



REGIONE
LAZIO



BRIOMICA

IL RIEQUILIBRIO DEL MICROBIOMA DEI SUOLI AGRARI PER IL MIGLIORAMENTO QUANTI-QUALITATIVO DELLE PRODUZIONI ORTICOLE E DELL'ECOSISTEMA



Pubblicazione realizzata e stampata con il contributo della Regione Lazio nell'ambito del progetto:
“Riequilibrio del microbioma dei suoli agrari per il miglioramento quanti-qualitativo delle produzioni orticole e dell’ecosistema” finanziato ai sensi del Reg (UE) n. 1305/2013 e ss. mm. e ii. PSR Lazio 2014-2020 - Mis. 16.2.1 “Sostegno a progetti pilota e allo sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie” - Cod. CUP F59H23000030009

1. PREMESSA	4
2. METODOLOGIA SPERIMENTALE	8
3 DISEGNO SPERIMENTALE	10
3.1 Schema prelievo campione di suolo	12
4. METODO E PROTOCOLLO PER LA DETERMINAZIONE DELLA FERTILITA' DEI SUOLI	14
4.1 ANALISI DEI DATI	16
4.2 APPROFONDIMENTI	18
4.3 SEQUENZIAMENTO OXFORD NANOPORE	20
5 RISULTATI	23
6. CONCLUSIONI	25
7. BIBLIOGRAFIA	26

1. PREMESSA

Il suolo è una risorsa esauribile e non rinnovabile. Il degrado, l'erosione e la contaminazione del suolo causano la perdita di suolo e possono verificarsi rapidamente e avere un impatto significativo sui servizi ecosistemici. La formazione di nuovi strati di suolo avviene spesso a un ritmo più lento rispetto alla perdita di suolo, con conseguente riduzione netta della disponibilità di suolo nel tempo e conseguente compromissione della produttività agricola, della biodiversità, dell'acqua e dei cicli dei nutrienti. Ciò evidenzia l'importanza della conservazione del suolo e delle pratiche di gestione sostenibile del suolo, essenziali per mantenere la salute biologica del suolo e garantirne la capacità continua di sostenere la vita sulla Terra. Gli attuali sistemi di produzione alimentare sono tra le cause principali dell'esaurimento delle risorse naturali e del degrado ambientale. In particolare, influiscono sulla qualità e sulla resilienza del suolo, rendendo l'agricoltura insostenibile. (Pace et. Al 2025) La salute e la qualità del suolo sono definite come la capacità del suolo di funzionare come un sistema vivente vitale entro i confini dell'uso del territorio. Questa funzione, che sostiene la produttività biologica del suolo, mantiene anche la qualità dell'ambiente circostante e la salute umana. Pertanto, i due termini sono usati in modo intercambiabile, anche se è importante distinguere che la qualità del suolo è legata alla sua funzione, mentre la salute del suolo presenta il suolo come una risorsa vivente dinamica, limitata e non rinnovabile. In questa recensione, trattiamo il concetto di salute del suolo che include le interazioni tra gli input vegetali e il suolo nella creazione di un ambiente sano. Gli effetti negativi sulla salute del suolo e sulla qualità del suolo derivano dallo squilibrio dei nutrienti nel suolo, dall'eccessiva fertilizzazione, dall'inquinamento del suolo e dai processi di perdita del suolo e di sostanza organica stanno diventando sempre più comuni. (Laishram et al. 2012). Sebbene l'approccio teorico all'agricoltura abbia sempre posto l'accento sulle pratiche agronomiche ritenute sostenibili, solo a partire dal 2010 ha cominciato a diffondersi

una maggiore consapevolezza dell'importanza di una gestione agricola volta a ripristinare l'equilibrio dell'ecosistema. (Dönmez et al.2024). L'utilizzo di microrganismi utili in agricoltura biologica è ampiamente illustrato e dimostrato in letteratura, l'integrazione e l'utilizzo di consorzi microbici, in sistemi agricoli e nei protocolli agronomici comporta la manipolazione delle popolazioni microbiche in relazione alla produzione agricola, promuovendo approcci ecosostenibili dell'agroecosistema di riferimento, con nuove prospettive sullo studio dell'interazioni tra piante e suolo, rizosfera e sulla salute del suolo.

Per centinaia di milioni di anni si è verificato un fenomeno di coevoluzione, in cui piante e microrganismi hanno instaurato forti relazioni simbiotiche Wallenstein MD (2017) e si sono influenzati a vicenda: le piante possono produrre sostanze organiche, soprattutto in condizioni di stress biotico o abiotico, modificando l'ambiente chimico e fisico circostante, attivando alcuni gruppi di microrganismi ed eliminandone altri, e viceversa. Comprendere e sfruttare le complesse interazioni tra suolo, microrganismi e piante è essenziale per l'agricoltura sostenibile, il ripristino degli ecosistemi e gli sforzi di conservazione dell'ambiente. Ciò sottolinea l'importanza di mantenere ecosistemi del suolo sani per il benessere dei sistemi agricoli. Utilizzando microrganismi benefici, l'agricoltura moderna non è in contraddizione con la coevoluzione: sta sfruttando la conoscenza del fenomeno coevolutivo per ottimizzare la salute e la produttività delle colture nelle condizioni attuali. Il nostro obiettivo è integrare questi principi, insieme alle nuove tecnologie, per promuovere lo sviluppo di sistemi di gestione e metodi di trattamento del suolo in condizioni di campo aperto. (Pace et. all 2025). I microrganismi e le loro comunità nel suolo possono essere valutati, sia in termini di diversità che di abbondanza, attraverso diverse tecniche di laboratorio: dalle tecniche tradizionali come la coltura su terreni selettivi alle più recenti applicazioni di approcci multi-

