

Vivai Sandro Bruschi

Pistoia

IL NUOVO TERRICCIO SAN SOIL DELLA VIVAI SANDRO BRUSCHI

NEW SAN SOIL FROM VIVAI SANDRO BRUSCHI

**Substrati da invasatura
ottenuti dagli scarti oleari**
Potting substrates from waste oil



Comunità Europea
Fondo Europeo agricolo
per lo sviluppo rurale (FEASR)
L'Europa investe nelle zone rurali



REGIONE
TOSCANA



Coltiviamo il Futuro

PSR
2007-2013

PROGRAMMA
DI SVILUPPO RURALE
2007-2013

Intervento realizzato con il contributo del PSR 2007-2013 misura 124 Progetto San soil

1. SCOPO DEL PROGETTO

2. GLI SCARTI OLEARI

- 2.1 Gli scarti dei frantoi oleari: produzione e problematiche ad essi associate
- 2.2 Utilizzo degli scarti dei frantoi oleari come ammendanti e come substrati da invasatura
- 2.3 Utilizzo degli scarti dell'industria olearia nel campo del florovivaismo
- 2.4 Interazioni tra radice e suolo
- 2.5 Interazioni tra pianta e microrganismi del suolo

3. MATERIALI E METODI

- 3.1 Campioni analizzati
- 3.2 Campionamento di suolo e radici
- 3.3 Estrazione di DNA totale da campioni di radici e suolo
- 3.4 Amplificazione PCR dei geni ribosomiali 16S e 18S
- 3.5 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)
- 3.6 PCR quantitativa (qPCR)

4. RISULTATI

- 4.1 Validazione delle metodiche molecolari per lo studio della microflora nelle radici
- 4.2 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità microbica del suolo e delle radici
 - 4.2.1 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità batterica del suolo
 - 4.2.2 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità fungina del suolo
 - 4.2.3 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità batterica delle radici
 - 4.2.4 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità fungina delle radici
- 4.3 Effetti del compost "Big Bag" sull'abbondanza batterica del suolo e delle radici

5. SINTESI DEI RISULTATI

6. CONCLUSIONI

7. BIBLIOGRAFIA

1. SCOPO DEL PROGETTO

Il progetto PIF SAN-SOIL, analizzato in questo volume è stato finanziato dalla Regione Toscana con i fondi europei del Programma di Sviluppo Rurale 2007-2013 (fondo europeo Feasr) Misura 124. Detto progetto ha come obiettivo strategico la riduzione d'impiego della torba nel vivaismo, attraverso la sperimentazione di prodotti ammendanti alternativi derivanti, in particolare, dal recupero delle sanse dei frantoi oleari. L'Unità di Ricerca che fa capo ai Laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale dell'Università degli Studi di Perugia ha portato avanti le indagini microbiologiche necessarie per approfondire le modificazioni delle comunità microbiche durante il processo di compostaggio degli scarti e per studiare gli effetti dei terricci sperimentali sulle comunità microbiche esistenti nel sistema suolo-pianta ed il loro ruolo nei processi biochimici connessi con la nutrizione vegetale.

In questo modo è stato possibile studiare le comunità batteriche e fungine presenti nel suolo e nelle radici di differenti varietà di piante coltivate impiegando substrati da invasatura contenenti compost ottenuto da scarti di frantoi

oleari quale parziale sostituto della torba. L'analisi delle modificazioni della microflora è stata condotta attraverso l'impiego di approccio coltura-indipendente basato su metodiche molecolari per lo studio della biodiversità e dell'abbondanza microbica.

2. GLI SCARTI OLEARI

2.1 Gli scarti dei frantoi oleari: produzione e problematiche ad essi associate.

Il settore industriale riguardante la produzione olearia, che vede l'Italia come secondo

produttore mondiale di olio d'oliva, è un ramo industriale di notevole importanza in

particolar modo per gli stati a clima Mediterraneo come Spagna, Grecia, Portogallo,

Turchia e Siria.

Possiamo distinguere due tipologie principali di olio d'oliva: quello ottenuto con metodi

meccanici, definito vergine, e quello ottenuto con metodi chimico-fisici.

Ad oggi la produzione olearia alimentare riguarda principalmente l'olio ottenuto con

metodi meccanici e possiamo distinguere cinque fasi principali di produzione:

- Lavaggio delle olive
- Molitura: passaggio che porta alla rottura della parete cellulare e alla fuoriuscita di succhi con produzione di pasta d'olio formata da olio, acqua e parti solide.
- Gramolatura: ha lo scopo di rompere l'emulsione tra olio e acqua per facilitarne la separazione successiva.
- Estrazione del mosto d'olio: questo passaggio prevede la separazione della frazione solida da quella liquida formata da acqua e olio. Il mosto d'olio è la fase liquida, la sansa è la fase solida composta da polpa, buccia e semi.
- Separazione dell'olio d'oliva.

Due sono le metodologie di estrazione dell'olio: la pressatura, metodo tradizionale che permette la separazione del mosto d'olio dalle sanse, e la centrifugazione, metodologia introdotta più recentemente, che prevede la centrifugazione della pasta d'olio; nel caso della centrifugazione sono distinguibili due diversi approcci: il sistema trifase, che è quello classico, e il sistema bifase.

Il problema principale della produzione olearia riguarda sostanzialmente lo smaltimento dei reflui, in particolar modo delle acque di vegetazione e della sansa. Le acque di vegetazione sono costituite dall'acqua contenuta nella drupa, dalle acque di lavaggio e da quelle di processo e contengono un'elevata concentrazione di sostanze organiche; la sansa è invece solida e composta da bucce e semi d'oliva.

I rifiuti dell'industria olearia sono prodotti caratterizzati da un'elevata fitotossicità dimostrata da diversi studi che hanno provato gli effetti negativi che esercitano sul suolo (Paredes et al., 1987), sui sistemi acquatici (Della Greca et al., 2001), e nell'aria (Rana et al., 2003). L'impatto ambientale potenzialmente negativo è dovuto alle particolari caratteristiche chimiche di questi scarti: alto contenuto di sali minerali, pH molto acido e presenza di composti polifenolici (Pardes et al., 1999) con azione fitotossica e antimicrobica che influisce sullo sviluppo di molte piante. Il problema relativo ai polifenoli è particolarmente accentuato nel caso di produzione olearia con sistema trifase; questo prevede la separazione in tre componenti: le sanse, il mosto d'olio e l'acqua reflua.

La pasta d'olio, che si forma nella fase di molitura, con questo sistema viene diluita con acqua ed è proprio questo lo svantaggio maggiore poiché vi è un notevole consumo d'acqua, un'elevata produzione di acqua di vegetazione e una grande estrazione di polifenoli dovuta al lavaggio della pasta; questa maggiore concentrazione di polifenoli, che come detto sono battericidi e a lenta biodegradabilità, rende le acque di vegetazione ancora più inquinanti e di difficile smaltimento.

Il sistema bifase, grazie al minor utilizzo di acqua, ovvia almeno in parte i problemi riscontrati nel sistema trifase e vede la produzione di scarti con un minor carico di polifenoli e di conseguenza con una ridotta potenzialità inquinante. La centrifugazione nel sistema bifase porta alla produzione di due sole frazioni: le sanse e l'acqua reflua.

Anche in questo tipo di produzione si riscontrano però dei problemi riguardanti lo smaltimento dei rifiuti, nel caso specifico delle sanse. È quindi evidente che dall'estrazione dell'olio d'oliva si generano una grande quantità di sottoprodotti che sono dannosi per l'ambiente (Morillo 2009), in particolar modo sansa e acque reflue. È di conseguenza indispensabile trovare metodologie adeguate non solo per smaltire questi rifiuti ma anche strategie per la loro valorizzazione.

2.2 Utilizzo degli scarti dei frantoi oleari come ammendanti e come substrati da invasatura.

Con la denominazione olive mill wastes (OMW) si indicano i sottoprodotti dell'attività olearia: acque reflue e sansa. Le acque di vegetazione sono lo scarto più critico a causa della loro elevata fitotossicità e all'attività battericida, effetti dovuti ai loro componenti chimici quali fenoli e polifenoli di difficile biodegradabilità. È vero che gli scarti oleari sono potenziali inquinanti e che quindi non possono essere rilasciati nell'ambiente; è però altrettanto vero che contengono preziose risorse come le elevate concentrazioni di materia organica e di sostanze nutritive che potrebbero essere riciclati come potenziali fertilizzanti (Roig et al., 2006). Di conseguenza è evidente che questi scarti possono essere trasformati in un utile risorsa da sfruttare in campo agricolo, sia come ammendanti direttamente nei terreni sia come substrati da invasatura. I sottoprodotti dell'attività olearia possono essere utilizzati sia come "tal quali" sia come compost.

Negli ultimi anni sono stati portati avanti numerosi studi proprio sull'utilizzo dei sottoprodotti dell'industria olearia come compost (Roig et al 2006, Morillo et al 2009, Federici et al 2009).

Con il termine "compost" si indica l'ammendante organico ottenuto dal processo biotecnologico aerobico di compostaggio di sostanze organiche, che porta alla formazione di un prodotto utilizzabile come fertilizzante agricolo poiché ricco di sostanza organica stabilizzata e di nutrienti minerali.

Il compostaggio è un processo naturale che può essere sfruttato industrialmente, con diverse finalità, come processo di maturazione biologica controllata di sostanze organiche in ambiente aerobio; grazie a questo processo si ha la produzione di materiali a catena molecolare più semplice, più stabili, sterilizzati grazie alle alte temperature che si raggiungono della fase termofila, ricchi di composti umidici e quindi utili nella concimazione e nel ripristino della sostanza organica nel suolo. In generale ogni prodotto biologico può fungere da substrato per il compostaggio e gli scarti dei frantoi non fanno differenza, sono anzi una base idonea per ottenere un compost di "qualità".

Le fasi principali del compostaggio sono due: la decomposizione mediante bioossidazione (active composting) e la fase di maturazione (curing). All'interno di queste due fasi principali si possono distinguere poi delle "sottofasi", passaggi del processo di compostaggio caratterizzati da temperature diverse e dall'azione di microrganismi differenti.

Nel primo step della fase di bioossidazione intervengono microrganismi mesofili e psicrofili aerobi, si tratta quindi di una fase mesofila nella quale

vengono degradate le componenti organiche più semplici (zuccheri, amminoacidi, lipidi, etc) con consumo di ossigeno, rilascio di anidride carbonica e calore (reazioni endoergoniche).

Grazie all'innalzamento della temperatura si osserva una progressiva scomparsa dei microrganismi mesofili, che hanno un optimum tra i 18°C e i 45°C, e la selezione di microrganismi più resistenti alle alte temperature e più adatti alla degradazione delle sostanze complesse non metabolizzate nella fase mesofila: si entra quindi nella fase termofila caratterizzata dalla presenza di batteri autotrofi facoltativi termofili e da termofili estremi. Le alte temperature di questa fase accelerano la degradazione delle biomolecole più complesse: proteine, grassi, carboidrati complessi come cellulosa e emicellulosa; inoltre il calore sviluppato favorisce il processo di caramellizzazione degli zuccheri che, insieme alla formazione delle sostanze umiche, dona alla matrice un colore bruno.

La fase termofila termina a causa delle alte temperature che favoriscono l'evaporazione dell'acqua e quindi la scomparsa dei batteri. La scomparsa dei batteri e la riduzione dei nutrienti alla base delle reazioni endoergoniche che portano allo sviluppo di calore, innesca l'abbassamento della temperatura e l'ingresso nella fase di raffreddamento e di maturazione mesofila. Questa fase è caratterizzata dalla colonizzazione della matrice da parte dei funghi i quali, grazie alla produzione di specifici enzimi, degradano parzialmente le sostanze complesse rimaste (cellulosa, emicellulosa, lignina). La temperatura di questa fase è simile a quella ambientale (Federici et al 2011).

I microrganismi che partecipano al processo di compostaggio nelle sue varie fasi e nei suoi diversi step, sono numerosi e principalmente rappresentati da batteri, attinomiceti e funghi.

I batteri sono i responsabili dello sviluppo di calore che viene liberato durante le reazioni endoergoniche di degradazione delle sostanze organiche semplici. Gli attinomiceti sono in grado di degradare sostanze più complesse. Intervengono anche nella fase finale di maturazione portando alla produzione di componenti umiche. I funghi intervengono in tutte le fasi del compostaggio e sono in grado di degradare sostanze complesse portando alla formazione di metaboliti secondari che vengono poi attaccati dai batteri.

Il compostaggio è una tecnica di possibile utilizzo anche per la valorizzazione degli scarti della produzione olearia: la sansa umida compostata potrebbe essere usata in agricoltura sfruttando il suo apporto di sostanze organiche e fertilizzanti e nel contesto del florovivaismo come substrato da invasatura per sostituire risorse non rinnovabili attualmente utilizzate come la torba.

Il problema dell'utilizzo degli scarti dell'industria olearia risiede nel fatto che questi possono apportare non solo benefici ma possibili danni, sia nel caso di reflui non compostati sia nel caso di reflui compostati.

Ad oggi l'utilizzo diretto sui terreni agricoli delle sansi umide, controllate nella loro composizione chimica, al fine sia di reintegrare la sostanza organica nel

terreno sia di smaltire i rifiuti oleari, è regolata dall'articolo 4 della legge n.574 dell'11 novembre 1996.

In linea teorica l'utilizzo degli scarti oleari offre numerose prospettive in campo agricolo. Questo è dovuto alle caratteristiche dei sottoprodotti dell'industria olearia: le sanse umide contengono elevate concentrazioni di materia organica (intorno all' 84%), sostanze grasse residue intorno al 10%, umidità di circa 50-70%, fosforo in quantità vicine allo 0,2%, potassio (2%) e azoto (1%). Va ricordato che questi ultimi tre elementi sono essenziali per nutrimento, crescita e sviluppo delle piante.

Oltre a dare effetti rilevabili sul suolo e sulle piante, vi sono evidenze sperimentali che dimostrano cambiamenti nella microflora del suolo dopo spargimento di scarti oleari: si denota una iniziale diminuzione della microflora probabilmente per la presenza di sostanze batteriostatiche o battericide nell'ammendante; dopo la riduzione si osserva invece una ripopolazione microbica con raggiungimento o superamento dei valori iniziali. Uno degli studi condotti sugli scarti oleari e sugli effetti che questi hanno sui terreni agricoli ha dimostrato che un anno dopo lo spandimento di OMW è possibile rilevare un notevole effetto a breve termine sui batteri nella rizosfera (Boldini et al. 2011).

Gli effetti dell'utilizzo di questi scarti oleari dipende comunque da numerosi fattori come la modalità e le dosi di spandimento, la tipologia di suolo, le condizioni climatiche e le colture in atto.

Data la grande variabilità di fattori dai quali dipendono gli effetti positivi o negativi di questi prodotti sia sull'ambiente che sulle coltivazioni, si sta cercando di mettere a

punto delle strategie per ovviare agli svantaggi, come ad esempio la pratica prima descritta di compostaggio che consente la biorisanazione della sostanza organica.

2.3 Utilizzo degli scarti dell'industria olearia nel campo del florovivaismo.

Nel campo del florovivaismo il substrato da invasatura più utilizzato è la torba la quale si accumula in suoli ricchi d'acqua in assenza di ossigeno e rappresenta lo stadio iniziale della formazione di carbone. È composta da materia organica soprattutto di origine vegetale, ma anche di altra natura, e rappresenta un ottimo substrato da invasatura grazie all'apporto di nutrienti e al pH ottimale per la crescita delle piante.



La torba ha però lo svantaggio di essere una risorsa non rinnovabile e negli ultimi anni in alcune nazioni europee (Austria, Germania, Gran Bretagna, Svizzera) il suo utilizzo è stato osteggiato da gruppi ambientalisti, con lo scopo di limitare l'estrazione della torba, preservando così l'habitat delle torbiere (Schmilewski, 2000; Carlile, 2001). L'aumento dei costi e il fatto che non sia una risorsa rinnovabile ha richiamato l'attenzione sulla necessità di trovare substrati da invasatura alternativi affinché questa venga sostituita.

In linea teorica gli scarti dei frantoi oleari, sia tal quali che compostati, potrebbero rappresentare un ottimo substrato sostitutivo alla torba, grazie all'apporto di sostanze organiche, di sali minerali e di altri nutrienti indispensabili per la crescita delle piante in

vaso. Questi scarti potrebbero però influire anche sulle popolazioni microbiche presenti nell'ecosistema radici-suolo. La microflora ha funzioni fondamentali per la vita della pianta e modifiche a livello della composizione del substrato potrebbero rispecchiarsi in variazioni nella popolazione microbica che interagisce con le radici, causando cambiamenti nella pianta, non necessariamente vantaggiosi o positivi.

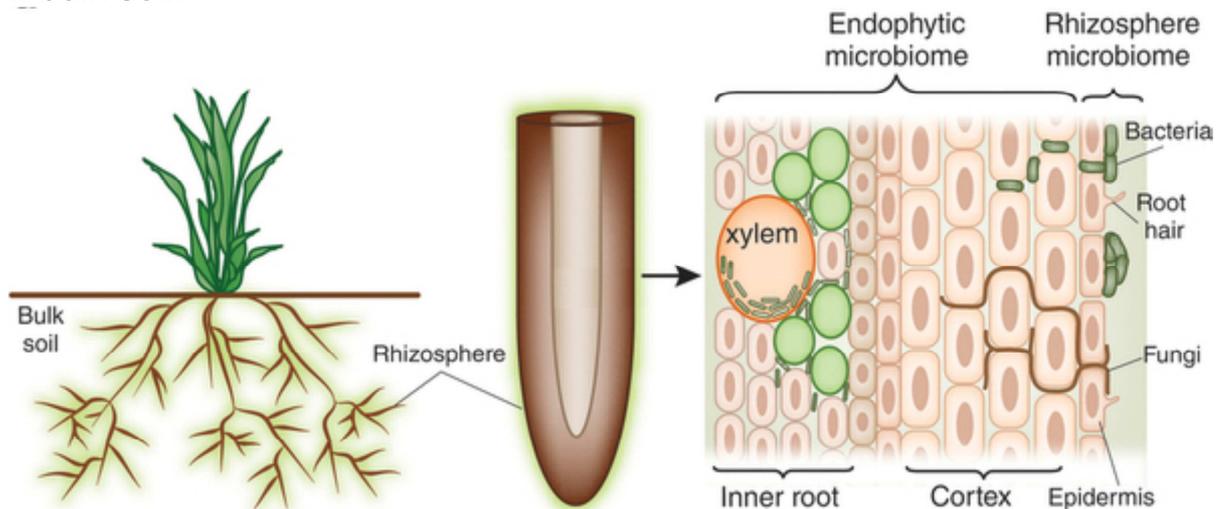
I substrati da invasatura influiscono quindi sulla crescita e la salute della pianta in due modi: sia direttamente, attraverso l'apporto di sostanze nutrienti e di sali minerali, sia indirettamente, andando a influenzare la microflora dell'ecosistema suolo-pianta.

L'utilizzo delle sanse come substrati da invasatura potrebbe risolvere due problematiche: la necessità di trovare un'alternativa alla torba nel campo del florovivaismo e lo smaltimento dei rifiuti dell'industria olearia, che potrebbero essere così riciclati in modo produttivo. Il punto cruciale è quindi quello di cercare di individuare se e quanto sia favorevole per la pianta la sostituzione della torba con gli scarti derivanti dall'industria olearia e in che modo questi sottoprodotti debbano essere trattati per essere valorizzati e utilizzati come substrati da invasatura.

2.4 Interazioni tra radice e suolo.

Quando ci riferiamo all'interazione tra pianta ed ecosistema nella quale questa è ubicata, anche nel caso di piante in vaso, tre sono le regioni principali da prendere in considerazione:

- L'apparato radicale;
- La rizosfera;
- Il bulk soil.



La radice è l'organo della pianta specializzato nell'assorbimento di acqua e sali minerali dal terreno, fondamentali per la vita dell'organismo vegetale. Ha anche la funzione di ancoraggio, di produzione di ormoni e di secrezione di essudati.

La rizosfera (dal greco *rhizo*=radice; *sphaira*=sfera) è la porzione di suolo che circonda le radici delle piante, da cui queste assorbono i nutrienti essenziali e l'acqua necessaria per crescere. In questa regione si trovano componenti biotiche come microorganismi simbiotici, batteri benefici e patogeni, funghi micro e macroscopici. La rizosfera può essere suddivisa in tre zone:

- endorizosfera, ambiente multistratificato che si estende dalla superficie delle radici fino ai primi strati cellulari interni dove si può avere invasione microbica e colonizzazione;
- rizopiano o superficie esterna radicale, costituito dallo strato epidermico con peli radicali (rizoderma) e dallo strato mucoide dove si può avere una colonizzazione microbica;
- ectorizosfera, che consiste nel volume di suolo adiacente alle radici di dimensioni variabili a seconda del tipo di pianta e delle interazioni con le popolazioni microbiche presenti in tale zona.

Infine, con il termine *bulk soil* si indica il terreno, il suolo, al di fuori della rizosfera non penetrato dalle radici delle piante. In questa regione la concentrazione dei composti organici naturali è molto più bassa rispetto a

quella della rizosfera; lo stesso vale per le popolazioni microbiche, presenti in misura minore.

L'influenza della pianta sull'ambiente nella quale questa è ubicata si esplica attraverso la rizodeposizione, processo di secrezione da parte dell'apparato radicale di materiale organico e inorganico. Questo materiale può essere composto da cellule o frammenti cellulari o da essudati radicali.

Gli essudati prodotti dalle piante e rilasciati nel terreno circostante si possono classificare in due tipologie:

- Essudati a basso peso molecolare: composti idrosolubili come zuccheri, acidi organici, aminoacidi e fenoli;
- Essudati ad alto peso, ovvero sostanze macropolimeriche polisaccaridiche insolubili come ectoenzimi (fosfatasi, polifenoli ossidasi) e mucillagini, come il mucigel che circonda le radici e nel quale sono immersi i microrganismi. Il mucigel ha la funzione originaria di lubrificare la radice per permettere la penetrazione della stessa all'interno del suolo; è però un ottimo ambiente per la crescita di batteri, specialmente azotofissatori, e funghi.

Il fenomeno della rizodeposizione porta a quello che è definito effetto rizosfera, termine coniato da Hiltner (1904) per descrivere l'influenza degli essudati radicali nella proliferazione dei microrganismi del suolo e interni alla radice (Hartmann et al., 2008): la secrezione nel suolo di tutti questi essudati ne modifica la composizione, apporta sostanze nutrienti per i microrganismi, e questo influenza la microflora, sia per quanto riguarda la biodiversità che la carica microbica; le popolazioni microbiche sono dalle 5 alle 100 volte (in media 20 volte) più numerose nella rizosfera che nel resto del suolo.

Questa variabilità è data dal fatto che la secrezione di essudati da parte delle radici è influenzata da numerosi fattori come la specie vegetale, l'età e lo stato nutrizionale della pianta e le condizioni ambientali.

