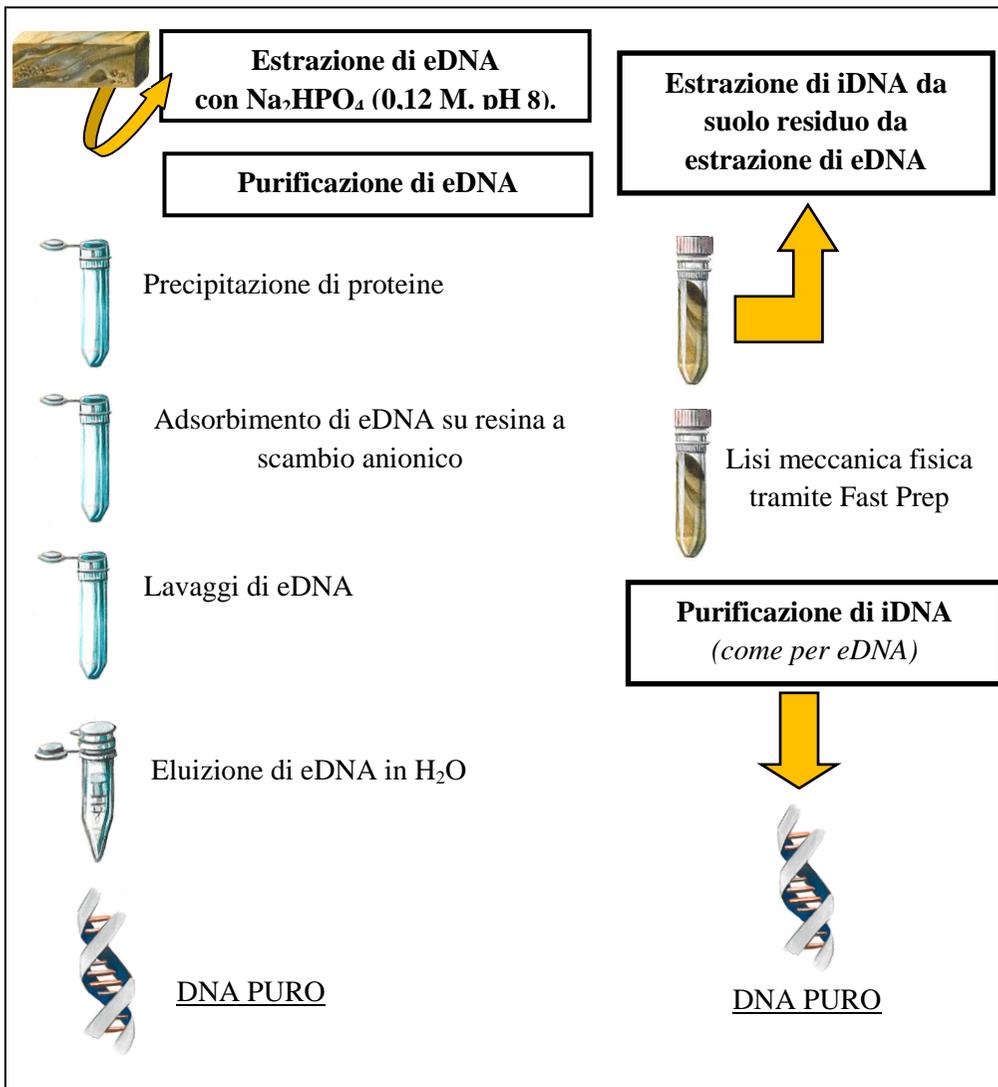


Fig.24 *Rappresentazione schematica dell'estrazione sequenziale di DNA (eDNA-iDNA).*

Analisi qualitativa e quantitativa del DNA estratto

Anche su questi campioni è stata condotta l'analisi spettrofotometrica per osservare il livello degli indici di purezza A260/A280 e A260/A230, un'analisi fluorimetrica per aver(iDNA *ds*), ed infine un'analisi qualitativa su gel d'agarosio, per poter definire la qualità del DNA estratto dalle differenti classi di aggregati, provenienti da suolo bruciato.

Amplificazione del DNA estratto tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)

Per l'amplificazione dei campioni tramite 16s rDNA PCR anche in questo caso è stato utilizzato l'approccio di Nested PCR utilizzato per i campioni di suolo bruciato, in cui è prevista una prima PCR con primers P0/ P6 ed una seconda PCR con primers 341f gc/ 534r .

Le mix di reagenti delle rispettive PCR ed i loro cicli sono riportati in Tab. 2 e 3.

Anche nel caso dell'amplificazione della 18s rDNA PCR, è stato applicato l'approccio di Nested PCR, che ha previsto una prima PCR con primers NS1 f / NS8r, ed una seconda PCR con primers Ef4f / NS3 gc r , le cui mix di reagenti e cicli sono riportati rispettivamente in Tab.4 e 5.

Caratterizzazione elettroforetica dei profili amplificati mediante DGGE

16srDNA DGGE

18srDNA- DGGE

Gli amplificati sono stati caratterizzati tramite elettroforesi su gradiente denaturante di tipo chimico (DGGE), effettuata utilizzando il Sistema Ingeny. 100 ng di ogni amplificato sono stati caricati su gel verticale all'8% (p/v) (16srDNA-DGGE) e 6% (18srDNA-DGGE) di acrilamide (acrilamide, N,N'-metilenebisacrilamide, p/p, 37.5:1) con gradiente denaturante lineare di tipo "top filling" con concentrazioni di agenti denaturanti crescenti dalla sommità verso il fondo, che copriva l'intervallo 45% - 70% per la 16s rDNA- DGGE e 45% - 60% per la 18srDNA- DGGE (dove il 100% di capacità denaturante è data da una soluzione 7M di urea e 40% v/v di formamide deionizzata).

La corsa elettroforetica è durata 18 h a temperatura e voltaggio costanti, 60 °C e 80V, 58°C e 85V rispettivamente per la 16sDGGE e per la 18sDGGE, in tampone TAE 0,5 X (16sDGGE) e TAE 1X (18sDGGE).

Stesso protocollo applicato nel caso dei campioni di suolo bruciato.

In Fig. 25 è riportato lo schema riassuntivo delle DGGE batteriche e fungine.

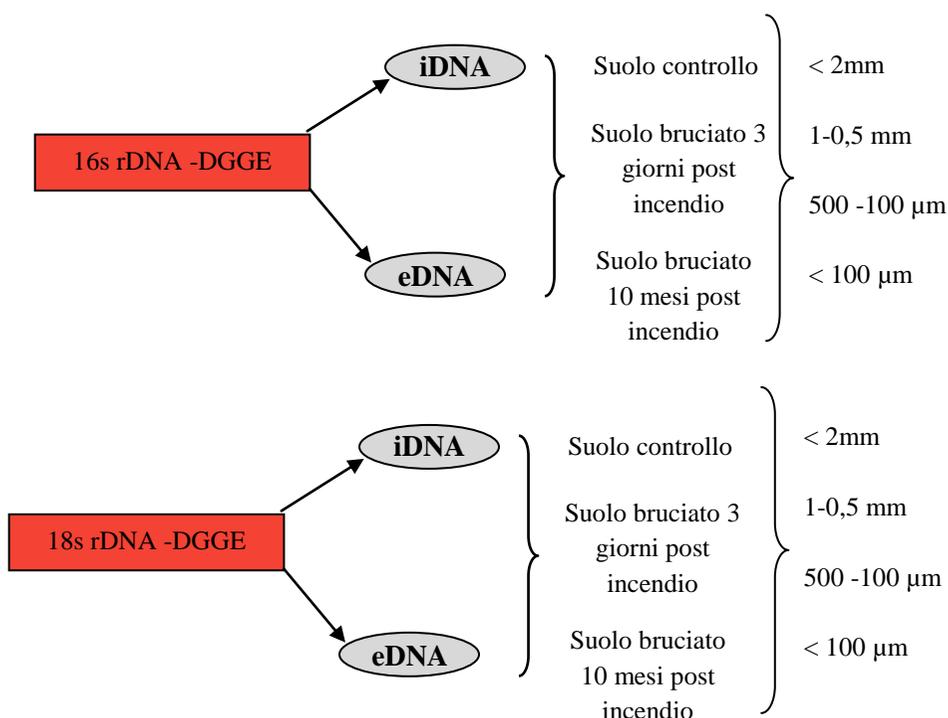


Fig. 25 Schema riassuntivo delle 16srDNA-DGGE e delle 18srDNA-DGGE dei campioni di suolo studiati.

7.5 RISULTATI

Analisi qualitativa e quantitativa del DNA estratto

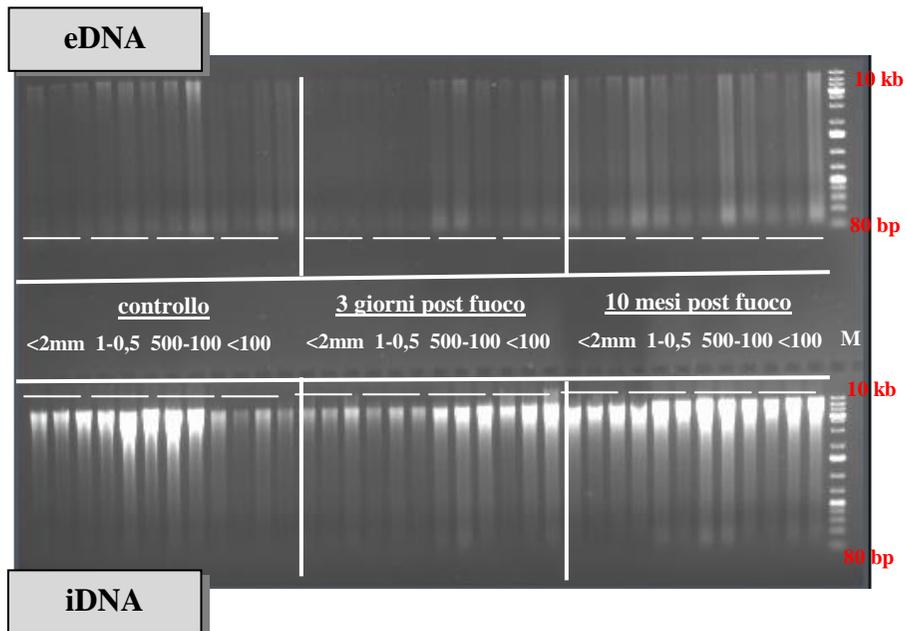


Fig.26 DNA extracellulare ed intracellulare estratto da differenti classi dimensionali di aggregati di suolo bruciato e da suolo di controllo, 3 giorni dopo l'incendio e 10 mesi dopo.

Il volume di DNA (intra ed extra) caricato su entrambi i gel all'1% di Agarosio, è di 10 μ l con 2 μ l di BBF (6X). L'elettroforesi è stata condotta a 100V per 60 minuti. M MassRulerTM DNA Ladder Plus (10 kb-80 bp).

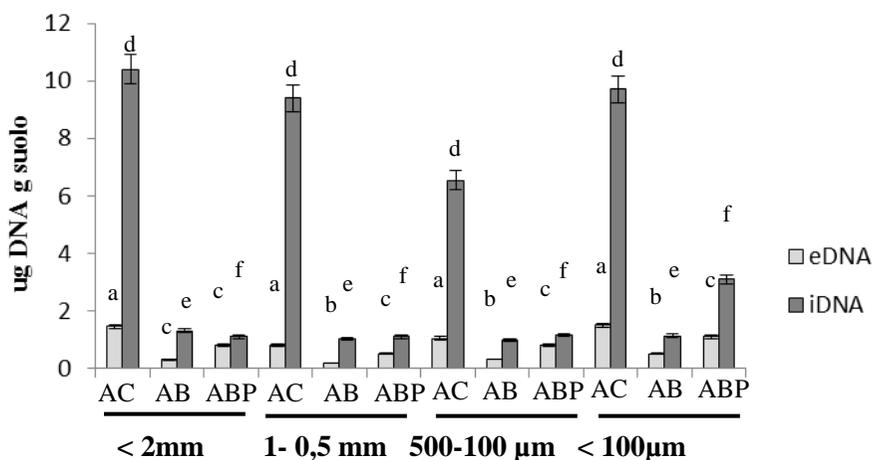


Fig. 27 *Contenuto di DNA intracellulare (iDNA) ed extracellulare (eDNA) estratti da differenti classi di aggregati da suolo bruciato e da suolo di controllo, campionati a 3 giorni dall'incendio e a dieci mesi dopo. I valori sono relativi alle medie di tre repliche (a,b,c) e le barre indicano le deviazioni standard relative al valore della media di tre repliche (n= 3) e le lettere indicano la differenza statistica per $p < 0,05$.*

In Fig. 26 è riportato il gel d'agarosio rispettivamente relativo alla frazione di eDNA e di iDNA che mostra la qualità del DNA estratto da differenti classi dimensionali di aggregati provenienti da suolo forestale bruciato, in diversi tempi di campionamento (3 giorni e dieci mesi dopo l'incendio) e dal suolo di controllo, considerato il suolo di riferimento.

Nella frazione di eDNA si hanno frammenti di DNA che vanno da alto peso molecolare (> 10 kb) fino ad 80 bp, a differenza della frazione di iDNA dove invece i frammenti di DNA sono tutti ad alto peso molecolare, in ogni situazione e classe di aggregato considerata.

L'eDNA negli aggregati < 2mm e 1- 0,5 mm dopo tre giorni dall'incendio, sembra essere più degradato rispetto alle altre situazioni considerate.

Qualitativamente in generale non si riscontrano grandi differenze tra le diverse classi dimensionali di aggregati, soprattutto nella frazione di iDNA.

Da un punto di vista semiquantitativo, l'iDNA è maggiore dell'eDNA, risultato che trova una significativa conferma anche dall'analisi qualitativa delle due frazioni di DNA estratto, espressa come $\mu\text{g DNA. g suolo}$. (Fig. 27).

Da un punto di vista strettamente quantitativo, non c'è una differenza significativa tra le diverse classi di aggregati, bensì per frazione di DNA, tra

il suolo di controllo, il suolo bruciato campionato dopo 3 giorni dall'incendio e quello dopo dieci mesi.

Campioni	iDNA			eDNA	
	[ng/μl]	A260/280	A260/230	A260/280	A260/230
AC (<2mm)	50,6	1,8	0,07	1,9	0,09
AC (1-0,5mm)	90,3	1,8	0,06	1,6	0,4
AC (500-100mm)	41,6	1,9	0,05	1,8	0,05
AC (<100μm)	97,6	2	0,05	1,7	0,03
AB (<2mm)	7,8	1,7	1	1,8	0,9
AB (1-0,5mm)	5,8	1,7	0,9	2	0,09
AB(500-100mm)	5,2	1,8	0,8	2	0,8
AB (<100μm)	5,03	1,9	0,6	1,6	0,006
ABP(<2mm)	0,3	1,9	0,08	1,8	0,8
ABP (1-0,5mm)	8,1	1,8	0,8	1,7	0,06
ABP(500-100mm)	9,2	2	0,9	1,9	0,9
ABP(<100μm)	9,7	1,9	0,06	2	1

Tab.8 Valore dei rapporti di assorbimento del DNA estratto nelle differenti condizioni di studio, nelle due frazioni di DNA analizzate. iDNA ds [ng/μl] considerato come indice di biomassa microbica.

I rapporti calcolati hanno permesso di valutare il grado di contaminazione degli estratti, da proteine (A260/A280) ed acidi umici (A260/A230). Come riportato in Tab.8, i valori A260/A280 del DNA estratto sia da suolo di controllo che da bruciato nelle differenti classi di aggregati, in tempi diversi di campionamento, sono risultati tendenzialmente buoni, indicando l'assenza di contaminazione da parte di materiale proteico.

I rapporti A260/A230, denotano invece una contaminazione da acidi umici nei campioni: valori che in ogni caso non hanno compromesso il buon esito delle amplificazioni del DNA tramite PCR, senza ricorrere ad ulteriori steps di purificazione del DNA.

Amplificazione 16S e 18S rDNA.

L'amplificazione del 16S rDNA, tramite l'applicazione dell'approccio di Nested PCR, messo a punto per un suolo bruciato ed utilizzato con buoni risultati anche nel caso di aggregati provenienti da suolo bruciato, ha generato un prodotto pulito per l'assenza di bande aspecifiche, della lunghezza di 200 bp per ogni suolo analizzato.(Fig.28 a).

Nel caso dell'amplificazione del 18S rDNA l'approccio Nested PCR ha permesso di ottenere un amplicone adeguato per ogni campione, pari a 564 bp. (Fig. 28 b).

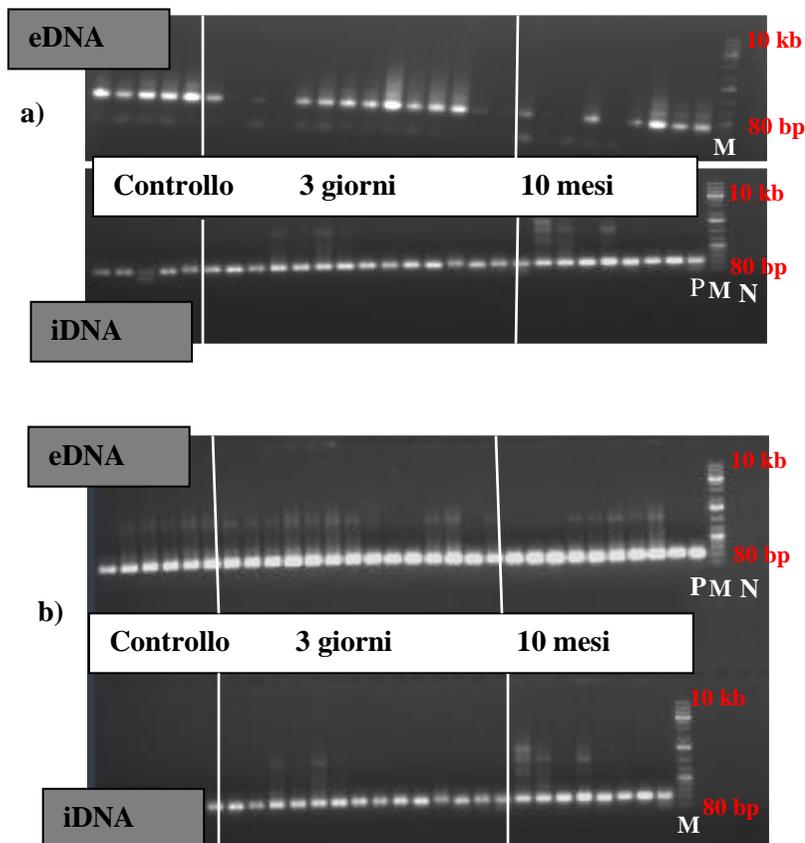
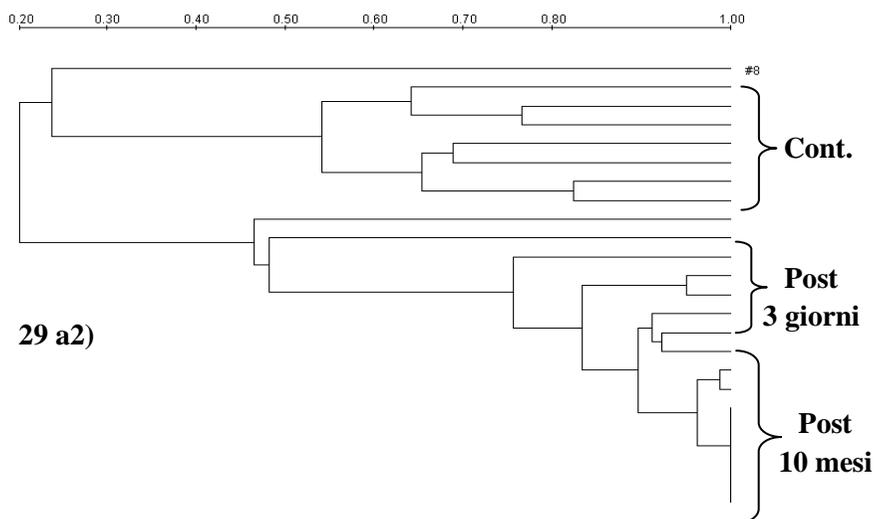
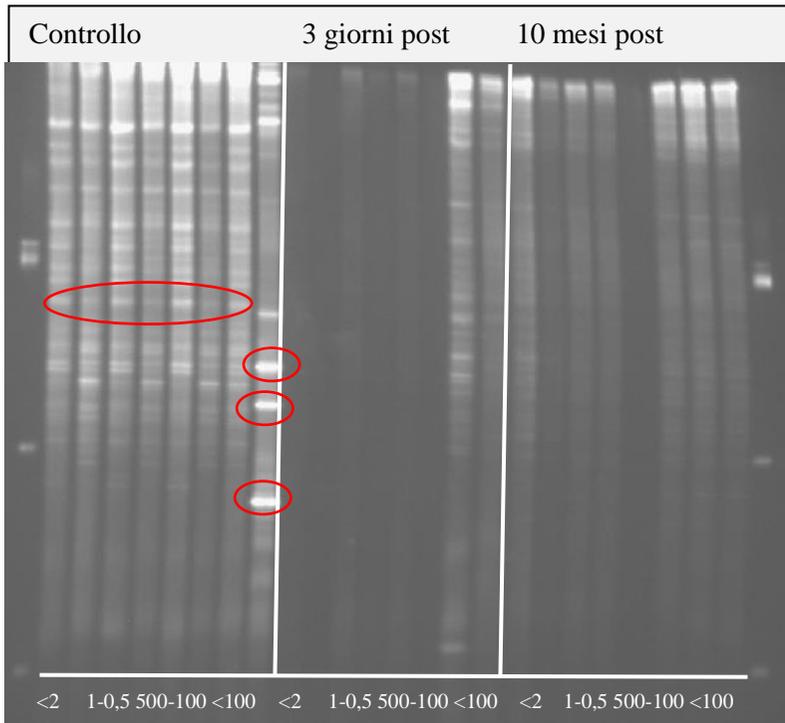