omici (Enespa et al 2022) , questi ultimi migliorano notevolmente la precisione e l'accuratezza del risultato e il rilevamento dei cambiamenti microbici in diverse condizioni e pratiche di gestione, che a loro volta possono influenzare le proprietà del suolo. Tra gli approcci basati sull'analisi del DNA totale del suolo per fornire profili tassonomici delle comunità microbiche, uno dei metodi più comuni è il metabarcoding: si basa sull'amplificazione di regioni specifiche del DNA, come il 16S rDNA (DNA ribosomiale) per i batteri e ITS (Internal Transcribed Spacer) per i funghi, utilizzando la PCR (reazione a catena della polimerasi), seguita da sequenziamento ad alta produttività, ad esempio con metodi NGS (Next Generation Sequencing) (Satam et al 2023). Sebbene questo approccio abbia l'innegabile vantaggio di consentire l'analisi simultanea di molti campioni con un buon livello di precisione e in un tempo relativamente breve, presenta alcune limitazioni che possono influire sull'accuratezza delle assegnazioni tassonomiche. Per migliorare la risoluzione tassonomica del risultato, è possibile combinare più marcatori genetici e, grazie alle tecnologie di sequenziamento sviluppate da Oxford Nanopore, sono disponibili letture più lunghe rispetto ai metodi NGS tradizionali, consentendo un migliore assemblaggio dei genomi e una caratterizzazione accurata di comunità microbiche complesse (Escobar-Zepeda et al 2015). A livello di comunità microbica, il metodo di profilazione fisiologica eseguito utilizzando il sistema Biolog® si basa sui modelli di utilizzo di una singola fonte di carbonio da parte dei microrganismi presenti nel suolo. Quest' analisi consente di ottenere informazioni su come le comunità microbiche rispondono ai cambiamenti dell'ambiente su scale sia spaziali che temporali. Gli enzimi prodotti dai microrganismi sono fattori chiave nei processi del suolo come la decomposizione della materia organica, il riciclo dei nutrienti e il miglioramento della struttura del suolo. La misurazione delle attività enzimatiche dei microrganismi nel

suolo fornisce informazioni sull'attività microbica e può servire come indicatore indiretto della salute del suolo. Livelli più elevati di attività enzimatica indicano spesso una maggiore diversità microbica, soprattutto nei microrganismi attivi del suolo, essenziali per mantenere la salute del suolo. (Pace. at all 2025). L'obiettivo del progetto Briomica è il riequilibrio del microbioma dei suoli agrari per il miglioramento quanti-qualitativo mediante lo studio dei generi o delle specie di microrganismi presenti nel suolo, poiché i microrganismi specifici possono fungere da “specie indicatrici” o “bioindicatori”. Con la presente iniziativa progettuale si intende perseguire in sintesi, le seguenti finalità:

- definire delle tecniche analitiche che consentano una rilevazione rapida della fertilità dei suoli, anche già sperimentate e collaudate a livello scientifico.
- mettere a punto dei protocolli di coltivazione ottimali per le principali specie orticole che consentano il mantenimento o il ripristino di un'adeguata fertilità dei suoli, nell'ottica di implementare metodiche di sostenibilità agricola.

Le soluzioni innovative proposte, prevedono misure volte a modificare l'aspetto tecnico-analitico e si basano su metodiche di laboratorio rapide ed economiche per la valutazione della fertilità dei suoli sia generale che nelle sue specifiche componenti, microbiologiche. Tale innovazione risponde al bisogno di avere dei parametri sintetici che rappresentino efficacemente i livelli della fertilità dei suoli che attualmente rappresenta un aspetto quasi del tutto ignorato dagli operatori del settore siano essi agricoltori o tecnici agricoli.

2. METODOLOGIA SPERIMENTALE

La sperimentazione è stata condotta in alcune aziende con sede nella pianura dell'agro-pontino e partner del G.O., come di seguito riportate:

Liotti Roberta, sito in via S.S. 148 Pontina KM 99,500, Terracina

Liotti Salvatore sito in via S.S. 148 Pontina KM 99,500, Terracina

La Casetta Bio sito in VIA Casetta Ugo 32/A, Fondi.

Donnarumma Claudio sito in VIA S.S. Pontina KM 95.700, Terracina

Cini Mattia sito in VIA Scifelle 46, Terracina

Turcato Massimo sito VIA Molella, 73, San Felice Circeo

Lusuardi Carlo sito in VIA S.S. 148 Pontina KM 88,600, Sabaudia

Cialeo Mariapia sito in VIA Favonia SNC, 04019, Terracina

Ferraioli Sara sito in VIA Migliara 56, Terracina

Romanelli Angelo sito in VIA Migliara 53 DX 996, Pontinia

Lauretti Amedeo sito in via VIA Migliara 55, 04014, PONTINIA, LT

La scelta delle successioni colturali è avvenuta come di seguito descritto in serra:

Liotti Roberta: Ravanello, cavolo cinese (pakchoi), insalata

Liotti Salvatore: Cavolo rapa, cocomero. – 2 cicli ravanello (serre differenti)

Casetta Bio: Ravanello, pomodoro e bietola

Lusuardi Carlo: Cavolo rapa, cocomero e cavolo rapa (serra differente)

Donnarumma Claudio: Pomodoro e cetriolo (serra differente)

Turcato Massimo: Cavolo rapa, cocomero e carota

Ferraioli Sara: Due cicli di cetriolo (serra differente)

Lauretti Amedeo: Pomodoro datterino e pomodoro ciliegino (serra differente)