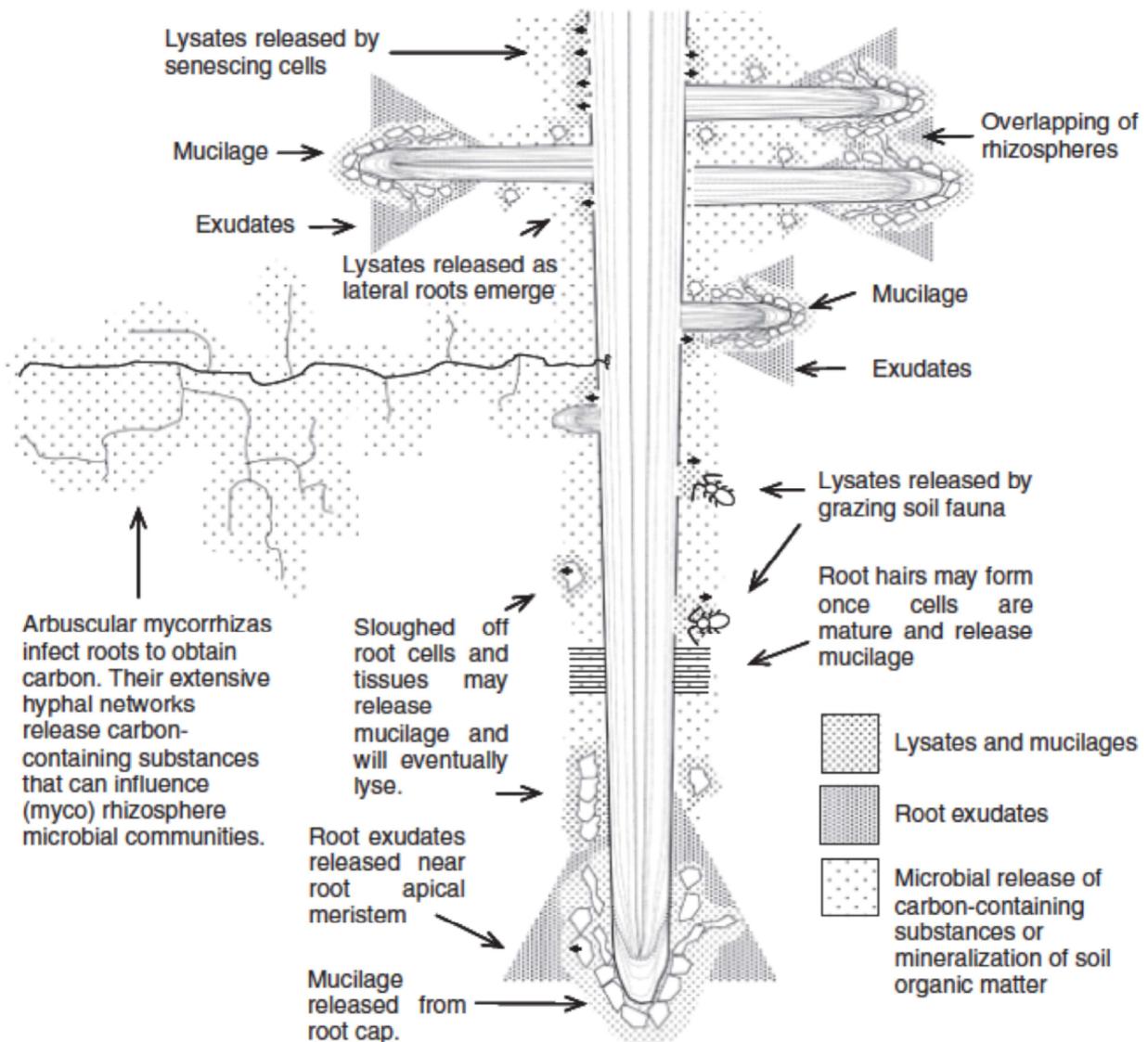
Con la denominazione Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), (Kloepper et al., 1978) si indicano tutti quei microrganismi presenti nella rizosfera che promuovono la crescita della pianta e hanno effetto di biofertilizzanti, biorisanatori e biopesticidi; un esempio di PGRP sono i batteri generi *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium* e *Bacillus*. La struttura del suolo, consentendo il movimento dei microrganismi rizosferici presenti nelle immediate vicinanze della radice, ne favorisce il reclutamento (Dennis et al., 2010).

Gli effetti benefici sulla pianta si esplicano attraverso meccanismi d'azione diretti e indiretti; esempi di effetti diretti sono la fissazione dell'azoto atmosferico, la produzione di siderofori chelanti il ferro e la solubilizzazione del fosforo che rendono più disponibili le due sostanze per l'assorbimento da parte delle piante, e la sintesi di fitormoni che ne stimolano lo sviluppo. Tra i meccanismi indiretti possiamo invece citare la produzione di metaboliti

antagonisti nei confronti dei microrganismi dannosi, la competizione verso i patogeni per i nutrienti o per specifiche nicchie, la capacità di produrre siderofori chelanti il ferro non più disponibile per i microrganismi dannosi e l'induzione della resistenza sistemica indotta (ISR).

2.5 Interazioni tra pianta e microrganismi del suolo.

Quando si parla di ecosistema vegetale è necessario tenere in considerazione tutte quelle interazioni che si instaurano tra l'apparato radicale e i microrganismi presenti nel suolo, siano questi batteri o funghi.



Il suolo è un habitat ricco di comunità microbiche, appartenenti a gruppi differenti, le quali possono essere suddivise in due categorie: la microflora autoctona e i microrganismi zimogeni. La prima categoria comprende specie sia batteriche che fungine presenti a un livello generalmente stazionario; i gruppi ecofisiologici, capaci di svolgere specifiche funzioni ed attività metaboliche, appartengono a questa classe. La seconda categoria è quella dei microrganismi zimogeni: invasori alloctoni, i quali degradano i resti organici freschi, che si moltiplicano con rapidità per poi tornare al livello iniziale. Fin dall'inizio della sua crescita la pianta interagisce con la

componente biotica del suolo. La fase iniziale di interazione con i microrganismi si può definire come fase di colonizzazione nella quale i microrganismi, grazie a diversi fattori, si muovono verso le radici. Questo movimento può essere sia passivo, per mezzo di flussi di acqua nel suolo, che attivo, attraverso un processo di chemiotassi attivato dagli essudati vegetali che stimolano lo spostamento dei microrganismi verso l'apparato radicale. Tra i vari prodotti stimolanti la chemiotassi possiamo citare i composti fenolici e aromatici, gli zuccheri e gli amminoacidi.

Successivamente alla fase di colonizzazione avviene un adsorbimento aspecifico dei microrganismi alla superficie della radice grazie alle forze elettrostatiche; è possibile poi l'ancoraggio della cellula batterica all'apparato radicale. Questo porta alla formazione di interazioni simbiotiche piuttosto complesse tra la pianta e il suo ospite.

È possibile distinguere due tipologie di simbiosi: ectosimbiosi, nel caso in cui il microrganismo viva sulla superficie dell'ospite, ed endosimbiosi, nel caso in cui risieda nello spazio intercellulare o intracellulare. Nel secondo caso parliamo di endofiti.

La simbiosi permette in genere alla pianta di acquisire nuove funzioni sia metaboliche, come l'azotofissazione e la degradazione della cellulosa, che non metaboliche come la protezione da agenti chimici, fisici e biologici.

La simbiosi si distingue in ulteriori due tipologie: ciclica, nel caso in cui ad ogni generazione la pianta debba "richiamare" attraverso segnali chimici i microrganismi simbiotici, e permanente, nel caso in cui il simbionte sia trasmesso verticalmente, quindi di generazione in generazione.

Le micorrize sono un classico esempio di simbiosi tra l'apparato radicale e microrganismi del suolo; queste sono un tipo di associazione simbiotica mutualistica che si instaura tra le radici di molte piante e i funghi presenti nel suolo, alla quale possono partecipare, in diversa misura, anche i batteri.

Da questa associazione sia la pianta che il microrganismo traggono vantaggio: la pianta fornisce ai funghi simbiotici carboidrati semplici prodotti con la fotosintesi indispensabili al loro metabolismo, i funghi producono fattori di crescita vegetali che inducono alterazioni morfologiche delle radici stimolando la formazione dello strato micorrizico.

I benefici che la pianta trae da tale simbiosi sono numerosi: il maggior sviluppo delle sue radici e quindi l'aumentata estensione dell'apparato radicale, l'amplificata efficienza di assorbimento di nutrienti, ioni e acqua, oltre che la protezione dagli stress ambientali e dai patogeni.

Si possono distinguere due tipi di micorrize: ectomicorrize (micorrize ectotrofiche) e le endomicorrize (micorrize vescicolari-arbuscolari); le prime sono un'infezione superficiale nella quale le ife non penetrano all'interno dei tessuti dell'apparato radicale, ma lo rivestono formando una guaina intorno alla radice; nel secondo caso si osserva invece una penetrazione del fungo all'interno delle cellule radicali.

Un ulteriore esempio di relazione simbiotica tra pianta e microrganismo è quella che si instaura tra batteri dei generi *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e piante di leguminosa.

Questa interazione porta alla formazione di noduli radicali nei quali il batterio si differenzia in peribatterioide e converte l'azoto atmosferico in ammoniaca che viene utilizzata dalla pianta come fonte di azoto; il mutualismo si basa sul fatto che il batterio ricopre il ruolo di azotofissatore e la pianta fornisce ad esso carbonio, di conseguenza entrambi traggono beneficio dalla simbiosi.

I microrganismi del suolo e i simbionti della pianta intervengono nei principali cicli biogeochimici risultando indispensabili per l'organismo vegetale: nel ciclo dell'azoto possiamo individuare microrganismi fondamentali nella fase di proteolisi e ammonizzazione, quindi nella mineralizzazione dell'azoto proteico con conseguente liberazione di NH_4^+ , e batteri nitrificanti, che ossidano l'ammonio a nitrito il quale viene ossidato a nitrato; nel ciclo del carbonio troviamo cellulolitici, microrganismi che degradano la cellulosa, amilolitici, che degradano l'amido, pectinolitici, i quali degradano la pectina e ligninolitici che degradano la lignina.

Non tutti i microrganismi presenti nel suolo né tutti i simbionti apportano benefici alla pianta, in alcuni casi la pianta non riceve né danno né vantaggi in altri casi i simbionti sono fitotossici.

I microrganismi saprofiti rientrano nella classificazione di microrganismi che non apportano svantaggi alla pianta, ma neanche vantaggi, se non in modo indiretto. Le funzioni di questi microrganismi sono numerose e tra queste è importante ricordare il loro ruolo nella decomposizione della sostanza organica e quindi nella mineralizzazione degli elementi nutritivi, indispensabili per l'equilibrio dell'ecosistema del suolo e per il circolo dei nutrienti. Di conseguenza il beneficio che la pianta ne trae è indiretto, ma comunque indispensabile.

Gli stessi essudati che richiamano simbionti benefici per l'organismo vegetale fungono da stimolo chemiotattico anche per quelli che sono simbionti patogeni e che quindi apportano danno alla pianta ad esempio inibendone la crescita attraverso la produzione di fitotossine, come il cianuro, o danneggiando la microflora della rizosfera come nel caso dell'inibizione dei batteri azoto-fissatori e delle micorrize.

Le interazioni tra pianta e microflora sono evidentemente molto complesse e si assiste a una reciproca interazione oltre che a una reciproca influenza: attraverso gli essudati le piante modificano la microflora la quale a sua volta influenza la pianta nei più svariati modi. È evidente come la vita della pianta e il suo sviluppo siano imprescindibili da questo legame con i microrganismi del suolo e come modificazioni dell'ambiente, ad esempio attraverso l'utilizzo di compost derivanti dagli scarti oleari, possano portare a modificazioni della microflora con possibili effetti sulla crescita e sulla salute della pianta.

3. MATERIALI E METODI

I metodi utilizzati per lo studio delle comunità microbiche in un dato campione ambientale sono di due tipologie: metodi coltura-dipendenti e metodi coltura-indipendenti.

Nel primo gruppo troviamo quei metodi che consentono lo studio delle comunità microbiche attraverso la coltivazione diretta su piastra.

I metodi coltura-indipendenti sono invece metodi molecolari che non richiedono il piastramento, come il sequenziamento, la real-time PCR e l'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE).

La DGGE è un ottimo strumento di studio delle comunità microbiche in matrici ambientali; l'importanza di questo metodo risiede principalmente nel fatto che consente l'individuazione, grazie ad analisi successive come il sequenziamento, di microrganismi impossibili da coltivare in laboratorio.

La maggior parte delle specie batteriche o fungine risedenti nelle matrici ambientali non si riesce a coltivare in laboratorio: la discrepanza tra il numero di cellule batteriche osservate mediante microscopia diretta di campioni di terreno colorati e il numero di quelle che crescono su piastre di agar è da tempo riconosciuta. Un esempio evidente sono gli archeobatteri del suolo a crescita lenta, non rilevati utilizzando culture in

piastra di agar; anche nella valutazione dell'abbondanza di miceli fungini e spore attraverso la coltura diretta sono state riscontrate inesattezze nei dati ottenuti (Penny R & Mauchline H. T 2012).

Appare evidente quindi come non sia possibile dare un'idea, attraverso metodi colturadipendenti, dell'enorme biodiversità microbica presente in questa tipologia di campioni, mentre si può ottenere una panoramica più ampia quando si utilizzano metodi coltura-indipendenti.

3.1 Campioni analizzati.

L'indagine delle comunità microbiche all'interno del sistema suolo-pianta, avviene nel quadro del progetto PIF SAN-SOIL finanziato dalla Regione Toscana. Tale progetto si pone come scopo l'approfondimento degli aspetti microbiologici di nuovi ammendanti, sostitutivi della torba utilizzata nel vivaismo, ottenuti dalla trasformazione degli scarti da frantoio oleario. In particolare sono state monitorate diverse varietà di piante coltivate in terricci sperimentali presso Vivai Sandro Bruschi per lo studio delle comunità microbiche esistenti e del loro ruolo nei processi biochimici connessi con la nutrizione vegetale.

I primi campioni analizzati sono stati utilizzati per la fase di messa a punto e validazione dell'approccio sperimentale e derivano da piante allevate in vaso delle seguenti varietà:

- Photinia fraseri 'Red Robin'
- Osmanthus burkwoodii

La seconda e principale fase del presente lavoro, ha quindi preso in esame piante coltivate in diversi substrati da invasatura composti da differenti combinazioni di torba e compost "Big Bag", un compost sperimentale formulato dall'Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFOM) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Perugia) a partire da scarti di frantoi oleari. Questo materiale è stato oggetto della sperimentazione per valutarne l'utilizzo come sostitutivo della torba, formulando 8 diverse tesi sperimentali che prevedevano sia diverse quantità di compost che presenza/assenza di concime minerale:

- TC: Testimone aziendale solo con torba - concimato
- BB_33_C: Torba sostituita al 33% con compost "Big Bag" - concimato
- BB_66_C: Torba sostituita al 66% con compost "Big Bag" - concimato
- BB_100_C: Torba sostituita al 100% con compost "Big Bag" - concimato
- TNC: Testimone aziendale solo con torba – non concimato
- BB_33_NC: Torba sostituita al 33% con compost "Big Bag"- non concimato;
- BB_66_NC: Torba sostituita al 66% con compost "Big Bag"- non concimato;
- BB_100_NC: Torba sostituita al 100% con compost "Big Bag"- non concimato;

Dopo 6 mesi dall'inizio della sperimentazione, sono state prelevate otto piante per ciascuna tesi sperimentale. In questo caso sono state analizzate le seguenti varietà:

- *Cupressus sempervirens* 'Pyramidalis'
- *Viburnum lucidum*
- *Prunus laurocerasus* 'Novita'

L'analisi di tre diverse varietà di piante e di 8 replicate per tesi, ha portato ad un gran numero di campioni da analizzare. Quest'approccio ha permesso un'indagine molto approfondita e statisticamente robusta dell'influenza dei vari terricci sull'equilibrio della microflora del suolo e della pianta. La gestione sperimentale dell'elevato numero di campioni raccolti è stata quindi semplificata allestendo pool costituiti dalle otto piante di ciascuna varietà trattate allo stesso modo.

3.2 Campionamento di suolo e radici.

L'analisi delle comunità microbiche presenti nel suolo, nella rizosfera e nelle radici delle piante in vaso richiede come primo passaggio il campionamento delle tre componenti e di conseguenza il sacrificio della pianta oggetto di studio.

Una volta estratta la pianta dal suo contenitore si separa per scuotimento e manualmente il suolo dall'apparato radicale; questo può essere conservato come fresco a -80°C oppure può essere essiccato all'interno della stufa a 40°C per analisi successive. Il suolo essiccato viene fatto passare attraverso un setaccio per separarlo dalle componenti che fanno parte del substrato da invasatura ma che non devono essere analizzate e dai residui di radici non rimosse inizialmente. Il campione di suolo essiccato e setacciato è pronto per le successive analisi o può essere conservato a -20°C .

Una volta separato il suolo dalle radici, il terreno che resta a livello dell'apparato radicale rappresenta la rizosfera.

Per poter campionare separatamente le due componenti è necessario che queste, una volta inserite in una Falcon contenente acqua sterile, vengano poste nell'agitatore per un'ora al termine della quale le radici vengono spostate. Nella Falcon sottoposta ad agitazione è presente la rizosfera; questa è raccolta grazie al prelievo di 900 ml di liquido il quale viene inserito in una provetta e centrifugato. Dopo centrifugazione a 17000 RCF per 4' e 30" viene raccolto il sovrantante; il precipitato rappresenta la rizosfera. Si può procedere all'aggiunta di ulteriori 900 ml di liquido prelevati dalla Falcon e inseriti nella stessa provetta, ricentrifugare ed eliminare nuovamente il sovrantante; questi passaggi vanno ripetuti finché non si è campionata la quantità adeguata di rizosfera, che viene poi conservata a -20°C .

Le radici sottoposte ad agitazione e spostate in un'altra Falcon, prima del campionamento devono essere sottoposte a una fase di lavaggi successivi in modo da rimuovere la rizosfera rimanente e da lasciare solo la porzione di apparato radicale. In genere si procede con tre lavaggi con salina non sterile, un lavaggio con sapone (NaOH 2% e Tween 0,2%) e infine tre lavaggi con salina sterile al termine dei quali la radice è completamente separata dai residui di rizosfera ed è possibile prelevarne un campione per il campionamento e la conservazione a -20°C in attesa di analisi successive.

Generalmente i campioni di rizosfera e radici sono campionati in triplicato, quindi per ogni pianta vengono raccolti e conservati tre campioni di rizosfera e tre campioni di apparato radicale.

3.3 Estrazione di DNA totale da campioni di radici e suolo.

L'estrazione del DNA totale dal campione oggetto di studio avviene utilizzando diversikit a seconda del tipo di campione di partenza del quale si vuole ottenere il materiale genetico. Si parla di DNA metagenomico perché viene estratto il genoma di tutto il materiale biologico presente nel campione di partenza; questo significa che se si estrae DNA ad esempio da radici, quello che si ottiene non è solo materiale genico dell'apparato radicale ma anche dei microrganismi associati ad esso, come batteri e funghi: il metagenoma o DNA totale.

Per l'estrazione di DNA da radici si utilizza il PowerPlant® Pro DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsberg CA), mentre per l'estrazione dal suolo il PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio), kit usati per estrazione di DNA metagenomico da matrici ambientali.

Entrambi questi kit si basano sull'utilizzo di beads per rompere le pareti cellulari, nella fase iniziale, e di colonne filtranti che contengono una membrana di silice, nella fase finale.

Possiamo riconoscere tre passaggi fondamentali nel contesto di estrazione di DNA:

- La lisi della parete cellulare, sia meccanicamente, grazie alle biglie, sia attraverso la forza chimica delle soluzioni fornite nel kit e al calore;
- L'estrazione del DNA dal lisato utilizzando una soluzione capace di far rimanere in sospensione il DNA e di far precipitare sotto forma di pellet tutto il resto dopo centrifugazione;
- La purificazione del DNA grazie al passaggio del campione attraverso una membrana di silice.

La membrana trattiene il materiale genico, al fine di purificarlo, grazie all'aggiunta nel campione di una soluzione contenente un sale di legame in grado di stabilizzare il legame tra la membrana e il DNA.

Una volta terminati i vari passaggi di caricamento del campione a livello della membrana e rimosse le soluzioni che stabilizzano il legame tra materiale genetico e filtro, grazie all'aggiunta di una soluzione tampone si ottiene l'eluizione dalla colonna di DNA purificato in soluzione; questo può essere conservato a -20°C.

Per l'estrazione di DNA totale da radici tre sono i possibili protocolli da seguire; questi si differenziano in base:

- alla presenza o meno di una fase di congelamento che precede il pestellamento per la lisi parziale delle pareti e delle membrane cellulari;
- all'aggiunta o meno di PSS (Phenolic Separation Solution) che impedisce il legame tra acidi nucleici e composti fenolici;
- al momento nel quale il campione è sottoposto a calore mediante bagnetto a 65°C.

Prima di iniziare l'estrazione vera e propria i campioni vengono posti all'interno delle PowerPlant Bead Tube, provette fornite nel kit contenenti biglie per la lisi meccanica della parete cellulare; in ogni provetta vengono posti approssimativamente 50 mg di radici.

Nel primo protocollo di estrazione i campioni all'interno delle provette vengono sminuzzati meccanicamente con delle forbici prima di iniziare i passaggi di estrazione.

A questo punto si procede con l'aggiunta di due soluzioni che consentono la lisi chimica della parete cellulare e di RNase A che rimuove l'RNA presente; i campioni vengono poi posti nel bagnetto preriscaldato a 65°C per dieci minuti.

Nel secondo protocollo di estrazione le radici vengono congelate a -80°C per almeno tre ore; immediatamente dopo lo scongelamento si procede alla rottura parziale delle pareti cellulari attraverso la forza meccanica esercitata con un pestello di plastica. Terminato questo passaggio si procede con l'aggiunta di soluzioni facilitanti la lisi chimica della parete e con il bagnetto a 65°C per dieci minuti. Solo dopo il riscaldamento del campione si aggiunge l'RNase A, per evitare che a causa delle alte temperature l'enzima si denaturi e perda funzionalità.

Il terzo protocollo di estrazione prevede gli stessi passaggi del secondo con una sola differenza: l'aggiunta nel primo step di PSS.

Le differenze tra le tre metodologie di estrazione riguardano soltanto la fase iniziale al termine della quale si procede come da istruzioni presenti nel protocollo del kit.

3.4 Amplificazione PCR dei geni ribosomiali 16S e 18S.

Il materiale genico ottenuto nella fase di estrazione di DNA da matrice ambientale è definito DNA metagenomico, comprendente quindi tutto il genoma di tutto il materiale biologico contenuto nel campione di partenza. Questo significa che, attraverso la selezione di un gene variabile tra i diversi microrganismi presenti, è possibile valutare la biodiversità nel campione di partenza.

La polymerase chain reaction (PCR) è una fase indispensabile negli studi molecolari aventi come oggetto il genoma poiché consente l'amplificazione selettiva di un determinato target grazie all'utilizzo di primers specifici che si appaiano a regioni costanti del gene bersaglio; quindi, grazie alla PCR, si ottengono numerose copie del gene che si desidera amplificare (circa 2^n dove n indica il numero di cicli) e inoltre si può selezionare la regione oggetto di studio sulla base del tipo di analisi che si vuole eseguire: per lo studio delle comunità batteriche in un dato campione viene amplificato il gene ribosomiale 16S e per le comunità fungine il 18S.