Fig. 28 a) Amplificazione della 16S rDNA PCR tramite approccio Nested. b) Amplificazione della 18S rDNA PCR tramite approccio Nested. Entrambi i gels d'agarosio all' 1% mostrano gli ampliconi generati tramite la seconda PCR, per la frazione di DNA intracellulare ed extracellulare. P controllo positivo, N negativo, M

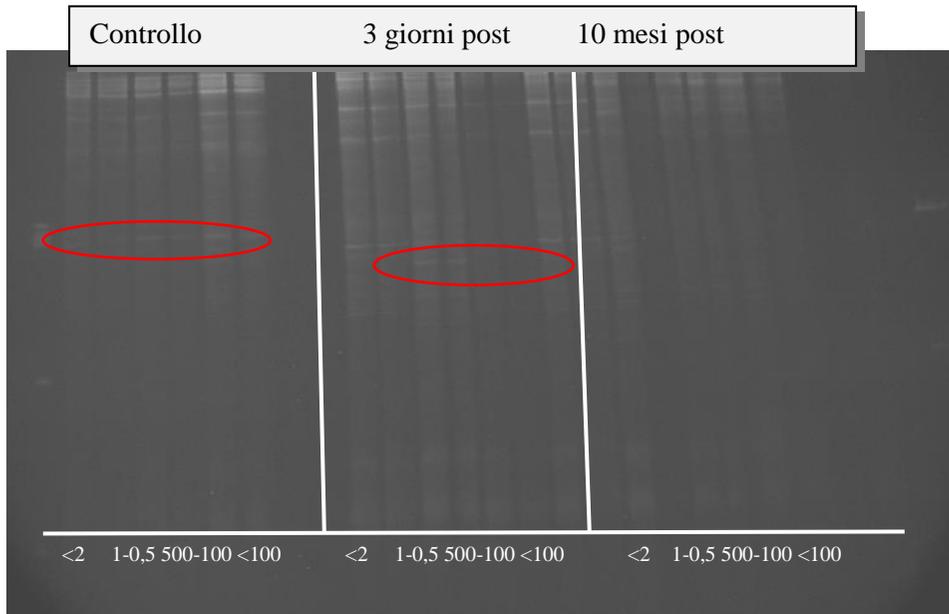
Mass Ruler™ Ladder Plus (10 kb-80 bp). Caricati per ogni gel e frazione di DNA, 5 µl DNA e 1 µl BBF (6X). Corsa 100V, 60 minuti.

Caratterizzazione dei profili elettroforetici tramite DGGE

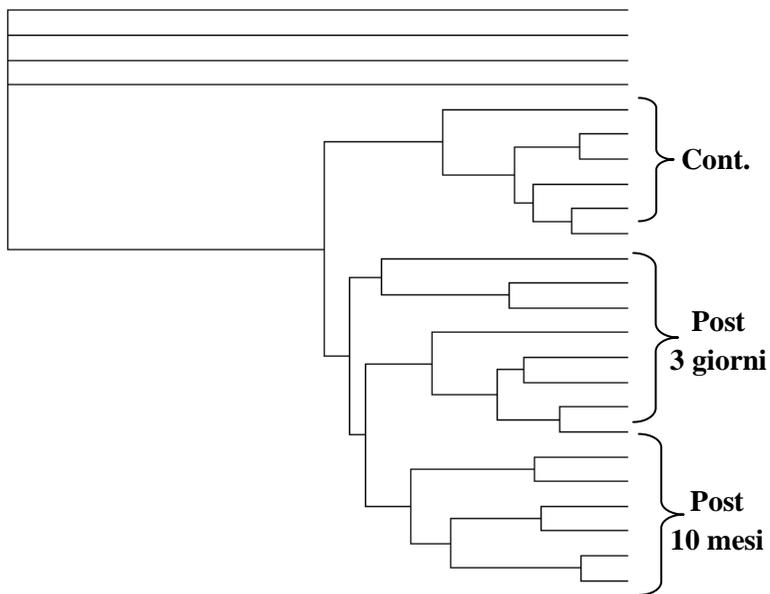
29 a1)



29 a2)



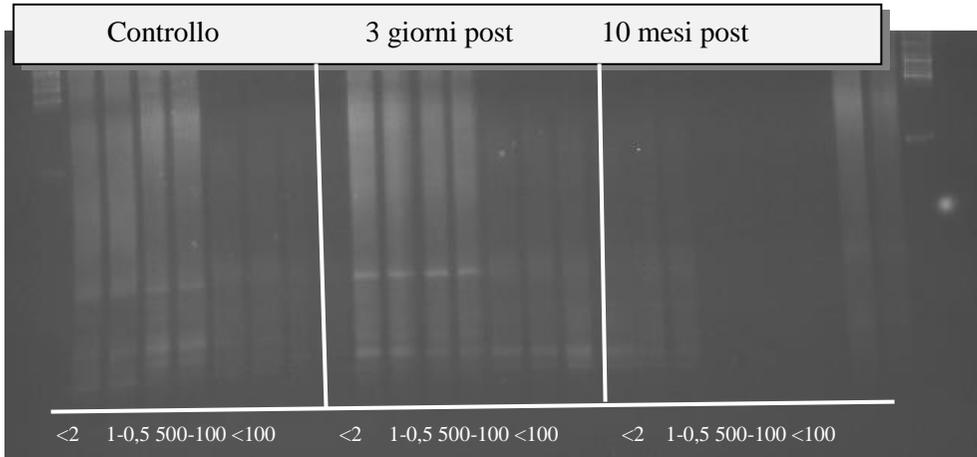
29 b1) 0,00 0,20 0,40 0,60 0,80 1,00



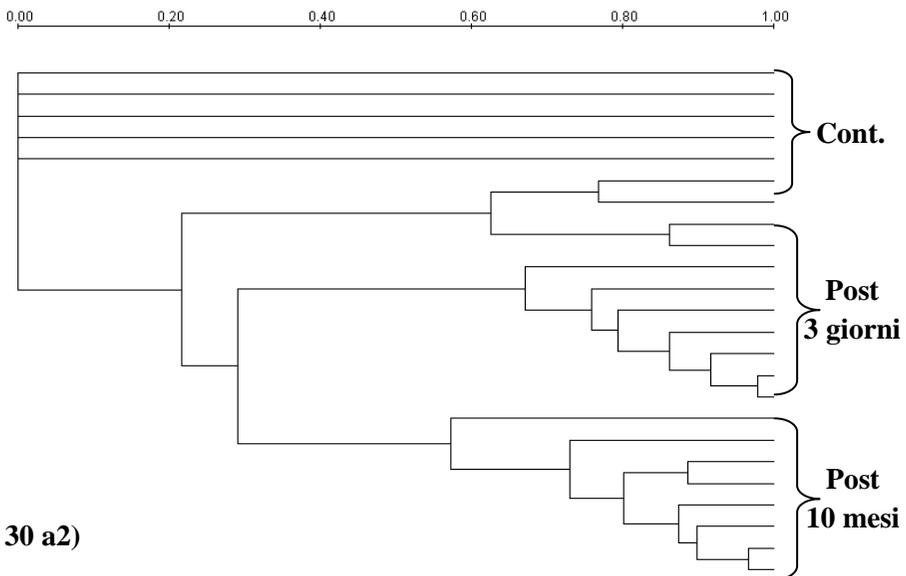
29 b2)

Fig. 29 a1) *Profilo elettroforetico della 16 srDNA DGGE relativa alla frazione di iDNA, condotta sulle comunità microbiche batteriche su suolo di controllo, Suolo bruciato dopo 3 giorni e dopo 10 mesi, nelle diverse classi dimensionali di aggregati (<math><2\text{ mm}</math>; 1-0,5 mm; 500-100 μm; <math><100\text{ μm}</math>.)* **29 a2)** *Similarità genetica di tipo batterico tra suolo di controllo e suolo bruciato nelle differenti classi dimensionali di aggregati, relativa alla frazione di iDNA.* **29 b1)** *Profilo elettroforetico della 16 srDNA DGGE relativa alla frazione di eDNA, condotta sulle comunità microbiche batteriche su suolo di controllo, Suolo bruciato dopo 3 giorni*

e dopo 10 mesi, nelle diverse classi dimensionali di aggregati (<2mm; 1-0,5mm; 500-100µm; < 100µm.) **29b2)** Similarità genetica di tipo batterico tra suolo di controllo e suolo bruciato nelle differenti classi dimensionali di aggregati, relativa alla frazione di eDNA.



30 a1)



30 a2)

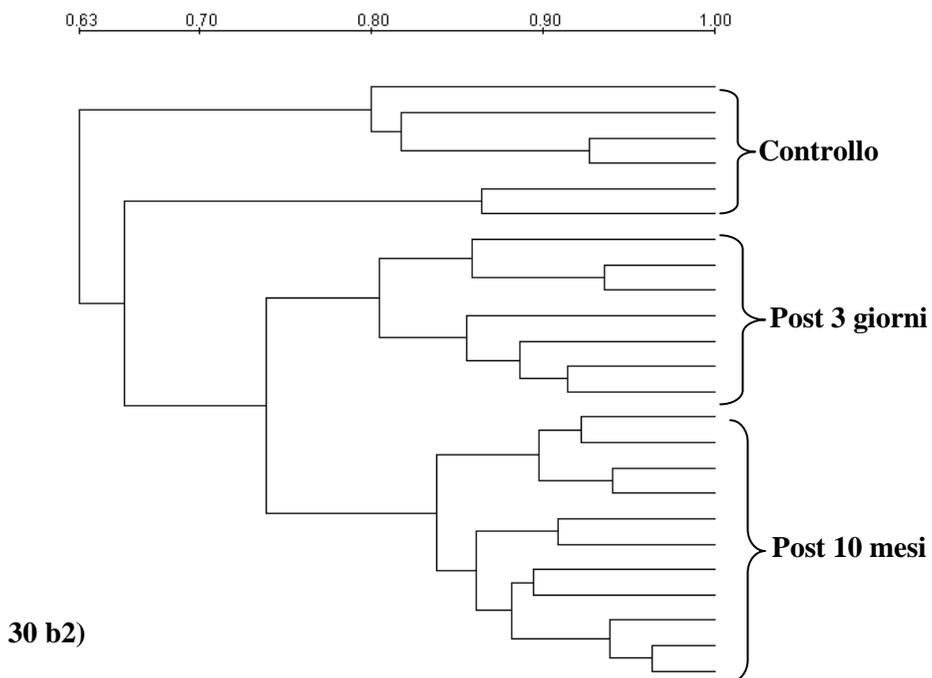
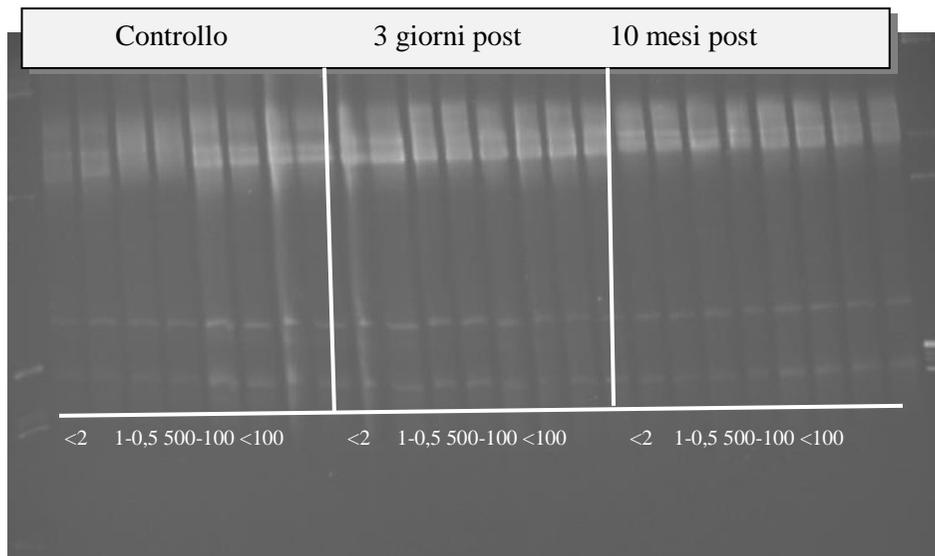


Fig. 30 a1) *Profilo elettroforetico della 18 srDNA DGGE relativa alla frazione di iDNA, condotta sulle comunità microbiche fungine su suolo di controllo, suolo bruciato dopo 3 giorni e dopo 10 mesi, nelle diverse classi dimensionali di*

aggregati (<2mm;1-0,5mm;500-100µm; < 100µm.) **30 a2)** *Similarità genetica di tipo fungino tra suolo di controllo e suolo bruciato nelle differenti classi dimensionali di aggregati, relativa alla frazione di iDNA.***30b1)** *Profilo elettroforetico della 18 srDNA DGGE relativa alla frazione di eDNA, condotta sulle comunità microbiche fungine su suolo di controllo, suolo bruciato dopo 3 giorni e dopo 10 mesi, nelle diverse classi dimensionali di aggregati (<2mm;1-0,5mm;500-100µm; < 100µm.)* **30b2)** *Similarità genetica di tipo fungino tra suolo di controllo e suolo bruciato nelle differenti classi dimensionali di aggregati, relativa alla frazione di eDNA*

Dall'analisi dei dendrogrammi, si definiscono le seguenti situazioni per le rispettive DGGE.

Nel caso della 16srDNA DGGE per la frazione di iDNA, si mettono in evidenza due clusters principali, di cui il primo è relativo ai campioni appartenenti alle classi dimensionali del suolo di controllo, mentre il secondo raggruppa i suoli bruciati a tre giorni e a dieci mesi dall'incendio.

Tra i due cluster c'è una similarità molto bassa, che non supera il 20%.

Tra le classi dimensionali <2mm, 1-0,5mm e 500-100 mm, del suolo di controllo c'è una similarità del 100%, mentre invece la classe dei microaggregati (<100 µm) dello stesso suolo (una sola replica), è simile al 50% circa alla stessa classe di aggregati, del suolo campionato dieci mesi dopo l'incendio.

Tra le classi di aggregati del suddetto suolo c'è una similarità piuttosto alta, intorno all'85%.

In tutte le classi dimensionali di aggregati del suolo di controllo è presente una stessa banda caratteristica, tranne nella seconda replica della classe <100 µm, in cui ci sono tre bande caratteristiche e per cui crea un cluster a sé, che ha una similarità con gli altri campioni dello stesso suolo, intorno al 20%.

Dal dendrogramma della frazione di eDNA, nella classe di microaggregati del suolo di controllo e di quello campionato a dieci mesi dall'incendio, non sono presenti bande.

Per il resto del dendrogramma, si evidenziano due raggruppamenti principali, il primo relativo al suolo di controllo mentre invece nell'altro si trovano i

campioni del suolo a tre giorni dall'incendio e a dieci mesi: tra i due principali clusters c'è una similarità del 50%.

Analizzando i due sottogruppi del secondo cluster, tra gli aggregati appartenenti al suolo campionato subito dopo l'incendio e tra gli aggregati del suolo dopo dieci mesi dal passaggio del fuoco, c'è una similarità del 60%. Vi è una banda caratteristica in tutte le classi dimensionali per gli aggregati del suolo di controllo, ed un'altra banda caratteristica, differente dalla prima, nelle classi di 1-0,5mm, 500-100µm e < 100 µm, nel suolo campionato dopo 3 giorni dal fuoco.

Dall'analisi delle comunità microbiche fungine, nel caso della frazione di iDNA, emergono 3 clusters principali.

Nel primo ricadono le classi di aggregati <2mm e 1-0,5 mm del suolo di controllo, nel secondo le classi di 500-100 µm e <100 µm a tre giorni dall'incendio, mentre nel terzo cluster ricadono le classi <2mm, 1-0,5mm (dopo dieci mesi) e la classe di 500-100µm (suolo di controllo).

Tra tutti questi clusters vi è una similarità bassa, che non supera in nessun caso il 30%.

Da notare come nella maggior parte delle classi di aggregati del suolo dopo dieci mesi dal passaggio del fuoco, non vi sono bande. Mentre la classe di microaggregati (<100 µm) dello stesso suolo ha una similarità dell'85% con la classe dimensionale di 1-0,5mm degli aggregati provenienti da suolo bruciato e campionato dopo 3 giorni.

Nel caso della frazione di eDNA, si hanno in evidenza tre clusters principali, rispettivamente costituiti dal suolo di controllo e dai suoli bruciati a tre giorni e dieci mesi dall'incendio, e tra questi tre raggruppamenti c'è una similarità del 63%, mettendo anche in evidenza un'alta similarità tra la classe di aggregati di <2mm e 1-0,5 mm (post 3 giorni) pari all'84%.

7.6 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Gli aggregati del suolo, sono le unità base strutturali del suolo, forniscono microhabitat speciali e vengono assunti proteggere sia la materia organica del suolo che il microbiota contro gli effetti negativi di condizioni ambientali difficili ed estreme.

Molti studi sono stati condotti sugli effetti del fuoco sullo stato di aggregazione del suolo che si riferisce alla capacità di resilienza della struttura del suolo in risposta ad eventi di disturbo esterni, come può essere un incendio.

In letteratura esistono divergenze circa l'effetto del fuoco sullo stato di aggregazione del suolo: Sanroque et al.,(1985), Giovannini et al.,(1987) e Úbeda et al. (1990), hanno osservato una sua diminuzione, soprattutto in suoli interessati da incendi di grave intensità, mentre Giovannini e Sequi (1976), Ibáñez et al.,(1983) e Díaz - Fierros et al.,(1987) ne hanno invece riscontrato un aumento.

La risposta della stabilità degli aggregati del suolo agli incendi boschivi è complessa, in quanto dipende da una serie di proprietà e caratteristiche correlate tra loro, come il contenuto di materia organica, la microbiologia del suolo, l'idrorepellenza e la mineralogia del suolo. (Mataix Solera et al., 2011).