Cialeo Mariapia: Pomodoro da mensa e cavolo rapa

I protocolli di coltivazione di cui si è valutato l'impatto sono stati:

Controllo/Integrato che prevedrà normali modalità di lavorazione del terreno meno impattanti sul profilo del suolo, con l'utilizzo solo di attrezzi per la fresatura, e non per il rivoltamento degli strati del suolo; di fertilizzazione del terreno effettuata in base ai disciplinari di produzione integrata regionali; di difesa anticrittogamica (effettuata con utilizzo prevalente di mezzi chimici ammessi dai disciplinari e con mezzi biologici) utilizzo di biostimolanti:

-Biologico che prevedrà modalità di lavorazione del terreno conservative, senza l'utilizzo sia di attrezzi per la fresatura, che per il rivoltamento degli strati del suolo; la fertilizzazione del terreno e la difesa anticrittogamica saranno effettuate con mezzi tecnici ammessi in agricoltura biologica.

Per la tesi Biologico è stato utilizzato per tutte le aziende un consorzio microbico il cui nome sarà indicato con l'acronimo di "PEP" la cui composizione è formata da: micorrize 1%, batteri della rizosfera (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas sp.*) 1x10⁸ UFC/g, *Trichoderma spp.* (*T. gamsi* e *T. asperellum*) 1x10⁸ UFC/g.

Per ogni ciclo, i trattamenti da effettuare sono due. Il primo trattamento effettuato alla semina o al trapianto, tramite bagnatura della baula sottoposta alla sperimentazione o tramite immersione in soluzione delle piantine prima di effettuare il trapianto. In caso di bagno delle piantine la soluzione è stata preparata con 1 litro di prodotto ogni 100 litri di acqua; in fertirrigazione sono stati utilizzati 5 litri per ettaro. Il secondo trattamento è stato effettuato a metà del ciclo o comunque almeno un mese prima del raccolto. Il prodotto non andrebbe utilizzato o miscelato con altri prodotti o somministrato alla coltura a distanza di pochi giorni da altri prodotti, per non comprometterne l'efficacia. Ogni altro trattamento andrebbe effettuato almeno 15 giorni prima del "PEP".

3 DISEGNO SPERIMENTALE

COLTURE: RAVANELLO, CAVOLO CINESE, INSA-LATA

Coltura: Ravanello e Cavolo cinese in serra, tre archi, superficie complessiva di 3000 mq con una Densità impianto: 260 p/m²

Ravanello 4 cicli

Data semina/trapianto 1 ciclo: 05/04/2024 - Fine ciclo: 02/05/2024

Data semina/trapianto 2 ciclo :03/05/2024 - Fine ciclo: 29/05/2024

Data semina/trapianto 3 ciclo: 11/06/2024 - Fine ciclo: 08/07/2024

Data semina/trapianto 4 ciclo: 12/07/2024 – Fine ciclo: 12/07/2024

Cavolo cinese 2 cicli

Data semina/trapianto 1 ciclo: 21/09/2024- Fine ciclo 11/11/2024

Data semina/trapianto 2 ciclo: 18/11/2024- Metà ciclo 13/12/2024

Insalata

COLTURA: CAVOLO RAPA E COCOMERO

Coltura: Cavolo rapa, superficie serra di 800 mq² con una densità di semina di 15pt/m²

Coltura Cocomero, superficie 2100 mq² con densità di semina di 0.22pt/m²

Cavolo rapa

Data semina/trapianto: 27/12/2023 - Fine ciclo: 02/04/2024

Cocomero

[Data semina/trapianto:](#) 13/04/2024 – Fine ciclo: 08/07/2024

COLTURA: RAVANELLO, POMODORO E BIETOLA IN SERRA

Ravanello

[Superficie della serra di sperimentazione 472 mq²](#) con densità di semina di 200 pt/m².

Data semina/trapianto: 06/02/2024 - Fine ciclo 02/04/2024

Pomodoro

Superficie della serra di sperimentazione 472 mq² con densità della semina di 2,5pt/m²

Data trapianto: 29/04/2024

Data semina/trapianto: 29/04/2024 – Fine ciclo: 26/08/2024

Bietola

Superficie della serra di sperimentazione 472 mq² con densità di semina 10-25 piante/m²



***FIGURA.1** CASETTA BIO. FINE CICLO DEL RAVANELLO*



***FIGURA. 2** CASETTA BIO. INIZIO CICLO DEL POMODORO*



FIGURA. 3 AZIENDA AGRICOLA CASETTA BIO METÀ CICLO DEL POMODORO

3.1 Schema prelievo campione di suolo

I terreni interessati dalla sperimentazione saranno sottoposti a tre differenti tesi:

I TESI – Coltivazione in regime biologico (SPERIMENTALE)

II TESI – Coltivazione in regime integrato/controllo Aziendale

Per effettuare il campionamento, una corretta metodologia deve assicurare che il campione da sottoporre alle analisi sia “rappresentativo” del sistema oggetto di studio. Per il prelievo si deve seguire una corretta procedura affinché si ottenga un campione “medio”, realmente rappresentativo.