La peculiarità dei geni ribosomiali risiede nel fatto che questi possono definirsi orologi molecolari: sono geni presenti in tutte le specie i quali subiscono mutazioni con tasso costante e che quindi possono fungere da metro di misura per analizzare la distanza evolutiva tra le sequenze in esame.

I geni ribosomiali contengono sequenze conservate universali ed è per questo sufficiente utilizzare una singola copia di primers universali che si vanno ad appaiare ad esse per poter amplificare in PCR tutti i geni ribosomiali (16S o 18S) contenuti nel campione malgrado questi abbiano, nella regione interna, sequenza diversa (regioni ipervariabili).

È proprio grazie all'amplificazione dello stesso gene avente però sequenza interna differente che è possibile valutare con la DGGE la biodiversità all'interno del campione.

È possibile eseguire la PCR sia utilizzando materiale tal quale sia effettuando una diluizione precedente per limitare la possibile interazione di inibitori che potrebbero inficiare la buona riuscita della reazione a catena della polimerasi. Generalmente la diluizione utilizzata è 1:10 con 5 μ L di DNA e 45 μ L di acqua, ma sono possibili anche altri ordini di diluzioni.

Al DNA, tal quale o diluito, vengono aggiunti 20 μ L di mastermix.

Il mastermix utilizzato è formato da 4 componenti:

- 5X HOT FIRE Pol (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), contenente tutti i substrati e i cofattori indispensabili per reazione di amplificazione, come Mg^{++} , deossiribonucleotidi, tampone, e l'enzima Taq polimerasi, una polimerasi termostabile che esegue la duplicazione del gene bersaglio;
- Primer Forward
- Primer reverse

- Acqua

Nel caso di PCR che precede la DGGE uno dei due primer deve contenere il GC-clamp, una coda terminale ricca di guanine e citosine che non si denatura durante la corsa; questo è indispensabile per una buona risoluzione delle bande e quindi per la riuscita della corsa nel gel a gradiente denaturante.

I primers utilizzati nell'amplificazione dei geni ribosomiali sono i seguenti:

- Per il gene 16S: 341_FGC, primer forward contenente GC-clamp, e 534_R_hplc, primer reverse;
- Per il 18S: FUN_NS, primer forward, e GC_fung, primer reverse contenente GC-clamp .

Le provette contenenti DNA e master mix sono poste nel termociclatore il quale, grazie alle variazioni termiche, permette il susseguirsi ciclico delle diverse fasi di PCR.

Nella PCR si possono distinguere tre fasi principali, ripetute in media trenta volte:

- Denaturazione: in questa fase, grazie al raggiungimento della temperatura di circa 94°C le due eliche di DNA si separano;
- Appaiamento: la temperatura di questa fase, nel quale i primers si appaiano alle regioni conservate del gene target, viene calcolata in base alle sequenze dei due primers, comunque è intorno ai 50-55°C.
- Elongazione: la temperatura è di circa 72°C, ideale per l'attività della taq polimerasi che, utilizzando come stampo le sequenze complementari e come innesco la regione di appaiamento tra primer e gene target, allunga i filamenti bersaglio.

Si ottiene in questo modo in ogni provetta una miscela del gene amplificato. Se nel campione sono presenti più tipologie dello stesso gene, quindi geni bersaglio con sequenza interna diversa, questi sono tutti amplificati.

Per valutare la riuscita della PCR è necessario far correre i campioni in elettroforesi.

L'elettroforesi si basa sul principio che le molecole di DNA, cariche negativamente per la presenza di gruppi fosfato, quando sottoposte ad un campo elettrico migrano verso il polo positivo; caricando il DNA in un setaccio molecolare, come l'agarosio, queste migreranno in base alla loro lunghezza, alla loro conformazione e al loro peso molecolare. Con setaccio molecolare si intende infatti un gel in cui la resistenza al movimento di una particella aumenta all'aumentare delle dimensioni della particella stessa. I pori del gel d'agarosio, che hanno dimensioni diverse in base alla concentrazione del gel, rallentano la corsa dei filamenti di DNA: quelli a dimensioni minori correranno di più, quelli a dimensioni maggiori correranno di meno e i frammenti con la

medesima dimensione correranno con la stessa velocità. È questo il principio alla base dell'elettroforesi.

Quando si amplificano i geni ribosomiali 16S e 18S, con lunghezza di 220 pb per il primo e di 400 pb per il secondo, la concentrazione del gel deve essere all'1,8%; questo significa che per ogni 100 ml di tampone Bionic Buffer, vanno aggiunti 1,8 g di agarosio. Al gel va aggiunto anche il colorante Syber safe (Life Technologies) il quale si lega al DNA consentendone la visualizzazione quando viene eccitato da radiazioni ultraviolette nel transilluminatore.

I campioni vengono caricati a livello dei pozzetti una volta inserito il gel all'interno della cella elettroforetica contenente lo stesso tampone con il quale è stato preparato il gel (bionic buffer). Il tampone ha la duplice funzione di conduttore di corrente elettrica e di controllo del pH durante l'elettroforesi.

Oltre a caricare i campioni e il controllo negativo è necessario caricare anche uno standard di peso molecolare (Fast Ruler Low Range, Fermentas); lo standard è una miscela di frammenti a lunghezza nota, che vanno fatti correre in elettroforesi per essere confrontati con il target amplificato in PCR. Se, dopo elettroforesi, la banda del

campione è alla giusta altezza rispetto alla banda dello standard con la lunghezza più simile a quella del gene bersaglio, allora la PCR è riuscita ed è stato amplificato il target e non un aspecifico.

Una volta caricati i campioni, il controllo negativo e lo standard, si chiude la cella elettroforetica e si applica un campo elettrico di 100 V per 14 minuti.

Terminata la corsa si posiziona il gel nel transilluminatore che rileva l'immagine.

Nel gel di agarosio i campioni corrono in base al loro peso molecolare, quindi ci si aspetta di ottenere per ogni campione caricato una sola banda.

Dall'immagine si possono dedurre molte informazioni: la presenza o meno della banda indica se l'amplificazione è avvenuta o meno, l'intensità della banda dà un'idea approssimativa sulla quantità di amplificato, il confronto tra la banda ottenuta nel campione e lo standard indica se è stato amplificato il target o un aspecifico; inoltre le caratteristiche della linea del controllo negativo danno indicazioni sulla contaminazione:

un controllo pulito indica assenza di contaminazione mentre la presenza di bande nel controllo indica una possibile contaminazione.

3.5 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

L'elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE) è una tecnica di biologia molecolare usata per separare segmenti di dsDNA in base alla loro sequenza nucleotidica, particolare che permette di discriminare frammenti aventi stessa lunghezza ma diversa composizione in termini di basi. La dimensione dei frammenti che è possibile discriminare varia da 200 a 700 pb. Il gel della DGGE è un gel di poliacrilamide preparato con un gradiente crescente formato da una miscela di urea e formamide in grado appunto di denaturare le molecole di dsDNA, di rompere quindi i legami a idrogeno tra le basi azotate. In base alla composizione nucleotidica del frammento di DNA la denaturazione sarà completata in un punto differente del gel e il polinucleotide resterà intrappolato nelle maglie di questo in una regione diversa, corrispondente al gradiente denaturante adatto per scindere tutti i legami a idrogeno presenti tra le basi.

Una sola regione del frammento resta a doppia elica: quella che si forma grazie al GCclamp di uno dei primer utilizzato nella PCR che precede la DGGE; questo particolare primer utilizzato in DGGE possiede una coda di GC terminale, il G-C clamp, che serve da stampo in PCR per la formazione di una regione a doppia elica ricca di GC; va ricordato che i legami a idrogeno tra guanina e citosina sono tre e che quindi una regione ricca di GC è più difficile da denaturare e resta a doppia elica durante la corsa su gel a gradiente denaturante rendendo possibile una buona risoluzione delle bande. Quello che si può osservare al termine della corsa in un gel di DGGE nel caso di analisi di DNA metagenomico di origine batterica o fungina, sono dei profili molecolari, che possono definirsi fingerprints, i quali vanno a evidenziare la biodiversità del gene oggetto di studio presente nel campione di partenza, in base alla quantità di bande diverse riscontrate, ed anche, seppur in modo approssimativo, la quantità di DNA per ogni banda di ogni lane, in base all'intensità della banda.

Il gel per la DGGE è formato da due regioni a diversa composizione: il running gel e lo stacking gel; il primo è il vero e proprio gel a gradiente denaturante nel quale avviene la separazione dei frammenti in base alla sequenza nucleotidica, il secondo, colato successivamente e quindi situato nella parte apicale, è la regione dove vengono inseriti i pozzetti e dove quindi vengono caricati i campioni. La funzione dello stacking è quella di far in modo che i campioni inizino la corsa tutti nello stesso punto: nell'interfaccia tra stacking e running.

Il running gel si forma a partire da due diverse soluzioni preparate separatamente: una soluzione definita Hi e una soluzione definita Low.

Le concentrazioni delle due soluzioni sono differenti in base al gene che si intende analizzare: per il 16S la low deve avere una concentrazione finale di acrilamide del 40%, la Hi del 60%, mentre per il 18S la low deve avere una

concentrazione finale del 20% e la Hi del 35%. Questo significa che il gradiente denaturante del gel va da un massimo di 60% ad un minimo di 40% nel caso del 16S e da un massimo di 35% a un minimo di 20% nel gel 18S.

Le soluzioni di partenza sono due: una al 60% e una allo 0%.

La polimerizzazione dell'acrilamide avviene solo in presenza di TEMED e ammonio persolfato (APS): il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione di un radicale libero SO_4^{--} ; durante la polimerizzazione il radicale libero, che ha un elettrone spaiato, reagisce con il monomero di acrilamide e forma un legame singolo condividendo il suo elettrone spaiato con uno proveniente dal guscio esterno della molecola del monomero. In questo modo l'acrilamide legata al radicale possiede un elettrone spaiato e va a polimerizzare con un altro monomero di acrilamide; la reazione procede portando alla formazione della poliacrilamide, in tempi rapidi. Dunque TEMED e APS devono essere aggiunti alle due soluzioni.

Il gradiente denaturante si forma all'interno del gradient former nel quale vengono versate le due soluzioni; questo è collegato a una pompa peristaltica che possiede un tubo d'uscita al termine del quale è presente un ago inserito nella fessura dei due vetri dove viene colato il gel.

Al termine della polimerizzazione del running, che dura tre ore, si cola con un pipettatore lo stacking gel composto da una soluzione al 10% di acrilamide in TAE allo 0,5X alla quale vengono aggiunti APS e TEMED come catalizzatori della reazione di polimerizzazione.

Una volta avvenuta la polimerizzazione dello stacking gel, passaggio che richiede 30 minuti, viene rimosso il pettine e viene inserita la cassetta nel tank contenente TAE 0,5X, un tampone preriscaldato a 60°C, si applica un voltaggio basso (Low voltage) e si caricano i campioni utilizzando una siringa Hamilton.

Terminato il caricamento il tank viene chiuso e si applica l'Hi voltage che nella corsa di DGGE è di 100V.

La corsa ha una durata di circa 16 ore, al termine delle quali si procede con la colorazione del gel ricoprendolo completamente di una soluzione composta da TAE 0,5X e colorante syber gold 1X (DITTA).

Dopo la colorazione si dispone il gel nel transilluminatore e si procede con la foto.

L'immagine ottenuta, se la corsa è avvenuta correttamente, mostra per ogni lane (corsia) una serie di bande che rispecchiano le posizioni nelle quali i frammenti dsDNA sono denaturati, e quindi hanno interrotto la migrazione, grazie ai gradienti denaturanti.

Già dalla semplice osservazione della foto ottenuta si possono ricavare delle informazioni preliminari: la biodiversità all'interno del campione secondo il numero di bande ottenute nella stessa lane, la quantità approssimativa di frammenti diversi per ogni banda in base all'intensità di fluorescenza, la

biodiversità esistente tra i diversi campioni delle diverse line in base alle bande diverse tra le diverse corsie.

Per un'analisi più dettagliata e rigorosa dei risultati si possono utilizzare diversi software, come Quantity One con il quale è possibile andare a valutare in termini matematici la similarità dei profili appartenenti a differenti campioni.

Il primo passaggio consiste nel confronto parallelo delle lanes discriminando le bande che hanno compiuto la stessa migrazione da quelle che invece hanno interrotto il loro percorso ad altezze diverse. Una volta terminata la selezione delle bande il programma calcola automaticamente un albero, dendrogramma, che rispecchia non la distanza evolutiva ma la similarità (o la distanza) in termini di biodiversità all'interno del campione: più i profili delle bande di due diverse line saranno simili, minore sarà la distanza calcolata, più i profili saranno differenti, maggiore sarà la distanza.

3.6 PCR quantitativa (qPCR).

La PCR quantitativa, o Real Time PCR, è una tecnica di PCR che consente l'amplificazione selettiva del gene target e la sua contemporanea quantificazione. Le fasi della Real Time sono sostanzialmente le stesse di una PCR classica: denaturazione, appaiamento ed elongazione, con la differenza che, ad ogni ciclo, viene rilevata la quantità di amplificato.

La rilevazione della concentrazione del gene bersaglio avviene grazie all'aggiunta di reagenti fluorescenti nel mix di reazione; questi vanno a legarsi al DNA emettendo una fluorescenza proporzionale alla quantità di target presente nel campione ad ogni ciclo.

Ad ogni ciclo di PCR la concentrazione del gene bersaglio raddoppia, di conseguenza la curva fornita dallo strumento che permette amplificazione e rilevazione di fluorescenza sarà una sigmoide. La forma della curva è dovuta anche al fatto che inizialmente il target è in quantità minima.

L'operatore deve impostare un valore soglia sotto il quale la fluorescenza è considerata come rumore di fondo (background) e non derivante dall'amplificazione selettiva del bersaglio.

Con ciclo soglia (Ct) si indica il ciclo al quale la fluorescenza supera la threshold ed è proporzionale alla quantità di target presente nel campione di partenza prima che questo sia sottoposto a PCR: maggiore è la quantità di DNA iniziale, minore sarà il numero di cicli necessari affinché la fluorescenza superi il valore soglia e sia rilevata, al contrario, minore è la quantità di DNA iniziale, maggiore sarà il valore del Ct.

Per andare a quantificare il target presente nel campione iniziale esistono due metodologie: la quantificazione assoluta e la quantificazione relativa. Nel primo caso la quantità di target nel campione si misura interpolando la sigmoide ottenuta con una curva "standard" ottenuta dai Ct rilevati da diluizioni seriali di un campione a concentrazione nota. Nel secondo caso si confrontano i Ct ottenuti con quelli di un gene housekeeping di riferimento.

- FastStart Essential (Roche), contenente tutte le componenti necessarie per la reazione di polimerizzazione, come deossiribonucleotidi, Mg⁺⁺, tampone e taq polimerasi, oltre che il Sybr green, agente intercalante che permette la quantificazione del target grazie all'emissione di fluorescenza;
- Primer Forward;
- Primer reverse;
- Acqua.

Il colorante utilizzato per andare a rilevare la quantità di gene bersaglio amplificato è il sybr green, un agente intercalante il quale aumenta la sua fluorescenza quando si intercala nel solco maggiore del DNA.

Di conseguenza maggiore è la quantità di fluorescenza rilevata, maggiore sarà la quantità di target amplificato.

A causa del fatto che il sybr green non è specifico per una determinata sequenza target, ma si lega indiscriminatamente al DNA a doppia elica, lo strumento che rileva la quantità di bersaglio esegue anche la rilevazione di quella che è definita curva di dissociazione, che permette di capire, grazie alla conoscenza preliminare della T_m (temperatura di melting) del target, se è stato amplificato il gene oggetto di studio o un aspecifico.

4. RISULTATI

4.1 Validazione delle metodiche molecolari per lo studio della microflora nelle radici.

Lo studio delle comunità batteriche endosimbionti dell'apparato radicale, utilizzato per indagare le variazioni della microflora quando la pianta è invasata con substrati contenenti diverse concentrazioni di compost "Big Bag" derivante dagli scarti dei frantoi oleari, richiede come passaggio preliminare l'individuazione del miglior protocollo per l'estrazione di materiale genetico da radici. L'estrazione del DNA metagenomico è infatti un passaggio cruciale per le successive analisi molecolari, poiché è indispensabile preservare la biodiversità microbica presente nel campione di origine. La maggior parte del materiale genico è infatti di origine vegetale, di conseguenza risulta fondamentale utilizzare un protocollo di estrazione che consenta la purificazione della maggior parte di materiale batterico e fungino presente nell'apparato radicale, così da poter valutare con esattezza la biodiversità nei campioni sottoposti alle diverse tesi.

I protocolli valutati al fine di ricerca del miglior metodo di estrazione di DNA totale da radici sono tre, i quali differiscono sostanzialmente nelle fasi iniziali dell'estrazione.

Le divergenze riguardano tre punti principali:

- Presenza o assenza di una fase di congelamento a -80°C e successiva lisi meccanica delle membrane e delle pareti cellulari mediante pestello, con aumentata liberazione di microrganismi endofiti della radice.
- Aggiunta o meno di PSS (Phenolic Separation Solution), soluzione in grado di legare i fenoli impedendo che questi leghino il materiale genico e quindi usata per contrastare la possibile perdita di biodiversità.
- Aggiunta di RNase A precedentemente o successivamente al riscaldamento del campione mediante bagnetto a 65°C .

Nel primo protocollo la fase di congelamento è assente e il campione viene semplicemente frammentato attraverso l'utilizzo di forbici, non vi è aggiunta di PSS e l'RNase A viene inserita nella provetta contenente il campione prima del riscaldamento dello stesso.

Il secondo protocollo prevede invece una fase di congelamento a -80°C immediatamente seguita dalla parziale lisi meccanica del campione grazie all'utilizzo di un pestello manuale. Inoltre l'RNase A viene aggiunta successivamente al riscaldamento del campione per evitare che questa, essendo un enzima, si denaturi e perda funzionalità.

Il terzo protocollo, come il secondo, prevede congelamento, pestellamento e aggiunta di RNase A in tempi successivi al bagnetto a 65°C , con la sola differenza che in questo

caso vi è anche l'aggiunta, all'inizio dell'estrazione, di PSS.

Per andare a valutare l'efficienza delle tre metodologie di estrazione sono state utilizzate tre replicate, quindi tre campioni prelevati dalla stessa pianta, di radici della pianta invasata *Photinia fraseri*; ognuna delle replicate è stata sottoposta a tutti e tre i protocolli.

L'analisi molecolare che permette di valutare quale delle metodologie consenta di preservare con maggior efficienza la biodiversità della microflora è l'elettroforesi in gel su gradiente denaturate, effettuata sia per valutare la validità dei protocolli per quanto concerne l'estrazione di DNA batterico, quindi attraverso una DGGE nella quale vengono fatti correre amplificati del gene ribosomiale 16S, sia per quanto riguarda l'estrazione di DNA fungino, con una DGGE eseguita su campioni di amplificato del gene ribosomiale 18S. Andando ad analizzare le immagini ottenute dalle DGGE si può notare che tutti i profili ottenuti sono ricchi di bande, il che rispecchia un'elevata biodiversità microbica nel campione analizzato. In ogni caso appare chiaro come il miglior risultato in termini di mantenimento della biodiversità si ottiene con terzo protocollo. Questo si osserva soprattutto con la comparazione nel dettaglio delle corsie riguardanti l'estrazione del primo campione delle tre replicate in tutti e tutti e tre i protocolli: con la semplice osservazione si può notare che il campione etichettato Ra_7, quindi la replicata alfa estratta con il terzo metodo, presenta un numero di bande maggiori in confronto allo stesso campione il cui materiale genico è stato estratto con i protocolli uno e due.

Nell'analisi della foto ottenuta dal gel di DGGE nel quale sono stati fatti correre campioni di amplificato del gene 18S, con il fine di valutare la variabilità della componente fungina attraverso l'utilizzo dei tre protocolli, ancora una volta il miglior profilo si ottiene dal campione estratto con il terzo metodo, malgrado le differenze siano minori rispetto a quelle osservate per l'analisi dei batteri e i profili delle tre replicate non si discostino di molto. Sebbene le differenze non siano così evidenti in tutte le replicate si è preferito scegliere il terzo protocollo al fine di evitare perdita di biodiversità nell'estrazione di DNA totale dai successivi campioni di radici.

Un punto fondamentale nella scelta del miglior protocollo di estrazione riguarda non solo il mantenimento della biodiversità presente nel campione d'origine, ma anche la riproducibilità dei profili: replicate della stessa pianta, se sottoposte allo stesso protocollo, dovrebbero dare un profilo se non uguale almeno molto simile in DGGE.

Questo punto è indispensabile per evitare che la presunta biodiversità presente in campioni diversi non dipenda dal metodo di estrazione, ma soltanto dalle differenze di composizione in termini di microflora del campione iniziale.

È importante sottolineare che comunque le differenze tra profili di replicate non necessariamente dipendono dal metodo di estrazione, ma potrebbero essere dovute alla fase di campionamento. Le replicate vengono infatti

prelevate dalla stessa pianta, ma in regioni diverse dell'apparato radicale; è quindi possibile che campionando porzioni diverse in queste vi sia la presenza di una microflora non omogenea, e di conseguenza quello che si ottiene in DGGE sono profili differenti almeno in parte tra loro.

Nell'analisi del gene rRNA 18S, relativo alla comunità fungina, si nota una bassa riproducibilità dei profili tra campioni estratti con lo stesso protocollo ma una grande somiglianza tra stesse replicate estratte con metodi diversi. Questo potrebbe andare ad avvalorare l'ipotesi che le differenze che si riscontrano tra replicate diverse, nel caso del 18S, siano dovute alla modalità di campionamento, e con questo si potrebbe spiegare la disomogeneità tra campioni prelevati dalla stessa pianta e sottoposti allo stesso protocollo di estrazione e l'enorme somiglianza esistente tra le stesse replicate estratte con protocolli differenti. Per ovviare a questo possibile problema legato al campionamento, nelle analisi che seguono è stata fatta particolare attenzione alla fase di omogeneizzazione del pool di campioni da piante diverse della stessa varietà così da migliorare la riproducibilità dei profili DGGE.

Per quanto riguarda la variabilità dei profili delle comunità batteriche tra replicate della stessa pianta e di piante diverse della stessa varietà è stata eseguita un'analisi DGGE del gene ribosomiale 16S su campioni estratti da *Osmantus burkwoodii*.

Dall'immagine dei tre gruppi di tre replicate campionate dalle tre piante di *Osmantus burkwoodii* si può notare che i profili di campioni prelevati dalla stessa pianta sono molto simili tra loro, il che è probabile indice di riproducibilità dei profili del gene 16S quando si utilizza il terzo protocollo di estrazione. Inoltre andando a confrontare le replicate di piante diverse tra loro si può notare che anche la variabilità all'interno della stessa varietà è molto bassa, i profili sono infatti molto simili.

Una caratteristica interessante dei gel che mostrano profili molecolari ottenuti dalla corsa in DGGE di amplificati del gene ribosomiale 16S derivante da estratti di materiale genico radicale, è la presenza in ogni corsia, indipendentemente dal protocollo usato, di due bande ravvicinate più evidenti delle altre. Questa peculiarità nei profili dei campioni è stata riscontrata in tutte le DGGE con amplificati del gene 16S estratti da radici.