In letteratura c'è una carenza di studi relativi a questi ultimi aspetti, soprattutto per ciò che concerne la parte microbiologica.

In questo studio si è cercato di studiare la risposta degli aggregati di un suolo forestale percorso da incendio, valutando l'effetto protettivo degli aggregati sul microbiota del suolo e sulla molecola di DNA (iDNA vs eDNA), analizzando tre differenti classi dimensionali di aggregati in termini di biomassa microbica (DNA double strand) e di struttura delle comunità microbiche, batteriche e fungine.

Come indice di biomassa microbica è stato scelto il dsDNA, valutato come iDNAds.

La distribuzione della biomassa microbica non è significativa per classi di aggregato.

Dall'analisi qualitativa delle differenti frazioni di DNA studiate non emergono particolari differenze a livello di classi di aggregato tra il suolo di controllo e il bruciato nei due differenti tempi di campionamento, soprattutto nel caso dell'iDNA, per cui la molecola di DNA non risulta particolarmente degradata, tranne nel caso della classe <2 e 1-0,5 mm dell'eDNA.

Di fatto gli aggregati anche dimensionalmente più piccoli, riescono a proteggere la molecola di DNA dal passaggio del fuoco, in quanto non si riscontra una particolare degradazione del DNA a livello qualitativo, né una completa sterilizzazione del suolo a livello di nessuna classe dimensionale di aggregati, seppur sia significativamente più elevata la quantità di iDNA

rispetto ad eDNA, nel suolo di controllo rispetto al suolo bruciato (dopo 3 giorni e dopo dieci mesi).

In termini generali, come riportato in letteratura (Ciardi et al. 1998; Bollen., 1969; Alexander.,1967; Widden e Parkinson.,1975), a temperature superiori a 70 - 80° C, è stata osservata la effettiva diminuzione della biomassa micorbica.

Il “*fine-tuning DNA analyses*”, ha evidenziato l’effetto protettivo degli aggregati non solo sulla frazione di iDNA ma anche sull’eDNA, considerando le importanti implicazioni ecologiche ed evolutive di quest’ultimo.

Infatti l’eDNA nel suolo può essere usato da batteri naturalmente competenti capaci di integrarlo nel loro genoma (Trevors et al., 1987; Clerc and Simonet, 1998), attraverso per esempio il processo di trasformazione genetica orizzontale.

La trasformazione batterica può avere importanti implicazioni sul destino del DNA extracellulare e sull’evoluzione batterica nel suolo. Infatti, una volta avvenuta la trasformazione, l’informazione genetica del DNA extracellulare può essere successivamente diffusa nella popolazione batterica del suolo mediante coniugazione e trasduzione (Nielsen et al. 2007).

Informazioni aggiuntive in termini di struttura delle popolazioni microbiche studiate a livello delle varie classi dimensionali di aggregati, sono state ottenute effettuando un fingerprinting genetico comparativo tra la frazione di iDNA e di eDNA.

La 16srDNA DGGE ha generato patterns complessi in entrambe le frazioni di DNA studiate e messo in evidenza delle differenze tra quest’ultime, sia a livello di struttura che di richness.

In iDNA è evidente un completo cambiamento nella struttura delle popolazioni batteriche tra il suolo di controllo e il bruciato (3 giorni e 10 mesi dopo l’incendio): differenza da considerare anche in una maggiore richness nel controllo rispetto al suolo bruciato.

Il controllo ha una distribuzione omogenea delle popolazioni microbiche in tutte le classi di aggregato analizzate.

Da notare che nella classe dei microaggregati (< 100 µm) del suolo bruciato (dopo 3 giorni), si riscontra una distribuzione delle popolazioni microbiche ed una richness molto simile al suolo di controllo.

Nel caso della frazione di eDNA si riscontra un cambiamento nella struttura del genoma ribosomiale batterico extracellulare tra il suolo di controllo ed il

bruciato (3 giorni e 10 mesi post fuoco), e c'è una più ricca presenza di genomi ribosomiali batterici dominanti nel suolo bruciato (dopo 3 giorni) rispetto al suolo di controllo e al bruciato campionato dopo dieci mesi.

Nel microaggregato (<100 μm) sia nel controllo che nel bruciato (post dieci mesi) non si evidenziano popolazioni batteriche dominanti.

Patterns meno complessi nel caso delle comunità microbiche fungine, in cui per entrambe le frazioni di DNA non si determina nessun cambiamento strutturale tra il suolo di controllo ed il bruciato, in entrambi i tempi di campionamento.

Allineando i gels delle frazioni di DNA studiate, (iDNA vs eDNA), grazie al DNA Marker di riferimento caricato in ogni DGGE gels, nel caso dei batteri, per la frazione di eDNA sono presenti popolazioni caratteristiche tipiche.

Questi genomi ribosomiali (eDNA), sono popolazioni rare più sensibili all'incendio, di cui se ne ha traccia soltanto su gel relativo alla frazione di eDNA.

Queste popolazioni caratteristiche, non sono dominanti, per cui su gel di iDNA non sono detectate: questa è un'informazione aggiuntiva rispetto alla visione delle popolazioni dominanti presenti a livello della comunità microbica batterica rilevata dalla frazione di iDNA.

7.7 EFFETTO DEL FUOCO SULLA COMPONENTE MICROBIOLOGICA DI UN SUOLO FORESTALE.

OBIETTIVI RAGGIUNTI E LINEE DI STUDIO FUTURE

Lo studio di suoli bruciati, soprattutto forestali, è un argomento tanto attuale ed anche studiato, che però vista la sua notevole importanza, ancora richiede di chiarire molti punti, soprattutto per ciò che concerne gli effetti del fuoco sulla componente biologica di un suolo forestale.

Infatti mentre sono stati condotti numerosi studi sulle conseguenze dell'incendio sulle proprietà chimico e fisiche di un suolo, ben poco ancora si sa su come effettivamente si comporta la componente biologica.

Questo probabilmente perché se da un lato i microrganismi del suolo sono estremamente importanti in quanto rappresentano la parte viva del suolo, ciò che determina la sua biodiversità e parallelamente a questo perché è grazie ai microrganismi del suolo che tutto l'ecosistema può funzionare, dall'altro si sa ancora poco di loro perché fin quando non sono state applicate le tecniche molecolari allo studio del suolo, era ancor più difficile addentrarsi in questo tipo di analisi, tanto è che il suolo è stato definito come una "black box".

La scelta di effettuare un'analisi comparativa delle frazioni di iDNA e di eDNA su un suolo forestale bruciato, ha previsto l'ottimizzazione di un protocollo per l'estrazione sequenziale di DNA e la messa a punto di un protocollo ex novo per la 16s rDNA PCR, e molte prove per riuscire ad ottenere un buon prodotto di PCR per poter effettuare le successive analisi molecolari (DGGE).

Questi risultati sono il frutto di una ricerca di base, ex novo, da cui sono stati ottenuti dei primi risultati soddisfacenti che dimostrano come la molecola di eDNA possa persistere nel suolo anche dopo il passaggio del fuoco e di come questo possa aprire un'eventuale nuovo sbocco di ricerca grazie alla rilevanza ecologica dell'eDNA, in questo particolare ambiente estremo.

La peculiarità di questo lavoro è l'innovativa comparazione tra la frazione di iDNA e di eDNA, e lo studio dello stesso DNA extracellulare, che hanno permesso di ottenere informazioni descrittive e di maggior dettaglio, su come varia la diversità delle comunità microbiche batteriche e fungine, sia in termini di cambiamenti o meno a livello di struttura delle popolazioni

microbiche, sia a livello di richness, subito dopo il passaggio del fuoco e dopo circa un anno dall'evento.

Le linee di studio future, permetteranno di dare un valore aggiunto all'attuale studio, in quanto si prevede di combinare questi dati con quelli relativi al cDNA derivante dal pool totale di RNA del suolo, questo per raggiungere una completa caratterizzazione della comunità microbica presente nel suolo, in modo da valutare quali siano le popolazioni attive pre e post incendio e la loro correlazione a specifiche funzioni nel terreno, ed anche con analisi di espressione di geni che codificano per la beta-glucosidasi e proteasi, al fine di valutare l'impatto del fuoco sulle caratteristiche microbiologiche del suolo, anche in termini di attività funzionale e metabolica .

E' stato condotto un ulteriore approfondimento relativo allo studio dell'effetto del fuoco sulla componente microbiologica di un suolo forestale, relativamente agli aggregati, in quanto essi rappresentano l'unità strutturale di base del suolo, definiscono microhabitat speciali e proteggono sia la materia organica del suolo che il microbiota da effetti negativi in condizioni ambientali difficili.

Lo studio condotto sulle differenti classi di aggregato al fine di valutare il loro effetto protettivo sul microbiota del suolo, in termini di biomassa microbica (ds DNA) e struttura delle comunità microbiche (batteri e funghi), discriminando l'intero metagenoma del suolo tra frazione di iDNA e di eDNA, ha permesso di ottenere interessanti informazioni a riguardo, soprattutto per ciò che concerne la persistenza della molecola di eDNA dopo il passaggio del fuoco.

SECONDA PARTE

SUOLI CONTAMINATI DA METALLI PESANTI.

**1° MONITORAGGIO SUGLI EFFETTI DELLA
FITOSTABILIZZAZIONE ASSISTITA SULLA DIVERSITA' DELLE
COMUNITA' MICROBICHE DEL SUOLO, IN DUE DIFFERENTI
SITI DI CAMPIONAMENTO**

SITO SPERIMENTALE DI SLAGNAS (SVEZIA)

8.2 MATERIALI E METODI

8.2.1 Area di campionamento e schema sperimentale



L'area di studio si trova nel Nord della Svezia. Si tratta di un suolo contaminato principalmente da Cu, Pb e As.

Questo suolo è stato rimediato tramite fitostabilizzazione assistita, iniziata nel 2006, con l'aggiunta di 5% (w/w) di cenere e 5% (w/w) di torba, su terreno asciutto.

Le ceneri, derivanti dalla combustione del legno, provengono

da un impianto di riscaldamento a Oresundskraft (Svezia).

La torba invece è stata messa a disposizione da un fornitore privato di suolo e substrati (Norrlandsjord och Miljo AB, Luleå, Svezia) (Kumpiene et al, 2008).

I campioni di suolo sono stati raccolti ad una profondità di 20 cm nel 2011, dopo cinque anni dalla bonifica del suolo, seguendo il precedente schema sperimentale riportato da Kumpiene et al., 2008.

Per il campionamento sono stati utilizzati 4 lisimetri cilindrici di polietilene (diametro 0,5 m , altezza 0,5 m , volume di 100 litri).

Due lisimetri sono stati riempiti con suolo non trattato (UNT), e altri due con suolo trattato (TR). Inizialmente, un lisimetro con suolo UNT e uno con suolo TR sono stati seminati con una miscela di semi di specie erbacee, generalmente utilizzata per la rivegetazione di terreni carenti di nutrienti. Tuttavia, le piante nel terreno seminato UNT non sono sopravvissute, mentre in quello trattato sono cresciute.

Pertanto, la prova sperimentale risulta costituita da due lisimetri con terreno TR con presenza costante di vegetazione erbacea e da due lisimetri contenenti terreno UNT senza vegetazione. I lisimetri sono stati inseriti nel terreno ad una profondità di 0,5 m ed esposti alle condizioni ambientali, con

temperatura media annuale di 16° C e precipitazioni annuali di 506 mm (SMHI, 2001).

I percolati provenienti dai lisimetri sono stati raccolti dal loro fondo per 10 volte nell'arco di 400 giorni dal loro inserimento nel suolo. Sono stati successivamente filtrati con una siringa e conservati a 4°C prima delle analisi. Il pH del percolato è stato misurato entro 1h dopo il campionamento. Le concentrazioni di Cu e Pb nel percolato sono state misurate mediante ICP - OES (Perkin Elmer Optima 2000 DV).

Il primo campionamento è stato effettuato subito dopo la fitostabilizzazione, nel 2006 (T1), mentre il secondo è stato effettuato con la stessa modalità, nel 2011 (T2).

In questo arco di tempo, nel suolo non sono stati effettuati ulteriori interventi di biorisanamento, e non è stato effettuato nessun monitoraggio dall'unico intervento di fitostabilizzazione assistita (2006).

8.2.2 Caratterizzazione molecolare delle comunità microbiche del suolo

8.2.2.1 Estrazione del DNA totale (tDNA) dal suolo.

Il tDNA del suolo è stato estratto mediante lisi diretta basata sulla lisi meccanica, tramite *Fast DNA ® Kit for soil* (BIO 101, Inc.).

Il suolo (0,5 g) è stato posto in appositi tubini contenenti una miscela di sfere di ceramica e di silice di due diverse dimensioni. I tubini sono stati agitati nel *Fast Prep®* (FP 120 Fast Prep Cell Distrupor) con moto sussultorio a velocità stabilita a 5.5 metri/secondo per 30 secondi , così da ottenere la rottura meccanica delle cellule. La lisi meccanica avviene in presenza di vari tamponi (solventi organici, detergenti, sali) che assicurano un'omogeneizzazione completa del campione e la solubilizzazione delle proteine. Il DNA estratto è stato purificato con la procedura *GeneClean®* (BIO 101) che prevede l'uso di una resina a scambio anionico. Il protocollo del BIO 101 è stato modificato trattando il DNA legato alla resina“ Binding Matrix”, due volte con Guanidine Thiocynate 5.5 M, prima di sottoporlo ai lavaggi con SEWS (Salt Etanol Wash Solution). La grandezza molecolare del DNA ottenuto va da 6 a 25 kb, con una resa da 1 a 150 µg/500 mg suolo: variabilità che dipende dalla matrice suolo e dai microrganismi presenti.

8.2.2.2 Caratterizzazione quantitativa e qualitativa del DNA

Il DNA è stato caratterizzato qualitativamente in termini di peso molecolare mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio (0,8% w/v), in tampone TAE 1 x (Tris Acetate EDTA buffer), e quantitativamente in termini di rese di DNA totale espresse in μg di DNA per g di suolo confrontando i campioni con un marker costituito da frammenti di DNA a lunghezza nota. (DNA Marker Mass Ruler Plus: 10 kb – 80 bp, Fermentas).

Sono state effettuate letture relative alla concentrazione del DNA estratto, sia allo spettrofotometro che al fluorimetro.

Le letture allo spettrofotometro (NanoDrop) sono state effettuate alle lunghezze d'onda di 260, 280 e 230 nm (picco d'assorbanza del DNA, delle proteine e di vari composti quali: fenolo, composti aromatici, peptici e carboidrati, rispettivamente). Effettuando il rapporto tra le rispettive assorbanze si può ottenere una stima della purezza del DNA estratto.

Il rapporto di 1.8-2.0 tra i valori di assorbanza a 260 e 280 (A_{260}/A_{280}) e 260 e 230 nm (A_{260}/A_{230}) è indice di elevato grado di purezza del DNA rispetto alle proteine e altri composti contaminanti come il fenolo.

La concentrazione degli acidi nucleici è stata misurata anche con il fluorimetro (*Qubit Fluorometer*[™], Invitrogen, Molecular Probes, USA), che permette di effettuare misure di fluorescenza tramite l'uso di fluorofori e che dà una misura del DNA a doppia elica (dsDNA), che rappresenta un indice di biomassa microbica.

E' stato utilizzato il kit per l'analisi del DNA, *Quant-iT*[™] *dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, USA).

8.2.2.3 Amplificazione del DNA estratto tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)

8.2.2.4 Caratterizzazione dei profili elettroforetici amplificati tramite DGGE

16SrDNA PCR-DGGE

80 ng di DNA stampo sono stati amplificati tramite primers universali per i batteri: gc968f/UNI1401r, (Tab.9), (Nubel et al., 1996), e 100 ng del prodotto di PCR sono stati utilizzati per effettuare la DGGE, gel di poliacrilamide al 6%, con gradiente denaturante di 45% e 65% (dove il 100% di capacità denaturante è data da una soluzione 7M di urea e 40% v/v di formamide deionizzata), a temperatura costante di 60°C per 16h a 100V, usando il sistema Ingeny phor.

Mix (per 1 campione)	Conc.iniziale	volume (µl)
H ₂ O UHQ		15,25
Primer GC 968f	[10 µM]	1,25
Primer UNI 1401r	[10 µM]	1,25
Buffer	[10x]	5
MgCl ₂	[10 mM]	7,5
BSA	[500 µg/ ml]	10
dNTP mix	[10 mM] ciascuno	1,25
TAQ Polymed	[5U/ µl]	0,5
Mix finale		42
DNA STAMPO	[10 ng/µl]	8
Volume finale		50

Tab. 9 *Mix di reagenti della 16s rDNA PCR.*

18SrDNA PCR-DGGE

La composizione della comunità microbica fungina è stata analizzata tramite fingerprinting genetico 18srDNA PCR-DGGE.

La PCR ha previsto una Nested PCR: nella 1° PCR sono stati utilizzati 40 ng di DNA stampo, con i NS1f/NS8r (Kowalchuk, 1999), da cui si ottiene un prodotto di 1700 bp. La 2° PCR è stata effettuata con 2µl del prodotto della prima PCR, utilizzando il set di primers EF4f/NS3rGC (Brodie et al., 2003), da cui si ottiene un amplicone di 564 bp.

Il gel DGGE all'8% di poliacrilamide, ha previsto un gradiente denaturante di 45–60%, a 58°C e 85 V per 18 h.

8.3 RISULTATI

Analisi del DNA

E' stata confrontata la qualità del tDNA estratto da campioni di suolo nei due differenti tempi di campionamento T1 e T2: il DNA estratto è ad alto peso molecolare (> 10 Kb), soprattutto nei campioni di suolo trattati in T1.

Il grado di fluorescenza riflette la quantità di DNA presente nel terreno: ad una maggiore intensità di fluorescenza corrisponde una maggiore quantità di DNA. Il CA-T1 ha una maggiore quantità di DNA rispetto a CA – T2, così come tra TA- T1 e TA- T2. (Fig.31).

Non vi è però alcuna significativa differenza quantitativa relativamente alle rese del DNA estratto al tempo T1 e T2.

I rapporti tra i valori di assorbanza A260/A280 e A260/A230, non erano buoni per i campioni di suolo al T1, indicando impurezze nel DNA, che non hanno comunque particolarmente interferito con la successiva amplificazione dei campioni tramite PCR.

In tutti i campioni al T2 i valori di assorbanza A260/A280 erano invece buoni, mentre restavano bassi i valori di assorbanza A260/A230, indicando una contaminazione da composti fenolici (Tab.10).

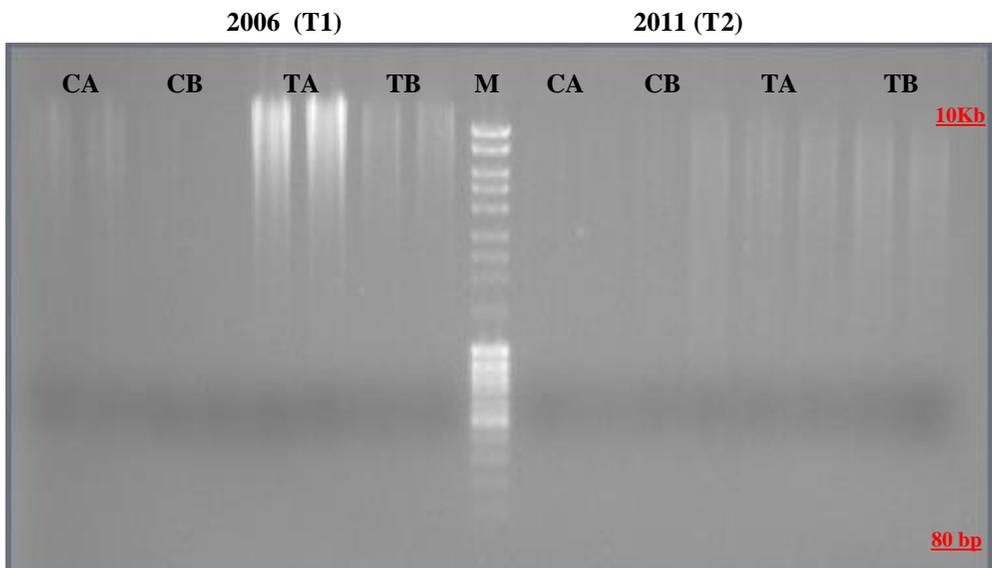


Fig.31 CA e CB indicano i terreni non trattati, TA e TB indicano i terreni trattati. M DNA Mass Ladder 80bp-10Kb. 0,8% gel di agarosio. 10 microlitri di DNA totale (tDNA) e 2 ml di BBF 6X. Corsa: 100V, 60 min, in due tempi di campionamento diversi, 2006 (T1), 2011 (T2).