Per ogni tesi i punti di prelievo del campione sono schematizzati secondo una distribuzione regolare, tracciando due diagonali, ognuna delle quali con cinque punti di prelievo, che andranno a costituire i 5 sub-campioni di ogni diagonale. Il suolo campionato va riposto in sacchetti di plastica puliti. Ogni sub-campione di ciascuna diagonale deve essere unito per costituire il campione vero e proprio. Per ogni appezzamento ci saranno quindi 2 campioni. Lo schema per il prelievo dei campioni nei lotti oggetto della sperimentazione è di seguito illustrato:

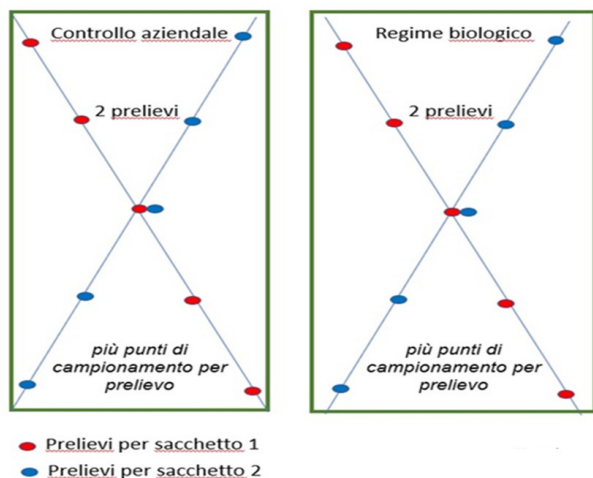
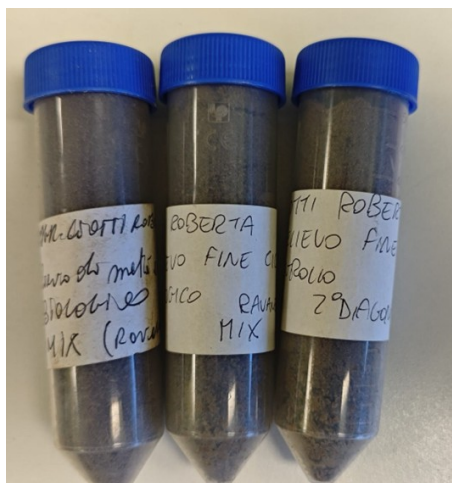


FIGURA 4. SCHEMA DI CAMPIONAMENTO DEL SUOLO PER LE TESI SPERIMENTALI CONTROLLO AZIENDALE/INTEGRATO E LA TESI DEL BIOLOGICO

Per quanto riguarda la profondità di prelievo, questa deve interessare lo strato di suolo occupato dalle radici, non superiore a 30 cm. In riferimento ai momenti per effettuare il campionamento, è stato effettuato un campionamento ad inizio ciclo colturale, un campionamento a metà ciclo colturale ed un ultimo campionamento a fine ciclo colturale. Il campionamento di inizio ciclo successivo può corrispondere con l'ultimo campionamento del ciclo colturale precedente. Raggiunta la sede di laboratorio, per ogni tesi è stato costituito un terzo campione, risultato da una miscela dei primi due campionamenti. In questo modo, i risultati delle tre repliche (2 campioni prelevati in campo ed 1 costituito in laboratorio) renderanno le analisi statistiche più affidabili. Tutti i campioni sono stati opportunamente collocati in tubi Falcon sterili, etichettati e conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in attesa di procedere con le analisi.



4. Metodo e Protocollo per la determinazione della fertilità dei suoli

Community-level physiological profile of microbial populations

Per il profilo fisiologico delle comunità microbiche nel suolo è stato utilizzato il metodo BIOLOG. Questa analisi è basata sull'utilizzo di substrati di carbonio da parte dei microorganismi presenti nel suolo. [BIOLOG EcoPlates™](#) è costituito da 96 pozzetti contenenti 31 diverse fonti di carbonio e un bianco come controllo, in triplicato. Ogni fonte di carbonio è caratterizzata da un colorante (tetrazolium), che si riduce generando un colore viola una volta che la fonte di carbonio è utilizzata dai microorganismi. I microorganismi del suolo ossidano il substrato e formano NADH, che può essere quantificato con uno spettrofotometro, con lettura a 595 nm. BIOLOG è una tecnologia utilizzata per l'identificazione e la caratterizzazione dei microrganismi in base alle loro attività metaboliche. È utilizzata nei laboratori di microbiologia per l'identificazione di batteri, lieviti e funghi, nonché per la valutazione dei loro profili metabolici. Essa valuta le capacità metaboliche dei microrganismi misurando la loro capacità di utilizzare varie fonti di carbonio e altri substrati. Profila diverse specie o ceppi in base alle loro impronte metaboliche. Di seguito illustrato la BIOLOG EcoPlates™:

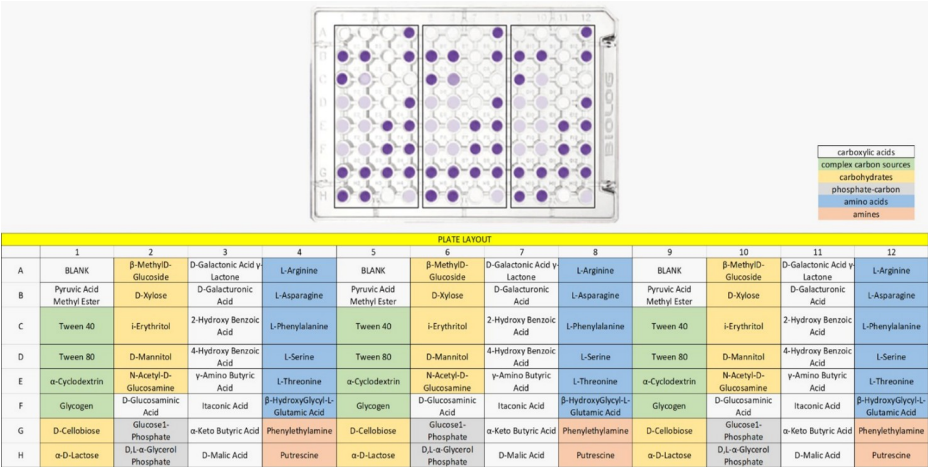


FIGURA 6: IN FIGURA LA DISTRIBUZIONE DELLA BIOLOG ECOPLATESTM. LA STESSA COLORAZIONE INDICA MOLECOLE APPARTENENTI ALLO STESSO GRUPPO FUNZIONALE COME DI SEGUITO ELENCAE: ZUCCHERI, CARBOIDRATI, AMMINOACIDI, ACIDI ORGANICI

Il protocollo ha previsto la preparazione di una diluizione da inserire in ogni pozzetto della BIOLOG ECOPLATE stilato dal CNR-IPSP di Portici.