L'ipotesi fatta è che queste bande marcate rappresentino il gene ribosomiale 16S dei coloroplasti; questo spiegherebbe sia l'ubiquità che l'intensità di fluorescenza emessa, maggiore rispetto alle altre bande ma naturale dato che il materiale genico più abbondante è quello derivante dalla radice stessa.

La determinazione della validità dei protocolli di estrazione è stata eseguita non solo con il fine di ottimizzare i parametri di mantenimento della biodiversità e di riproducibilità dei profili, ma anche di ricercare la metodologia in grado di dare la resa migliore in termini di quantità di materiale genetico estratto.

La quantificazione di gene bersaglio estratto con i diversi protocolli è stata fatta eseguendo una PCR quantitativa avente come target il gene ribosomiale 16S. Dai dati statistici ottenuti eseguendo la Real Time PCR sui nove campioni si può osservare che non vi sono differenze significative tra i cicli soglia ottenuti con i diversi protocolli e questo significa che la quantità di DNA estratta è molto simile. Si può comunque notare che il Ct medio minore, se si considerano tutti i valori dei cicli soglia per ogni singolo protocollo, si ottiene con il terzo metodo di estrazione (14,4166), mentre il maggiore con il primo(15,945).

Di conseguenza, malgrado la differenza sia statisticamente poco rilevante, il terzo protocollo anche da un punto di vista di quantità di materiale genico estratto, sembra essere la scelta migliore per eseguire l'estrazione di DNA totale da radici.

4.2 Effetti del compost “Big Bag” sulla biodiversità microbica del suolo e delle radici.

Uno degli attuali problemi delle aziende florovivaistiche è la ricerca di un componente da invasatura in grado di sostituire adeguatamente la torba, attualmente utilizzata, che ha lo svantaggio di essere un prodotto non rinnovabile e con costi sempre più elevati.

Il progetto di ricerca PIF-SANSOIL nel quale si inserisce questo lavoro di tesi, ha lo scopo di andare a valutare la possibilità di utilizzare il compost Big Bag preparato a partire da scarti compostati dei frantoi oleari, nella caso specifico le sanse, come substrato da invasatura sostitutivo. Tra i diversi effetti che i prodotti utilizzati nell'invasatura hanno sulle piante, vi è anche quello di influenza diretta e indiretta sulla popolazione microbica di suolo, rizosfera e radici. Partendo da questo presupposto è indispensabile andare a valutare quali sono i possibili effetti che il compost Big Bag ha sulla microflora, tenendo in considerazione il fatto che variazioni nella popolazione possono rispecchiarsi in variazioni sulla crescita e la salute della pianta. I substrati utilizzati sono composti da diverse combinazioni del compost B.B con la torba. Queste combinazioni dei due componenti rappresentano le varie tesi oggetto di studio:

- TC: Testimone aziendale solo con torba - concimato
- BB_33_C: Torba sostituita al 33% con compost “Big Bag” - concimato
- BB_66_C: Torba sostituita al 66% con compost “Big Bag” - concimato
- BB_100_C: Torba sostituita al 100% con compost “Big Bag” - concimato
- TNC: Testimone aziendale solo con torba – non concimato
- BB_33_NC: Torba sostituita al 33% con compost “Big Bag”- non concimato;
- BB_66_NC: Torba sostituita al 66% con compost “Big Bag”- non concimato;
- BB_100_NC: Torba sostituita al 100% con compost “Big Bag”- non concimato;

L'importanza di valutare differenti tesi, ognuna contenente una concentrazione caratteristica del compost oggetto di studio, risiede nel fatto che oltre a cercare di individuare l'adeguatezza o meno degli scarti oleari come substrati da invasatura e gli effetti che questi hanno sulla popolazione microbica, si deve anche ricercare la concentrazione migliore alla quale questi apportano alla pianta i maggiori benefici.

Gli effetti che le differenti tesi hanno sulla popolazione microbica di suolo e radici sono stati valutati attraverso l'elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE). La tecnica consente, grazie all'utilizzo di un gel a gradiente denaturante, di separare frammenti di DNA aventi la stessa lunghezza ma diversa composizione in termini di basi. Questo significa che i geni ribosomiali 16S e 18S, con sequenza intera diversa nei differenti

micorganismi, completano la denaturazione in regioni diverse del gel. Di conseguenza attraverso lo studio del gel e delle bande differenti che si riscontrano nelle diverse lane, si può valutare la biodiversità all'interno dei singoli campioni e le discrepanze da un punto di vista di popolazioni microbiche tra campioni diversi al fine di valutare gli effetti che le varie concentrazioni di compost Big Bag hanno sulla microflora.

4.2.1 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità batterica del suolo.

L'analisi delle variazioni nella popolazione batterica nei campioni di suolo prelevati dalle piante di *Cupressus sempervirens* "pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* sottoposti alle varie tesi è stata svolta andando ad analizzare i gel di DGGE nei quali sono stati fatti correre gli amplificati del gene ribosomiale 16S preparati a partire da estratti delle tre piante sottoposte alle varie tesi sperimentali. Ogni corsia rappresenta la comunità batterica presente nel campione trattato e/o controllo.

La presenza di numerose bande in tutte le corsie dei gel è indice di elevata biodiversità in tutti i campioni, sia nei controlli, concimato e non concimato, sia nelle lanes corrispondenti ai campioni testati con le differenti concentrazioni di compost; questo lascia intendere che l'effetto generale dell'utilizzo del compost Big Bag sulla biodiversità microbica non è un effetto negativo.

Nelle immagini dei gel di DGGE delle piante *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* si possono notare variazioni nei profili ma non calo della biodiversità. Questo indica che la matrice che viene utilizzata, modifica la popolazione microbica, ma non va a diminuire il numero di specie presenti, anche se queste almeno in parte cambiano proprio in relazione alle variazioni del substrato da invasatura.

Dal dendrogramma ottenuto a partire dalla comparazione dei profili, si possono ricavare le stesse considerazioni: le matrici usate, quindi le tesi nelle quali la torba è sostituita da quantità crescenti di compost Big Bag, vanno ad influire sulla popolazione microbica, modificandola; questo si evince dal fatto che sia il dendrogramma di *Viburnum lucidum* che quello di *Prunus laurocerasus* mostrano i controlli concimato (TC) e non concimato (TNC) formare un cluster a parte, così come le tesi 33_C e 33_NC, quelle contenenti le quantità minori di Big Bag.

Lo stesso dato si può ricavare dalle matrici di similarità di *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus*, calcolate in base alla comparazione delle bande presenti nelle diverse lanes dei gel; la percentuale di similarità tra i controlli, TC e TNC, è infatti del 63% per *Viburnum* e del 52.6% per *Prunus*, mentre tra le tesi 33_C e 33_NC è del 59.7% per *Viburnum* e del 67.4% per *Prunus*.

Inoltre la similarità è maggiore proprio tra le tesi 33_C, 33_NC e i rispettivi controlli, mentre diminuisce tra questi quattro campioni e tutti gli altri nei quali è presente una quantità maggiore di compost.

Ad esempio, dalle matrici si ricava che la similarità tra il TC e il 100_C è solo del 15.2% in Viburnum e del 26.8% in Prunus, mentre tra il TNC e il 100_NC è del 17.7% e del 14.3% rispettivamente.

Di conseguenza, almeno per queste piante, si può dedurre che ci sia una relazione tra quantità di compost utilizzato nelle varie tesi e modificazioni della popolazione batterica, mentre sembra essere poco influente la preventiva concimazione.

Per quanto riguarda *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis" si può riscontrare ugualmente una similarità dei profili tra i controlli TC e TNC anche se con un valore percentuale inferiore rispetto alle altre due specie vegetali: 38.9%.

Inoltre, la similarità tra il TC ed i suoi relativi trattamenti è sempre sotto il 40%, mentre tra il TNC e le sue tesi si abbassa in relazione alla concentrazione di compost: 43.4 % di similarità con la tesi 33_NC, 32.1 % con la tesi 66_NC e 30% con la 100_NC.

Si può quindi dedurre che anche nel caso di *Cupressus* l'utilizzo del compost porti a evidenti modificazioni della popolazione batterica, con comparsa di nuove bande in DGGE e in alcuni casi anche con aumento dell'intensità delle bande già presenti nel controllo.

Il dato generale che si può ricavare è l'effetto stimolante del compost sulla popolazione batterica che varia, anche arricchendosi, quando il Big Bag viene utilizzato come substrato da invasatura.

4.2.2 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità fungina del suolo.

I gel che mostrano la corsa di campioni nei quali è stato amplificato il gene ribosomiale 18S per la valutazione della popolazione fungina in campioni di suolo prelevati da piante in vaso di *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus*, rivelano che l'utilizzo del compost Big Bag non apporta modifiche negative per quanto riguarda i funghi, non vi è dunque calo della biodiversità.

Andando ad osservare nel dettaglio la foto di *Cupressus* si può notare un effetto positivo, con incremento della popolazione microbica e della biodiversità, soprattutto per quanto riguarda i trattamenti privi di concimazione minerale (NC). Il testimone aziendale non concimato presenta, infatti, un numero limitato di bande, mentre i rispettivi campioni trattati, indipendentemente dalla concentrazione del compost, mostrano un evidente aumento di biodiversità, corrispondente alla comparsa di nuove bande, e un incremento dell'intensità delle bande già presenti del TNC. Ciò dimostra

come vi sia un apporto di popolazioni esogene provenienti dal compost e, allo stesso tempo, una stimolazione di quelle autoctone.

Questo effetto è meno evidente nei campioni concimati sottoposti alle varie tesi, anche se un aumento della biodiversità si può osservare soprattutto nei campioni 66_C e 100_C.

Dal dendrogramma di *Cupressus* che mostra la similarità tra i differenti profili, si può giungere alle stesse conclusioni: i controlli, sia concimato che non concimato, hanno un grado di similarità basso con gli altri campioni, in particolar modo il testimone non concimato il quale mostra una differenza molto marcata con gli altri profili.

Dalla matrice di similarità calcolata dall'analisi del gel di *Cupressus*, la differenza tra il TNC e i campioni non concimati sottoposti alle differenti tesi è ancora più evidente: 22.5% di similarità con il 33_NC e solo 7.8% e 10.1% con il 66_NC e il 100_NC.

I differenti campioni sottoposti alle diverse tesi sono invece più simili tra loro, indipendentemente dalla concentrazione di compost alla quale sono stati sottoposti, soprattutto per quanto riguarda i non concimati, mentre nei campioni concimati sottoposti alle diverse tesi vi è una similarità maggiore tra 66_C e 100_C (56.4%) piuttosto che tra questi e il 33_C. Di conseguenza, almeno in parte, l'effetto potrebbe essere dose-dipendente.

Lo stesso discorso fatto nell'analisi degli effetti delle tesi su *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis" può essere applicato a *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus*. Anche in queste piante i trattamenti hanno come effetto un aumento della biodiversità e non un impoverimento della popolazione fungina, riscontrabile nei dendrogrammi come similarità dei controlli tra loro maggiore che tra controlli e campioni testati con i compost

Dalle matrici di *Viburnum* e *Prunus* si ottengono percentuali di similarità tra i controlli del 44.5% in *Viburnum* e del 34.6% in *Prunus*, dati più alti che tra i controlli e i rispettivi campioni sottoposti alle diverse tesi.

Anche in *Viburnum*, come in *Cupressus*, le variazioni più evidenti nei profili di DGGE si osservano tra il TNC e i campioni non concimati trattati con le differenti concentrazioni di compost; i dati che si ricavano dalla matrice indicano infatti una similarità del 17.3% tra il profilo del TNC e quello del 66_NC, e del 14.8% tra TNC e 100_NC.

Per quanto riguarda *Prunus* queste percentuali sono lievemente maggiori, fermo restando le basse percentuali di similarità tra il controllo non concimato (TNC) e i rispettivi campioni sottoposti alle differenti tesi: 15.9 % con il 33_NC, 28.6% con il 66_NC e 25.7% con il 100_NC.

Dall'analisi della comunità fungina si evince come in tutte e tre le varietà, i trattamenti arricchiscano la comunità autoctona.

4.2.3 Effetti del compost “Big Bag” sulla biodiversità batterica delle radici.

L'indagine della biodiversità microbica a livello dei Batteri che abitano le radici permette di comprendere se vi sono degli effetti da parte del compost Big Bag che possono essere mediati dagli endofiti e se questi possono influire sulla salute della pianta.

L'analisi delle dinamiche batteriche nelle varietà di *Cupressus sempervirens* “pyramidalis”, *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* attraverso la tecnica della DGGE ha prodotto dei fingerprints di comunità differenti da quelli ottenuti dall'analisi della microflora batterica del suolo.

Le immagini riguardanti le tre varietà trattate con le tesi oggetto di studio (Fig. 20, 21 22), mostrano in generale dei profili molto ricchi benché la biodiversità, a parità di trattamento, risulti inferiore a quella fornita dai campioni di suolo. Questo dato è comprensibile poiché l'ecosistema del suolo è certamente molto più aperto rispetto all'ambiente radicale il quale, di per sé, rappresenta una barriera fisica per i batteri del suolo che vengono, quindi, selezionati, diventando simbionti della pianta.

Un'altra caratteristica in comune tra i profili di comunità appartenenti alle 3 varietà è costituita dalla presenza di almeno 2-3 bande ubiquitarie che non dipendono dai trattamenti. Si tratta probabilmente di popolazioni residenti che naturalmente si trovano all'interno delle radici e che non vengono dunque apportate con l'aggiunta del compost.

In particolare, si può osservare una banda con intensità superiore rispetto alle altre, la quale molto probabilmente fa riferimento al gene 16S dei cloroplasti, refuso della fase di amplificazione del DNA, nella quale i primers specifici per le porzioni costanti del gene target possono allinearsi anche con i geni 16S presenti all'interno degli organelli delle cellule vegetali della radice (Aires et al. 2012, Hanshew et al. 2013).

Dall'analisi della biodiversità batterica che abita le radici delle 3 varietà trattate con le diverse percentuali di compost Big Bag, si possono osservare variazioni nei profili ma non calo della biodiversità. Inoltre è possibile ottenere un dato numerico della similarità attraverso la costruzione di matrici che consentono un confronto uno a uno di tutti i campioni.

L'immagine del gel DGGE ma soprattutto il dendrogramma di similarità relativo all'analisi DGGE di *Cupressus sempervirens* “Pyramidalis”, mostra un basso valore di similarità di circa il 42% tra il controllo con concimazione minerale da un lato, ed i trattamenti e il controllo non concimato dall'altro. Inoltre si osserva anche un effetto dell'aggiunta del compost poiché i profili relativi ai trattamenti formano un cluster a parte, in particolare le tesi in cui la torba viene sostituita al 100% dal compost Big Bag.

La foto DGGE relative a *Viburnum lucidum* mostra anch'essa dei profili molto ricchi, tuttavia è possibile osservare dei valori di similarità più elevati tra i controlli, concimato e non, e le rispettive tesi, infatti il range di valori ottenuti

vanno da un minimo di 63,1% ad un massimo dell'83,4% per le tesi con presenza di concime minerale, e un range tra il 64,8% e il 75,3% per i campioni derivanti da piante trattate senza concime minerale.

Dal dendrogramma è possibile comprendere come l'aggiunta di compost abbia provocato un cambiamento della struttura della comunità, infatti il range di valori di similarità che si possono estrapolare dalla matrice (figura 23) va da 46,8% a 63,6% per le tesi con presenza di concime minerale ed un range di 44,8% a 66,4% per quelle senza concime minerale.

L'aggiunta di compost Big Bag sembra avere influito sulla microflora batterica delle radici, questo è particolarmente evidente per *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis" e per *Prunus laurocerasus*.

4.2.4 Effetti del compost "Big Bag" sulla biodiversità fungina delle radici.

L'indagine della struttura della comunità fungina delle radici delle 3 varietà *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* attraverso l'analisi DGGE mostra dei profili di comunità differenti da quelli relativi ai Batteri.

Anzitutto, i profili sono più semplici, con un numero di bande inferiore e dunque una biodiversità inferiore.

L'analisi DGGE relativa a *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis" mostra dei profili molto differenti l'uno dall'altro evidenziando il fatto che l'aggiunta di compost Big Bag ha influito sulla struttura della comunità fungina, in particolare quando esso sostituisce la torba al 100%.

Le matrici di similarità ottenute dall'analisi dell'immagine della DGGE mostrano un dato numerico che conferma l'osservazione precedente, infatti essa mostra dei valori di similarità estremamente bassi tra i campioni controllo ed i rispettivi trattamenti (min. 18,5% ad un max. di 50,4% per le tesi con concime minerale e 17,9%- 54,1% per le tesi prive di concime).

Per quanto riguarda l'indagine della biodiversità fungina in *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus*, è possibile affermare che tale effetto riscontrato per *Cupressus*, è ancora più evidente.

Infatti i valori di similarità fra profili scendono in maniera significativa quando il controllo privo di concime viene confrontato con la tesi 33C, mostrando un valore di similarità inferiore al 10%.

Inoltre, l'effetto dell'aggiunta del compost è accentuato anche in *Prunus*, la cui matrice mostra che la struttura della comunità fungina viene totalmente sovvertita quando il compost sostituisce completamente la torba nelle piante a cui non è stato aggiunto concime minerale.

L'effetto dell'aggiunta di compost come substrato da invasatura in sostituzione totale o parziale della torba sulla comunità fungina delle radici è

molto evidente e in misura maggiore rispetto all'effetto riscontrabile sulla comunità batterica.

4.3 Effetti del compost "Big Bag" sull'abbondanza batterica del suolo e delle radici.

L'analisi della microflora batterica è stata completata attraverso lo studio degli effetti dell'aggiunta di compost Big Bag alle 3 varietà di pianta sull'abbondanza dei Batteri presenti sia nel suolo che nelle radici.

L'analisi Real-Time qPCR ha messo in evidenza che non vi sono degli effetti evidenti sulla abbondanza totale del numero dei Batteri.

In particolare i grafici in figura mostrano dei valori che si aggirano attorno a 10^{11} e 10^{10} cellule/g campione di partenza per i Batteri del suolo e delle radici rispettivamente, relativi a tutte le varietà analizzate, non mostrando alcuna differenza significativa tra i diversi trattamenti.

Quindi l'aggiunta di compost sembra avere stimolato determinate popolazioni batteriche, come evidenziato dall'analisi della biodiversità, ma questo non ha influito sul numero dei Batteri totali, probabilmente perché le popolazioni positivamente selezionate sono state favorite a discapito di altre.

5. SINTESI DEI RISULTATI

In questa pubblicazione è stato analizzato e valutato l'effetto dell'aggiunta di compost ottenuto da scarti della lavorazione delle olive sulla microflora del suolo e delle radici di differenti varietà di pianta allevate in vivaio. E', infatti, ormai generalmente accettato che l'impiego di matrici alternative alla torba può considerarsi un'ottima strategia, sia in termini economici che ecologici, per l'allevamento di piante nell'industria florovivaistica. In particolare, gli scarti dell'industria olearia possono rappresentare candidati ideali a questo scopo in quanto possono essere trasformati in compost di qualità grazie a processi di trasformazione aerobici (Abad et al. 2001, Altieri et al. 2009, Altieri et al. 2010, Federici et al. 2011).

In questo lavoro per indagare la biodiversità microbica è stato utilizzato un approccio coltura-indipendente, basato su metodiche molecolari di analisi del DNA metagenomico estratto da campioni ambientali. La prima parte dello studio è stata, infatti, dedicata alla messa a punto del metodo di estrazione del DNA totale dalle radici. Questo passaggio è infatti alla base di tutte le analisi molecolari successive e differisce dall'estrazione di DNA da suolo poiché nelle radici il materiale genico predominante è quello della pianta. Risultava quindi indispensabile la messa a punto di un metodo in grado di consentire l'estrazione del genoma appartenente alla microflora endosimbionte dell'apparato radicale. In base ai criteri scelti per la validazione del metodo ovvero la capacità di dare i profili più ricchi in DGGE e quantità di materiale genico estratto, è stato scelto un solo protocollo che potesse garantire buone rese in termini sia di biodiversità che di abbondanza dei geni target. In particolare, il terzo protocollo consentiva uno studio più realistico della biodiversità microbica presente nel campione perciò è stato scelto per la seconda parte di questo lavoro.

Nella seconda parte sono state indagate le comunità microbiche nel suolo e nelle radici delle piante *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus*, invase con otto differenti tesi, che si distinguono in base alla presenza o meno di concimazione e alle quantità di compost "Big Bag" utilizzato in sostituzione alla torba.

Dall'analisi dei profili molecolari dei geni rRNA 16S e 18S ottenuti in DGGE da campioni di suolo e delle radici è possibile affermare che le comunità batterica e fungina rispettivamente, venivano modificate dall'aggiunta del compost apportando un aumento della biodiversità. In particolare, le popolazioni fungine del suolo e delle radici venivano profondamente modificate mostrando strutture di comunità estremamente differenti da quelle presenti nelle piante allevate con substrati da invasatura standard. La biodiversità osservata nei campioni trattati indica che il compost "Big Bag" non apporta variazioni negative alla comunità microbica, infatti nuove popolazioni comparivano a seguito dell'aggiunta di compost mentre altre venivano stimulate nella quantità. Per tutte e tre le varietà indagate, inoltre

appariva chiaro che l'effetto sulla comunità microbica del suolo è almeno in parte dose dipendente, poiché i gli effetti maggiori venivano riscontrati quando venivano aggiunte il 66% ed il 100 % di compost.

E' possibile quindi concludere che l'effetto prodotto dal compost "Big Bag" sulle popolazioni microbiche del suolo e della radice, sia per quanto riguarda la comunità batterica che fungina, non è di inibizione ma di stimolazione, riscontrabile sia come aumento della biodiversità sia come aumento della carica delle specie già presenti nel controllo.

In uno studio condotto da Kolton et al. 2010, veniva valutato l'impatto dell'aggiunta di un compost sulla comunità batterica del suolo e delle radici di piantine di peperoncino allevate in serra ed è stato osservato che, già dopo 3 mesi, in entrambi gli ambienti la microflora batterica veniva significativamente influenzata nella struttura. Inoltre, è stato ipotizzato che le popolazioni stimolate dall'aggiunta del compost fossero in parte responsabili degli effetti positivi osservati nella crescita e nello sviluppo della pianta.

L'impatto di lieve entità osservato sull'abbondanza dei batteri risulta essere già noto in letteratura sia esso riferito a studi condotti in campo che in vaso. Infatti, Nasini et al. 2013 aveva riscontrato che l'aggiunta di sostanza organica derivante da scarti di frantoio ad un oliveto, non aveva significativamente prodotto un incremento del numero dei Batteri del suolo, ipotizzando che questo tipo di ammendante organico poteva avere un impatto a breve termine soltanto. Tuttavia, questo lavoro dimostra in parte come un effetto a medio-lungo termine (6 mesi) sia possibile, almeno per quanto concerne la struttura della comunità microbica.