Campioni	2006 (T1)				2011 (T2)			
	[ng/μl] ds DNA	A260/280	A260/230	μg DNA/g suolo	[ng/μl] ds DNA	A260/280	A260/230	μg DNA/g suolo
CA	1	1,6	0,06	0,5	0	1,7	0,2	0,5
CB	1,1	1,4	0,04	1,3	0,9	1,8	0,02	1,2
TA	1,8	1,2	0,05	2,2	1,1	1,7	0,08	1,4
TB	1,3	1,4	0,03	1,5	1,1	1,6	0,07	1,5

Tab. 10 Valori di concentrazione e rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 del DNA totale estratto da 0,5 g di suolo, al tempo T1 e T2. Rese riferite a μg di DNA per g di suolo.

Amplificazione 16S e 18S rDNA.

L'amplificazione del 16S rDNA ha generato un prodotto pulito per l'assenza di bande aspecifiche, della lunghezza di 473 bp per ogni suolo analizzato.(Fig.32 a).

Nel caso dell'amplificazione del 18S rDNA l'approccio Nested PCR ha permesso di ottenere un amplicone adeguato per ogni campione, pari a 564 bp. (Fig.32b).

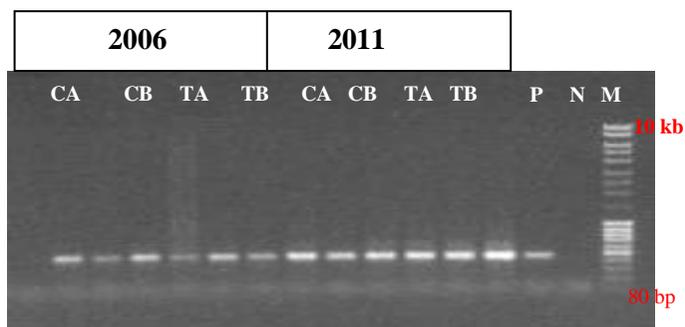


Fig. 32 a) Gel elettroforetico del tDNA estratto da suolo di controllo (CA, CB) e suolo trattato (TA, TB), nei due tempi di campionamento (2006- 2011) ed amplificato mediante 16S rDNA- PCR (GC 968f/ UNI 1401r). P controllo positivo, DNA amplificato di *BD 15, 12* [7,9 ng / μ l]; N controllo negativo. Il volume di DNA caricato su gel all' 1% è stato di 5 μ l con 1 μ l BBF (6x). L'elettroforesi è stata effettuata a 100 V per 60 minuti. M MassRuler™ DNA Ladder, Mix (10 kb-80 bp).

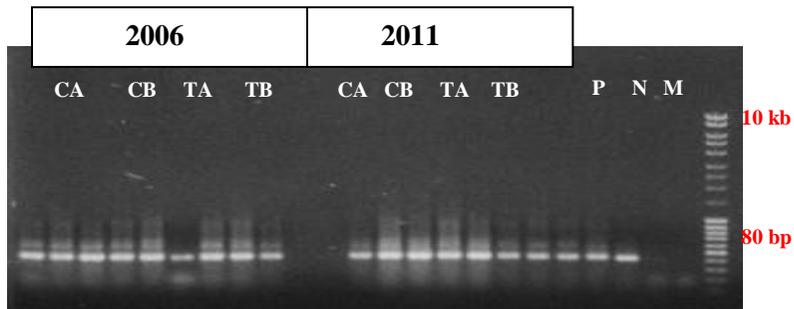
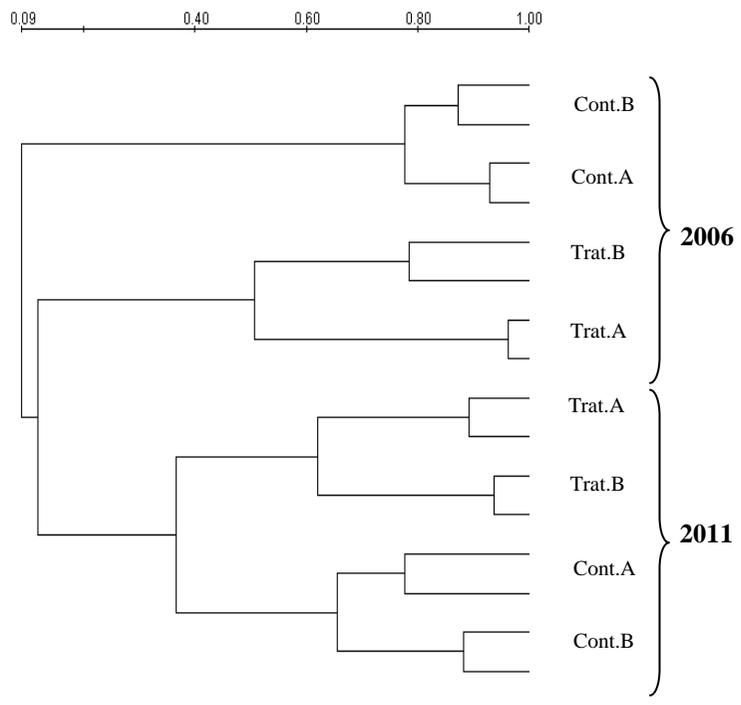
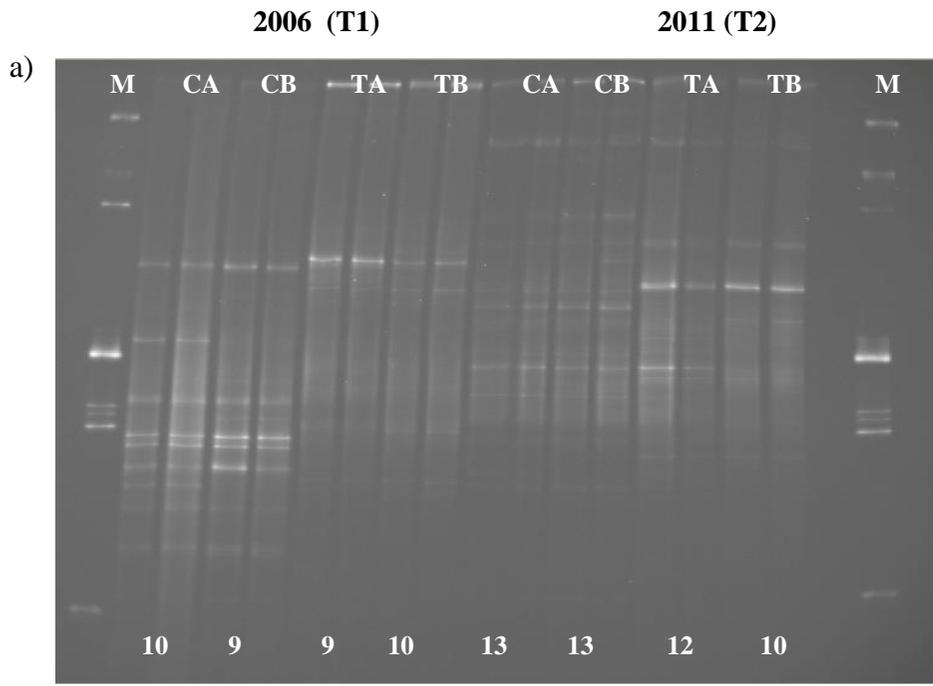


Fig. 32 b) Gel elettroforetico di campioni di tDNA estratti da suolo di controllo (CA, CB) e suolo trattato (TA, TB), nei due tempi di campionamento (2006- 2011) ed amplificato mediante 18S rDNA- PCR (*Ef4 f/NS3 gc r*, 2°PCR). P controllo positivo, *Saccaromiches cerevisiae*; N controllo negativo. Il volume di DNA caricato su gel all' 1% è stato di 5 μ l con 1 μ l BBF (6x). L'elettroforesi è stata effettuata a 100 V per 60 minuti. M MassRuler™ DNA Ladder, Mix (10 kb-80 bp).



2006 (T1)

2011 (T2)

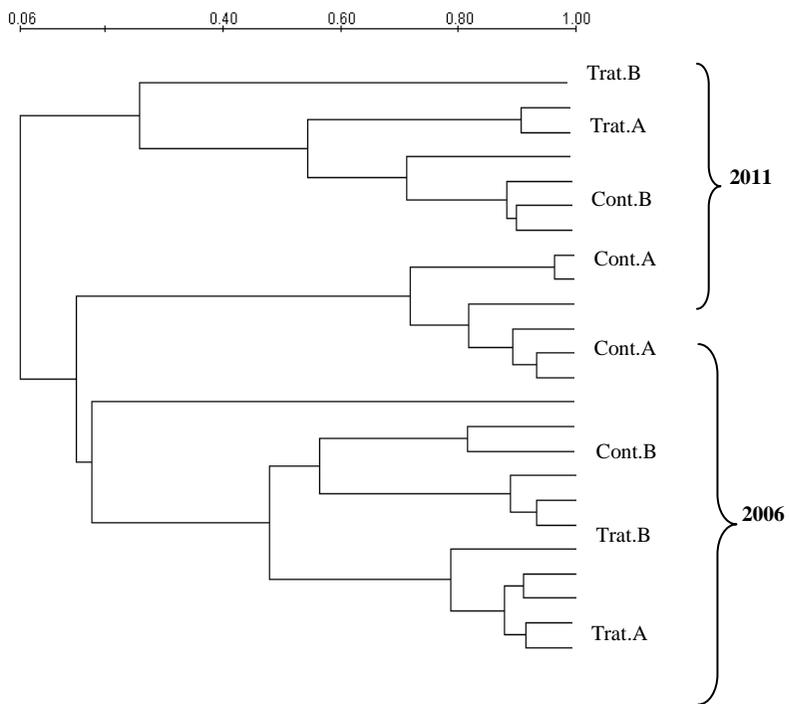
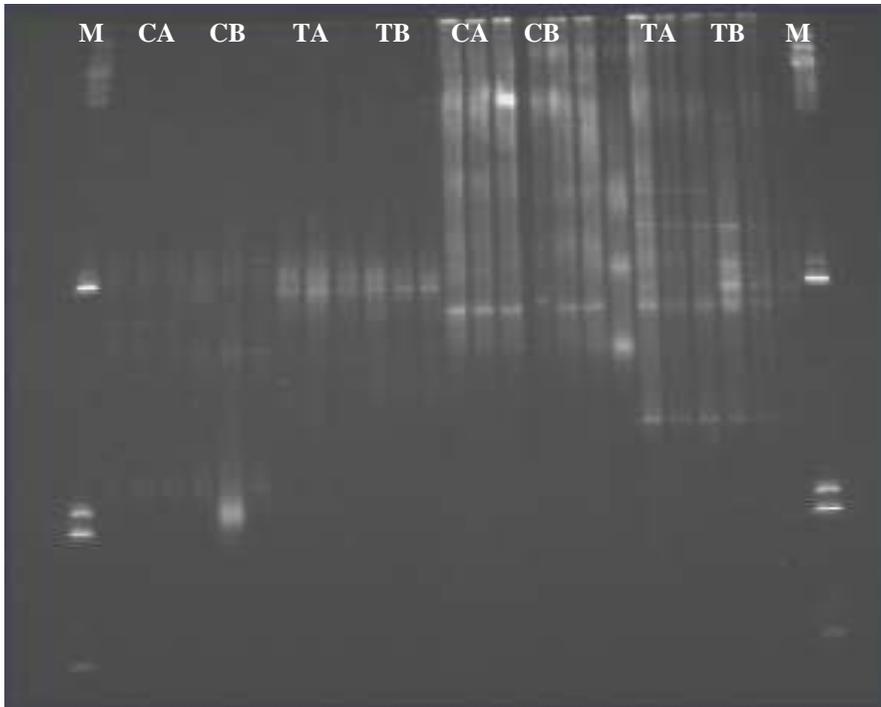


Fig.33a) 16S rDNA-PCR-DGGE fingerprinting della microflora batterica dei suoli prelevati campionati nel 2006 (T1) e nel 2011 (T2). **b)** 18S rDNA-PCR-DGGE fingerprinting della microflora fungina dei suoli prelevati campionati nel 2006 (T1) e nel 2011 (T2).

Le rispettive clusters analysis delle comunità batteriche (**a**) e fungine (**b**) dei suoli nei tempi (T1) e (T2) sono state definite graficamente tramite dendogramma, ottenute analizzando i fingerprints, mediante software *Quantity One* (BioRad), ed applicando l'UPGMA basato sull'indice di similarità Dice.

8.4 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Sia la 16S rDNA DGGE che la 18S rRNA - DGGE hanno generato patterns caratteristici delle comunità di popolazioni dominanti batteriche e fungine, sia nei suoli trattati (TA, TB) che in quelli non trattati (CA,CB), nei due differenti tempi di campionamento (T1,T2).

Nel caso della 16s rDNA DGGE, si è verificata una similarità assolutamente bassa, intorno al 10%, tra i suoli campionati al T1 e al T2.

Stessa situazione si ripresenta anche nel caso del fingerprinting fungino, in cui si è verificata una similarità molto bassa tra i suoli trattati e non trattati campionati al tempo T1 e T2.

La tecnica della fitostabilizzazione assistita in situ, per il recupero di questi suoli contaminati da metalli pesanti, principalmente da Cu, Pb e As, in un primo momento ha favorito un certo aumento della biomassa microbica, favorendo anche una maggiore attività enzimatica (Kumpiène et al., 2008), dimostrando che questa tecnica può essere validamente utilizzata per l'immobilizzazione delle frazioni più labili degli elementi in traccia, per abbattere la tossicità del suolo ed incrementare molte delle sue attività microbiologiche e biochimiche (Kumpiène et al., 2008).

Il miglioramento della funzionalità del suolo inizia nel breve periodo dopo l'inizio del complesso di azioni che avviano la fitostabilizzazione (Kumpiène et al., 2008).

Dopo un primo monitoraggio di questi suoli, dal tempo T1 a T2, periodo mediamente lungo in cui nessun'altra azione di ripristino è stata condotta su questi suoli, la biomassa microbica, intesa in termini di dsDNA, non subisce

una significativa diminuzione, né il tDNA estratto risulta essere qualitativamente peggiore, in termini di peso molecolare.

Dal fingerprinting genetico condotto sulle comunità batteriche e fungine, tramite rispettivamente 16s rDNA e 18s rDNA DGGE, non si verifica un aumento della richness delle specie microbiche da T1 a T2, ma piuttosto i vari trattamenti di fitostabilizzazione inducono cambiamenti nella struttura delle comunità microbiche nel breve periodo (T1), come già dimostrato da altri studi (Renella et al., 2006; Ascher et al., 2009).

Dopo cinque anni (T2) la struttura delle comunità microbiche subisce un ulteriore cambiamento rispetto al primo campionamento (T1).

La funzionalità del suolo durante il progresso della fitostabilizzazione evolve a causa dell'effetto cooperativo tra colonizzazione biologica (piante, microrganismi, microfauna), riduzione della tossicità e miglioramento della struttura, e porta ad un incremento della funzionalità del suolo (Satchel e Martin, 1984; Pagliai e De Nobili, 1993), all'umificazione della sostanza organica (Schulten et al., 1995) e al raggiungimento di uno stato stazionario che evidentemente rappresenta il nuovo equilibrio del suolo trattato con l'ambiente.

Per assicurare che suoli come questi, trattati con fitostabilizzazione assistita in situ, possano evolvere verso una crescente complessità ecologica, occorre che siano periodicamente monitorati.

I risultati relativi a questo primo monitoraggio dei suoli, (da T1 a T2), coprono un arco di tempo mediamente lungo, pari a circa cinque anni, in cui non si sono verificati grandi e determinanti cambiamenti in termini di biomassa microbica ma nei riguardi della struttura delle comunità microbiche, da T1 a T2 si sono verificate ulteriori modifiche, per cui la funzionalità del suolo da una prima ripresa avvenuta subito dopo l'inizio della fitostabilizzazione, nel 2006 (T1), pare che continui ad evolvere verso una differente complessità ecologica o quanto meno, strutturale.

Tuttavia per assicurare che questa tecnica sia effettivamente efficace nel lungo periodo, sicuramente più ampio di cinque anni, i risultati attuali dovranno essere completati e correlati periodicamente, da risultati aggiuntivi che confermino o smentiscano l'odierna condizione di questi suoli.

SITO MINERARIO DI BRUNITA –CARTAGENA LA UNION, SPAGNA

8.6 MATERIALIE E METODI

8.6.1 Area di campionamento e schema sperimentale



Il suolo studiato proviene dal distretto minerario di Cartagena e le montagne di La Union, Sud-Est della Spagna, che copre un'area di circa 50 Km² (Conesa et al., 2006).

Questa zona è stata intensamente sfruttata per l'estrazione di Fe, Ag, Pb, Zn, e Cu a partire dall'epoca dei Fenici e dei Cartaginesi, con un incremento dell'attività estrattiva nel

periodo del dominio romano.

A causa della lunga storia di attività mineraria (oltre 2500 anni), l'area ha sofferto importanti stress ambientali (Robles – Arenas et al., 2006): enormi volumi di rifiuti sono stati prodotti dai processi di concentrazione dei minerali e di estrazione metallurgica che hanno portato al loro accumulo nel suolo (Martos-Miralles et al., 2001).

Questi suoli di miniera si possono considerare inquinanti considerando i livelli di riferimento generici della provincia di Murcia (Martinez-Sanchez et al., 2007).

Elevate concentrazioni di elementi in traccia, uniti ai notevoli rischi per la popolazione, hanno richiesto l'avvio di un progetto pilota di fitostabilizzazione assistita su di un sito minerario rappresentativo, chiamato Brunita (1100 m s.l.m), circondato da insediamenti urbani, rappresentato da un suolo poco sviluppato e poco strutturato classificato come Spolic Anthropic Regosols (FAO-ISRIC-ISSS, 1998) e Haplic Torriarents (USDA, 2006).

Al fine di ridurre gli elementi in traccia e migliorare le caratteristiche del suolo, permettendo la ricostituzione di una copertura vegetale, sono stati impiegati ammendanti organici e carbonati (Faz et al., 2008, Ottenhof, 2007).

L'esperimento di fitostabilizzazione assistita del sito di Brunita è cominciato nel Dicembre del 2008.

Consiste di 20 parcelle sperimentali di 4 m² ciascuna, tutti trattati con carbonati (lime) costituiti da materiali di scarto di un'industria di estrazione del marmo e con tre dosi di ammendanti: stallatico di porcilaia (pig manure) che è sostanza organica stabilizzata, fanghi di depurazione (sewage sludge) che è sostanza organica non stabilizzata.

Il disegno sperimentale di campo prevedeva tre repliche (A,B,C) per ogni trattamento (dose 1, 2, 3) dell'ammendante organico e limo, e due repliche di suolo non trattato (Fig.34).

Dopo l'incorporazione degli ammendanti i suoli sono stati subito campionati per poi ripetere il campionamento 6, 12 e 24 mesi dopo.