La preparazione del campione ha previsto come di seguito elencato:

1. Pesare 100 mg di terreno fresco
2. Inserire il campione in eppendorf con 1 ml di acqua Millipore
3. Agitare il campione per 20 minuti (Vortex, massima velocità)
4. Lasciare depositare il campione per 3 minuti
5. Trasferire un'aliquota (150µl) in una nuova eppendorf
6. Diluire 100 volte il campione ottenuto
7. Utilizzare 100µl del campione diluito per ciascun pozzetto del BIOLOG EcoPlates™
8. Lettura dell'attività enzimatica

La lettura della piastra è stata effettuata con lo spettrofotometro modello Thermo Scientific™ Multiskan™ FC 96 well Plate Microplate Photometers. Le letture sono iniziate dal tempo di inoculo tempo zero fino allo sviluppo massimo della colorazione di ogni pozzetto (solitamente una lettura ogni 24h fino a 96h, a temperatura ambiente). Per una migliore discriminazione delle comunità microbiche, è di fondamentale importanza scegliere il tempo di incubazione più breve in cui l'AWCD raggiunge un valore di picco prima della successiva fase costante.

Tra una lettura e la successiva, si ripone la piastra nel suo sacchetto per evitare l'essiccazione e incubare a 25 C° al buio, agitando continuamente a 50 rpm su un agitatore con piattaforma inclinabile per ottenere una distribuzione uniforme del campione nel pozzetto.

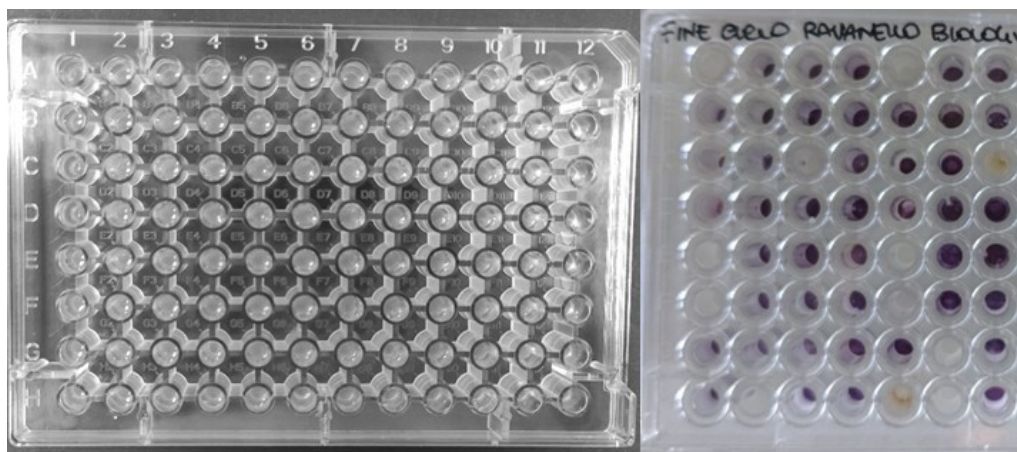


FIGURA 7: IN FIGURA BIOLOG ECOPLATESTM. LA VARIAZIONE PRIMA E DURANTE L'INCUBAZIONE (0H A 96H) PRODotta DALL'ATTIVITÀ METABOLICA DELLA COMUNITÀ MICROBICA.

4.1 ANALISI DEI DATI

Per ogni tempo di incubazione, è sottratto il valore medio di assorbanza del bianco (controllo) ed è calcolata l'assorbanza media di ciascun substrato, per calcolare l'attività catabolica nell'uso di quella fonte di carbonio (A_i). Tutti i valori negativi di A_i sono impostati a zero.

E' stato calcolato lo sviluppo medio del colore dei pozzetti (**AWCD - Average Well Colour Development**) come la somma delle attività (A_i) per piastra, divisa per le 31 fonti di carbonio. Sono state calcolate prima separatamente per ogni pozzetto, lo sviluppo medio del colore del pozzetto (AWCD) per tutti i tempi di incubazione e poi sommati per avere un unico dato rappresentativo l'intera la piastra.

L'AWCD (sviluppo medio del colore del pozzetto) è una stima della capacità totale di una comunità microbica di utilizzare diversi composti del carbonio. Utilizzando i valori di sviluppo del colore (c_i) del tempo di incubazione scelto, è possibile calcolare ulteriori indici, quali:

Richeness (S), che è il numero di substrati di carbonio utilizzati

Indice di diversità di Shannon (H'), che è correlato al numero di substrati di carbonio che la comunità batterica è in grado di degradare

Formule Utilizzate

L'AWCD

$$n \sum i = \ln(C_i - R)$$

Dove:

C_i = assorbanza (OD) del **pozzo i-esimo** con substrato

R = assorbanza del **pozzo di controllo** (blank)

n = numero di pozzi con substrato

Richeness (Ricchezza)

$$R = \sum I(C_i - C_{blank} > 0,25)$$

dove:

C_i = assorbanza del pozzo i

C_{blank} = assorbanza del pozzo di controllo

I = funzione indicatrice (1 se vero, 0 se falso)

n = numero di substrati

0,25 = soglia di assorbanza

Indice di diversità di Shannon (H')

$$H_i = - p_i * \ln(p_i)$$

dove:

p_i = C_i / somma di tutte le assorbanze

C_i = assorbanza del pozzo i

La somma di tutte le assorbanze = somma dei valori dei pozzi

4.2 APPROFONDIMENTI

Analisi molecolari: Meta barcoding e sequenziamento con Nanopore Oxford

Con l'analisi BIOLOG ci siamo soffermati sullo studio della diversità microbica all'interno di un singolo campione, cioè quanti tipi diversi (di specie o funzionalità) sono presenti e quanto sono equamente distribuiti, e pertanto sulla capacità delle comunità microbiche presenti, di utilizzare e degradare un substrato. Per conoscere e identificare i singoli microrganismi o i diversi taxa e gruppi funzionali, il CNR-IPSP ha elaborato un protocollo di estrazione del DNA dal suolo con successiva amplificazione di regioni specifiche del DNA mediante PCR e sequenziamento mediante *NANOPORE OXFORD*. Di seguito verranno illustrate tutti i passaggi e il protocollo elaborato:

1 Fase: Estrazione del DNA dal suolo.

L'estrazione di DNA dal suolo è stata eseguita con il Kit di estrazione *QIAGEN DNeasy PowerSoil Pro Kits for Soil DNA Extraction*. Per un'accurata estrazione sono state effettuate diverse prove, in relazione alla tessitura del suolo in esame al fine di ottenere un DNA finale che rientri negli indici di purezza A260/280 e A260/230 (1.8/2 e 2.0/2.2) che individuano rispettivamente contaminazioni da proteina, sali o solventi. I campioni di suolo sono stati prima setacciati per l'allontanamento di matrici grossolane. Dal setacciato è stato prelevato e pesato una quantità di suolo, fino a 250 mg in relazione alla tessitura. Per ogni replica biologica sono state pesate tre repliche tecniche (1rb=3rt). Ogni replica biologica riflette la variabilità naturale del suolo, mentre ogni replica tecnica rappresenta misure ripetute sullo stesso campione, per valutare la variabilità della procedura sperimentale o dell'analisi. La quantità di suolo pesato è stata inserita all'interno di bead tube, successivamente aggiunto il buffer CD1 e preriscaldato alla temperatura di 60 °C. I successivi step seguono il protocollo *QIAGEN DNeasy PowerSoil Pro Kits for Soil DNA₈Ex-*

traction.

2 Fase: Purificazione del DNA genomico estratto.

Il DNA genomico rappresentante le repliche tecniche è stato purificato con il kit *Bio labs Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) | Purification Kits*. Le principali problematiche dell'estrazione di DNA da suolo sono rappresentate da acidi umici e in generale da inibitori della PCR che influenza i rapporti di purezza nonché l'amplificazione della porzione del target genomico di riferimento.

3 Fase: PCR (Reazione a Catena della Polimerasi) elettroforesi e purificazione.

Per l'amplificazione di regioni specifiche del DNA come la 16S rDNA (DNA ribosomiale) per i batteri e ITS (Internal Transcribed Spacer) per i funghi, mediante PCR è adottato un protocollo che ha previsto l'utilizzo del kit *GoTaq® DNA Polymerase - Promega Italia*. La preparazione della reazione è stata effettuata in un volume finale di 50 µl secondo le direttive fornite dall'azienda ad una concentrazione finale di 100 ng totali. I primer utilizzati sono:

TABELLA 1 REGIONE TARGET AMPLIFICATA E PRIMERS UTILIZZATI PER L'AMPLI-

Batteri	Funghi
Target 16 S	Target ITS
Primer: 27 Fw -1492Rw	Primer: ITS1 Fw e ITS4 Rw

Le condizioni termiche consigliate per l'amplificazione PCR mediata dalla DNA polimerasi GoTaq® sono le seguenti:

TABELLA 2 CICLO TERMICO UTILIZZATO PER LA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI. LE TEMPERATURE DI ANNEALING FANNO RIFERIMENTO ALLE REGIONI TARGET AMPLIFICATE.

Step	Temperature	Time	Number of Cycles	Notes / Purpose
Initial Denaturation	95°C	5 min	1	Denatura completamente il DNA
Denaturation	95°C	0.30 min	35	Denatura il DNA ad ogni ciclo
Annealing	*50 °C - *56° C	0.5 min	35	I primers si legano alla sequenza complementare
Extension	72°C	0.50 min	35	Sintesi del DNA da parte della DNA polimerasi
Final Extension	72°C	10 min	1	Completa eventuale DNA a singolo filamento
Soak / Hold	4°C	Indefinito	1	Mantiene stabile il prodotto fino all'uso

Il passo successivo è stato quello dell'elettroforesi su gel di Agarosio al fine di valutare il buon fine della PCR. Questo step ha previsto la preparazione del gel di Agarosio all' 1%, la corsa elettroforetica con successiva visualizzazione del DNA mediante raggi UV emessi da un trans-illuminatore. Ultimo passaggio purificazione degli ampliconi per l'eliminazione dei prodotti in eccesso della PCR, al fine di quantificare con uno spettrofotometro (Nanodrop one Spectrophotometer della Termofisher) e Qubit Fluorometer, per determinare i valori soglia relativi alla purezza e quantificare in modo accurato il prodotto della PCR.