Tiquia et al. 2002 ed Inbar et al. 2005 hanno osservato che i cambiamenti nella microflora si possono verificare sia in funzione delle diverse fasi di sviluppo della pianta, ma anche in virtù delle proprietà chimiche, fisiche e biologiche delle matrici impiegate per l'allevamento delle piante, in particolare quando si tratta di compost.

In uno studio condotto da Green et al. 2006 veniva monitorata la successione delle comunità batteriche durante le prime fasi di sviluppo di piantine di cetriolo a cui era stato aggiunto compost come parziale sostituto della torba. In questo caso era stata osservata un'influenza del compost sulle popolazioni batteriche presenti sulla superficie del seme, infatti numerosi gruppi microbici ritrovati in esso, si trovavano anche nel terriccio impiegato per l'allevamento, tra cui il genere *Chryseobacterium* e la famiglia delle *Oxalobacteraceae*. Tuttavia, molte delle specie inizialmente ritrovate nel seme, non sono state più ritrovate a livello delle radici ovvero durante le fasi di crescita e sviluppo del seme. Questo sta ad indicare come l'habitat della radice operi una selezione che sposta l'equilibrio della microflora iniziale verso un nuovo tipo di struttura.

In questo lavoro l'effetto del compost Big Bag è stato osservato anche sulla microflorafungina, in particolare nella sua struttura. E', infatti, noto l'importante ruolo svolto dai funghi in quanto decompositori primari della

sostanza organica presente nel suolo, si tratta in particolare dei Basidiomiceti che includono i funghi ligninolitici ed alcuni lieviti che svolgono un ruolo attivo in determinate fasi della degradazione della sostanza organica (Karpouzas et al 2009). Nel suolo vi è un particolare gruppo di Funghi, definiti Arbuscular Micorrizal Funghi (AM Funghi), che sviluppano delle relazioni simbiotiche con l'apparato radicale delle piante. Tra essi si trovano le Endomicorrize, Funghi che colonizzano l'ambiente interno delle radici. Gli effetti benefici delle endomicorrize sulla crescita della pianta sono ben documentati tra cui, appunto, la stimolazione della crescita della pianta e dell'assunzione di nutrienti, come fosforo, zinco e rame (Pfeiffer 2013).

Ipsilantis et al. 2009 ha investigato l'effetto delle acque reflue di vegetazione sul sistema suolo-pianta di *Vicia faba*, con particolare riferimento alla struttura, alla diversità e alla capacità di colonizzazione da parte dei funghi AM. Da questo studio è stato osservato che l'applicazione dello scarto in presenza dei Funghi arbuscolari favoriva la mineralizzazione del fosforo del suolo, suggerendo e confermando un coinvolgimento attivo di questa classe di funghi nel rendere i nutrienti disponibili per la pianta. Questa evidenza suggerisce che le modificazioni della struttura fungina del suolo e delle radici rispettivamente, in tutte le varietà indagate in questo lavoro, possano avere favorito quelle popolazioni che contribuiscono alla promozione della salute della pianta.

6. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi prevedeva lo studio delle comunità batteriche e fungine del suolo e delle radici di differenti varietà di piante allevate in vaso utilizzando compost derivante da scarti dell'industria olearia come parziale sostituto della torba nel substrato da invasatura.

Dai risultati ottenuti, è possibile affermare che l'aggiunta di compost "Big Bag" come parziale sostituto della torba per la formulazione di substrati da invasatura può modificare significativamente le comunità microbiche associate con la pianta-ospite. E' comunque importante rilevare che la microflora di suolo e radici non subiva un'inibizione della crescita riscontrabile in un calo dell'abbondanza totale dei microrganismi. Al contrario, era possibile osservare un marcato aumento della biodiversità di batteri e funghi nelle tesi sperimentali in cui il compost sostituiva la torba. Questo permette di ipotizzare un potenziale effetto positivo per la crescita della pianta.

7. BIBLIOGRAFIA

Abad, M., Noguera, P., Burés, S., 2001. National inventory of organic wastes for use as growing media for ornamental potted plant production: case study in Spain. *Bioresource Technology* 77, 197e200.

Aires, T., Marbà, N., Serrao, E. A., Duarte, C. M. and Arnaud-Haond, S. (2012), Selective elimination of chloroplastial dna for metagenomics of bacteria associated with the green alga *caulerpa taxifolia* (bryopsidophyceae). *Journal of Phycology*, 48: 483–490

Alissa S. Hanshew, Charles J. Mason, Kenneth F. Raffa, Cameron R. Currie, Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 95, Issue 2, November 2013, Pages 149-155

Altieri R., Esposito A., Baruzzi G., Use of olive mill waste mix as peat surrogate in substrate for strawberry soilless cultivation, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 64, Issue 7, October 2010, Pages 670-675

Altieri, R., Esposito, A., Parati, F., Lobianco, A., Pepi, M., 2009. Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 993e997.

Bodini, S.F., Cicalini, A.R., Santori, F., (2011). Rhizosphere dynamics during phytoremediation of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 102, 4383e4389.

Carlile W.H., 2001 – Growing media and the environmental lobby in the UK 1997-2001. *ISHS Symposium "Growing Media & Hydroponics"*, Alnarp, Sweden, 8-14 September 2001

Della Greca M., Monac, P., Pinto G., Pollio A., Previtiera L., Temussi F., (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill wastewaters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 352–359.

Dennis, P.G., Miller, A.J. & Hirsch, P.R. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 313–327 (2010).

Federici E., Pepi M., Esposito A., Scargetta S., Fidati L., Gasperini S., Cenci G., Altieri R., (2011) Two-phase olive mill waste composting: Community dynamics and functional role of the resident microbiota. *Bioresource Technology* 102 10965– 10972

Federici F., Fava F., Kalogerakisc N., and Mantzavinosc D. (2009) Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *J Chem Technol Biotechnol* ; 84: 895–900 2009 Society of Chemical Industry

Green S.J., Inbar E., Frederick C. Michel Jr., Yitzhak Hadar, and Dror Minz, 2006. Succession of Bacterial Communities during Early Plant

Development: Transition from Seed to Root and Effect of Compost Amendment. *Appl. Environ. Microbiol.* June 72:6 3975-3983;

Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. *Plant Soil* 312, 7–14 (2008).

Hiltner L. 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berücksichtigung der Grundungen und Brauche. *ARL Dtsch Lasdwrts Ges Berl* 98: 59-78.

Inbar, E., S. J. Green, Y. Hadar, and D. Minz. 2005. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. *Microb. Ecol.* 50:73–81.

Ipsilantis I., Karpouzas G.D., Papadopoulou K., Ehaliotis C., 2009. Effects of soil application of olive mill wastewaters on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 41, Issue 12, December, Pages 2466-2476.

Karpouzas, D. G., Rousidou, C., Papadopoulou, K. K., Bekris, F., Zervakis, G. I., Singh, B. K. and Ehaliotis, C. (2009), Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of nitrogen fertilization, on the structure of rhizosphere–soil fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 70: 388–401.

Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Pages 879-882 in: *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter.* Vol. 2, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France.

Max Kolton, Yael Meller Harel, Zohar Pasternak, Ellen R. Graber, Yigal Elad, and Eddie Cytryn, 2011. Impact of Biochar Application to Soil on the Root-Associated Bacterial Community Structure of Fully Developed Greenhouse Pepper Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* July 2011 77:14 4924-4930.

Morillo J.A & Antizar-Ladislao B. & Monteoliva-Sánchez M. & Ramos-Cormenzana A & Russell N.J (2009) Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:25–39

Nasini L., Gigliotti G., Balduccini M.A., Federici E., Cenci G., Proietti P., Effect of solid olive-mill waste amendment on soil fertility and olive (*Olea europaea* L.) tree activity. 2013, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 164, 1 January, Pages 292-297.

Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sa´nchez-Monedero M.A., Bernal M.P., (1999). Characterization of olive-mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* 67, 111–115

Paredes M.J., Moreno E., Ramos-Cormenzana A., Martinez J., (1987). Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere* 16 (7), 1557–1564

Penny R & Mauchline H. T, Who's who in the plant root microbiome?. *Nature Biotechnology* 30, 961–962 (2012)

Pfeiffer, M. Mycorrhizae and plant growth. (2013). Pesticide training resources. Rana G., Rinaldi M., Introna M.,(2003) . Volatilisation of substances alter spreading olive oil waste water on the soil in a Mediterranean environment. Agriculture, Ecosystems and Environment 96, 49–58.

Roig A., Cayuela M.L. , Sa´nchez-Monedero M.A., Spain Accepted 5 July (2005). Available online 24 October 2005 (A. Roig et al. / Waste Management 26(2006) 960–969) An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, CEBAS CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia,

Schmilewski G., 2000 – Sustainable horticulture with peat – a German case study, Peatlands International 1: 27-30

Tiquia, S. M., J. Lloyd, D. A. Herms, H. A. J. Hoitink, and F. C. Michel, Jr. 2002. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR amplified 16S rRNA genes. Appl. Soil Ecol. 21:31–48.

Pistoia , Italy

**SOIL SOIL OF THE NEW SAN
VIVAI SANDRO Bruschi**

**Potting substrates
obtained from waste oil mills**

1 . PURPOSE OF THE PROJECT

2 . WASTE OLEARI

2.1 The waste from oil mills : production and problems associated with them

2.2 Use of olive mill waste as a soil improver and as substrates for potting

2.3 Use of waste oil industry in the field of horticulture

2.4 Interactions between root and soil

2.5 Interactions between plants and soil microorganisms

3 . MATERIALS AND METHODS

3.1 Samples analyzed

3.2 Sampling of soil and roots

3.3 Extraction of total DNA from samples of soil and roots

3.4 PCR amplification of the 16S and 18S ribosomal genes

3.5 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

3.6 Quantitative PCR (qPCR)

4 . RESULTS

4.1 Validation of molecular methods for the study of the microflora in the roots

4.2 Effects of compost "Big Bag " on the microbial diversity of soil and roots

4.2.1 Effects of compost "Big Bag " on the biodiversity of soil bacterial

4.2.2 Effects of compost "Big Bag " on the biodiversity of soil fungal

4.2.3 Effects of compost "Big Bag " on the bacterial biodiversity of the roots

4.2.4 Effects of compost " Big Bag" Biodiversity of fungal root

4.3 Effects of compost " Big Bag" bacterial abundance of soil and roots

5 . SUMMARY OF RESULTS

6 . CONCLUSIONS

7 . REFERENCES

1 . PURPOSE OF THE PROJECT

The project PIF SAN - SOIL , analyzed in this volume was funded by the Region of Tuscany with European funds of the Rural Development Programme 2007-2013 (European fund EAFRD) Measure 124 . This project has a strategic aim of reducing the use of peat in the nursery , through the testing of soil alternative products arising in particular from the recovery of residue oil from oil mills . The Research Unit which is part of the Laboratory of Microbiology , Department of Cellular and Environmental Biology , University of Perugia has carried out the microbiological investigations necessary to investigate the changes of microbial communities during the composting process waste and to study the effects of experimental soils on microbial communities exist in the soil-plant system and their role in the biochemical processes associated with plant nutrition .

In this way it was possible to study the bacterial and fungal communities in soil and roots of different crop varieties

using substrates containing potting compost made from waste crushers mills as partial substitute for peat. The analysis of changes in the microflora was conducted through the use of culture - independent approach based on molecular methods for the study of microbial biodiversity and abundance .

2 . OIL WASTE

2.1 The waste from oil mills : production and problems associated with them .

The industrial sector regarding oil production, which sees Italy as the second world producer of olive oil, is a branch of considerable industrial importance in especially for the states in the Mediterranean climate such as Spain, Greece , Portugal, Turkey and Syria.

We can distinguish two main types of olive oil : the one obtained with methods mechanics, defined a virgin, and that obtained by physico-chemical methods .

To date, oil production food is primarily concerned with the oil obtained mechanical methods , and we can distinguish five main stages of production:

- Washing the olives
- Pressing: passage that leads to disruption of the cell wall and the leakage of juice with pulp production of oil formed by oil, water and solids .
- Kneading : has the aim to break the emulsion between the oil and water to facilitate the subsequent separation .
- Extraction of oil must : This step involves the separation of the solid fraction from the liquid made up of water and oil. The wort oil is the liquid phase , the pomace is the solid phase composed of pulp, peel and seeds.
- Separation of olive oil.

Two methodologies are oil extraction : pressing, traditional method which allows the separation of the oil must from the pomace , and centrifugation, methodology introduced more recently , that provides for the centrifugation of the paste of oil, in the case of the centrifugation are distinguishable two different approaches : the three-phase system , which is the classical one, and the two-phase system .

The main problem of oil production basically covers the disposal of waste , especially of vegetable water and pomace . The vegetable water are formed by the water contained in the drupe , from the washing waters and from those of the process and contain a high concentration of organic substances, the pomace is instead solid and consists of skins and seeds olive .

The waste products of the oil industry are characterized by high phytotoxicity demonstrated by several studies that have shown the negative effects of exercise on the ground (Paredes et al. , 1987) , on aquatic systems (Della Greca et all. , 2001) and air (Rana et all. , 2003). The potentially negative environmental impact is due to the particular characteristics of these chemical waste : high content of minerals, very acidic pH and the presence of polyphenolic compounds (Pardes et all. , 1999) with phytotoxic and antimicrobial action that affects the development of many plants . The problem with polyphenols is particularly pronounced in the case of oil

production with three-phase system , this involves the separation into three components: the pomace , the oil must and wastewater .

The oil pulp , which is formed in the stage of milling , with this system is diluted with water and this is the biggest disadvantage as there is a considerable consumption of water, high water production of vegetation and a large extraction of polyphenols due to the washing of the curd, this higher concentration of polyphenols , which as said are bactericidal and slow biodegradability , makes the vegetation waters even more polluting and difficult to dispose .

The two-phase system , because less water is used, at least in part the obvious problems encountered in the three-phase system and sees the production of waste with a lower load of polyphenols and consequently with a low pollution potential . The centrifugation in the two-phase system leads to the production of only two fractions: the husks and the waste water .

Even in this type of production are found , however, the problems relating to the disposal of waste, in the specific case of the residue. It is therefore evident that the extraction of olive oil will generate a large amount of by-products that are harmful to the environment (Morillo 2009) , in particular waste water and pomace . It is therefore necessary to find an appropriate approach not just to dispose of this waste , but also strategies for their exploitation .

2.2 Use of olive mill waste as a soil improver and as substrates for potting .

With the name olives mill wastes (OMW) are indicated by-products of olive oil waste water and residue . The waters of vegetation are the most critical gap because of their high phytotoxicity and bactericidal activity , effects due to their chemical components such as phenols and polyphenols difficult biodegradability. It is true that the waste mills are potential pollutants and therefore can not be released into the environment , it is equally true that contain valuable resources such as high concentrations of organic matter and nutrients that could be recycled as fertilizer potential (Roig et all . , 2006). Consequently it is evident that these wastes can be processed into a useful resource to be exploited in the agricultural field , either directly in the soil as a soil improver or as substrates by potting . The by-products of olive oil can be used as either "as is " or as compost.

In recent years, numerous studies have been carried out on the use of its by-products of the oil industry as compost (Roig et all 2006 Morillo et all 2009 Federici et all 2009).

With the term "compost" indicates the organic soil obtained from biotechnological process aerobic composting of organic substances , which leads to the formation of a product can be used as agricultural fertilizer because rich in organic matter and mineral nutrients stabilized .

Composting is a natural process that can be exploited industrially , with different purposes , such as controlled biological process of maturation of organic substances in an aerobic environment , thanks to this process is the production of materials has a molecular chain is simpler, more stable , sterilized thanks to the high temperatures that are reached in the thermophilic phase , rich in compounds umidici and therefore useful in fertilization and in recovery of the organic substance in the soil . In general, any organic product can serve as a substrate for composting and waste crusher make no difference , they are indeed a suitable base for a compost of "quality ."

The main stages of composting are two: the decomposition by bio-oxidation (active composting) and the maturation phase (curing) . Within these two main phases can be distinguished then the " sub " steps of the composting process characterized by different temperatures and different from the action of microorganisms .

In the first step of the phase of biooxidation intervene psychrophilic and mesophilic aerobic microorganisms , it is therefore a mesophilic stage , in which the organic components are degraded more simple (sugars , amino acids, lipids, etc.) with oxygen consumption, release of carbon dioxide and heat (endergonic reactions) .

Thanks to the raising of the temperature is observed a gradual disappearance of mesophilic microorganisms , which have an optimum between 18 ° C and

45 ° C , and the selection of microorganisms more resistant to high temperatures and more suitable for the degradation of complex substances not metabolized in mesophilic phase : it then enters the thermophilic phase characterized by the presence of thermophilic and facultative autotrophic bacteria from extreme thermophiles . The high temperatures of this phase accelerate the degradation of more complex biomolecules : proteins, fats, complex carbohydrates such as cellulose and hemicellulose , in addition the heat developed facilitates the process of caramelization of sugars which, together with the formation of humic substances , gives the matrix a color brown .

The thermophilic phase ends because of the high temperatures that favor the evaporation of water , and then the disappearance of the bacteria. The disappearance of the bacteria and nutrient reduction at the base of endergonic reactions that lead to the development of heat , triggers the lowering of the temperature and the entrance of the cooling phase and maturation mesophilic . This stage is characterized by colonization of the matrix by fungi which , thanks to the production of specific enzymes degrade complex substances remained partially (cellulose , hemicellulose , lignin) . The temperature of this step is similar to that environmental (Federici et al 2011) .

The microorganisms involved in the composting process in its various stages and in its different steps , are numerous and mainly consisting of bacteria, actinomycetes and fungi.

The bacteria are responsible for the development of heat that is released during the degradation of endergonic reactions of simple organic substances . Actinomycetes are able to degrade more complex substances . Also involved in the final stage of maturation leading to the production of humic components . The fungi involved in all stages of composting and are able to degrade complex substances leading to the formation of secondary metabolites which are then attacked by bacteria .

Composting is a technique you can use for the enhancement of waste of oil production : the composted pomace could be used in agriculture leveraging its organic nutrients and fertilizers and in the context of the nursery as a substrate for potting to replace non-renewable resources currently used as peat.

The problem of the use of wastes of the oil industry lies in the fact that they can bring not only benefits but possible damage, both in the case of non-composted waste is composted in the case of wastewater .

To date, the direct use of wet pomace on agricultural land , controlled in their chemical composition , in order both to replenish the organic matter in the soil is to dispose of waste oil mills , is governed by Article 4 of Law 574 of 11 November 1996.

In theory, the use of waste oil mills offers numerous prospects in the agricultural field . This is due to the characteristics of by-products of the oil industry : the wet husks contain high concentrations of organic matter (around the ' 84%), fatty substances remaining at around 10 % humidity of about 50-70% , phosphorus in amounts close to 0.2 % , potassium (2 %) and nitrogen (1 %) . It should be remembered that the last three elements are essential for nourishment , growth and development of plants.

In addition to giving detectable effects on soil and plants, there is experimental evidence demonstrating changes in the soil microflora after shedding waste mills : it denotes an initial decrease of the microflora probably due to the presence of bacteriostatic or bactericidal nell'ammendante , after the reduction is observed with a microbial repopulation reached or exceeded the initial values.

One of the studies conducted on the waste oil mills and the effects these have on agricultural land showed that a year after the spreading of OMW is possible to detect a significant short-term effect on the bacteria in the rhizosphere (Boldini et al. 2011).

The effects of using these waste mills , however, depends on several factors such as the dose and mode of spreading , the type of soil , climatic conditions and crops in place .

Given the great variability of the factors on which they depend positive or negative effects of these products on both the environment and crops , you're trying to make point of the strategies to overcome the disadvantages , such as the practice described before composting which allows biorisanazione of the organic substance .

2.3 Use of waste oil industry in the field of horticulture .

In the field of horticulture substrate by potting most used is peat which accumulates in soils rich in water in the absence of oxygen and represents the initial stage of the formation of coal. It is composed of organic matter especially of plant origin, but also of other nature, and is a good substrate by potting thanks to the contribution of nutrients and pH optimum for the growth of plants .



Peat , however, has the disadvantage of being a non-renewable resource and in recent years in some European countries (Austria, Germany , Great Britain, Switzerland), its use has been opposed by environmental groups , with the aim of limiting the extraction of peat , thus preserving the habitat of the bog (Schmilewski , 2000; Carlile , 2001). The rising costs and the fact that it is not a renewable resource has drawn attention to the need to find alternative potting substrates in order for this to be replaced .

In theory, waste from oil mills , both as they are composted , they could be a good substitute to peat substrate , thanks to the contribution of organic matter , minerals and other nutrients essential for plant growth in vase. However, these differences may also influence the microbial populations present in the ecosystem - ground roots . The microflora has important functions in the life of the plant and changes in the level of the

composition of the substrate could be reflected in changes in the microbial population that interacts with the roots , causing changes in the plant, not necessarily beneficial or positive.

The potting substrates will therefore affect the growth and health of the plant in two ways: either directly , through the intake of nutrients and minerals , and indirectly going to affect the microflora of the soil-plant ecosystem .

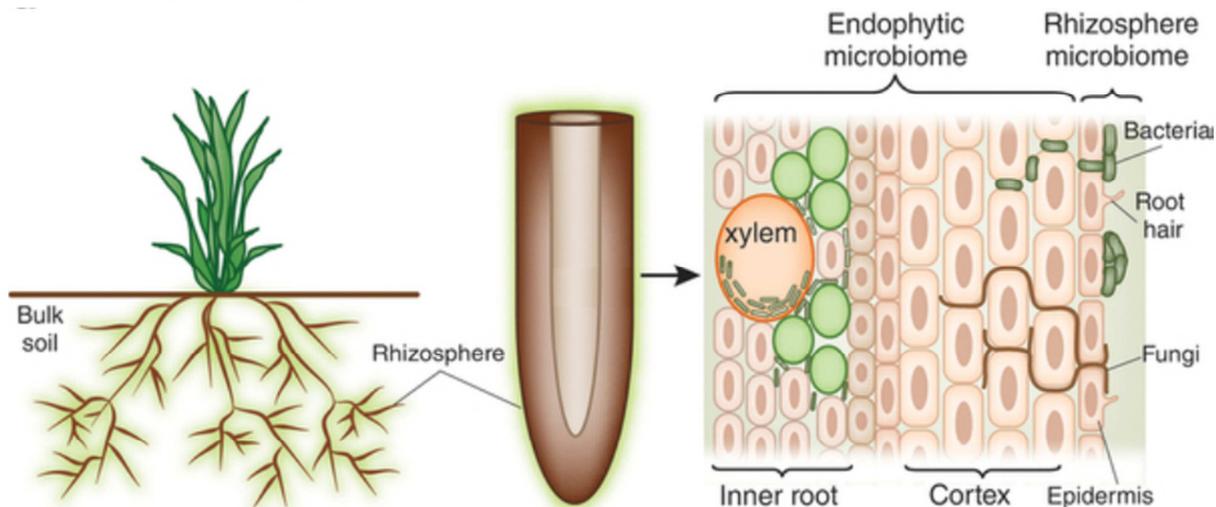
The use of olive residues as substrates for potting could solve two problems : the need to find an alternative to peat in the field of

horticulture and waste disposal of the oil industry , which could be recycled so productively. The crucial point is therefore to try to identify if and how much is favorable for the plant replacement of peat with olive oil waste from industry and how these products should be treated to be exploited and used as substrates for potting .