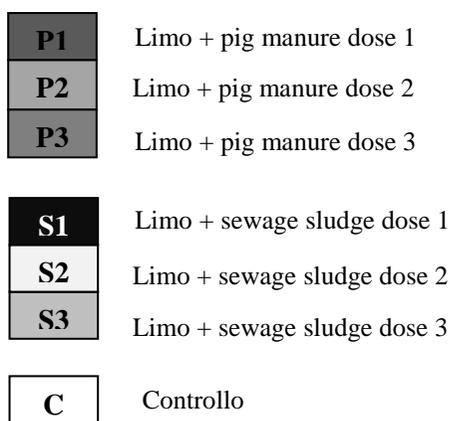
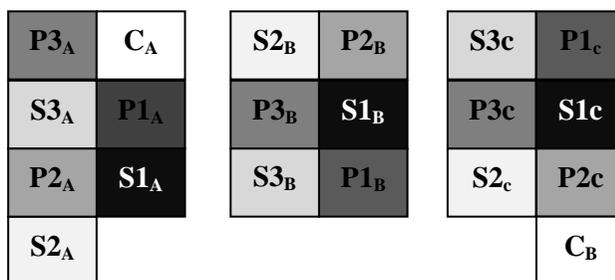


Fig. 34 Disegno sperimentale di pieno campo.

8.6.2 Caratterizzazione molecolare delle comunità microbiche del suolo

8.6.2.1 Estrazione del DNA TOTALE (tDNA) dal suolo

Il tDNA del suolo è stato estratto mediante lisi diretta basata sulla lisi meccanica, tramite *Fast DNA® Kit for soil* (BIO 101, Inc.).

Il suolo (0,5 g) è stato posto in appositi tubini contenenti una miscela di sfere di ceramica e di silice di due diverse dimensioni. I tubini sono stati agitati nel *Fast Prep®* (FP 120 Fast Prep Cell Distrupor) con moto sussultorio a velocità stabilita a 5.5 metri/secondo per 30 secondi, così da ottenere la rottura meccanica delle cellule. La lisi meccanica avviene in presenza di vari tamponi (solventi organici, detergenti, sali) che assicurano un'omogeneizzazione completa del campione e la solubilizzazione delle proteine. Il DNA estratto è stato purificato con la procedura *GeneClean®* (BIO 101) che prevede l'uso di una resina a scambio anionico. Il protocollo del BIO 101 è stato modificato trattando il DNA legato alla resina "Binding Matrix", due volte con Guanidine Thiocynate 5.5 M, prima di sottoporlo ai lavaggi con SEWS (Salt Etanol Wash Solution). La grandezza molecolare del DNA ottenuto va da 6 a 25 kb, con una resa da 1 a 150 µg/500 mg suolo: variabilità che dipende dalla matrice suolo e dai microrganismi presenti.

8.6.2.2 Caratterizzazione quantitativa e qualitativa del DNA

Il DNA è stato caratterizzato qualitativamente in termini di peso molecolare mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio (0,8% w/v), in tampone TAE 1 x (Tris Acetate EDTA buffer), e quantitativamente in termini di rese di DNA totale espresse in µg di DNA per g di suolo confrontando i campioni con un marker costituito da frammenti di DNA a lunghezza nota. (DNA Marker Mass Ruler Plus: 10 kb – 80 bp, Fermentas).

Sono state effettuate letture sia allo spettrofotometro che al fluorimetro.

Le letture allo spettrofotometro (NanoDrop) sono state effettuate alle lunghezze d'onda di 260, 280 e 230 nm (picco d'assorbanza del DNA, delle proteine e di vari composti quali: fenolo, composti aromatici, peptici e

carboidrati, rispettivamente). Effettuando il rapporto tra le rispettive assorbanze si può ottenere una stima della purezza del DNA estratto.

Il rapporto di 1.8-2.0 tra i valori di assorbanza a 260 e 280 (A260/A280) e 260 e 230 nm (A260/A230) è indice di elevato grado di purezza del DNA rispetto alle proteine e altri composti contaminanti come il fenolo. Preparazioni in cui i rapporti sopra indicati si discostano significativamente da quelli delle preparazioni pure sono indice di contaminazione e ciò fa sì che la stima della concentrazione di DNA ottenuto sia meno accurata.

La concentrazione degli acidi nucleici è stata misurata anche con il fluorimetro (*Qubit Fluorometer*[™], Invitrogen, Molecular Probes, USA), che permette di effettuare misure di fluorescenza tramite l'uso di fluorofori. È stato utilizzato il kit per l'analisi del DNA, *Quant-iT[™] dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, USA) che dà una stima relativa al dsDNA (DNA doppia elica), indice di biomassa microbica.

8.6.2.3 Amplificazione del DNA estratto tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)

16SrDNA PCR-DGGE

80 ng di DNA stampo sono stati amplificati tramite primers universali per i batteri: gc968f/UNI1401r, (Nubel et al., 1996). (vedi Tab. 9).

100 ng del prodotto di PCR sono stati utilizzati per effettuare la DGGE, gel di poliacrilamide al 6%, con gradiente denaturante di 45% e 65% (dove il 100% di capacità denaturante è data da una soluzione 7M di urea e 40% v/v di formamide deionizzata), a temperatura costante di 60°C per 16h a 100V, usando il sistema Ingeny phor.

18SrDNA PCR-DGGE

La composizione della comunità microbica fungina è stata analizzata tramite fingerprinting genetico 18srDNA PCR-DGGE.

La PCR ha previsto una Nested PCR: nella 1° PCR sono stati utilizzati 50 ng di DNA stampo, con i NS1f/NS8r (Kowalchuk, 1999), da cui si ottiene un

prodotto di 1700 bp. La 2° PCR è stata effettuata con 4µl del prodotto della prima PCR, utilizzando il set di primers EF4f/NS3rGC (Brodie et al., 2003), da cui si ottiene un amplicone di 564 bp.

Il gel DGGE all'8% di poliacrilamide, ha previsto un gradiente denaturante di 45–60%, a 58°C e 85 V per 18 h.

8.7 RISULTATI

Analisi del DNA

La qualità del DNA totale estratto dal terreno T1(campionato nel 2008) e T2 (campionato nel 2010) è mostrato in Fig.35 a, b.

Le due repliche di suolo non trattato (Ca e Cb), nei due tempi di campionamento (T1 e T2), avevano una quantità talmente bassa di DNA che non è rilevata nel profilo elettroforetico, mentre tutti i suoli trattati, dopo il primo campionamento T1, presentavano DNA poco degradato e ad alto peso molecolare (> 10kb), (Fig.35 a) con un incremento di concentrazione che va dai suoli trattati con la minore dose di fango di depurazione (S1), ai suoli trattati con la dose maggiore di stallatico (P3).

La qualità del tDNA nel secondo tempo di campionamento T2 resta invariata, ma varia la condizione semiquantitativa del DNA estratto dopo due anni dall'intervento di fitostabilizzazione, soprattutto nel caso delle dosi di stallatico (P1, P2, P3), (Fig.15b) anche se non si riscontra una grande differenza in termini di rese di DNA. (Tab.11).

La concentrazione del DNA estratto dai campioni contaminati e rimediati sia al T1 che al T2, era molto bassa (compresa tra 1 e 3,6 ng/µl per T1 e 0 e 1,2 ng/µl per T2) mentre i rapporti tra i valori di assorbanza A260/A280 e A260/A230, non erano buoni per i campioni di suolo e controllo al T1, indicando impurezze nel DNA mentre per tutti i campioni al T2 i valori di assorbanza A260/A280 erano buoni, mentre restavano bassi i valori di assorbanza A260/A230, indicando una contaminazione da composti fenolici. (Tab.11)

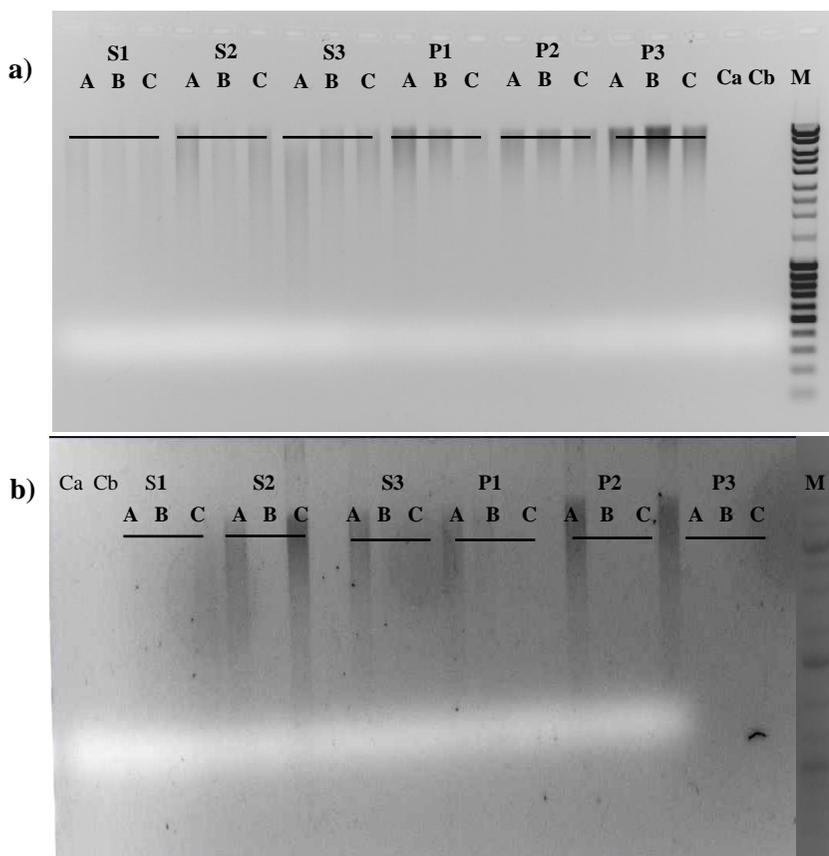


Fig.35 *S* e *P* indicano i terreni trattati con fanghi e letame con tre dosi differenti (1,2,3), *C* è il terreno non trattato (*a*, *b*, sono repliche). *M* DNA Mass Ladder 80bp-10Kb. 0,8% gel di agarosio. 10 microlitri di DNA totale (*tDNA*) e 2 ml di BBF 6X. Corsa: 100V, 60 min, in due tempi di campionamento diversi, 2008 (*T1*), **Fig.a**, e 2010 (*T2*), **Fig.b**.

Campioni	2008 (T1)				2010 (T2)			
	[ng/μl]	A260/280	A260/230	μg DNA/g suolo	[ng/μl]	A260/280	A260/230	μg DNA/g suolo
Ca	1,1	1,6	0,08	0,9	0	1,7	0	0
Cb	1,3	1,4	0,04	1	0,9	1,8	0,04	0
S1	2,6	1,2	0,06	1,2	2,4	1,7	0,03	1,1
S2	2,5	1,3	0,09	1,1	2	1,9	0,06	1
S3	2,8	1,5	0,08	1,7	2,5	2	0,5	1,2

P1	3,6	1,6	0,07	1,5	1	2,1	0,01	1
P2	4,8	1,1	0,03	2,9	1,6	1,9	0,02	1,1
P3	5,9	1,4	0,04	3,6	0,7	1,8	0,7	0,8

Tab.11 Valori di concentrazione e rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 del DNA totale estratto da 0,5 g di suolo, al tempo T1 e T2. Rese riferite a μg di DNA per g di suolo.

Amplificazione 16S e 18S rDNA.

L'amplificazione del 16S rDNA ha generato un prodotto pulito per l'assenza di bande aspecifiche, della lunghezza di 473 bp per ogni suolo analizzato. (Fig.36a).

Nel caso dell'amplificazione del 18S rDNA l'approccio Nested PCR ha permesso di ottenere un amplicone adeguato per ogni campione, pari a 564 bp. (Fig.36b).

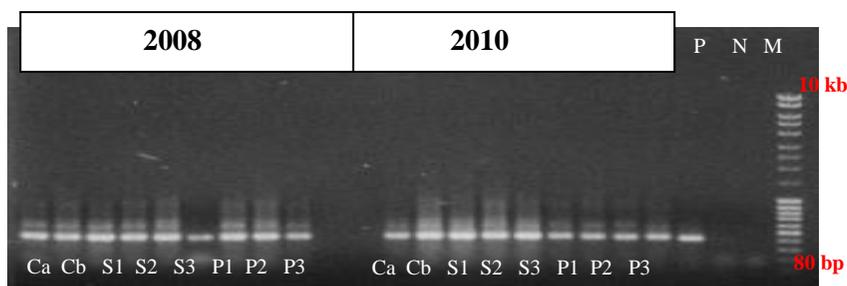


Fig. 36 a) Gel elettroforetico del tDNA estratto da suolo di controllo (Ca, Cb) e suolo trattato (S1,S2,S3,P1,P2,P3), nei due tempi di campionamento (2008- 2010) ed amplificato mediante 16S rDNA- PCR (GC 968f/ UNI 1401r). P controllo positivo, DNA amplificato di BD 15, 12 [7,9 ng / μl]; N controllo negativo. Il volume di DNA caricato su gel all' 1% è stato di 5 μl con 1 μl BBF (6x). L'elettroforesi è stata effettuata a 100 V per 60 minuti. M MassRuler™ DNA Ladder, Mix (10 kb-80 bp)

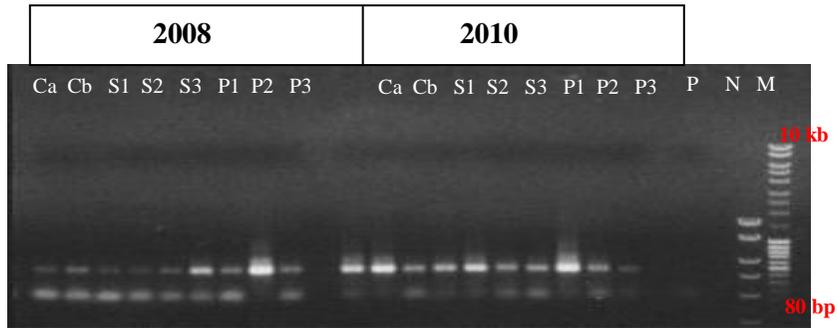


Fig. 36 b) Gel elettroforetico di campioni di *tDNA* estratti da suolo di controllo (Ca,Cb) e suolo trattato (S1,S2,S3,P1,P2,P3) nei due tempi di campionamento (2008- 2010) ed amplificato mediante 18S *rDNA*- PCR (Ef4 f/NS3 gc r, 2°PCR). P controllo positivo, *Saccaromiches cerevisiae*; N controllo negativo. Il volume di DNA caricato su gel all' 1% è stato di 5 μ l con 1 μ l BBF (6x). L'elettroforesi è stata effettuata a 100 V per 60 minuti. M MassRuler™ DNA Ladder, Mix (10 kb-80 bp).

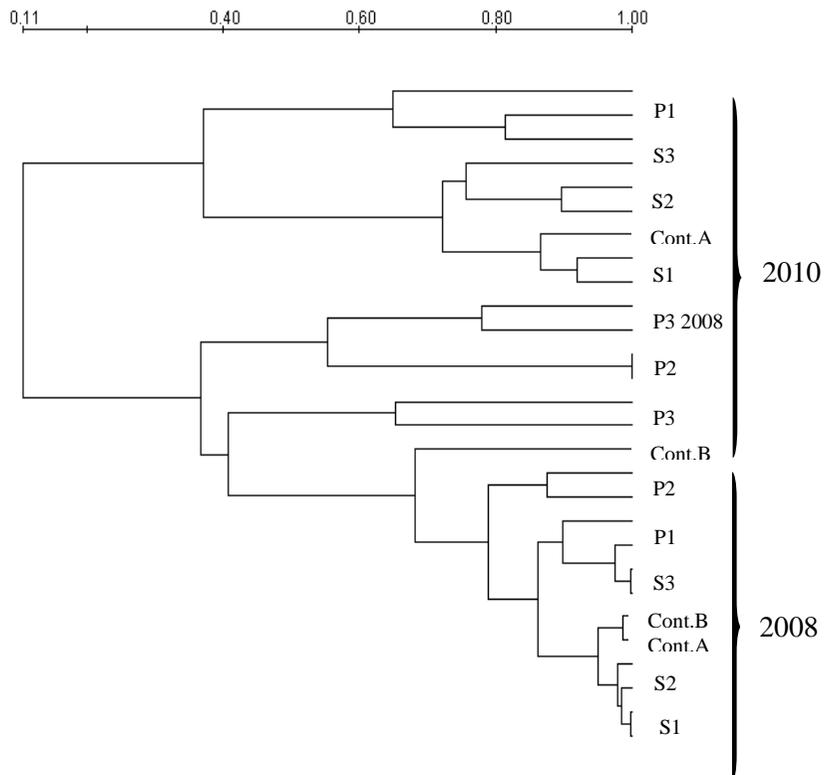
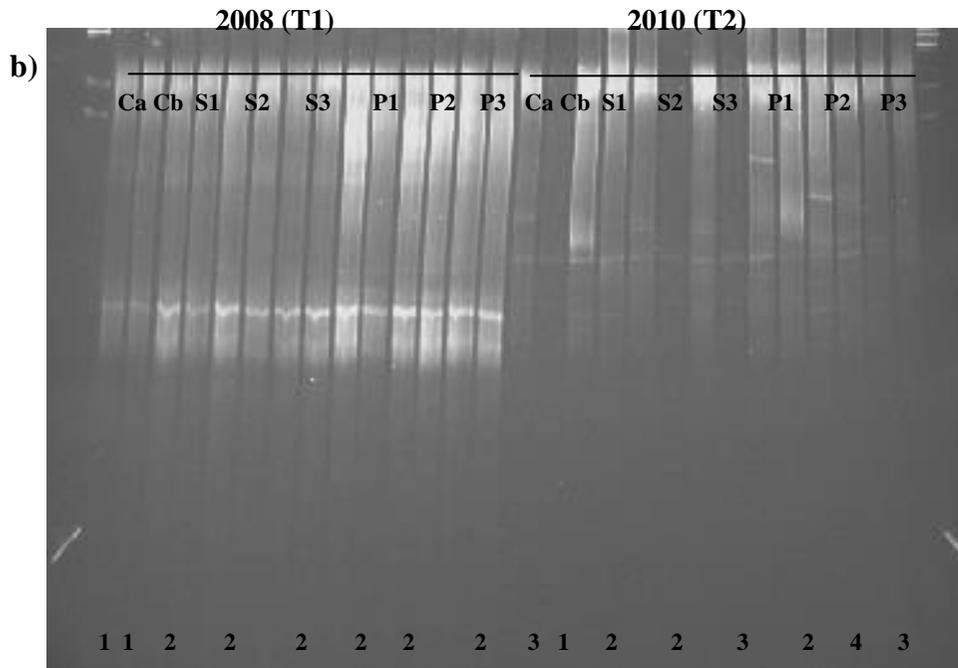


Fig.37a) 16S rDNA-PCR-DGGE fingerprinting della microflora batterica dei suoli prelevati campionati nel 2008 (T1) e nel 2010 (T2).**b)** 18S rDNA-PCR-DGGE fingerprinting della microflora fungina dei suoli prelevati campionati nel 2008 (T1) e nel 2010 (T2).

Le rispettive clusters analysis delle comunità batteriche (a) e fungine (b) dei suoli nei tempi (T1) e (T2) sono state definite graficamente tramite dendrogramma, ottenute analizzando i fingerprints, mediante software Quantity One (BioRad), ed applicando l'UPGMA basato sull'indice di similarità Dice.

8.8 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Entrambi i gel di DGGE, 16S e 18S rDNA – DGGE, hanno generato patterns caratteristici delle comunità microbiche batteriche (Fig.36a) e di quelle fungine (Fig.36b), sia nel suolo trattato con letame (P) che con fanghi di depurazione (S).

La 16S rRNA - DGGE mostra patterns più complessi per i suoli trattati che per quelli non trattati, in entrambi i tempi di campionamento, T1 e T2.

I dendrogrammi ottenuti sono illustrati in Fig. 36a.

Essenzialmente tra il cluster T1 e T2 c'è una bassa similarità (intorno al 10%).

All'interno dei due grandi cluster riferiti ai due differenti tempi di campionamento, similarità maggiore si riscontra tra i suoli trattati con stallatico a T1, alle tre differenti dosi, (P1, P2, P3 = 40%), e tra i suoli trattati con fanghi di depurazione (S1, S2 = 40%).