4.3 Sequenziamento Oxford Nanopore

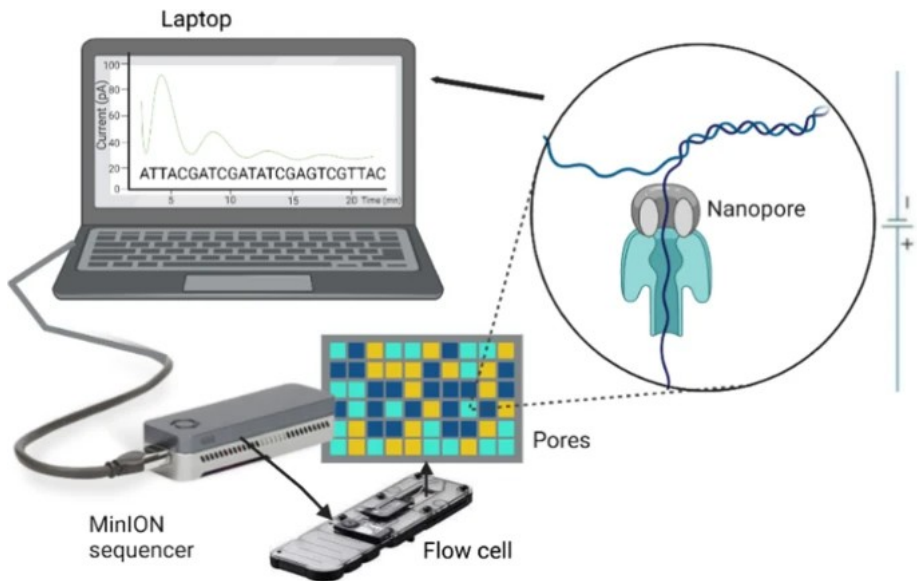
Il sequenziamento degli ampliconi è stato eseguito con la tecnologia Oxford Nanopore Technologies (ONT), che permette di leggere porzioni di DNA molto lunghe (quasi per intero) e quindi di riconoscere meglio i microrganismi rispetto a tecniche che producono sequenze

più corte. Per ogni campione di suolo, le tre repliche di PCR sono state unite (pooling) in un unico campione. La libreria di sequenziamento è stata preparata usando il kit Rapid Barcoding Kit 24 (SQK-RBK114.24; Oxford Nanopore Technologies). Il sequenziamento è stato poi effettuato su una flow cell Flongle utilizzando la piattaforma MinION, seguendo le istruzioni del produttore.



FIGURA 8. MINION (MK1D) OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES TESTATO PER IL SEQUENZIAMENTO

I segnali grezzi prodotti dal sequenziatore sono stati convertiti in sequenze di DNA tramite il software Guppy (basecalling) e i campioni sono stati separati in base al loro codice a barre (demultiplexing). Sono state mantenute solo le letture di buona qualità, con punteggio $\geq Q7$. Le successive analisi informatiche sono state svolte sulla piattaforma EPI2ME (Oxford Nanopore Technologies), utilizzando il workflow wf-16S, adatto alla classificazione di ampliconi 16S/18S/ITS. Questo workflow comprende un controllo di qualità delle sequenze, il confronto con banche dati di riferimento e l'assegnazione dei microrganismi (classificazione tassonomica). A partire dalle sequenze classificate sono state calcolate le abbondanze relative. In generale, i risultati sono stati riportati soprattutto a livello di genere; quando i dati lo permettevano (numero di letture sufficiente e classificazione affidabile), è stata considerata anche l'identificazione a livello di specie. Infine, le tabelle finali con il numero di letture per ciascun taxon e per campione (barcode) sono state esportate in formato Excel per le analisi successive.



SCHEMA ILLUSTRATIVO FUNZIONAMENTO DEL SEQUENZIATORE MinION NONOPORE OXFORD.

5. RISULTATI

La valutazione dell'attività metabolica e dei relativi indici di diversità microbica, ottenuti con la metodologia BIOLOG, ha mostrato dei valori dell'*AWCD* a 72h e 96h maggiori del trattamento biologico rispetto al controllo aziendale, il valore indicato al controllo aziendale indica un'attività metabolica moderata della comunità microbica. Nel monitoraggio finale corrispondente alla fine del ciclo del cavolo cinese il dato del controllo aziendale risulta incrementato ma inferiore al trattamento biologico. In questo caso il valore indicato (1.43) è indice di un'attività metabolica molto elevata. I valori relativi alla Richness ovvero la ricchezza funzionale della comunità microbica riflette la diversità metabolica della comunità microbica, cioè la capacità di degradare un numero diverso di substrati carboniosi. In questo caso, i valori del controllo aziendale e del biologico all'inizio del ciclo del ravanella, risultano essere rispettivamente 13 e 24 su 31 substrati disponibile, indice di elevata diversità funzionale nel biologico mentre nel controllo aziendale il valore indica una comunità microbica moderatamente o poco diversificata. Il monitoraggio corrispondente la fine del ciclo del cavolo cinese per il controllo ha presentato valori maggiori, pressoché simile al T0 quello del biologico. In questo caso una maggiore Richness osservata suggerisce un recupero della diversità funzionale e una ristrutturazione della comunità microbica nel lungo periodo. L'indice di Shannon fornisce una misura della diversità funzionale della comunità microbica del suolo, tenendo conto sia del numero di substrati utilizzati sia dell'uniformità del loro utilizzo. In entrambi i trattamenti, nei due tempi di monitoraggio i valori di tale indice mostrano un H' medio tra il pari e superiore a 3-3.2 sia per il controllo e il biologico, indicando una distribuzione più uniforme dell'attività metabolica tra i substrati nonché elevata diversità metabolica, comunità ben equilibrata. Solo nel controllo all'inizio del ciclo del ravanella il valore era pari a 2.8 sintomo

di diversità funzionale moderata e comunità microbica eterogenea ma con qualche predominanza. Per una valutazione generale, l'AWCD misurato alle 72–96 h è risultato basso, suggerendo un metabolismo complessivo ridotto, probabilmente legato alla disponibilità di substrati complessi e a condizioni ambientali non ottimali. Tuttavia, la Richness e l'indice di Shannon elevati indicano che la comunità microbica è funzionalmente diversificata e distribuita in modo equilibrato, evidenziando una comunità resiliente e metabolicamente versatile.