2.4 Interactions between root and soil.

When we refer to the interaction between the plant and the ecosystem in which this is located, even in the case of potted plants , there are three main areas to consider :

- The root system ;
- The rhizosphere ;
- The bulk soil.



The root is the organ of the plant specialized in the absorption of water and minerals from the soil , which are essential for the plant life of the organism . Also has the function of anchoring , the production of hormones and secretion of exudates .

The rhizosphere (from the greek rhizo = root ; sphaira = ball) is the portion of the soil that surrounds the roots of the plants from which they absorb essential nutrients and water needed to grow. In this region there are biotic components as symbiotic microorganisms, beneficial bacteria and pathogens, fungi, micro-and macroscopic . The rhizosphere can be divided into three zones:

- endorizosfera , multilayered environment that extends from the surface of the roots to the early inner cell layers where you can have microbial invasion and colonization ;
- rizoplano or outer surface radical , consisting of the epidermis with root hairs (rizoderma) and the mucoid layer where you can have a microbial colonization ;
- ectorizosfera , which consists of the volume of soil adjacent to the roots of variable size depending on the type of plant and the interactions with the microbial populations present in that area.

Finally , the term bulk soil indicates the land , soil , outside of the rhizosphere is not penetrated by plant roots . In this region the concentration of natural

organic compounds is much lower than that of the rhizosphere and the same applies for the microbial populations present in a lesser extent .

The influence of the plant on the environment in which this is located is expressed through the rizodeposizione , the process of secretion by the root system of organic and inorganic material . This material may be composed of cells or cell fragments or root exudates .

Exudates produced by plants and released into the surrounding soil can be classified into two types:

- Exudates low molecular weight water-soluble compounds such as sugars, organic acids , amino acids and phenols ;
- Exudates high weight , or substances macropolimeriche insoluble polysaccharide as ectoenzymes (phosphatase , polyphenol oxidase) and mucilages , as the mucigel surrounding the roots , and in which are immersed the microorganisms . The mucigel has the original function to lubricate the root to allow the penetration of the same within the soil ; however, is an excellent environment for the growth of bacteria , especially nitrogen-fixing , and fungi.

The phenomenon of rizodeposizione leads to what is called the rhizosphere effect , a term coined by Hiltner (1904) to describe the influence of root exudates in the proliferation of soil microorganisms and the root interior (Hartmann at al. , 2008) secretion in soil of all these exudates modifies its composition , provides nutrients for the microorganisms , and this influences the microflora , both as regards the biodiversity that the microbial load ; microbial populations are from 5 to 100 times (on average 20 times) more numerous in the rhizosphere than in the rest of the soil.

This variability is given by the fact that the secretion of exudates from the roots is affected by many factors such as plant species, age and nutritional status of the plant and the environmental conditions .

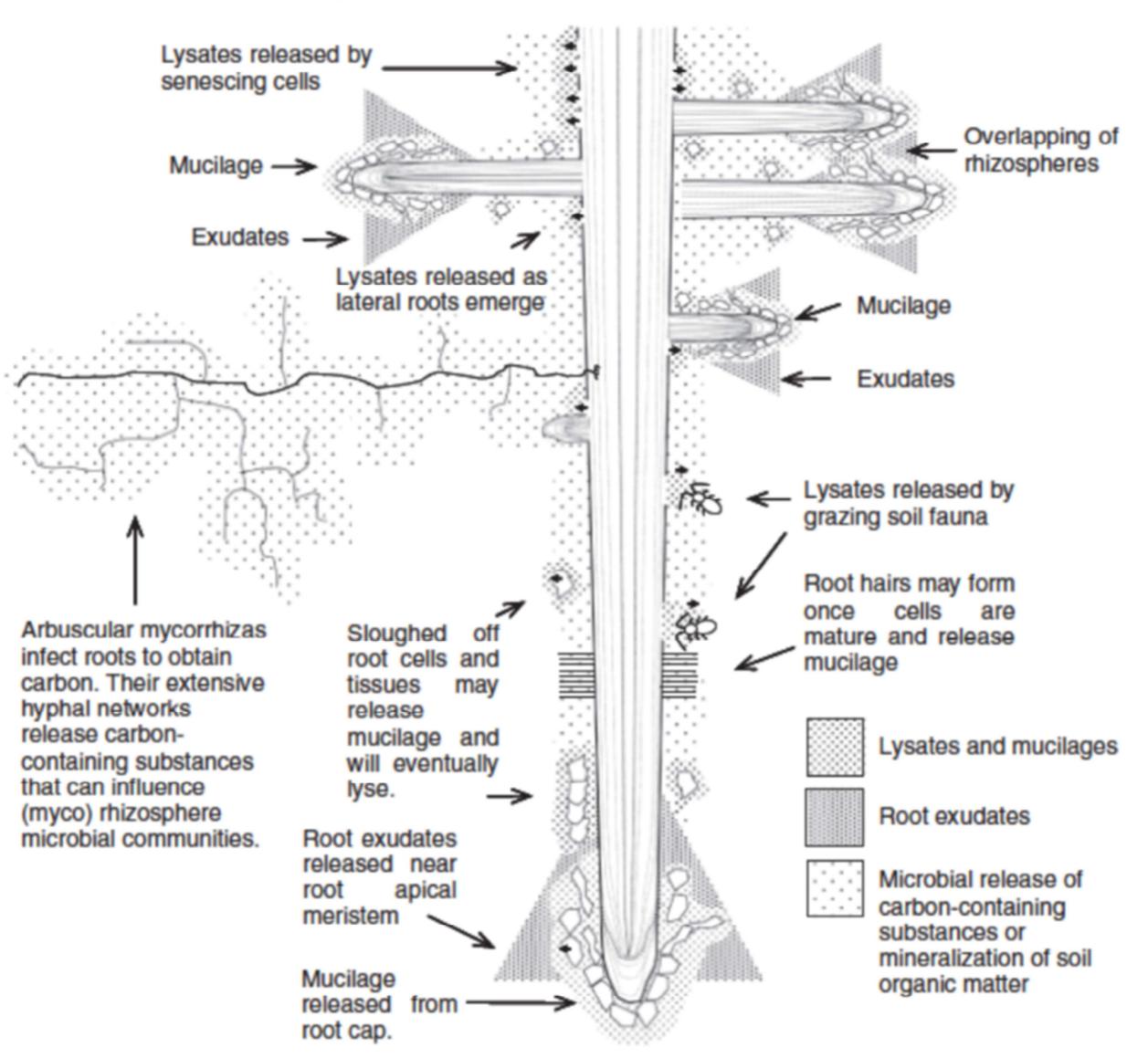
Under the name of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Kloepper et al. , 1978) , we mean all those present in the rhizosphere microorganisms that promote plant growth and have the effect of biofertilizers, biopesticides and biorisanatori , an example of PGRP are bacteria genera Aspergillus , Pseudomonas , Azotobacter , Bacillus and Bradyrhizobium . The structure of the soil, allowing the movement of the rhizosphere microorganisms present in the immediate vicinity of the root, it promotes the recruitment (Dennis at al. , 2010) .

The beneficial effects on the plant are conducted through direct and indirect mechanisms of action , examples of direct effects are the fixation of atmospheric nitrogen , the production of iron chelating siderophores and solubilization of phosphorus that make it more available for the two substances ' uptake by plants, and the synthesis of plant hormones that stimulate development. Among the indirect mechanisms we can cite instead the production of metabolites antagonists against harmful microorganisms ,

the competition towards pathogens for nutrients or for specific niches , the ability to produce siderophores chelating the iron is no longer available for harmful microorganisms and the induction of induced systemic resistance (ISR) .

2.5 Interactions between plants and soil microorganisms .

When it comes to plant ecosystem is necessary to take into account all the interactions that take place between the roots and soil organisms , whether they are bacteria or fungi.



The soil is a rich habitat for microbial communities belonging to different groups, which can be divided into two categories: the indigenous microflora and microorganisms zymogens . The first category includes both bacterial and fungal species present at a level generally steady ; ecophysiological groups , able to carry out specific functions and metabolic activities , belong to this class . The second category is that of micro-organisms zymogens : alien invaders , which degrade the organic remains fresh , which multiply rapidly and then return to the initial level . From the beginning of its growth the plant interacts with the biotic component of the soil. The initial phase of interaction with the microorganisms can be defined as a phase of colonization in which micro-organisms , due to various factors , they move towards the

roots . This movement can be either passive , by means of streams of water in the soil , that active , through a process of chemotaxis activated by plant exudates that stimulate the movement of the microorganisms to the root system . Among the various products stimulating chemotaxis we can cite the phenolic compounds and aromatic , sugars and amino acids .

Following the step of colonization occurs a nonspecific adsorption of microorganisms to the surface of the root due to electrostatic forces , it is then possible the anchoring of the bacterial cell to the root . This leads to the formation of rather complex symbiotic interactions between the plant and its host.

It is possible to distinguish two types of symbiosis : ectosimbiosi , in the case where the microorganism living on the surface of the host, and endosymbiosis , in case resides in the intercellular space or intracellular . In the second case we speak of endophytes .

The symbiosis generally allows the plant to acquire new metabolic functions both as nitrogen fixation and the degradation of cellulose , which is not as metabolic protection from chemical, physical and biological .

The symbiosis stands in further two types: cyclic , in the case where every generation the plant must "call" through chemical signals the symbiotic microorganisms , and permanent , in the case where the symbiont is transmitted vertically, then from generation to generation .

Mycorrhizae are a classic example of symbiosis between the roots and soil microorganisms , and these are a kind of mutualistic symbiotic association that is established between the roots of many plants and fungi in the soil, which shall be open to varying degrees , even bacteria .

From this association both the plant and the microorganism benefit : the plant symbiotic fungi provides simple carbohydrates produced by photosynthesis essential to their metabolism , fungi produce growth factors that induce morphological alterations of plant roots , stimulating the formation of mycorrhizal layer .

The benefits that the plant extracts from this symbiosis are numerous : the largest development of its roots and therefore the increased extension of the root system , the amplified efficiency of absorption of nutrients, ions and water , as well as protection from environmental stress and by pathogens .

We can distinguish two types of mycorrhizae : ectomycorrhizae (mycorrhizae ectotrofiche) and endomycorrhizae (vesicular - arbuscular mycorrhizae) are the first in which a superficial hyphae do not penetrate into the tissues of the root , but the play forming a sheath around the root in the second case it is observed instead of a penetration of the fungus within cells radicals .

A further example of a symbiotic relationship between plant and microorganism is one that is established between bacteria of the genera *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and leguminous plants .

This interaction leads to the formation of root nodules in which the bacteria differs peribacterioide and convert atmospheric nitrogen into ammonia that is used by the plant as source of nitrogen ; mutualism is based on the fact that the bacterium fill the role of nitrogen-fixing and plant provides carbon to it , therefore both benefit from the symbiosis.

The soil microorganisms and plant symbionts are involved in major biogeochemical cycles resulting indispensable for the plant organism : the nitrogen cycle can we identify essential microorganisms in the process of harmonization on proteolysis and then in nitrogen mineralization protein with consequent release of NH_4^+ , and nitrifying bacteria that oxidize ammonia to nitrite which is oxidized to nitrate , in the carbon cycle are cellulolytic , microorganisms that degrade cellulose, amylolytic , which degrade starch , pectinolytic , which degrade the pectin degrading and ligninolitici lignin .

Not all microorganisms present in the soil or all symbionts are beneficial to the plant, in some cases, the plant does not receive any damage or benefits in other cases the symbionts are phytotoxic .

The saprophytic microorganisms fall under the classification of microorganisms which do not bring disadvantages to the plant, but even advantages , if not in an indirect way . The functions of these microorganisms are numerous and among them is important to remember their role in the decomposition of organic matter , and then in mineralization of nutrients , which are essential for the balance of the soil and the cycle of nutrients. Consequently, the benefit that the plant draws is indirect, but nonetheless essential .

The same exudates that attract symbiotic benefits to the plant organism act as chemotactic stimuli for those who are symbionts and pathogens that then bring harm to the plant , for example , inhibiting the growth through the production of phytotoxins , such as cyanide , or damage to the microflora of the rhizosphere as in the case of inhibition of nitrogen-fixing bacteria and mycorrhizae .

The interactions between the plant and the microflora are clearly very complex and there is a mutual interaction in addition to a mutual influence : through exudates plants alter the microflora which in turn affects the plant in various ways . It is evident that the life of the plant and its development are essential to this link with soil microorganisms and how changes in the environment, for example through the use of compost derived from waste oil mills , can lead to changes in the microflora with possible effects on the growth and health of the plant.

3 . MATERIALS AND METHODS

The methods used for the study of microbial communities in a given sample environment are of two types: methods and culture-dependent methods coltura-independenti .

In the first group are those methods that allow the study of microbial communities through the direct cultivation of the plate.

The culture - independent methods are molecular methods that do not require plating , such as sequencing , the real-time PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) .

The DGGE is an excellent tool for the study of microbial communities in matrices environmental ; the importance of this method lies mainly in the fact that it allows the detection , thanks to subsequent analysis such as sequencing , impossible to cultivate microorganisms in the laboratory.

Most of the bacterial or fungal species risedenti in environmental matrices are unable to grow in the laboratory : the discrepancy between the number of bacterial cells observed by direct microscopy of soil samples stained and the number of those that grow on agar plates is from long been recognized . An obvious example are the archaea soil to slow growth, not detected using cultures agar plate , also in the assessment of the abundance of fungal mycelia and spores by direct culture were found inaccuracies in the data obtained (Penny H. Mauchline R & T 2012).

It seems clear therefore that it is not possible to give you an idea , through methods coltura-dependenti , the enormous microbial biodiversity present in this type of samples, while you can get a wider overview when using methods coltura-independenti .

3.1 Samples analyzed .

The investigation of microbial communities in the soil-plant system , takes place in the framework of the project PIF SAN SOIL - funded by the Region of Tuscany . This project has as objective the study of the microbiological aspects of new soil , peat substitutes used in the nursery industry , resulting from the processing of waste from oil mill . In particular we have monitored several varieties of plants grown in soils at experimental Nurseries Sandro Bruschi for the study of microbial communities exist and their role in the biochemical processes associated with plant nutrition .

The first samples analyzed were used for the phase of development and validation of experimental and derived from plants grown in pots of the following varieties:

- Photinia fraseri ' Red Robin '
- Osmanthus burkwoodii

The second and main phase of this work, he then examined plants grown in different substrates by potting compounds from different combinations of peat and compost " Big Bag" , an experimental compost made from ' Institute for Agriculture and Forest Systems in the Mediterranean (ISAFOM) of the National Research Council (Perugia) from waste oil mills . This material has been the subject of experimentation to evaluate its use as a substitute for peat , formulating 8 different experimental thesis which included both different amounts of compost presence / absence of mineral fertilizer :

- TC : Witness business only with peat - manured
- BB_33_C : Peat replaced 33% with compost " Big Bag" - manured
- BB_66_C : Peat replaced 66% with compost " Big Bag" - manured
- BB_100_C : Peat replaced 100% with compost " Big Bag" - manured
- TNC: Witness business only with peat - non- manured
- BB_33_NC : Peat replaced 33% with compost " Big Bag" - not fertilized ;
- BB_66_NC : Peat replaced 66% with compost " Big Bag" - not fertilized ;
- BB_100_NC : Peat replaced 100% with compost " Big Bag" - not fertilized ;

After 6 months of the start of the experiment, eight plants were taken for each thesis . In this case, we have analyzed the following varieties:

- Cupressus sempervirens ' Pyramidalis '
- Viburnum lucidum
- Prunus laurocerasus ' News '

The analysis of three different varieties of plants and 8 replicated for thesis , has led to a large number of samples to be analyzed . This approach has

enabled statistically robust and very thorough investigation of the influence of various soils on the balance of the microflora of the soil and the plant. The management of the large number experimental samples collected was then simplified setting up pools of the eight plants of each variety treated in the same way.

3.2 Sampling of soil and roots.

The analysis of microbial communities in the soil, in the rhizosphere and roots of potted plants requires as a first step, the sampling of the three components and consequently the sacrifice of the plant under study.

Once extracted from the plant from its container is separated by shaking manually and the soil from the root system and this can be kept as cool to -80°C or may be dried in the stove at 40°C for subsequent analysis. The dried soil is passed through a sieve to separate it from the components that are part of the substrate by potting but that should not be analyzed and from the residues of roots not removed initially. The sample of dried and sieved soil is ready for subsequent analysis or can be stored at -20°C .

Once you separate the soil from the roots, the soil remains at the level of the root is the rhizosphere.

In order to be sampled separately the two components is necessary that these, once placed in a Falcon containing sterile water, are placed nell'agitatore for one hour after which the roots are moved. In Falcon stirred is present the rhizosphere; collection this is thanks to the removal of 900 ml of liquid which is inserted into a test tube and centrifuged. After centrifugation at 17,000 RCF for 4 ' 30 " and the supernatant was collected and the precipitate represents the rhizosphere. You can proceed to the addition of a further 900 ml of liquid taken from Falcon and inserted in the same tube, ricentrifugare and eliminate the supernatant again, these steps must be repeated until it is sampled the proper amount of the rhizosphere, which is then stored at -20°C .

The roots subjected to agitation and moved to another Falcon, before sampling must be subjected to a phase of successive washes in order to remove the remaining rhizosphere and to leave only the portion of the root system. Typically proceeds with three washes with sterile saline not, a washing with soap (NaOH 2% and Tween 0.2%) and finally three washes with sterile saline at the end of which the root is completely separated from the residues of the rhizosphere and it is possible prelevarne a sample for the sampling and storage at -20°C until further analysis.

Generally samples of rhizosphere and roots are sampled in triplicate and for each plant are collected and stored three samples of rhizosphere and three samples of root system.

3.3 Extraction of total DNA from samples of soil and roots .

The extraction of total DNA from the sample under study is done using diversikit depending on the type of starting sample of which you want to obtain the genetic material . There is talk of metagenomic DNA is extracted because the genomes of all the biological material present in the original sample , which means that if for example, DNA is extracted from the roots, what you get is not only the genetic material of the root system but also of micro-organisms associated with it , such as bacteria and fungi : the metagenome or total DNA .

For the extraction of DNA from roots using the PowerPlant ® Pro DNA Isolation Kit (Mobio , Carlsberg CA) , while for the extraction from the soil PowerSoil ® DNA Isolation Kit (Mobio) , kit used for DNA extraction from metagenomic matrices environment.

Both of these kits are based on the use of beads to break the cell walls , in the initial phase , and the filtering of columns containing a silica membrane in the final phase .

We can recognize three basic steps in the context of DNA extraction :

- The lysis of the cell wall , both mechanically and , thanks to the marbles , either through chemical force of the solutions provided in the kit and heat ;
- The extraction of DNA from the lysate using a solution capable of remaining in suspension and the DNA to precipitate in the form of pellets throughout the rest after centrifugation ;
- The purification of DNA by passing the sample through a membrane of silica.

The membrane holds the genetic material , in order to purify it , thanks to the addition of the sample in a solution containing a salt of a bond able to stabilize the bond between the membrane and DNA.

Once you've completed the steps of loading the sample at the level of membrane removed and the solutions that stabilize the link between genetic material and filter , thanks to the addition of a buffer solution is obtained by elution from the column purified DNA in solution , and this can be stored at -20 ° C.

For the extraction of total DNA from roots there are three possible protocols to be followed , and these differ in terms of :

- the presence or absence of a freezing phase which precedes the pestellamento for partial lysis of the walls and cell membranes ;
- whether or not the addition of PSS (Phenolic Separation Solution) that prevents binding between nucleic acids and phenolic compounds ;
- at the time in which the specimen is subjected to heat through bath at 65 ° C.

Before you start extracting real samples are placed inside the PowerPlant Bead Tube , tubes provided in the kit containing beads for the mechanical lysis of the cell wall ; each tube are placed approximately 50 mg of roots.

In the first extraction protocol samples within the tubes are mechanically sminuzzatti with scissors before starting the steps of extraction.

At this point, we proceed with the addition of two solutions that enable the chemical lysis of the cell wall and RNase A that removes the RNA present , the samples are then placed in a preheated bath at 65 ° C for ten minutes.

In the second extraction protocol roots are frozen at -80 ° C for at least three hours, immediately after thawing we proceed to partial rupture of the cell walls through the mechanical force exerted with a plastic pestle . After this step proceeds with the addition of solutions facilitating chemical lysis of the wall and with the bath at 65 ° C for ten minutes. Only after the heating of the sample is added to the RNase A , to avoid that due to the high temperatures the enzyme is denaturi and lose functionality.

The third extraction protocol involves the same steps of the second with only one difference : the addition in the first step of the PSS.

The differences between the three extraction methods apply only to the initial phase after which we proceed as instructed in the kit protocol .

3.4 PCR amplification of the 16S and 18S ribosomal genes .

The genetic material obtained during the extraction of DNA from environmental matrix is defined metagenomic DNA , comprising therefore the whole genome of all the biological material contained in the starting sample . This means that , through the selection of a gene variable between the different microorganisms present , it is possible to assess biodiversity in the starting sample .

The polymerase chain reaction (PCR) is an indispensable step in the molecular studies having as object the genome because it allows the selective amplification of a specific target through the use of specific primers that anneal to constant regions of the target gene ; then , thanks to the PCR , we get several copies of the gene you want to amplify (about 2^n where n is the number of cycles) and also you can select the region under study on the basis of the type of analysis you want to perform : for the study of bacterial communities in a given sample is amplified the gene for ribosomal 16S and 18S fungal communities .

The peculiarity of the ribosomal genes lies in the fact that these can be defined molecular clocks : genes are present in all the species which undergo mutations with constant rate and thus can serve as yardstick for analyzing the evolutionary distance between the sequences in question .

The ribosomal genes contain conserved sequences universal and this is sufficient to use a single copy of universal primers that will go to match them to PCR amplify all ribosomal genes (16S or 18S) contained in the sample despite these have , in the inner region , different sequence (hypervariable regions) .

It is thanks to the amplification of the same gene but having different internal sequence that can be evaluated with the DGGE biodiversity within the sample.

It is possible to perform PCR using either material as it is and making a dilution precedent for limiting the possible interaction of inhibitors that may affect the success of the polymerase chain reaction . Generally, the dilution used is 1:10 with 5 l of DNA and 45 μ L of water, but are also possible other orders of dilutions .

DNA , undiluted or diluted , are added to 20 L of mastermix .

The mastermix used is formed from four components :

- 5X HOT FIRE Pol (Solis Biodyne , Tartu , Estonia) , containing all substrates and cofactors necessary for the amplification reaction , such as Mg^{++} , deoxyribonucleotides , buffer, and the enzyme Taq polymerase, a thermostable polymerase that performs the duplication of the target gene ;

- Forward Primer
- reverse primer
- Water

In the case of PCR DGGE that precedes the one of the two primers should contain the GC -clamp , a terminal tail rich in guanine and cytosine which are not denatured during the race , and this is essential for a good resolution of the bands , and then the success of run in denaturing gradient gel .

The primers used in the amplification of ribosomal genes are the following :

- For the 16S : 341_FGC , forward primer containing GC -clamp , and 534_R_hplc , reverse primer ;

- For the 18S : FUN_NS , forward primer , and GC_fung , reverse primer containing GC -clamp .