Anche nel caso della 18S rDNA DGGE, si è verificata una ridotta complessità nei suoli non trattati, rispetto a quelli trattati e una bassa similarità, intorno al 40%, tra i suoli del campionamento T1 e T2. (Fig.36 b).

Il metodo di estrazione e purificazione del DNA estratto da suoli sottoposti a fitostabilizzazione assistita ha permesso di ottenere DNA abbastanza puro e benché le quantità di DNA fossero molto basse, sono comunque risultate sufficienti per le analisi successive.

Considerando il dsDNA come indice di biomassa microbica (Tab.11), i trattamenti operati sul suolo hanno portato ad un suo iniziale incremento

(T1), questo probabilmente dovuto all'incorporazione di sostanza organica e in minor parte alla mineralizzazione degli essudati radicali, essendo stato questo sito colonizzato da pochissime specie vegetali.

La sostanza organica è la fonte primaria di nutrienti per le comunità microbiche del suolo e sostiene il metabolismo microbico, in ragione del suo contenuto totale ma anche della sua composizione.

Il fatto che lo stallatico (P1, P2, P3), inizialmente (T1), abbia incrementato la biomassa microbica più dei fanghi di depurazione, anche se non in modo esagerato, indica che lo stallatico, che è sostanza organica stabilizzata, probabilmente seleziona una comunità microbica più stabile.

Incrementi di biomassa microbica in suoli contaminati da elementi in traccia in suoli e siti minerari recuperati tramite fitostabilizzazione assistita sono ampiamente riportati in letteratura (Noyd et al., 1995; Lombi et al., 2002; Mench et al., 2006; Renella et al., 2009; Ascher et al., 2009).

La fitostabilizzazione dei suoli contaminati da vari elementi in traccia riduce la tossicità del suolo mediante l'adsorbimento di metalli pesanti e metalloidi, incrementa la biomassa, l'attività microbica e la colonizzazione vegetale (Aschet et al., 2009).

Tuttavia al tempo T2, quindi due anni dopo l'inizio del biorisanamento, senza ulteriori interventi di fitostabilizzazione, la biomassa microbica subisce un certo calo, pur se in modo non drastico e particolarmente significativo.

Evidenze in letteratura sull'incremento di specie microbiche coltivabili in suoli contaminati da elementi in traccia e recuperati con fitostabilizzazione assistita, attraverso l'incorporazione di ammendanti, sono reperibili dalla fine degli anni 70 ad oggi (Lindeman et al., 1984, Kelly et al., 2003; Machulla et al., 2005).

In realtà, la relazione tra complessità della comunità vegetale, funzionalità e complessità della comunità microbica dei suoli recuperati tramite fitostabilizzazione assistita presenta molti risultati sperimentali contrastanti.

Da un lato è stato osservato un chiaro incremento della ricchezza di specie microbiche, dall'altro la colonizzazione vegetale è apparsa come premessa per l'incremento della funzionalità del suolo e l'incremento di specie microbiche (Cundell, 1977), mentre in altri casi la funzionalità del suolo è premessa per l'aumento e la complessità della fitocenosi, e per ultimo altri risultati sperimentali non hanno evidenziato nessun legame particolare tra complessità delle comunità vegetali, funzionalità del suolo e arricchimento in specie microbiche (Renella et al., 2008).

Anche in questo caso i profili di ssU rDNA – DGGE, sia batterici che fungini, rivelano che i vari trattamenti di fitostabilizzazione non aumentano la ricchezza in specie eubatteriche e fungine, ma inducono cambiamenti nella struttura delle comunità microbiche.

Le evidenze contrastanti sono da attribuirsi alla scarsità di conoscenze sulla complessità delle interazioni tra suolo, organismi e piante, particolarmente più spiccate in suoli in condizioni estreme come questi.

E' stato osservato un incremento della funzionalità del suolo al tempo T1, per cui dopo un periodo relativamente breve dall'inizio dei trattamenti, e questa condizione di mutamento strutturale delle comunità microbiche, sia nei suoli trattati con stallatico che con fanghi di depurazione, continua anche dopo due anni (T2) dall'inizio dei trattamenti, facendo presupporre che i suoli trattati tendano probabilmente verso un nuovo equilibrio ecologico, possibilmente più complesso e dinamico.

In letteratura si trovano informazioni circa la funzionalità di suoli contaminati recuperati tramite “phytoremediation”, relativamente a suoli trattati per tempi lunghi, nell'ordine di anni, (Bouwman et al., 2001; Mench et al., 2006; Renella et al., 2008), meno noti invece sono sia i cambiamenti della funzionalità del suolo e della struttura della comunità microbica durante gli stadi iniziali della fitostabilizzazione, sia dopo un periodo di tempo medio lungo in cui i suoli non hanno subito ulteriori trattamenti.

Per cui questi primi risultati possono considerarsi come il punto di partenza di un monitoraggio che deve essere condotto periodicamente, così da poter far luce su quella che può essere l'effettiva efficienza nel lungo periodo della fitostabilizzazione assistita *in situ* che, ad oggi, rappresenta una carenza conoscitiva che pone ancora dei limiti applicativi nei confronti di questa tecnica.

8.9 MONITORAGGIO SUGLI EFFETTI DELLA FITOSTABILIZZAZIONE ASSISTITA SULLA DIVERSITA' DELLE COMUNITA' MICROBICHE DEL SUOLO.

OBIETTIVI RAGGIUNTI E LINEE DI STUDIO FUTURE

I suoli provenienti dalle due diverse località di campionamento, in Svezia ed in Spagna, sono contaminati da metalli pesanti e sono stati rimediati tramite fitostabilizzazione assistita *in situ*, rispettivamente nel 2006 e nel 2008.

L'incremento della funzionalità del suolo è una premessa fondamentale per il recupero di un suolo contaminato, per la produzione, per la fruibilità e per l'interazione ecologica con gli altri comparti naturali.

Pochi dati sono ad oggi a disposizione sull'effettiva riuscita dell'applicazione della fitostabilizzazione assistita, soprattutto dovute all'esiguità della sperimentazione ed anche del tempo trascorso dalla messa a punto delle tecniche, e non di meno dalla carenza di informazioni e conoscenze di base sulla modalità di colonizzazione del suolo da parte dei microrganismi nel lungo periodo.

Dal primo monitoraggio effettuato su questi due differenti suoli, in entrambi i casi è emerso che nei suoli recuperati tramite questa tecnica, a distanza di qualche anno, non si verifica un aumento nella ricchezza in specie eubatteriche e fungine, ma un cambiamento nella struttura delle comunità microbiche.

Questo primo monitoraggio, è da considerarsi un punto di partenza per la pianificazione periodica di una serie di controlli, al fine di definire in modo certo se suoli recuperati mediante tecnica di fitostabilizzazione assistita siano in grado di evolvere effettivamente, verso una crescente complessità ecologica oppure no, così da avere basi certe per poter testare la concreta efficacia di questa tecnica sperimentale.

9. APPENDICE

Quest'ultima parte è dedicata ai lavori che sono stati presentati a Congressi Internazionali e Nazionali durante l'attività di Dottorato.

Lo studio che segue è invece il riassunto esteso del lavoro che è stato condotto principalmente durante il primo anno di Dottorato.

Lo studio riguarda l'eventuale effetto delle condizioni di conservazione del DNA per le analisi di laboratorio, sulle proprietà microbiologiche del suolo attraverso un'analisi molecolare (fingerprinting genetico) del pool di DNA del suolo (DNA intracellulare vs DNA extracellulare): attualmente è in fase di stesura finale per essere sottomesso a referaggio.

I riassunti e gli abstract dei lavori presentati, sono riportati nella versione ufficiale in lingua inglese.

Impact of soil storage conditions on the assessment of soil microbiological properties by fine-tuning analyses of the total soil DNA pool (extracellular vs. intracellular DNA).

Due to the heterogeneity of soil, the most complex and biological system on Earth (Nannipieri et al., 2003), its assessment is still an arduous challenge. Among all disciplines in soil science, the one studying soil (micro-) biota is considered to be the most difficult one in terms of representativity (Stenberg et al., 1998).

Next to the adopted soil sampling strategy, the principal step in soil studies, the soil storage time or sample holding time, including the transport and preparation of soil samples to the laboratory, is determinant for soil microbiota and represents a crucial step in any soil-testing program. There is still no standard sampling procedure available neither for physico-chemical nor for microbiological analysis of soil (Klammer et al., 2005). For the assessment of biological properties of soil, analyses of fresh samples immediately after sampling are recommended (ISO, 1993). However, in the laboratory reality it is almost impossible to perform the huge number of analyses, necessary to assess the black box soil, on fresh samples. Thus it is of paramount importance to choose the most suitable soil storage methods with regard to the planned analyses.

Next to soil sampling and the experimental design (i.e., number of samples; composite independent replicates representative of the study site avoiding

pseudo-replicates; soil sample size), the treatment of the soil after sampling and prior to storage (i.e., sieving) is another critical aspect. This is important not only for molecular studies to assess the size (microbial biomass), but also for microbial structure (diversity in terms of evenness and richness) and function of soil microbial communities (Lee et al., 2007). Molecular fingerprinting approaches based on DNA for studying the soil microbiota are affected by numerous variables such as the DNA extraction method (Robe et al., 2003; Ascher et al., 2009; 2013; Inceoglu et al., 2010), the type of primers used (Chronakova et al., 2012; Noe et al., 2012), the choice of the method, analyses and working tool (Nannipieri et al., 2003; Ascher et al., 2010).

Considering the large number of parameters affecting soil properties and their assessment, the standardization of soil storage based on the planned analyses (physico-chemical vs. micro-biological) is of paramount importance (Lauber et al., 2010). Some studies indicate that the effect of storage depends also on soil type and analysis.) For example, DNA-based analyses are more sensitive to freeze–thaw and drying–rewetting stresses than bulk activity measures (Pesaro et al., 2003 and 2004) and forest soils are more susceptible to storage-related changes than mineral agricultural soils (Lee et al., 2007).

Effects of soil storage on physical, chemical and biological properties of soil have been investigated in terms of volatile compounds (Hewitt, 1999); stability of selected contaminants in soil/sediment samples, i.e., aromatic hydrocarbons, pesticides, and heavy metals (U.S Environmental protection Agency Office of Research and Development, 2006); modification of the soil solution in terms of concentration of several soil elements (Jones and Edwards, 1993; Walworth, 1992; Paine and Rechigl, 1989; Saarinen 1989); sulfur content in soil (Watkinson et al., 1987); dissolved organic carbon (DOC) (Ross and Barlett, 1990; Kaiser et al., 2000); dissolved organic matter (DOM) (Kaiser et al., 2001); N and C mineralization (Birch, 1958; 1960); phospholipid fatty acid (PLFA) (Wu et al., 2009); respiration and denitrification (Stenberg et al., 1998); microbial biomass (Liu et al., 2009; Wallenius et al., 2010) and enzyme activities (Petersen, 1994; Bandick and Dick, 1999; Kaiser, 2001; Perez, 2004; Lee et al., 2007; De Forest, 2009; Peoples et al., 2012).

Molecular studies of soil microbial communities indicated that storage influences soil microbiological characteristics depending on storage method, soil properties and even on the assay method (Sessitsch et al., 2002; Pesaro et

al., 2003, 2004). The storage of soil samples in refrigerator (4°C), even for few hours, can cause shifts in the microbial community structure, e.g., by inducing a high proliferation of *Pseudomonads* with a significant alteration of the original soil microbial community. Tien et al. (1999) also reported that the soil storage at 4°C caused a marked reduction in high molecular weight (HMW) DNA extracted from soil samples (indicating an occurred DNA degradation due to nuclease activities).

The investigation of frozen and air-dried storage of soil samples revealed that freezing (-20 °C) of small sample aliquots retains the activity of most enzymes and the structure of the bacterial community in different soil matrices relatively well whereas air-drying cannot be recommended as a storage method for soil microbiological properties due to large reductions in activity. Ultra-freezing (below -70 °C) was the preferred method of storage for samples with high organic matter content (Wallenius 2011). Next to ultra-freezing, it has been suggested to extract soil DNA as soon as possible after sampling (Bruce et al., 1999; Robe et al. 2003). Storage recommendations indicate that air-dried soils can be stored at room temperature for an indeterminate length of time, depending upon the intended use/research interest (Boone et al. 1999; Campbell et al. 2009; Hirsch et al. 2010). Soils that are to be archived should be air-dried soon after initial molecular evaluation to possibly reduce subsequent problems with DNA degradation.

Pesaro et al., 2003 observed changes in the soil microbial community in an agricultural soil frozen, thawed for four days and subsequently equilibrated and monitored during 42 days under controlled conditions. If it is not possible to extract nucleic acids immediately after sampling, soil sample storage in freezer is recommended (Rochelle et al., 1994). The most commonly used soil storage strategies for DNA and RNA are at -20°C (Rissanen et al., 2010) and -80°C in a solution of glycerol (Sessitsch et al., 2002), respectively. Concerning the impact of storage on soil microbiota, there are conflicting opinions in literature (Stenberg et al., 1998). Klammer et al. (2005) concluded that molecular studies (PCR-DGGE approach) on biowaste compost samples of various maturity stages are not that strongly affected by storage (4°C, air drying, -20°C, and lyophilization) in terms of alteration of the structure of edaphic microbial communities. Stenberg et al. (1998) reported that storage at -20°C for 13 months did not affect the microbial biomass and activity in annually frozen soils in any decisive way. Lauber et al. (2010) found that the duration and temperature of soil storage

(deep freezing at -80°C and subsequently at 20°C for 14 days) did not strongly affect the composition of the microbial community. Tzeneva et al. (2009) studied soil air-dried at 42°C for 48 h, yielding air-dried soil samples. Subsequently, aliquots of the air-dried soils were stored at $+20^{\circ}\text{C}$ for 90 days or $+15^{\circ}\text{C}$ for 120 days. They observed that soil drying and storage affected the detectable community structure, in relation to changes caused by other environmental conditions, such as soil pH, type of fertilizer and vegetation.

The available studies about the influence of storage on soil DNA are restricted to analysis of total DNA (Wallenius et al., 2009; Lauber et al. 2010, Klammer et al., 2005; Lee et al. 2007), and, to the best of our knowledge, there are no reports that discriminate between storage effects on the extracellular (eDNA) and intracellular (iDNA) fraction of the soil DNA pool (soil metagenome).

There are evidences of the ecological relevance eDNA in soil, as it has been found to make up a quantitative and qualitative important portion of the soil metagenome (Agnelli et al., 2004; Ascher et al., 2009; Chronakova et al., 2013). eDNA represent an important source of nutrients for soil microbiota and a source of exchangeable genetic information for natural transformation (horizontal gene transfer) (Pietramellara et al., 2006, 2009; Levey Both et al., 2009). Recently, there is a growing scientific interest in studying eDNA increased since it has been shown that eDNA adsorbed on soil colloids can be, at least partially, physically protected (Pietramellara et al., 2001, 2006) and can persist in soil for extended periods (Agnelli et al., 2007). Furthermore, the fraction of eDNA free in the extracellular environment can move within the soil percolation water (Ascher et al., 2009; Ceccherini et al., 2009, 2010). This mobile fraction of eDNA is the most available one in soil for genetic exchange by natural transformation (Ceccherini et al., 2010) and can be directly affected by a change in environmental conditions, including soil storage ones. Furthermore, it is the most exposed to enzymatic digestion (degradation) than iDNA, which results protected by microbial cell wall.

The content of soil DNA (i.e., double strand DNA, dsDNA) provides an important environmental bioindicator of soil microbial biomass and is sensitive to changing conditions (Marstorp and Witters, 1999; Marstorp et al., 2000; Gagneux et al., 2011; Agnelli et al., 2004; Ascher et al., 2009; Noe et al., 2012; Chronakova et al., 2013). In this concern, the amount of intracellular DNA, without the contribution of extracellular DNA to the soil metagenome, is suggested to provide an even more reliable quantitative

descriptor of soil microbial biomass (Ascher et al., 2010, 2012; Andretta et al., 2012).

We challenged to assess the impact of soil storage on soil metagenomic DNA discriminating between its extracellular and intracellular fraction (soil microbial biomass index), and on selected enzyme activities involved in main biogeochemical cycles. This investigation could provide more accurate indications about storage effects on DNA-based investigations and therefore providing helpful directions to avoid possible biases. Fresh soil results were compared to different soil storage methods, covering the most diffused routine laboratory conditions including repeated freezing and thawing one.

Our hypotheses are that i) the *fine-tuning DNA approach*, discriminating between eDNA and iDNA of the soil metagenome (total DNA, tDNA) is a sensitive tool to assess effects of soil storage conditions on DNA based analyses of soil microbiological properties which are not that evident if storage effects are evaluated on directly extracted tDNA; ii) eDNA is more susceptible than iDNA to soil storage conditions, and thus their comparative quantitative-qualitative analyses provide more detailed insights about storage effects than the analyses of directly extracted total DNA; iii) iDNA provides a more reliable index of soil microbial biomass without the overestimation of the number of viable and/or dormant microbial cells due to the co-quantification of eDNA, and thus a potential parameter to evaluate soil storage effects on soil microbiota in terms of microbial biomass.

Our performed *fine-tuning DNA approach*, analytically discriminating the total soil DNA pool in its extracellular and intracellular fraction, coupled with comparative quantitative-qualitative description of extracted DNA is suggested to be a sensitive tool to accurately assess the effect of soil storage conditions, which are not that evident when directly extracted total genomic DNA is assessed; thus our working hypotheses i and ii can be accepted. This approach is capable to more accurately evaluate the most suitable storage method among the evaluated routine laboratory conditions for planned DNA-based analyses, to guarantee reliable DNA yields indicative of soil microbial biomass, and representative for analyses of soil microbial community structures. Furthermore, the applied *fine-tuning approach* also allowed the specific quantification of iDNA; especially the amounts of ds iDNA are suggested to provide a more reliable index of soil microbial biomass with respect to total genomic DNA including eDNA which could overestimate the overall number of viable and/or dormant microbial cells, and thus to provide

a sensitive tool to assess storage effects on soil microbial biomass; thus, also hypothesis iii can be accepted.

Compared to fresh soil (control), soil freezing at -20°C is suggested to better conserve soil microbiological properties (DNA, enzymes) with respect to air-drying. Furthermore, freezing-thawing, necessary in the laboratory routine when a large number of analyses has to be performed, did not cause marked alterations in terms of DNA content and enzymatic activities.

Considering also the variables within the same soil storage method, a detailed description of the performed soil storage, i.e., sample size (g vs. kg); field-fresh moist soil (bulk vs. sieved soil); exact temperature and period of storage, etc., is recommended and should be considered for comparative data interpretation.

Key words: extracellular DNA, soil storage, intracellular DNA.

Comunicazione orale presentata al Congresso MD 2013

SOIL AGGREGATES: PROTECTIVE HOT SPOTS FOR MICROBES UNDER EXTREME ENVIRONMENTAL CONDITIONS

F. Borgogni, P. Arfaioli, J. Ascher, M.T. Ceccherini, L.P. D'Acqui, A. Bonetti, G. Pietramellara

Soil aggregates, the basic structural unit of soil, provide special microhabitats and are assumed to protect both soil organic matter and microbiota against negative effects of harsh environmental conditions. Challenging to assess this protective effect on soil microbiota and soil DNA, we have calibrated in laboratory three different sizes of aggregates (0.5-1mm, 500-100 µm and <100 µm), obtained by dry sieving from 2 mm sieved fraction of a forest soil. In order to simulate extreme conditions, each fraction of aggregates was subjected to 1) Low Temperature Ashing (LTA) by oxygen plasma treatment and 2) high temperature by oven drying at 250°C, both at various time period of exposure (0, 5, 20 and 48 hours).