Su colture quali cavolo rapa e cocomero la valutazione dell'attività metabolica e dei relativi indici di diversità microbica hanno mostrato nel T0 e TM, fine ciclo cavolo rapa e inizio ciclo cocomero, una Richness e un indice di Shannon nella media, mentre il valore dell'AWCD ha mostrando un'attività metabolica della comunità microbica nella media ma non intensa. Nel TF ovvero la fine ciclo del cocomero i valori dell'AWCD e della Richness risultano particolarmente bassi a differenza dell'indice di Shannon. Tale quadro indica una comunità microbica del suolo limitata nel numero di substrati metabolizzati e nella sua intensità metabolica complessiva, ma equilibrata nella distribuzione dell'attività sui pochi substrati utilizzati, suggerendo la presenza di pochi taxa funzionalmente attivi e ben distribuiti. L' Heat Map delle 30 specie più abbondanti, evidenzia una netta dominanza di funghi saprofiti nei campioni biologici, in particolare *Trichoderma sp.*, indicativa di un'elevata attività decompositiva e di una maggiore intensità metabolica. Nei campioni di controllo/integrato si osserva una riduzione della dominanza fungina e una maggiore presenza di batteri non coltivabili, tipici di ambienti oligotrofi. Tali differenze risultano coerenti con i parametri funzionali Biolog, che mostrano variazioni nell'AWCD e nella struttura funzionale della comunità microbica del suolo.

In altra situazione, nel territorio Fondano, la valutazione dell'attività metabolica e dei relativi indici di diversità microbica come indicato dalla tabella 4, mostra un AWCD crescente da T0 a TF in entrambe le colture, indicando un aumento dell'attività metabolica complessiva della comunità microbica del suolo. I valori più elevati osservati nel trattamento biologico rispetto al controllo suggeriscono un effetto positivo delle pratiche biologiche sull'intensità metabolica microbica. In particolare, la coltura della bieta ha evidenziato un marcato aumento dell'AWCD nel tempo, indicando una progressiva attivazione della comunità microbica. La Richness funzionale ha mostrato una riduzione nel tempo nel trattamento del controllo aziendale, indicando una semplificazione dello spettro metabolico della comunità microbica del suolo. Al contrario, il trattamento biologico ha mantenuto valori di Richness più elevati a TF, suggerendo una maggiore stabilità e resilienza funzionale della comunità microbica. L'indice di Shannon ha mostrato valori elevati in tutti i trattamenti, indicativi di una comunità microbica funzionalmente ben strutturata. Tuttavia, nel trattamento di controllo si osserva una lieve riduzione di H' da T0 a TF, suggerendo una perdita di uniformità nell'utilizzo dei substrati. Al contrario, il trattamento biologico ha mantenuto valori di Shannon stabili nel tempo, indicando una maggiore stabilità ed equilibrio metabolico della comunità microbica del suolo. Dai risultati ottenuti si può dedurre che le pratiche agronomiche del protocollo agronomico del biologico riducono la dominanza funzionale e favoriscono una distribuzione più uniforme dell'attività metabolica.

6 CONCLUSIONI

Le pratiche agronomiche biologiche, integrate con l'uso di microrganismi, aumentano l'attività metabolica e la diversità funzionale della comunità microbica del suolo, promuovendo un ecosistema più stabile, resiliente e metabolicamente versatile rispetto ai controlli aziendali. Questo suggerisce benefici diretti sulla qualità biologica del suolo e potenzialmente sul supporto alla crescita e alla salute delle colture.

7. BIOBLOGRAFIA

Pace, R., Schiano Di Cola, V., Monti, M.M. et al. Artificial intelligence in soil microbiome analysis: a potential application in predicting and enhancing soil health—a review. *Discov Appl Sci* 7, 85 (2025). <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06381-4>

Laishram J, Saxena KG, Maikhuri RK, Rao KS. Soil quality and soil health: a review. *Int J Ecol Environ Sci*. 2012;38(1):19–37.

Dönmez D, Isak MA, İzgü T, Şimşek Ö. Green horizons: navigating the future of agriculture through sustainable practices. *Sustainability*.2024. <https://doi.org/10.3390/su16083505>.

Welbaum GE, Sturz AV, Dong Z, Nowak J. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Crit Rev Plant Sci*. 2004. <https://doi.org/10.1080/07352680490433295>.

Wallenstein MD. Managing and manipulating the rhizosphere microbiome for plant health: a systems approach. *Rhizosphere*. 2017

Enespa, Chandra P. Tool and techniques study to plant microbiome current understanding and future needs: an overview. *Commun Integr Biol*. 2022. <https://doi.org/10.1080/19420889.2022.2082736>.

Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, Thakare RP, Banday S, Alok K, Mishra AK, Das G, Malonia SK. Next-generation sequencing technology: current trends and advancements. *Biology*. 2023. <https://doi.org/10.3390/bio12070997>.

Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A, Sanchez-Flores A. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Front Genet*. 2015. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>.

Redazione: SIA s.r.l.

Coordinamento scientifico: D.ssa Michelina Ruocco (CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE – ISTITUTO PER LA PROTEZIONE SOSTENIBILE DELLE PIANTE—CNR-IPSP)