The test tubes containing DNA and master mix are placed in the thermal cycler which , due to temperature variations , allows the cyclical sequence of the various stages of PCR.

PCR can distinguish three main phases, repeated on average thirty times :

- Denaturation : in this phase , due to the attainment of a temperature of about 94 ° C the two helices of DNA are separated :

- Pairing : the temperature of this phase , in which the primers anneal to conserved regions of the target gene , is calculated according to the sequences of the two primers , however, is around 50-55 ° C.

- Elongation : the temperature is around 72 ° C , ideal for the activity of taq polymerase , using as template the complementary sequences and as the primer annealing region between the primer and the target gene , stretching the filaments target.

It is obtained in this way in each tube a mixture of the amplified gene . If in the sample are multiple types of the same gene , then target genes with different internal sequence , these are all amplified.

To evaluate the success of PCR is required to run the samples in electrophoresis .

Electrophoresis is based on the principle that the DNA molecules , for the presence of negatively charged phosphate groups , when subjected to an electric field migrate toward the positive pole ; loading the DNA in a molecular sieve , such as agarose, these will migrate according to their length , their conformation and their molecular weight . With molecular sieve means in fact a gel in which the resistance to the movement of a particle increases with the size of the particle itself . The pores of the agarose gel , which have different sizes depending on the concentration of the gel, slow down the stroke of the DNA strands : those in smaller will run more, those at a larger size will run less and the fragments with the same size will run with the same speed . This is the basic principle of electrophoresis .

When amplify the 16S and 18S ribosomal genes , with length of 220 bp to 400 bp of the first and for the second , the concentration of the gel must be 1 , 8 % , this means that for every 100 ml of buffer Bionic Buffer , are added 1.8 g of agarose. Gel is added also the dye Syber safe (Life Technologies) which

binds to DNA allows the viewing when excited by ultraviolet radiation in the transilluminator .

The samples are loaded at the level of the wells once inserted the gel inside the electrophoresis cell containing the same buffer with which the gel was prepared (bionic buffer) . The buffer has the dual function of conductor of electric current and the control of pH during electrophoresis .

In addition to loading the samples and the negative control must be loaded also one molecular weight standards (Fast Low Range Ruler , Fermentas), the standard is a mixture of fragments with known length , which must be made to run in electrophoresis to be compared with the target amplified by PCR . If , after electrophoresis , the band sample is at the correct height relative to the bandwidth of the standard with the length most similar to that of the target gene , then the PCR was successful and was amplified target and not a nonspecific .

After loading the samples, the negative control and the standard , it closes the electrophoresis cell and applies an electric field of 100 V for 14 minutes .

After the race you place the gel in transilluminator that detects the image .

In the agarose gel the samples run on the basis of their molecular weight , so it is expected to obtain for each sample loaded a single band .

From the image one can deduce many information: the presence or absence of the band indicates whether the amplification occurred or not , the intensity of the band gives an approximate idea of the amount of amplified , the comparison between the band obtained in the sample and the standard indicates whether the target was amplified or non-specific , also the characteristics of the negative control line provides guidance on contamination :a clean control indicates the absence of contamination while the presence of bands in the control indicates a possible contamination .

3.5 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) .

The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is a molecular biology technique used to separate segments of dsDNA based on their nucleotide sequence , particularly that allows to discriminate fragments having the same length but different composition in terms of bases . The size of the fragments is possible to discriminate that varies from 200 to 700 bp .

The DGGE gel is a polyacrylamide gel prepared with an increasing gradient formed from a mixture of urea and formamide able precisely to denature the dsDNA molecules , and then to break the hydrogen bonds between the nucleobases . Based on the nucleotide composition of the DNA fragment denaturation will be completed at a different point of the gel and the polynucleotide will remain trapped in the mesh of this in a different region , corresponding to the denaturing gradient suitable to cleave all the hydrogen bonds present between the bases .

A single region of the fragment remains double helix : one which is formed thanks to GCclamp of one of the primers used in PCR that precedes the DGGE ; this particular primer used in DGGE possesses a terminal tail of GC , the GC clamp, which serves as a mold PCR for the formation of a double-stranded region rich in GC ; should be noted that the hydrogen bonds between guanine and cytosine are three , and then a region rich in GC is more difficult to denature and remains double stranded during the run of denaturing gradient gel making possible a good resolution of the bands.

What can be observed at the term of the run in a DGGE gel in the case of analysis of metagenomic DNA of bacterial or fungal origin , are of molecular profiles , which can be defined fingerprints , which should be to highlight the biodiversity of the gene object of the present study in the starting sample , based on the amount of different bands detected , and also, albeit in an approximate way , the amount of DNA for each band of each lane, based on the intensity of the band.

The gel for the DGGE is formed by two regions of different composition : the running gel and the stacking gel , the first is the real denaturing gradient gel in which occurs the separation of the fragments based on the nucleotide sequence , the second , cast subsequently , and then situated in the apical part , is the region where the wells are placed and where then the samples are loaded . The function of the stacking is to make sure that samples start the race all in the same place : the interface between stacking and running .

The running gel is formed from two different solutions were prepared separately : a definite solution , and a solution defined Hi Low.

The concentrations of the two solutions are different according to the gene that is to be analyzed : for the low 16S must have a final concentration of 40% acrylamide , the Hi of 60% , while for the low 18S must have a final concentration of 20 % and 35% of the Hi . This means that the denaturing

gradient gel ranging from a maximum of 60 % to a minimum of 40 % in the case of 16S and a maximum of 35 % to a minimum of 20 % in the gel 18S .

The starting solutions are two: one at 60% and 0%.

The polymerization of acrylamide occurs only in the presence of TEMED and ammonium persulfate (APS) : the TEMED catalyzes the decomposition of the persulfate ion with the production of a free radical SO_4^- ; during the free radical polymerization , which has an unpaired electron , reacts with the monomer of acrylamide and form a single bond sharing its unpaired electron with one from the outer shell of the molecule of the monomer. In this way acrylamide linked to the radical has an unpaired electron and goes to polymerize with another monomer of acrylamide ; the reaction proceeds leading to the formation of acrylamide in a timely manner. Therefore TEMED and APS must be added to the two solutions .

The denaturing gradient is formed inside of the gradient former in which the two solutions are poured , and this is connected to a peristaltic pump which has a tube output at the end of which there is a needle inserted into the slot of the two glasses where is poured the gel .

At the end of polymerization of the running, which lasts three hours, with a pipettor stacking gel composed of a 10% solution of acrylamide in TAE 0.5 X to which are added APS and TEMED as catalysts of the polymerization reaction .

Once it has been the polymerization of the stacking gel , step that requires 30 minutes, the comb is removed and the cassette is inserted in the tank containing TAE 0.5 X , a buffer preheated to 60 ° C , apply a low voltage (low voltage) and loading the samples using a Hamilton syringe .

Finished loading the tank is closed and the Hi voltage is applied to the stroke of DGGE is 100V .

The race has a duration of about 16 hours , after which it proceeds with the staining of the gel covering it completely with a solution of TAE 0 , 5X and 1X dye Syber gold (FIRM) .

After staining the gel you have in transilluminator and proceed with the photo. The resulting image , if the run is successful, showing for each lane (lane) , a series of bands that reflect the positions at which the dsDNA fragments are denatured, and then they stopped the migration , due to the denaturing gradients .

Right from the simple observation of the picture can be drawn of the obtained preliminary information : biodiversity within the sample according to the number of bands obtained in the same lane, the approximate amount of different fragments for each band based on the intensity of fluorescence , biodiversity between different samples of the different line according to different bands among the different lanes .

For a more detailed and rigorous analysis of results you can use different software, such as Quantity One with whom you can go to mathematically evaluate the similarity of the profiles belonging to different samples.

The first step consists in the comparison of parallel lanes discriminating bands that have made the same migration from those which have stopped their path at different heights. Once the selection of the bands the program automatically calculates a tree dendrogram that reflects the evolutionary distance but not the similarity (or distance) in terms of biodiversity within the sample : most of the bands profiles of two different line will be similar , the lower the calculated distance , more profiles will be different , the greater the distance .

3.6 Quantitative PCR (qPCR) .

The quantitative PCR , or real-time PCR , PCR is a technique that allows the selective amplification of the target gene and its simultaneous quantification. The phases of the Real Time are substantially the same as a classic PCR : denaturation, annealing and elongation , with the difference that , in each cycle , the amount of amplicon is detected .

The detection of the concentration of the target gene occurs with the addition of fluorescent reagents in the reaction mix ; these go to bind to DNA by emitting a fluorescence proportional to the amount of target present in the sample at each cycle .

At each cycle of PCR, the concentration of the target gene is doubled , so the curve provided by the tool that allows amplification and detection of fluorescence will be a sigmoid . The shape of the curve is also due to the fact that initially the target is in minimum quantities .

The operator must set a threshold value below which the fluorescence is considered as background noise (background) and not arising selective amplification of the target.

With the threshold cycle (Ct) denotes the cycle at which the fluorescence exceeds the threshold and is proportional to the amount of target present in the sample starting before it is subjected to PCR : the higher the initial amount of DNA , the smaller the number of cycles necessary so that the fluorescence exceeds the threshold value is detected and , on the contrary , the smaller the amount of starting DNA , the higher the Ct value .

To go to quantify the target present in the initial sample , there are two methods : absolute quantification and relative quantification . In the first case the amount of target in the sample is measured by interpolating the sigmoid curve obtained by a "standard" obtained by Ct detected by serial dilutions of a sample of known concentration. In the second case comparing Ct obtained with those of a housekeeping gene of reference.

- Essential FastStart (Roche) , containing all the components necessary for the polymerization reaction , such as deoxyribonucleotides , Mg + + , buffer and Taq polymerase , as well as the SYBR Green , intercalating agent that allows the quantification of the target thanks to the emission of fluorescence ;

- Forward primer ;
- reverse primer ;
- Water.

The dye used to go to detect the amount of amplified target gene is the SYBR Green , an intercalating agent which increases its fluorescence when it intercalates into the major groove of DNA.

Consequently the greater the amount of fluorescence detected , the greater the amount of amplified target .

Due to the fact that the SYBR Green is not specific for a given target sequence , but indiscriminately binds to double-stranded DNA , the instrument that detects the amount of target also performs the detection of what is defined as dissociation curve , which allows to understand, due to prior knowledge of the T_m (melting temperature) of the target, if the gene was amplified under study or nonspecific .

4 . RESULTS

4.1 Validation of molecular methods for the study of the microflora in the roots.

The study of bacterial communities endosymbionts of the root , which is used to investigate the changes in the microflora when the plant is possessed with substrates containing different concentrations of compost " Big Bag" arising from residues from oil mills , requires as a preliminary step towards the identification of the best protocol for extracting genetic material from the roots. The extraction of metagenomic DNA is in fact a crucial step for subsequent molecular analysis , since it is essential to preserve the microbial diversity present in the original sample . Most of the genetic material of plant origin is in fact , as a result it is essential to use an extraction protocol that allows the purification of the majority of bacterial and fungal material present in the root , so as to be able to accurately assess biodiversity in the samples subjected the different thesis.

The protocols evaluated in order to search for the best method of extraction of total DNA from roots are three , which differ substantially in the initial stages of extraction.

The differences relate to three main points:

- Presence or absence of a phase of freezing at -80°C and subsequent mechanical lysis of membranes and cell walls by pestle, with increased release of microorganisms of the root endophytes .
- Adding or less of PSS (Phenolic Separation Solution) solution capable of binding phenols preventing them bind the genetic material and then used to counteract the possible loss of biodiversity.
- Adding RNase A previously or subsequently to the heating of the sample by bath at 65°C .

In the first protocol the freezing phase is absent and the sample is simply fragmented through the use of scissors , there is addition of PSS and RNase A is inserted into the test tube containing the sample before heating the same .

The second protocol provides instead a step of freezing at -80°C immediately followed by partial mechanical lysis of the sample through the use of a pestle manual. Furthermore, the RNase A is added after the heating of the sample to prevent this , being an enzyme , is denatured and lose functionality.

The third protocol , as the second , provides for freezing , pestellamento and addition of RNase A in subsequent times to the bath at 65°C , with the only difference that in this

If there is also the addition , at the beginning of the extraction, the PSS .

To go to evaluate the efficiency of the three methods of extraction are used three replicated , then three samples taken from the same plant , roots of potted plant *Photinia fraseri* ; each replicate was subjected to all three protocols.

Molecular analysis which allows to evaluate which of the methodologies with greater efficiency in order to maintain the biodiversity of the microflora is gel electrophoresis on denaturing gradient , both performed to assess the validity of the protocols with regard to the extraction of bacterial DNA , then through a DGGE in which they are made to run amplified 16S ribosomal gene , both as regards the extraction of fungal DNA , with a DGGE performed on samples of the amplified 18S ribosomal gene .

By analyzing the images obtained by DGGE you may notice that all of the profiles obtained are rich bands , which reflects a high microbial diversity in the analyzed sample . In any case it is clear that the best results in terms of maintaining biodiversity is achieved with the third protocol . This is observed especially with the comparison of the lanes in detail regarding the extraction of the first sample of the three replicated in all , and all three protocols : with the simple observation it can be noted that the sample labeled Ra_7 , then the replicated alpha extracted with the third method , presents a number of major bands in comparison to the same sample whose genetic material was extracted with protocols one and two.

In the analysis of the picture obtained from the DGGE gels were run in which samples of amplified 18S gene , with the aim to evaluate the variability of the fungal component through the use of the three protocols , once again the best profile is obtained from the sample extracted with the third method , although the differences are smaller than those observed for the analysis of bacteria and profiles of the three replicated do not differ by much. Although the differences are not so evident in all three replicated it is preferred to choose the third protocol to avoid loss of biodiversity in the extraction of total DNA from successive samples of roots .

A key point in choosing the best extraction protocol covers not only the maintenance of biodiversity in the sample of origin , but also the reproducibility of the profiles: replicated from the same plant , if subjected to the same protocol , they should give an account if you do not at least equal very similar in DGGE .

This point is essential to avoid that the alleged biodiversity present in different samples is not dependent on the method of extraction, but only by the differences in composition in terms of the microflora of the initial sample .

Importantly, however, the differences between profiles replicated not necessarily depend on the method of extraction, but could be due to the sampling phase . The replicated are in fact taken from the same plant , but in different regions of the root , so it is possible that by sampling several portions in these there is the presence of a microflora not homogeneous , and

consequently what you get in DGGE profiles are different at least in part between them.

In the analysis of 18S rRNA gene on the fungal community , there is a low reproducibility of the profiles between samples drawn by the same protocol but a great similarity between themselves replicated extracted by different methods. This could go to support the hypothesis that the differences that exist between different replicated in the case of 18S , are due to sampling procedures, and this could explain the lack of homogeneity between samples taken from the same plant and subjected to the same protocol extraction and the huge similarity between the same replicated extracted with different protocols . To overcome this possible problem related to sampling , in the analyzes that follow was made particular attention to the homogenization step of the pool of samples from different plants of the same variety as well as to improve the reproducibility of the DGGE profiles .

As regards the variability of the profiles of bacterial communities between replicated on the same plant and of different plants of the same variety DGGE analysis was performed on samples of the gene 16S ribosomal extracts from *Osmantus burkwoodii* .

From the image of the three groups of three replicated sampled from the three plants *Osmantus burkwoodii* it can be noted that the profiles of samples taken from the same plant are very similar to each other , it is likely that the index of reproducibility of the profiles of 16S when using the third extraction protocol . Also going to compare the replicated different plant between them it can be noted that also the variability within the same strain is very low , the profiles are indeed very similar.

An interesting feature of the gels that show molecular profiles obtained from the race in DGGE of amplified 16S ribosomal gene derived from extracts of the genetic material radical , is the presence in each lane , regardless of the protocol used , close-ups of two bands of the other more obvious . This peculiarity in the profiles of the samples was found in all amplified with DGGE of 16S extracted from the roots.

The assumption made is that these labeled bands represent the 16S ribosomal gene of coloroplasti ; this would explain both the ubiquity that the intensity of emitted fluorescence , greater than the other bands but natural since the material most abundant gene is derived from the root same .

The determination of the validity of the protocols of extraction was done not only with the aim of optimizing the parameters of maintaining biodiversity and reproducibility of the profiles , but also to search the methodology able to give the best yield in terms of the amount of genetic material extracted.

The quantification of the target gene extracted with different protocols has been done by performing a PCR having as target the 16S ribosomal gene . From the statistical data obtained by performing Real Time PCR on the nine samples can be observed that there are significant differences between the

threshold cycles obtained with the different protocols and this means that the amount of DNA extracted is very similar. It can however be noted that the average cost less , when you consider all the values of the threshold cycles for each protocol is given by the third method (14.4166), while the largest with the first (15.945) .

Consequently , despite the difference is statistically insignificant , the third protocol, even from a point of view of the amount of genetic material extracted , seems to be the best choice to perform the extraction of total DNA from roots .

4.2 Effects of compost "Big Bag " on the microbial diversity of soil and roots.

One of the current problems of nurseries is the search for a component by potting able to adequately replace the peat , currently used , which has the disadvantage of being a product with non-renewable and increasingly high costs .

The research project PIF - SAN SOIL in which you insert this thesis , the purpose of going to evaluate the possibility of using the Big Bag compost prepared from composted waste from oil mills , in the specific case pomace as substrate potting replacement . Among the various effects that the products used nell'invasatura have on plants, there is also to direct and indirect influence on the microbial population of the soil, rhizosphere and roots. On this basis it is essential to go to assess what are the possible effects that the compost Big Bag has microflora , taking into consideration the fact that changes in the population may be reflected in changes in the growth and health of the plant. The substrates used are composed of different combinations of BB compost with peat . These combinations of the two components represent the various thesis under investigation :

- TC : Witness business only with peat - manured
- BB_33_C : Peat replaced 33% with compost " Big Bag" - manured
- BB_66_C : Peat replaced 66% with compost " Big Bag" - manured
- BB_100_C : Peat replaced 100% with compost " Big Bag" - manured
- TNC: Witness business only with peat - non- manured
- BB_33_NC : Peat replaced 33% with compost " Big Bag" - not fertilized ;
- BB_66_NC : Peat replaced 66% with compost " Big Bag" - not fertilized ;
- BB_100_NC : Peat replaced 100% with compost " Big Bag" - not fertilized ;

The importance of evaluating different arguments , each containing a concentration characteristic of compost under study lies in the fact that in addition to trying to identify the adequacy or otherwise of olive oil mills wastes as substrates for potting and the effects these have on the microbial population , you should also look for the best concentration to which these bring the greatest benefits to the plant .

The effects of the different theses have on the microbial population of the soil and roots were evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) . The technique allows , thanks to the use of a denaturing gradient gel , to separate DNA fragments having the same length but different composition in terms of bases . This means that the 16S and 18S ribosomal genes , with entire sequence different in different microorganisms , complete denaturation in different regions of the gel. As a result , through the study of the gel and of

the different bands that are found of different wools, you can assess the biodiversity within individual samples and discrepancies from the point of view of microbial populations between different samples in order to assess the effects various concentrations of compost Big Bag have on the microflora .

4.2.1 Effects of compost "Big Bag " on the soil bacterial biodiversity .

The analysis of changes in the bacterial population in soil samples taken from plants of *Cupressus sempervirens* ' pyramidalis ', *Prunus* and *Viburnum lucidum laurocersaus* subjected to various thesis was carried out by analyzing the DGGE gels were run in which the amplified products of 16S ribosomal gene prepared from extracts of the three plants subjected to various experimental thesis . each lane represents the bacterial community present in the treated sample and / or control.

The presence of several bands in all lanes of the gel is indicative of high biodiversity in all samples , both in controls, fertilized and unfertilized , and in the lanes corresponding to the tested samples with different concentrations of compost , and this suggests that the ' overall effect of the use of compost Big Bag on microbial biodiversity is not a negative effect.

In the images of the DGGE gel of the plant *Cupressus sempervirens* " Pyramidalis " *Viburnum lucidum* and *Prunus laurocerasus* you may notice changes in the profiles but no decline in biodiversity . This indicates that the matrix that is used , change the microbial population , but does not go to decrease the number of species present , even if these at least in part change precisely in relation to the variations of the substrate by potting .

From the dendrogram obtained from the comparison of the profiles , you can get the same considerations : the matrices used, then the thesis in which the peat is replaced by increasing amounts of compost Big Bag , go to influence the microbial population , modifying , and this can be seen by the fact that both the dendrogram of *Viburnum lucidum* that one of *Prunus laurocerasus* show controls manured (TC) and unfertilized (TNC) form a cluster in part , as well as the thesis 33_C and 33_NC , those containing minor amounts of Big Bag .The same data can be derived from the similarity matrices of *Prunus* and *Viburnum lucidum laurocersaus* , calculated based on the comparison of the bands in the different lanes of the gel , the percentage of similarity between the controls , TC and TNC , in fact it is 63% for *Viburnum* and 52.6 % for *Prunus* , while between the thesis 33_C and 33_NC is of 59.7 % and 67.4 % for *Viburnum* for *Prunus* .

Furthermore, the similarity is greater than just between the thesis 33_C , 33_NC and their controls, while decreases between these four samples and all other in which there is a greater amount of compost .

For example , the matrices is obtained that the similarity between the TC and the 100_C is only 15.2 % and 26.8 % in *Viburnum* in *Prunus* , while between the TNC and the 100_NC is 17.7 % and 14.3 % respectively .

As a result , at least for these plants , we can deduce that there is a relationship between the amount of compost used in various thesis and modification of the bacterial population , while it seems to be little influence prior fertilization .

Regarding *Cupressus sempervirens* " *Pyramidalis* " can be seen equally a similarity of profiles between controls and TC TNC even if with a lower percentage value compared to the other two plant species : 38.9 % .

In addition, the similarity between the TC and its related treatments is always below 40% , while between the TNC and its thesis is lowered in relation to the concentration of compost : 43.4 % similarity with the thesis 33_NC , 32.1 % with the thesis 66_NC and 30 % with the 100_NC .

It can therefore be inferred that also in the case of the use of compost *Cupressus* ports to obvious modifications of the bacterial population , with the appearance of new bands in DGGE and in some cases also with increase of the ' intensity of the bands already present in the control.

The general fact is that you can get the stimulating effect of the compost on the bacterial population that varies , even enriching , when the Big Bag is used as a potting substrate .

4.2.2 Effects of compost "Big Bag " on the fungal biodiversity of the soil.

The gels that show the stroke of samples in which the gene was amplified ribosomal 18S for the evaluation of the fungal population in soil samples taken from plants potted *Cupressus sempervirens* " *Pyramidalis* " , *Viburnum lucidum* and *Prunus laurocerasus* , reveal that the use Big Bag of compost makes no changes with respect to negative mushrooms, therefore there is no decline in biodiversity .

Going to observe in detail the photo of *Cupressus* you may notice a positive effect , with growth of the microbial population and biodiversity , especially as regards the treatments without mineral fertilization (NC) . The witness corporate unfertilized presents , in fact , a limited number of bands , while the respective treated samples , regardless of the concentration of the compost , show a clear increase of biodiversity , corresponding to the appearance of new bands , and an increase of the intensity of bands already present the TNC . This demonstrates that there is an intake of exogenous populations from the compost and at the same time , a stimulation of native ones .