Aggregate protection-effects on soil microbiota were evaluated in terms of microbial biomass (double strand DNA) and microbial community structure (Bacteria, Archaea and Fungi). To accurately assess the effect of oxidation

and high temperature on soil DNA, we analytically discriminated between the extracellular (eDNA) and intracellular (iDNA) fraction of the soil metagenome, by sequential extraction and comparative genetic fingerprinting (Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) of eDNA and iDNA.

The performed *fine-tuning DNA analyses* provided clear evidences about the protective effect of aggregates not only on the microbial cells of all domains (iDNA) but also on the soil extracellular DNA, this latter with important evolutionary implication (genetic exchange by natural transformation). Clear differences were observed between the type of treatment (oxidation, temperature), duration of treatment, and pore sizes. Microbiota was much more affected by high temperature than by oxidation (LTA), and the protection was negatively correlated with the duration of the treatment.

Key words: soil aggregates, intra-extracellular DNA, high temperatures, oxigen plasma treatment

**Poster presentato al Congresso Internazionale FESP 2013
Luglio 2013-Vilnius, Lituania**

**WILDFIRE EFFECTS ON FOREST SOIL MICROBIAL COMMUNITY
STRUCTURE ASSESSED BY COMPARATIVE MOLECULAR ANALYSES
OF DNA (extracellular vs. intracellular) and RNA.**



**Borgogni F., Arfaioi P., Ascher J., Baraniya D., Ceccherini M.T., Certini G.,
Mastrolonardo G., Nannipieri P., Pathan S., Pietramellara G.**



*DISPAA - Department of Sciences Production, Agri-Food and Environment- Florence University, P.le
delle Cascine, 28- 50144. Florence- Italy.*

The fire impact on the soil ecosystem was only recently considered in relation to its relevance on the response of forest ecosystems.

This study aims to evaluate the fire effect on the microbial community diversity and the activity of a soil forest by DNA - RNA molecular screening (PCR-DGGE). For the DNA fingerprinting, has been analyzed the extracellular (eDNA) and intracellular (iDNA) soil DNA fraction .

1. DNA EXTRACTION FROM SOIL:

- eDNA: extraction with alkaline buffer Na_2HPO_4 , pH 8.
- iDNA: extraction by mechanical – chemical lysis (Fast DNA Kit for Soil, BIO 101) from residue soil from extracellular soil extraction (sequential DNA extraction). (Ascher J., Ceccherini M.T., Pantani O.L., Agnelli A., Borgogni F., Guerri G., Nannipieri P., Pietramellara G., 2009).

2. SSU rDNA- PCR- DGGE:

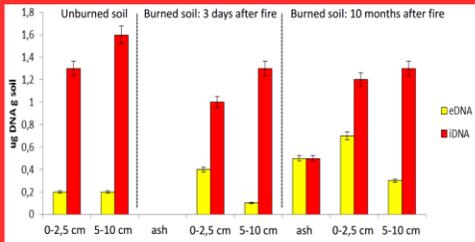
- 16S- Nested PCR : 1°PCR, primers PO/P6 ; 2°PCR, primers gc 341f/ U534 r (this work).
- 18S-Nested PCR: 1° PCR, primers NS1/ NS8 r; 2°PCR, primers EF4 f/ NS3 gc f. (Agnelli A., Ascher J., Corti G., Ceccherini M. T., Nannipieri P e Pietramellara G., 2004).

MATERIALS AND METHODS



The genetic fingerprinting (DGGE) conducted on eDNA and iDNA fractions showed

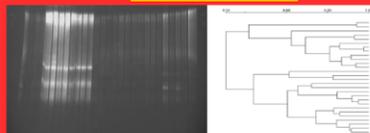
PRELIMINARY RESULTS



changes on the structure of soil microbial communities induced by fire.

These changes were more pronounced for fungi than for bacteria, suggesting that the fungal microbial communities are more susceptible to fire, but are also able to respond quickly to the changes brought by the fire. Such data will be combined with those relating to the cDNA derived from the soil total RNA pool and also with expression analysis of genes coding for the beta-glucosidase and proteases, in order to assess the fire impact on the soil microbiological characteristics, in terms of both functional and metabolic activities.

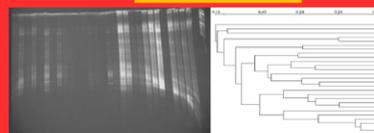
EXTRACELLULAR DNA



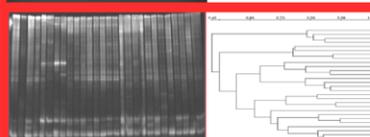
18S rDNA DGGE

3 DAYS AFTER FIRE
10 MONTHS AFTER FIRE

INTRACELLULAR DNA

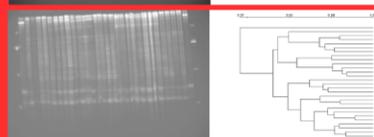


3 DAYS AFTER FIRE
10 MONTHS AFTER FIRE



16S rDNA DGGE

3 DAYS AFTER FIRE
10 MONTHS AFTER FIRE



3 DAYS AFTER FIRE
10 MONTHS AFTER FIRE

**Poster presentato al Congresso Internazionale BAGECO 2013
Giugno 2013- Lubiana, Slovenia**



SOIL AGGREGATES: PROTECTIVE HOT SPOTS FOR MICROBES AGAINST OXIDATION

S.Pathan¹, P.Arfaio¹, J.Ascher¹, F.Borgogni¹, L.P.D'Acqui², A.Bonetti², M.T.Ceccherini¹, G.Pietramellara¹, P.Nannipieri¹
 Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente – DISPA, Università degli Studi di Firenze, P.le Cascine 28, 50144 Firenze, ITALIA
²Istituto per lo Studio degli Ecosistemi ISE-CNR, Via Madonna del Piano n° 10, 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, ITALIA

Background

Soil aggregates represent special microbial habitats and protect both recalcitrant SOM (lignin, humic acid and alkyl C) and labile SOM (polysaccharides and proteins).

Most stabilized soil C is located into smaller aggregates.

Research questions

Can aggregates protect SOM against environmental impact?

What are the effects of oxidation (plasma exposure) on autochthonous micro-flora in terms of soil microbial biomass and community structure?

Objectives

To measure and compare the amount of double strand intra and extracellular DNA before and after oxidation (plasma exposure).

To characterize and determine the genomic profile and composition of microbial communities before and after oxidation (plasma exposure)

Methodology



Result and discussion

Quantification of extracted DNA (extra and intra)

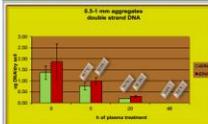


Fig. 1 Amount of DNA before and after oxidation in aggregate size 0.5-1 mm.

DNA protection is negatively correlated with plasma exposure time and they are partially protected against oxidation in soil aggregates.

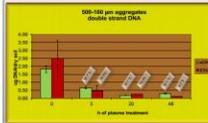


Fig. 2 Amount of DNA before and after oxidation in aggregate size 500-100 µm.

Aggregates can not only protect intracellular DNA of all microbial domains but also soil extracellular DNA, this latter with evolutionary implication.

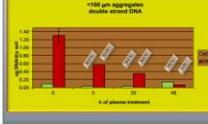


Fig. 3 Amount of DNA before and after oxidation in aggregate size <100 µm.

Qualitative analysis of extracted DNA (extra and intra)



Fig. 4. Agarose gel electrophoresis to assess the molecular weight of DNA and fragment length distribution.

*Fluorescence intensity reflects quantity of DNA; this semi quantitative data are in line with our quantitative data (dsDNA) and the protective effect of aggregates related to the aggregate size and duration of plasma exposure.
 *Molecular weight of DNA generally decreased with increasing plasma exposure time.

Dice similarity index based UPGAMA cluster analysis of micro-flora

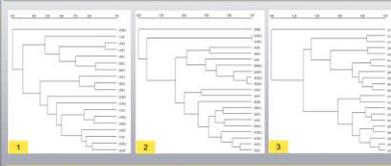


Fig. 5. Cluster analysis (DNA DGGE) of bacteriana (1), fungi (2) and archaea (3) to assess microbial community structures of different aggregates (A: 0.5-1 mm, B: 500-100 µm, C: <100 µm).

UPGAMA cluster analysis provide the evidence that aggregates represent special micro-habitats which harbor distinct microbial community.

Cluster analysis reveals multifactor effects (aggregate size, plasma exposure time) on microbial community structure (iDNA).

Conclusion

Soil aggregates are protective hot spots for microbes against oxidation (plasma exposure). Our findings suggest a correlation between the size of microbes (bacteria, archaea, fungi) and the size of aggregates.

This study contributes to molecular level understanding of microbial DNA protection in soil aggregates against plasma exposure.

As extracellular enzymes are assumed to be protected within micro-aggregates, detection/quantification studies of β-glucosidase encoding genes, representing one of the key enzymes involved in SOM turnover, are in progress.

REFERENCES:
 1) Ascher, J., Ceccherini, M.T., Pierantoni, O.L., Angelini, A., Borgogni, F., Guenzi, G., Nannipieri, P., Pietramellara, G., 2008. Sequential extraction and genetic fingerprinting of a forest soil metagenome. *Applied Soil Ecology* 43, 175-181.
 2) Dörmstedt, L.O., Jønk, L.J., Heald, M.J., and McCune, S.G., 1993. High energy ultraviolet photo-oxidation: a novel technique for studying physically protected organic matter in clay and silt-sized aggregates. *Journal of Soil Science* 44, 485-496.
 3) Vanessa, I., Balser, T.C., and McCune, S.G., 2001. Community diversity and functional redundancy of soil microbial communities in soil aggregates. *Biological Science*, PNAS 98:7274.

**Poster presentato al Congresso Internazionale ICOBTE 2011
Luglio 2011- Firenze, Italy**

EFFECT OF HEAVY METAL CATIONS ON THE FATE OF EXTRACELLULAR DNA ADSORBED AND BOUND ON CLAY MINERALS



Ascher J., Ceccherini M.T., Borgogni F., Arfaioi, P. and Pietramellara G.

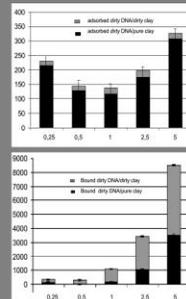
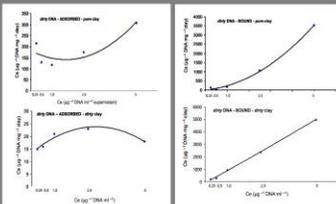
Department of Plant, Soil and Environmental Sciences, University of Florence, Italy



The presence of high-valent metal cations on clay mineral surface is suggested to induce conformational changes in the secondary and tertiary structure of the DNA molecule adsorbed and bound onto clays, defined as M-conformation, and its condensation. The hypothesis that these phenomena could enhance the resistance of DNA to enzymatic degradation strongly encourages the studies on the effects of heavy metal contamination in clay rich soils on the fate of extracellular soil DNA (eDNA). This lack of knowledge is relevant concerning the ecological role of soil eDNA in terms of persistence and availability for bacterial horizontal gene transfer by natural transformation, and as substrate for biofilm formation (Pietramellara et al., 2009).

We assessed the effect of Fe³⁺-polymers on the adsorption and binding of eDNA on clay minerals (*dirty* clay), that represent the mineral fraction of soil colloids. DNA-clay complexes (*dirty* eDNA/pure clay; *dirty* eDNA/*dirty* clay) were analysed in terms of strength of DNA-clay interaction (adsorption isotherms) and DNA molecular integrity and conformation. Challenging to conduct DNA-clay interaction studies in conditions as natural as possible, *dirty* eDNA was extracted by simulating natural cell lysis without any purification, in order to avoid possible bias coming from DNA purification processes.

- **pure clay**: Ca²⁺-Montmorillonite (M; Wyoming <2µm; Fusi et al., 1989).
- **dirty clay**: Ca²⁺-M coated with Fe(NO₃)₃ (Zades, 1984).
- **dirty DNA**: was extracted from *Bacillus subtilis* B01512 by modifying the protocol of Svarachom et al. (1989) and classified as *dirty* DNA with cellular debris (dDNA+deb; Pietramellara et al., 2007).
- **adsorption isotherms**: were performed with 0.25 mg of a) *pure* and b) *dirty* clay, by adding 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 µg of *dirty* DNA (Pietramellara et al., 2007).
- The fractions of DNA 1) not adsorbed, 2) adsorbed and 3) bound on clay minerals were determined by spectrophotometry (Picodrop) and fluorimetry (Qubit). The adsorption isotherm data were fitted to the Freundlich and Langmuir equations and analyzed by Scatchard plot (Tinoco et al., 1995).
- **Molecular characteristics of DNA** were analysed before and after the interaction with clay minerals (*pure* vs *dirty* clay) in terms of molecular weight (agarose gel electrophoresis) and conformational structure (atomic force microscopy).



DNA-clay interaction studies have been mostly performed under *artificial conditions* (*pure* DNA/*pure* clay). The performance under *more natural conditions* (*dirty* DNA/*pure* clay) suggested a positive effect of cellular debris coating DNA on DNA adsorption and binding behaviors (Pietramellara et al., 2007). **The present study, simulating natural soil conditions (*dirty* DNA/*dirty* clay), provided evidences of a positive effect of heavy metal cations coating clay minerals on DNA adsorption and binding features. This phenomena is assumed to be due to the chelate properties of Fe³⁺, acting as a bridge for DNA and exerting covalent and thus more strong bindings, as shown by lower amounts of DNA adsorbed but higher amounts of DNA bound onto *dirty* with respect to *pure* clay. Furthermore, Fe³⁺ induced conformational changes of the DNA molecules (M-conformation) are assumed to be involved in positively affecting the DNA adsorption affinity to clay minerals; the verification of this hypothesis by atomic force microscopy is in progress.**

The conducted study gives insights into a so far neglected aspect of heavy metal (HM) pollution, especially of clay-rich soils, namely the impact of HM cations coating soil colloid surfaces on the fate of eDNA in soil, suggesting to provide helpful information on risk assessment and remediation strategies of HM contaminated soils.

References
 Fusi et al. (1989) Soil Biol Biochem 21:911-920
 Zades (1984) Clays and clay minerals 32:49-57
 Pietramellara et al. (2007) Biol Fertil Soils 43:731-739
 Pietramellara et al. (2009) Biol Fertil Soils 45:219-235
 Svarachom et al. (1989) Appl Microbiol Biotechnol 30:299-304
 Tinoco et al. (1995) Physical chemistry, pp 203-208

10. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, I. 1984.** Changes in the abundance and activity of certain soil and litter fauna in the Jarrah forest of western Australia after a moderate intensity fire. *Australian Journal of Soil Research*, 22: 463-469.
- Acea, M.J. and T. Carballas. 1996.** Changes in physiological groups of microorganisms in soil following wildfire. *FEMS Microbiology Ecology*, 20: 33-39.
- Acea, M.J. and T. Carballas. 1999.** Microbial fluctuations after soil heating and organic amendment. *Bioresource Technology*, 67: 65-71.
- Acea, M.J., A. Prieto-Fernández, and N. Diz-Cid. 2003.** Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 513-524.
- Acea, M.J., N. Diz, and A. Prieto-Fernández. 2001.** Microbial populations in heated soils inoculated with cyanobacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 33: 118-125.
- Adedeji, F.O. 1983.** Effect of fire on soil microbial activity in Nigerian Southern Guinea savanna. *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol*, 20: 483-492.
- Ahlgren, I.F. 1974.** The effect of fire on soil organisms. pp. 47-72. In T.T. Kozlowski and C.E. Ahlgren [eds.]. *Fire and Ecosystems*. Academic Press, New York, New York, USA.
- Ahlgren, I.F. and C.E. Ahlgren. 1960.** Ecological effects of forest fires. *Botanical Review*, 26: 483-533.
- Ahlgren, I.F. and C.E. Ahlgren. 1965.** Effects of prescribed burning on soil microorganisms in a Minnesota jack pine forest. *Ecology*, 46: 304-310.
- Ajwa, H.A., C.J. Dell, and C.W. Rice. 1999.** Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 769-777.
- Alexander, M. 1967.** *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, New York, New York, USA.
- Almendros, G., A. Polo, J.J. Ibañez, and M.C. Lobo. 1984a.** Contribución al estudio de los incendios forestales en las características de la materia orgánica del suelo. I. Transformaciones del humus en un bosque de *Pinus pinea* del centro de España. *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol*, 21: 7-20.

- Andersen, A.N. and W.J. Müller. 2000.** Arthropods response to experimental fire regimes in an Australian tropical savannah: ordinal-level analysis. *Australian Ecology*, 25: 199-209.
- Anderson, T.H. 2003.** Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 98: 285-293.
- Agnelli A., Ascher J., Corti G., Ceccherini M.T., Nannipieri P. and Pietramellara G. (2004).** Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Ascher J, Ceccherini MT, Pantani OL, 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: 176-181.
- Ascher J., Ceccherini M.T., Chroňàková A., Jirout J., Borgogni F., Elhottová D., Šimek M and Pietramellara G. (2009)** Evaluation of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) –apparatus as a parameter influencing soil microbial community fingerprinting. *Sotto referaggio della rivista “World Journal of Microbiology and Biotechnology”*.
- Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Nannipieri P., Mench M., Renella G (2009).** Composition, biomass and activity of microflora and leaf yields and foliar elemental concentrations of lettuce after in situ stabilization of an arsenic-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*.
- Badía, D. and C. Martí. 2003.** Effect of simulated fire on organic matter and selected microbiological properties of two contrasting soils. *Arid Land Research and Management*, 17: 55-69.
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangrnsveld J., Van der Lelie D (2004).** Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water soluble, volatile, organic pollutants. *Natura Biotechnology* 22: 583-588.
- Bartoli A., R. Gerdol, and G. Massari. 1991.** Soil fungi succession in a Mediterranean ‘macchia’ after fire. *Revue d’Écologie et de Biologie du Sol*, 28: 387-402.
- Basanta, M.R., M. Díaz-Raviña, and S.J. González-Prieto. 2002.** Biochemical properties of forest soils as affected by a fire retardant. *Biology and Fertility of Soils*, 5: 377-383.

- Bastias, B.A., X. Zhihong, and J.W.G. Cairney. 2006.** Influence of long-term repeated prescribed burning on mycelial communities of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 172: 149-158.
- Bauhus, J., P.K. Khanna, and R.J. Raison. 1993.** The effect of fire on carbon and nitrogen mineralization and nitrification in an Australian forest soil. *Australian Journal of Soil Research*, 31: 621-639.
- Bergner, B., Johnston, J., Treseder, K.K., 2004.** Experimental warming and burn severity alter soil CO₂ flux and soil functional groups in a recently burned boreal forest. *Global Change Biology* 10, 1996–2004.
- Bellgard, S.E., R.J. Whelan, and R.M. Muston. 1994.** The impact of wildfire on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their potential to influence the re-establishment of post-fire plant communities. *Mycorrhiza*, 4: 139-146.
- Bissett, J. and D. Parkinson. 1980.** Long-term effects of fire on the composition and activity of the soil microflora of a subalpine, coniferous forest. *Canadian Journal of Botany*, 58: 1704-1721.
- Boerner, R.E.J. and J.A. Brinkman. 2003.** Fire frequency and soil enzyme activity in southern Ohio oak–hickory forests. *Applied Soil Ecology*, 23: 137-146
- Boerner, R.E.J., K.L.M. Decker, and E.K. Sutherland. 2000.** Prescribed burning effects on soil enzyme activity in a southern Ohio hardwood forest: a landscape-scale analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 899-908.
- Boerner, R.E.J., J.A. Brinkman, and A. Smith. 2005.** Seasonal variations in enzyme activity and organic carbon in soil of a burned and unburned hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 1419-1426.
- Bollen, G.J. 1969.** The selective effect of heat treatment on the microflora of a greenhouse soil. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 75: 157-163.
- Bollen, G.J. 1985.** Lethal temperatures of soil fungi. pp. 191-193. In C.A. Parker, A.D. Rovira, K.G. Moore, and P.T.W. Wong [eds.]. *Ecology and Management of Soil-borne Plant Pathogens*. American Phytopathogens Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Bowker, M.A., J. Belnap, R. Rosentreter, and B. Graham. 2004.** Wildfire-resistant biological soil crust and fire-induced loss of soil stability in a Palouse prairies, USA. *Applied Soil Ecology*, 26: 41-52.
- Bradstock, R.A. and T.D. Auld. 1995.** Soil temperatures during experimental bushfires in relation to fire intensity: consequences for legume

germination and fire management in south-eastern Australia. *Australian Journal of Applied Ecology*, 32: 76-84.

Bradstock, R.A., T.D. Auld, M.E. Ellis, and J.S. Cohn. 1992. Soil temperatures during bushfires in semi-arid, mallee shrublands. *Australian Journal of Ecology*, 17: 433- 440.

Brodie E., Susanne E., Clipson N (2003). Soil fungal community structure in a temperature upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1523: 1-10.

Byram, G.M. 1959. Combustion of forest fuels. pp. 61-89. In K.P. Davis. [ed.]. *Forest Fire: Control and Use*. McGraw-Hill, New York, USA.

Campbell, G.S., J.D. Jungbauer Jr., W.R. Bidlake, and R.D. Hungerford. 1994. Predicting the effect of temperature on soil thermal conductivity. *Soil Science*, 158: 307-313.

Campbell, R.E., M.B. Baker Jr., P.F. Ffolliott, F.R. Larson, and C.C. Avery. 1977. Wildfire effects on a ponderosa pine ecosystem: An Arizona case study. Research Paper RM-191, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experimental Station, Fort Collins, Colorado, USA.

Carballas, M., M.J. Acea, A. Cabaneiro, C. Trasar, M.C. Villar, M. Díaz-Raviña, I. Fernández, A. Prieto, A. Saa, F.J. Vázquez, R. Zöhner, and T. Carballas. 1993. Organic matter, nitrogen, phosphorus and microbial population evolution in forest humiferous acid soils after wildfires. pp. 379-385. In L. Trabaud and R. Prodon [eds.]. *Fire in Mediterranean Ecosystems*. Report Number 5, Ecosystems Research Series, European Economic Community, Brussels, Belgium.

Ceccherini MT, Ascher J, Agnelli A, Borgogni F., Nannipieri P., Pietramellara G. (2009) Experimental discrimination and molecular characterization of the extracellular soil DNA fraction. *Antonie van Leeuwenhoek* (2009) 96: 653- 657.

Ceccherini M.T., Ascher J., Pietramellara G. and Nannipieri P. (2001). Adsorption of dirty DNA on Ca²⁺ homoionic Montmorillonite and Kaolinite. Proceedings of the ISME-9, 9th International Symposium on Microbial Ecology, RAI International Exhibition and Congress Centre; Amsterdam, The Netherlands.

Ceccherini M.T., Potè J., Kay E., Van Tran V., Maréchal J., Pietramellara G., Nannipieri P., Vogel T.M. and Simonet P. (2003).

Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1): 673-678.

Cerdà, A., A.C. Imeson, and A. Calvo. 1995. Fire and aspect induced differences on the erodibility and hydrology of soils at La Costera, Valencia, southeast Spain. *Catena*, 24: 289-304.

Certini G., Ugolini F.C., Corti G and Agnelli A. (1997). Early stages of podzolization under Corsican pine (*Pinus nigra* Arn. *ssp. laricio*). *Geoderma* 83: 103-125.

Certini, G. 2005. Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143: 1-10.

Certini G., C. Nocentini, H. Knicker., P. Arfaioli., C.Rumpell. (2011). Wildfire effects on soil organic matter quantity and quality in two fire-prone Mediterranean pine forests. *GEODERMA*, vol. 167-168, pp. 148-155, ISSN:0016-7061.

Cheney, Ph. Thomas, L. Trabaud, and D. Williams. 1983. Fire in forestry. Vol. I, pp. 171-202. In C. Chandler, Ph. Cheney, Ph. Thomas, L. Trabaud, and D. Williams [eds.]. *Forest Fire Behavior and Effects*. John Wiley and Sons, New York, New York, USA.

Choromanska, U. and T.H. DeLuca. 2001. Prescribed fire alters the impact of wildfire on soil biochemical properties in a ponderosa pine forest. *Soil Science Society of America Journal*, 65: 232-238.

Choromanska U. and T.H. DeLuca. 2002. Microbial activity and nitrogen mineralization in forest mineral soils following heating: evaluation of post-fire effects. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 263-271.

Ciardi, C. 1998. Soil heating to distinguish the contribution of abiotic and extracellular activities to the overall enzyme activity in soil. *Agrochimica*, XLII: 104-117.

Coleman, D.C. and D.A. Crossley. 1996. *Fundamentals of Soil Ecology*. Academic Press, London, UK.

Coleman, T.W. and L.K. Rieske. 2006. Arthropod response to prescription burning at the soil-litter interface in oak-pine forests. *Forest Ecology and Management*, 233:52-60.

Collett, N.G. 1998. Effects of two short rotation prescribed fires in autumn on surface-active arthropods in sclerophyll eucalypt forest of west-central Victoria. *Forest Ecology and Management*, 107: 253-273.

Cooke, W.B. 1970. Fungi in burned and unburned chaparral soils. *Sydowia Annales Mycologicae Sereies II*, 24: 164-168.

- Coyne, M. 2000.** Microbiología del suelo: un enfoque explorativo. ITP-Paramomfo, Madrid, Spain.
- Courtois G. (2001).** Intracellular and total DNA extraction.
- D'Ascoli, R., F.A. Rutigliano, R.A. De Pascale, A. Gentile, and A. Virzo De Santo. 2005.** Functional diversity of the microbial community in Mediterranean maquis soils as affected by fires. *International Journal of Wildland Fire*, 14: 355-363.
- Dahlberg, A. 2002.** Effects of fire on ectomycorrhizal fungi in Fennoscandian boreal forest. *Silva Fennica*, 36: 69-80.
- Dahlberg, A., J. Schimmel, A. Taylor, and H. Johannesson. 2001.** The legacy of ectomycorrhizal fungal communities as mycorrhizas in boreal, following cutting and prescribed burning at different intensities. *Biological Conservation*, 100: 151-161.
- De la Torre, L., J. Mataix-Solera, J. Navarro, C. Guerrero, R. Zornoza, and M. Herrero. 2002.** Evaluación del nivel de degradación de suelos por efecto del fuego en el paraje de la Granadilla. pp. 99-103. In *The Proceedings of the II Congreso Nacional de Estudiantes de Ciencias Ambientales*. Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain.
- De Marco, A., A.E. Gentile, C. Arena, and A. Virzo De Santo. 2005.** Organic matter, nutrient content and biological activity in burned and unburned soils of a Mediterranean maquis area of southern Italy. *International Journal of Wildland Fire*, 14: 365-377.
- DeBano, L.F. 1981.** Water repellent soils: a state-of-the-art. USDA General Technical Report PSW-46, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Forest and Range Experimental Station, Berkeley, California, USA.
- DeBano, L.F. 2000.** Water repellency in soils: a historical overview. *Journal of Hydrology*, 231: 4-32.
- DeBano, L.F., G.E. Eberlein, and P.H. Dunn. 1979.** Effects of burning on chaparral soils: I. Soil nitrogen. *Soil Science Society of America Journal*, 43: 504-509.
- Dell'Anno A and Corinaldesi C. (2004).** Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments: Ecological and Methodological Considerations. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7): 4384-4386.
- De Oliveira V.M., Coutinho H.L.C., Sobrai B.W.S., Guimaraes C.T., Van Elsas J.D. and Manfio G.P. (1999).** Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarium* strains by PCR-specific amplification of 16S-

23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Letters in Applied Microbiology* 28: 137-141.

Dunn, P.H. and L.F. DeBano. 1977. Fire's effect on biological and chemical properties of chaparral soils. pp. 75-84. In H.A. Mooney and C.E. Conrad [eds.]. *The Proceedings of Symposium on Environmental Conservation: Fire and Fuel Management in Mediterranean Ecosystems*. General Technical Report WO-3, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C., USA.

Fernández, I., A. Cabaneiro, and T. Carballas. 1997. Organic matter changes immediately after a wildfire in an Atlantic forest soil and comparison with laboratory soil heating. *Soil Biology & Biochemistry*, 29: 1-11.

Fernández, I., A. Cabaneiro, and T. Carballas. 1999. Carbon mineralization dynamics in soils after wildfires in two Galician forests. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 1853- 1865.

Fonturbel, M.T., J.A. Vega, P. Cuiñas, and J.M. Gras. 1993. Variaciones cuantitativas de las poblaciones microbianas edáficas en pinares de Galicia incendiados pp. 197- 202. In *Actas del Congreso Forestal Español, Tomo III*. Lourizán, Pontevedra, Spain.

Fonturbel, M.T., J.A. Vega, S. Bara, and I. Bernardez. 1995. Influence of prescribed burning of pine stands in NW Spain on soil microorganisms. *European Journal of Soil Biology*, 31(1): 13-20.

Fornasier F., Margon A. (2007). Bovine serum albumin and Triton X-100 greatly increase phosphomonoesterases and arylsulphatase extraction yield from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2682-2684.

Fritze, H., T. Pennanen, and J. Pietikäinen. 1993. Recovery of soil microbial biomass and activity from prescribed burning. *Canadian Journal of Forest Research*, 23: 1286-1290.

Garbers I.M, T.J. Britz and R.C. Witthuhn. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 687–693, 2004.

González-Pérez, J.A., F.J. González-Vila, G. Almendros, and H. Knicker. 2004. The effect of fire on soil organic matter – a review. *Environmental International*, 30: 855-870.

- Grasso, G.M., G. Ripabelli, M.L. Sammarco, and S. Mazzoleni. 1996.** Effects of heating on the microbial populations of a grassland soil. *International Journal of Wildland Fire*, 6: 67-70.
- Grifoni, A., M. Bazzicalupo, C. Di Serio, S. Fancelli, and R. Fani. 1995** Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and the histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.*127:85–91.
- Grogan, P., J. Baar, and T.D. Bruns, 2000.** Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *Journal of Ecology*, 88: 1051-1062.
- Guerrero, C., J. Mataix-Solera, I. Gómez, F. García-Orenes, and M.M. Jordán. 2005.** Microbial recolonization and chemical changes in a soil heated at different temperatures. *International Journal of Wildland Fire*, 14: 385-400.
- Gundale, M.J., T.H. DeLuca, C.E. Fiedler, P.W. Ramsey, M.G. Harrington, and J.E. Gannon. 2005.** Restoration treatments in a Montana ponderosa pine forest: Effects on soil physical, chemical and biological properties. *Forest Ecology and Management*, 213: 25-38.
- Hernández, T., C. García, and I. Reinhardt. 1997.** Short-term effect of wildfire on the chemical, biochemical and microbiological properties of Mediterranean pine forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 25: 109-116.
- Heuer H. and Smalla K. (1997).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities, p. 353-373. In: Van Elsas J.D., Wellington E.M.H. and Trevors J.T. (Eds.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Heuer H., Kresk M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H. (1997).** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturant gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3233-3241.
- Insam, H. and K. Haselwandter. 1989.** Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia*, 79: 174-178.
- Insam, H., D. Parkinson, and K.H. Domsch. 1989.** Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, 21: 211-221.
- Knicker. 2004.** The effect of fire on soil organic matter – a review. *Environmental International*, 30: 855-870.

- Kowalchuk G. (1999).** Fungal community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). In: Akkermans A.D.L., Van Elsas J.D., De Bruijn F.J. (Eds.). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 3.4.6: 1-16.
- Kumpiene J., Guerri G., Landi L., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G. (2009).** Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental safety* 72: 115-119.
- Mataix-Solera, J., Guerrero, C., García-Orenes, F., Bárcenas, G.M., Torres, M.P., 2009.** For-estfire effects on soil microbiology. In: Cerdà, A., Robichaud, P.R. (Eds.), *Fire Effects on Soils and Restoration Strategies. : Land Reconstruction and Management Series*, vol. 5. Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, pp. 133–175.
- Mataix-Solera., A. Cerdà., V. Arcenegui., A. Jordán., L.M. Zavala (2011).** Fire effects on soil aggregation: A review. *Earth-Science Reviews* 109 (2011) 44–60
- Mabuhay, J.A., N. Nakagoshi, and T. Horikoshi. 2003.** Microbial biomass and abundance after forest fire in pine forest in Japan. *Ecological Research*, 18: 431-441.
- Mabuhay, J.A., N. Nakagoshi, and Y. Isagi. 2006a.** Soil microbial biomass, abundance, and diversity in a Japanese red pine forest: first year after fire. *Journal of Forest Research*, 11: 165-173.
- Mamilov, A.S., Dilly, O.M., 2002.** Soil microbial ecophysiology as effected by short term variations in environmental conditions. *Soil Biology and Biochem.* 34, 1283-1290.
- Mench M., Renella G., Gelsomino A., Landi L., Nannipieri P (2006).** Biochemical parameters and bacterial species richness in soils contaminated by sludge- borne metals and remediated with inorganic soils amendements. *Environmental pollution*, 144: 24-31.
- Mendez M.O., Maier R.M. (2008).** Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7: 47-59.
- Menzies N.W., Donn M.J., Kopittke P.M. (2007).** Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145: 121-130.

- Micó C., Recatalá L., Peris M., Sánchez J. (2006).** Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65: 863-872.
- Montagne D., Cornu S., Bourenanne H., Baize D., Ratié C., King D. (2007).** Effect of agricultural practices on trace-element distribution in soil. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 38: 473-491.
- Miller R. (1998).** Scambio di geni in natura. *Le Scienze* 335: 69-73.
- Montagne D., Cornu S., Bourenanne H., Baize D., Ratié C., King D. (2007).** Effect of agricultural practices on trace-element distribution in soil. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 38: 473-491.
- Muyzer G. and Smalla K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer G., De Waal E.C. and Uitterlinden A.G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Nannipieri P. and Badalucco (2003).** Biological processes. In: *Processes in the soil-plant system: modelling concepts and applications* (Bembi D.K. and Nieder R., Eds.). The Haworth Press, Binghamton, NY, .
- Nannipieri P. and Piccolo A. (1993).** Metodi analitici per lo studio della dinamica della sostanza organica del suolo. In: *Ciclo della sostanza organica nel suolo: Aspetti agronomici, chimici, ecologici, selvicolturali*. Nannipieri P. (Ed.), Patron Editore, Bologna.
- 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: 655-670.
- Nannipieri P., Pietramellara G., Falchini L., Bradford M., Parekh N., Pinzari F. and Schmidt N. (2000).** Microbial diversity and activity in soil: meaning, limits and advantages of the present methods: In: *NATO-ASI Soil and global change: carbon cycle, trace gas exchange and hydrology*“.
- Neary, D.G., Ryan, K.C., DeBano, L.F., 2005.** Wildlandfire in ecosystems. *Effects of Fire on Soil and Water: USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, General Technical Report RMRS-GTR-42-vol 4* (Ogden, UT).

- Nielsen K.M., Choi M., Pietramellara G., Nannipieri P. and Bensasson D. (2003).** Extracellular DNA: persistence in various environments and availability to bacteria. *Advances in Microbial Ecology* 17, *in press*.
- Niemeyer J. and Gessler F. (2002).** Determination of free DNA in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165: 121-124.
- Ogram A. (2000).** Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1499-1504.
- Ogram A., Mathot M.L., Harsh J.B., Boyle J. and Pettigrew C.A. (1994).** Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 393-396.
- Ogram A., Sayler G.S. and Barkay T. (1987).** The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7: 57-66.
- Ogram A., Sayler G.S., Gustin D. and Lewis R.J. (1988).** DNA adsorption to soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 22: 982-984.
- Øvreas L. and Torsvik V. (1998).** Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36: 303-315.
- Øvreås L., Forney L., Daae F.L. and Torsvik V. (1997).** Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3367-3373.
- Pietramellara G., Ascher J., Ceccherini M.T. and Nannipieri P. (2002, a).** Inquinamento genetico del suolo. *Atti del convegno Rimini Ricicla*, Rimini.
- Pietramellara G., Ascher J., Ceccherini M.T. and Renella G. (2002, b).** Soil as a biological system. *Annals of Microbiology* 52: 119-131.
- Pietramellara G., Ascher J., Borgogni F., Ceccherini M.T., Guerri G., Nannipieri P. (2009).** Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils* 45:219-235.
- Rolf D.** The Metagenomics of soil: review. (2005). *Nature* vol.3.
- Rutigliano F.A., De Marco A., D'Ascoli R., Castaldi S., Gentile A., Virzo de Santo A.** Impact of fire on fungal abundance and microbial efficiency in C assimilation and mineralisation in a Mediterranean maquis soil. 2007. *Biology and Fertility of Soils* 44, 377-381.

- Smalla K., Borin S., Heuer H., Gebhard F., Van Elsas J.D. and Nielsen K.M. (2000).** Horizontal gene transfer from transgenic plants to bacteria – are there new data do fuel the debate? In: Fairbairn C., Scoles G. and McHughen (Eds.), Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, Saskatoon, Canada, University Extension Press, University of Saskatchewan, pp. 146-154.
- Smit E., Leeflang P., Glandorf B., Van Elsas J.D. and Wernars K. (1999).** Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2614-2621.
- Sørensen T. (1948).** A method for establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content. *Biol. Skr* 4:1.
- Steinberger R.E and Holden P.A (2005).** Extracellular DNA in Single- and Multiple- Species Unsaturated Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5404- 5410.
- Stotzky G. (1989).** Gene transfer among bacteria in soil. In: *Gene Transfer in the Environment* (Eds., Levy S.B. and Miller R.V.), pp. 165-222. McGraw-Hill, New York.
- Stotzky G., Gallori E. and Khanna M. (1996).** Transformation in soil. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Eds., Akkermans A.D.L., Van Elsas D., De Bruijn F.), 5.1.2: 1-28. Kluwer, Dordrecht.
- Torsvik V.L. and Øvreas L. (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystem. *Microbiology* 5: 240- 245.
- Torsvik V.L., Goksøyr J., Daae F.L., Sørheim R., Michalsen J. and Salte K. (1994).** Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In: *Beyond the Biomass: Compositional and functional analysis of soil microbial communities* (K. Ritz, J. Dighton and K.E. Giller, Eds.), pp. 39-48. JohnWiley & Sons, New York.
- Zornoza R. 2006.** Evaluación de la calidad ambiental en suelos de la provincia de Alicante: desarrollo y aplicación de diferentes técnicas. Ph.D. thesis, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain.

RINGRAZIAMENTI

Non è necessario scrivere i nomi delle persone che mi hanno veramente sostenuto durante questi tre anni di Dottorato. Loro lo sanno, io lo so.

Grazie per tutto, di cuore, mi avete insegnato molto e di tutto questo farò sempre grande tesoro, sia nella vita, sia nel lavoro, ovunque sia e qualunque cosa faccia in futuro.

Tre anni vissuti, combattuti, sentiti, amati, odiati. Molti dei vostri consigli, delle vostre parole, anche dei silenzi, o dei sorrisi, mi hanno regalato momenti che hanno sicuramente arricchito il mio bagaglio professionale e personale.

Quando si lotta per le cose, si può essere solo fieri di sé stessi, ma sempre e comunque alla ricerca continua del meglio, mai fermarsi d'un tratto pensando che il meglio lo abbiamo ottenuto.

Sono stati tre anni intensi che hanno lasciato molto: molte idee, molti punti interrogativi, molti nuovi orizzonti che spero possano essere esplorati.

Nessun rimpianto, neppure per i momenti difficili che ci sono inevitabilmente stati.

Resta la voglia di continuare questo cammino, che comunque vada e dove mi porterà sarò felice di percorrere, con molta più consapevolezza dei miei limiti e delle mie potenzialità.

GRAZIE a questi tre anni e a tutto ciò che c'è stato dentro, ai giorni in cui ci siamo odiati e a quelli in cui ci siamo sentiti più vicini.

*“Pensate al futuro che vi aspetta,
pensate a quello che potete fare
e non temete niente”*

Rita Levi Montalcini