This effect is less evident in the samples subjected to the various fertilized thesis , although an increase in biodiversity can be observed especially in samples 66_C and 100_C .

From the dendrogram of *Cupressus* showing the similarity between the different profiles , one can come to the same conclusion : the controls , which is not fertilized fertilized , have a low degree of similarity with the other samples , particularly the witness is not fertilized which shows a very marked difference with the other profiles .

From the similarity matrix calculated from the analysis of the gel *Cupressus* , the difference between the TNC and the samples subjected to different unfertilized thesis is even more evident : 22.5 % similarity with the 33_NC and only 7.8 % and 10.1 % with the 66_NC and 100_NC .

The different samples subjected to different thesis are more similar to each other , regardless of the concentration of compost to which they have been subjected , especially with regard to the unfertilized , fertilized while in the samples subjected to different thesis there is a greater similarity between 66_C and 100_C (56.4 %) rather than between them and the 33_C . Consequently , at least in part , the effect may be dose-dependent .

The same is done in the analysis of the effects of the *Cupressus sempervirens* thesis on " *Pyramidalis* " can be applied to *Prunus* and *Viburnum lucidum laurocersaus* . Even in these treatment plants have the effect of increasing biodiversity impoverishment of the population and not a fungal infection, as seen in the dendrograms of similarity between their greater controls than among controls and samples tested with the compost

From the matrices of *Viburnum* and *Prunus* are obtained percentages of similarity between the

controls 44.5 % and 34.6 % in Viburnum in Prunus , data higher than among the controls and the respective samples subjected to different treatments .

Even in Viburnum , as in Cupressus , the most obvious changes in the DGGE profiles are observed between the TNC and unfertilized samples treated with different concentrations of compost , the data that are obtained from the matrix in fact indicate a similarity of 17.3 % between the profile TNC and that of 66_NC , and 14.8 % between TNC and 100_NC .

Regarding Prunus these percentages are slightly larger , notwithstanding the low percentages of similarity between the control unfertilized (TNC) and the respective samples subjected to different thesis : 15.9 % with the 33_NC , 28.6 % and 25.7 % with the 66_NC with 100_NC .

An analysis of the fungal community can be seen as in all three varieties , treatments enrich the indigenous community .

4.2.3 Effects of compost "Big Bag " on the bacterial biodiversity of the roots.

The investigation of microbial biodiversity at the level of bacteria that live in the roots allows us to understand whether there are effects from the compost Big Bag that may be mediated by the endophytic and if these can affect the health of the plant.

The analysis of the bacterial dynamics in varieties of *Cupressus sempervirens* " *Pyramidalis* " , *Viburnum lucidum* and *Prunus laurocerasus* through the technique of DGGE has produced fingerprints of communities different from those obtained from analysis of the bacterial microflora of the soil.

The images on the three varieties treated with the thesis object of study (Fig. 20 , 21, 22) , show in general profiles although very rich biodiversity , to equal treatment , is lower than that provided by the soil samples. This figure is understandable because the soil ecosystem is certainly much more open than the environment radical which , in itself , represents a physical barrier for the soil bacteria that are then selected , becoming symbionts of the plant.

Another feature in common between the community profiles belonging to the third variety is constituted by the presence of at least 2-3 bands ubiquitous that do not depend from the treatments . It is probably of the resident populations naturally found inside the roots and which are not , therefore, made with the addition of compost.

In particular , one can observe a band with higher intensity than the other , which very probably refers to the 16S gene of chloroplasts , misprint phase DNA amplification , in which the primers specific for the constant portions of the target gene can also align with the 16S genes present within organelles of plant cells of the root (Aires et al. 2012, Hanshew et al. , 2013) .

An analysis of bacterial biodiversity that inhabits the roots of the 3 varieties treated with different percentages of compost Big Bag , one can observe changes in the profiles but not decline in biodiversity . Furthermore it is possible to obtain a numerical data of similarity through the construction of matrices that enable a one to one comparison of all samples .

The image of the DGGE gel but above the dendrogram of similarity relative DGGE analysis of *Cupressus sempervirens* " *Pyramidalis* " , shows a low value of similarity of about 42% between the control with mineral fertilization on the one hand , and the treatments and the unfertilized control on the other. In addition, it is also noted as an effect of the addition of compost profiles related to the treatments form a separate cluster , in particular the theses in which the peat is replaced by the 100% compost Big Bag.

The photo DGGE related to *Viburnum lucidum* also shows the profiles very rich , but it is possible to observe the values of the highest similarity among the controls , and not fertilized , and the respective thesis , in fact the range of

values obtained from a minimum of 63.1 % to a maximum of 83 , 4% for the dissertation in the presence of mineral fertilizer , and a range between 64.8 % and 75.3 % for samples from treated plants without mineral fertilizer .

From the dendrogram is possible to understand how the addition of compost has caused a change in the structure of the community , in fact the range of values of similarity that can be extrapolated from the matrix (Figure 23) goes from 46.8% to 63.6 % for thesis with the presence of mineral fertilizers and a range of 44.8% to 66.4% for those without mineral fertilizer .

The addition of compost Big Bag seems to have affected the bacterial microflora of roots, this is particularly evident for *Cupressus sempervirens* " *Pyramidalis* " and *Prunus laurocerasus* .

4.2.4 Effects of compost " Big Bag" Biodiversity of fungal root.

The investigation of the fungal community structure of the roots of 3 varieties Cupressus sempervirens " Pyramidalis " Viburnum lucidum and Prunus laurocerasus through the analysis shows DGGE profiles of different communities from those for Bacteria .

First, the profiles are more simple , with a lower number of bands and therefore a lower biodiversity .

The DGGE analysis on Cupressus sempervirens " Pyramidalis " show profiles very different from each other by highlighting the fact that the addition of compost Big Bag has influenced the community structure of the fungal , in particular when it replaces the peat to 100 % .

The similarity matrices derived from an analysis of the image of DGGE show a numerical data which confirms the previous observation , in fact it shows extremely low values of similarity between the samples and the respective control treatments (min. 18.5 % to a max. 50.4 % for the dissertation with mineral fertilizer and 17.9% - 54.1% for the dissertation without fertilizer) .

Regarding the investigation of fungal biodiversity in Viburnum lucidum and Prunus laurocerasus , it can be argued that this effect found for Cupressus , is even more evident .

In fact, the values of similarity between profiles drop significantly when the control devoid of fertilizer is compared with the thesis 33C , showing a value of less than 10% similarity .

Moreover, the effect of the addition of compost is also accentuated in Prunus, whose matrix shows that the structure of the fungal community is totally subverted when the compost completely replace peat in plants which has not been added mineral fertilizer .

The effect of the addition of compost as potting substrate in complete or partial replacement of peat on the root fungal community is very evident and to a greater extent than the effect found on the bacterial community .

4.3 Effects of compost " Big Bag" bacterial abundance of soil and roots.

The analysis of the bacterial microflora was completed through the study of the effects of the addition of compost to the Big Bag 3 varieties of plant on the abundance of bacteria present in the soil which in the roots.

The Real-Time qPCR analysis has highlighted that there are no apparent effect on the abundance of the total number of bacteria .

In particular the graphs in the figure show the values that are around at 10^{11} and 10^{10} cells / g starting sample for Bacteria of soil and roots , respectively , relative to all varieties analyzed , showing no significant difference between the different treatments.

So the addition of compost seems to have stimulated certain populations bacteria , as evidenced by the analysis of biodiversity , but this did not affect the total number of bacteria , probably because the positively selected populations were favored at the expense of others.

5 . SUMMARY OF RESULTS

This publication has been analyzed and evaluated the effect of the addition of compost made from waste from olive processing on soil microflora and roots of different varieties of plants grown in the nursery. And ' in fact , now generally accepted that the use of alternatives to peat matrices can be considered a good strategy , in both economic and ecological , for the breeding of plants floriculture industry . In particular , the waste of the oil industry may represent ideal candidates for this purpose because they can be processed into compost quality thanks to processes of transformation aerobic (Abad et al . 2001 , Altieri et al . 2009 , Altieri et al . 2010 , Federici et al. 2011).

In this work, to investigate the microbial biodiversity has been used a culture - independent approach , based on molecular methods of analysis of metagenomic DNA extracted from environmental samples. The first part of the study was , in fact, dedicated to the development of the method for extraction of total DNA from the roots. This step is the basis of all subsequent molecular analysis and differs from the extraction of DNA from soil into the roots because the genetic material is predominantly that of the plant . It was therefore essential to the development of a method capable of allowing the extraction of genome belonging to the microflora endosymbiont of the radical . Based on the criteria chosen for the validation of the method , or the ability to give the richest in DGGE profiles and amount of genetic material extracted was chosen only one protocol that would ensure good yields in terms of biodiversity abundance of target genes . In particular, the study protocol allowed the third most realistic of microbial biodiversity present in the sample, therefore, was chosen for the second part of this work.

In the second part were investigated microbial communities in soil and roots of plants *Cupressus sempervirens* " *Pyramidalis* " , *Prunus* and *Viburnum lucidum laurocersaus* , potted with eight different thesis, which are distinguished by the presence or absence of fertilization and the amount of compost "Big Bag " used as a substitute to peat .

The analysis of molecular profiles of 16S and 18S rRNA genes obtained from DGGE samples of soil and roots is possible to affirm that the bacterial and fungal communities , respectively , were modified by the addition of compost making an increase in biodiversity . In particular, the fungal populations of soil and roots were showing profoundly changed community structures very different from those found in plants grown with standard potting substrates . Biodiversity observed in treated samples indicates that the compost " Big Bag" does not make any adverse changes to the microbial community , in fact, new populations appeared as a result of the addition of compost while others were stimulated in quantity. For all three varieties investigated , also seemed clear that the effect on the soil microbial community is dose

dependent at least in part , because the main effects were observed when they were added to the 66 % and 100 % of compost.

Then it concludes that the effect produced by compost " Big Bag" on the microbial populations of the soil and root, both as regards the bacterial community that fungal , but not inhibition of stimulation, seen both as increased biodiversity both how to increase the charge of the species already present in the control.

In a study conducted by Kolton et al. 2010 was evaluated the impact of the addition of compost on the bacterial community of soil and roots of seedlings of red pepper grown in greenhouse and it was noted that , already after 3 months, in both environments the bacterial microflora was significantly affected in the structure . In addition, it has been hypothesized that populations stimulated by the addition of compost were partly responsible for the beneficial effects observed in the growth and development of the plant .

The impact of minor observed abundance of bacteria appears to be already known in the literature it is reported in studies conducted in the field and in the vase. Indeed , Nasini et al . 2013 had found that the addition of organic matter derived from waste to an olive oil mill , had not produced a significant increase in the number of bacteria in the soil , assuming that this type of organic soil could have an impact in the short term only. However, this work shows partly as an effect in the medium to long term (6 months) is possible , at least as regards the structure of the microbial community .

Tiquia et al . 2002 and Inbar at al. 2005 have observed that changes in the microflora may occur both in function of the different stages of plant development, but also by virtue of the chemical properties , physical and biological properties of the matrices used for the breeding of plants , in particular when it comes to compost .

In a study by Green et al. 2006 was monitored by the succession of bacterial communities during the early stages of development of cucumber seedlings to which had been added as a partial substitute for peat compost . In this case was observed influence of compost on bacterial populations present on the surface of the seed , in fact numerous microbial groups found in it , were also found in the soil used for the breeding , including the genus *Chryseobacterium* , and the family of *Oxalobacteraceae* . However, many of the species originally found in the seed, were no longer found at root level or during the stages of growth and development of the seed. This indicates how the habitat of the root operates a selection that shifts the balance of the initial microflora towards a new type of structure.

In this work, the effect of the compost Big Bag was also observed on microflorafungina , in particular in its structure. And ' in fact noted the important role played by fungi as primary decomposers of organic matter in the soil , it is in particular that of the Basidiomycota include mushrooms ligninolitici and some yeasts that play an active role in certain stages of the degradation of the substance organic (Karpouzas et al 2009). In the soil

there is a particular group of Fungi, defined Arbuscular Micorrizal Fungi (Fungi AM) , which develop of symbiotic relationships with the root system of plants . Among them are the endomycorrhizae , fungi that colonize the interior of roots. The beneficial effects of endomycorrhizae on plant growth are well documented including, of course , the stimulation of plant growth and intake of nutrients, such as phosphorus , zinc and copper (Pfeiffer , 2013) .

Ipsilantis et al . 2009 investigated the effect of waste water of vegetation on the soil-plant system of *Vicia faba* , with particular reference to the structure , diversity and capacity for colonization by AM fungi . From this study it was observed that the application of the difference in the presence of Mushrooms arbuscurali favored mineralization of phosphorus in the soil , suggesting and confirming the active involvement of this class of fungi in making nutrients available to the plant. This evidence suggests that changes in the structure of soil fungi and roots , respectively , in all varieties investigated in this work, may have favored those populations that contribute to the promotion of the health of the plant.

6 . CONCLUSIONS

This thesis work involved the study of bacterial and fungal communities in the soil and roots of different varieties of plants grown in pots and debugger compost derived from waste oil industry as a partial substitute for peat in potting substrate .

From the results obtained , it can be stated that the addition of compost " Big Bag" as a partial substitute for peat for the formulation of potting substrates may significantly alter the microbial communities associated with the host plant . It 'important to note that the microflora of soil and roots did not suffer growth inhibition seen a decline in total abundance of organisms. On the contrary , it was possible to observe a marked increase in the biodiversity of bacteria and fungi in the experimental thesis in which the compost replaced the peat. This allows ipotizziane a potential positive effect for the growth of the plant.

7. REFERENCES

Abad, M., Noguera, P., Burés, S., 2001. National inventory of organic wastes for use as growing media for ornamental potted plant production: case study in Spain. *Bioresource Technology* 77, 197e200.

Aires, T., Marbà, N., Serrao, E. A., Duarte, C. M. and Arnaud-Haond, S. (2012), Selective elimination of chloroplastial dna for metagenomics of bacteria associated with the green alga *Caulerpa taxifolia* (bryopsidophyceae). *Journal of Phycology*, 48: 483–490

Alissa S. Hanshew, Charles J. Mason, Kenneth F. Raffa, Cameron R. Currie, Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 95, Issue 2, November 2013, Pages 149-155

Altieri R., Esposito A., Baruzzi G., Use of olive mill waste mix as peat surrogate in substrate for strawberry soilless cultivation, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 64, Issue 7, October 2010, Pages 670-675

Altieri, R., Esposito, A., Parati, F., Lobianco, A., Pepi, M., 2009. Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 993e997.

Bodini, S.F., Cicalini, A.R., Santori, F., (2011). Rhizosphere dynamics during phytoremediation of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 102, 4383e4389.

Carlile W.H., 2001 – Growing media and the environmental lobby in the UK 1997-2001. ISHS Symposium "Growing Media & Hydroponics", Alnarp, Sweden, 8-14 September 2001

Della Greca M., Monac, P., Pinto G., Pollio A., Previtiera L., Temussi F., (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill wastewaters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 352–359.

Dennis, P.G., Miller, A.J. & Hirsch, P.R. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 313–327 (2010).

Federici E., Pepi M., Esposito A., Scargetta S., Fidati L., Gasperini S., Cenci G., Altieri R., (2011) Two-phase olive mill waste composting: Community dynamics and functional role of the resident microbiota. *Bioresource Technology* 102 10965– 10972

Federici F., Fava F., Kalogerakisc N., and Mantzavinosc D. (2009) Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *J Chem Technol Biotechnol* ; 84: 895–900 2009 Society of Chemical Industry

Green S.J., Inbar E., Frederick C. Michel Jr., Yitzhak Hadar, and Dror Minz, 2006. Succession of Bacterial Communities during Early Plant Development: Transition from Seed to Root and Effect of Compost Amendment. *Appl. Environ. Microbiol.* June 72:6 3975-3983;

Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. *Plant Soil* 312, 7–14 (2008).

Hiltner L. 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berücksichtigung der Grundungen und Brauche. *ARL Dtsch Lasdwrt Ges Berl* 98: 59-78.

Inbar, E., S. J. Green, Y. Hadar, and D. Minz. 2005. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. *Microb. Ecol.* 50:73–81.

Ipsilantis I., Karpouzas G.D., Papadopoulou K., Ehaliotis C., 2009. Effects of soil application of olive mill wastewaters on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 41, Issue 12, December, Pages 2466-2476.

Karpouzas, D. G., Rousidou, C., Papadopoulou, K. K., Bekris, F., Zervakis, G. I., Singh, B. K. and Ehaliotis, C. (2009), Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of nitrogen fertilization, on the structure of rhizosphere–soil fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 70: 388–401.

Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Pages 879-882 in: *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter.* Vol. 2, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France.

Max Kolton, Yael Meller Harel, Zohar Pasternak, Ellen R. Graber, Yigal Elad, and Eddie Cytryn, 2011. Impact of Biochar Application to Soil on the Root-Associated Bacterial Community Structure of Fully Developed Greenhouse Pepper Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* July 2011 77:14 4924-4930.

Morillo J.A & Antizar-Ladislao B. & Monteoliva-Sánchez M. & Ramos-Cormenzana A & Russell N.J (2009) Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:25–39

Nasini L., Gigliotti G., Balduccini M.A., Federici E., Cenci G., Proietti P., Effect of solid olive-mill waste amendment on soil fertility and olive (*Olea europaea* L.) tree activity. 2013, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 164, 1 January, Pages 292-297.

Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sa´nchez-Monedero M.A., Bernal M.P., (1999). Characterization of olive-mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* 67, 111–115

Paredes M.J., Moreno E., Ramos-Cormenzana A., Martinez J., (1987).

Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere* 16 (7), 1557–1564

Penny R & Mauchline H. T, Who's who in the plant root microbiome?.
Nature Biotechnology 30, 961–962 (2012)

Pfeiffer, M. Mycorrhizae and plant growth. (2013). Pesticide training resources. Rana G., Rinaldi M., Introna M.,(2003) . Volatilisation of substances alter spreading olive oil waste water on the soil in a Mediterranean environment. Agriculture, Ecosystems and Environment 96, 49–58.

Roig A., Cayuela M.L. , Sa´nchez-Monedero M.A., Spain Accepted 5 July (2005). Available online 24 October 2005 (A. Roig et al. / Waste Management 26(2006) 960–969) An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, CEBAS CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia,

Schmilewski G., 2000 – Sustainable horticulture with peat – a German case study, Peatlands International 1: 27-30

Tiquia, S. M., J. Lloyd, D. A. Herms, H. A. J. Hoitink, and F. C. Michel, Jr. 2002. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR amplified 16S rRNA genes. Appl. Soil Ecol. 21:31–48.

Varieta' di piante disponibili con il terriccio San Soil
Variety of plants available with San Soil



Acer palmatum 'Microphyllum'



Acer palmatum 'Crispifolium'



Acer palmatum 'Skeeters's Broom'



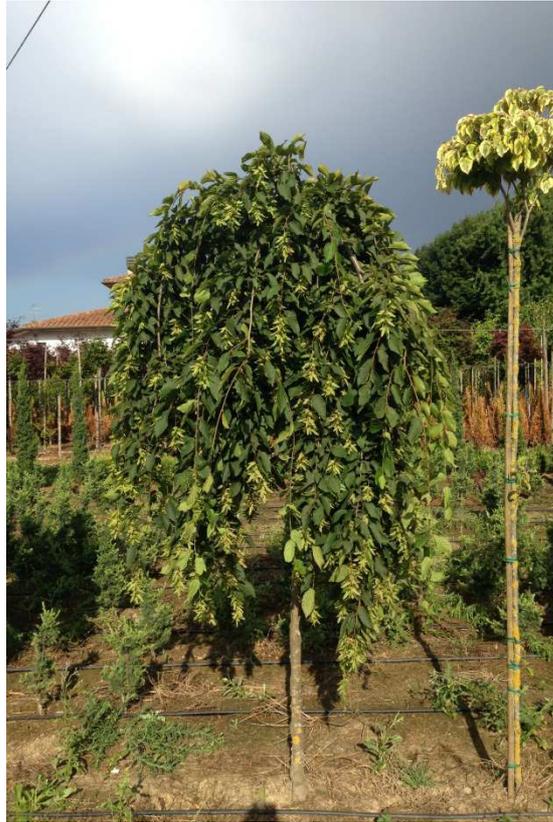
Aucuba japonica 'Crotonifolia'



Aucuba japonica 'Picturata'



Carpinus betulus 'Fastigiata'



Carpinus betulus 'Pendula'



Cupressocyparis leylandii



Cupressocyparis leylandii 'Gold Rider'



Cupressus macrocarpa 'Goldcrest'



Cupressus macrocarpa 'Goldcrest'



Euonymus japonicus 'Elegantissimus Aureus'



Ilex crenata 'Kimne'



Nerium oleander



Phoenix canariensis



Photinia fraseri 'Pink Marble'



Prunus lusitanica 'Angustifolia'



Prunus pandora



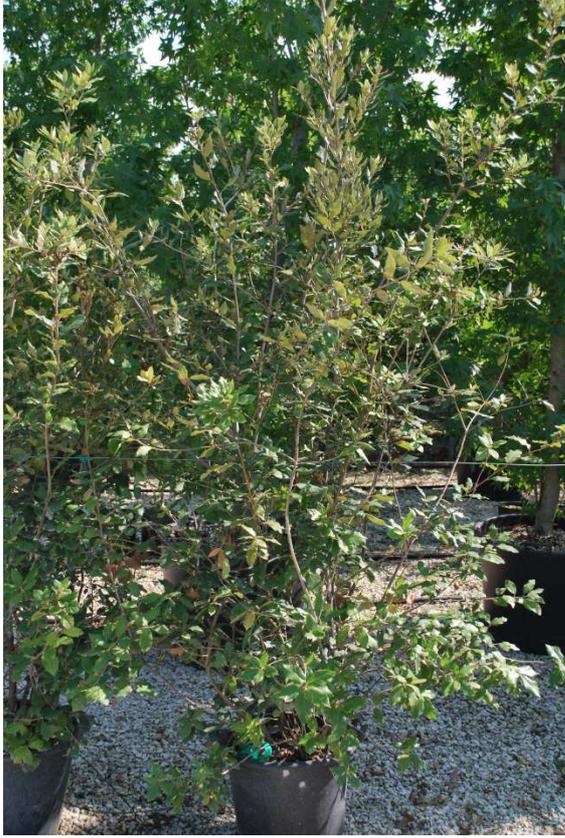
Prunus serrulata 'Taihaku'



Prunus serrulata 'Ukon'



Prunus virginiana 'Shubert'



Quercus ilex



Quercus palustris



Quercus robur 'Fastigiata' ('Skyrocket')



Rosmarinus officinalis



Santolina chamaecyparissus



Schinus molle



Sorbus 'Red Robin'



Taxus baccata



Teucrium fruticans



Thuya occidentalis 'Mr. Bowling Ball'



Thuja orientalis 'Pyramidalis Aurea'



Thuja orientalis 'Pyramidalis Aurea'



Thuja plicata 'Excelsa'



Thuja orientalis 'Pyramidalis Aurea'



Tilia tomentosa 'Brabant'



Viburnum eskimo



Viburnum tinus 'Eve Price'



Wisteria sinensis



Hosta 'Big Daddy'



Hosta 'Fire and Ice'



Hosta 'Wolverine'