

Progetto SOILSINK

LINEA 3 Diversità genetica e funzionale dei microrganismi

Attività 2

U.O. 5

Relazione attività svolta dall'Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo EnteCRA, gruppo coordinato dal Dr. Marcello Pagliai

L'attività dell'Unità Operativa 05 prevede il monitoraggio e lo studio della diversità della microflora batterica del suolo coinvolta in funzioni chiave nei cicli biogeochimici legati ai gas serra: il metabolismo degli acidi umici, del metano e dell'azoto. In particolare il nostro gruppo è interessato allo studio dell'espressione nella comunità microbica del suolo dei geni funzionali legati a tali processi. Al tal scopo è stato isolato e retrotrascritto mRNA direttamente dai campioni di suolo dei due siti sperimentali presi in esame nel progetto e localizzati nelle Marche ed in Sardegna, in maniera da consentire un possibile collegamento tra le sequenze di DNA eventualmente trovate e la loro effettiva funzionalità nel suolo.

Il primo campionamento del suolo avvenuto in ottobre presso l'Azienda Agraria Didattico-Sperimentale "Pasquale Rosati" di Agugliano (Ancona) è stato utilizzato per la messa a punto del metodo estrazione dell'RNA e per la scelta delle coppie di primer e di protocolli di amplificazione del cDNA retrotrascritto, come espressione di vari processi operati dai batteri della comunità microbica del suolo (denitrificazione, azotofissazione, ossidazione dell'ammonio ed ossidazione del metano).

Il campionamento del suolo è stato eseguito sulle parcelle coltivate a mais, su 2 livelli di lavorazione (non lavorazione e lavorazione tradizionale) e su 2 livelli di concimazione azotata (nessuna concimazione, NH_4NO_3 90 Kg/ha).

Affinché l'RNA presente, sia messaggero sia ribosomale, rimanesse integro e non venisse degradato, i campioni di suolo sono stati prelevati ed immediatamente congelati in azoto liquido a -190°C , arrivati la sera in Istituto sono stati trasferiti nel freezer a -80°C e li conservati fino al momento dell'estrazione.

L'isolamento di RNA è risultato complicato dal fatto che il suolo in questione fosse ricco di argille alle quali presumibilmente gli acidi nucleici risultavano fortemente adsorbiti. Pertanto sono stati testati diversi protocolli di estrazione, descritti da vari autori in letteratura, al fine di trovare quello che permetta una maggiore resa di RNA totale non degradato. Sono state testate anche varie sostanze chimiche a varie concentrazioni (NaCl, Na-metafosfato ed EDTA) che potessero facilitare il distacco degli acidi nucleici dalle argille.

L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita su tre repliche per parcella utilizzando il Total RNA Isolation Kit RNA PowerSoil™ – MO BIO Lab Inc., con l'aggiunta alla soluzione di lisi di 0,5 M EDTA. L'RNA estratto, sia messaggero che ribosomale, è stato successivamente purificato mediante colonne presenti nel kit allo scopo di eliminare contaminanti, quali acidi umici e DNA,

che potessero inibire le reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione, (Figura 1a) e trattato con DNase (Figura1b).

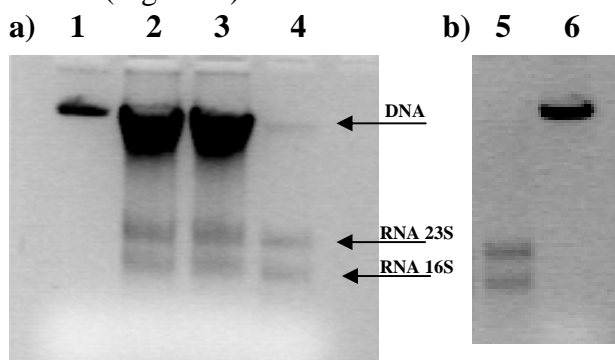


Figura 1: Isolamento degli acidi nucleici dal suolo prelevato in Agugliano (Ancona).

- a) Lane 1: DNA λ ; Lane 2 e 3: DNA + RNA estratto con il kit PowerSoilTM;
Lane 4: dopo purificazione su colonna;
- b) Lane 5: RNA dopo trattamento con DNase;
Lane 6: DNA λ .

L'RNA isolato è stato utilizzato come stampo per la sintesi di cDNA al fine di valutare l'espressione di geni funzionali specifici presenti nel suolo e legati al ciclo del carbonio e dell'azoto. La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando il kit per retrotrascrizione ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) e come iniziatori sia una miscela di esameri a sequenza random sia oligonucleotidi specifici per i geni in questione. Lo studio dell'espressione genica è stata eseguita mediante amplificazione del cDNA sintetizzato con primer specifici per i geni in esame (RT-PCR).

Come controllo dell'effettiva sintesi di cDNA dai campioni di RNA estratto sono state eseguite reazioni di amplificazioni utilizzando primer specifici per geni del rRNA 16S come stampo sia il cDNA sintetizzato sia l'RNA purificato (al fine di valutare l'assenza di DNA co-estratto contaminante).

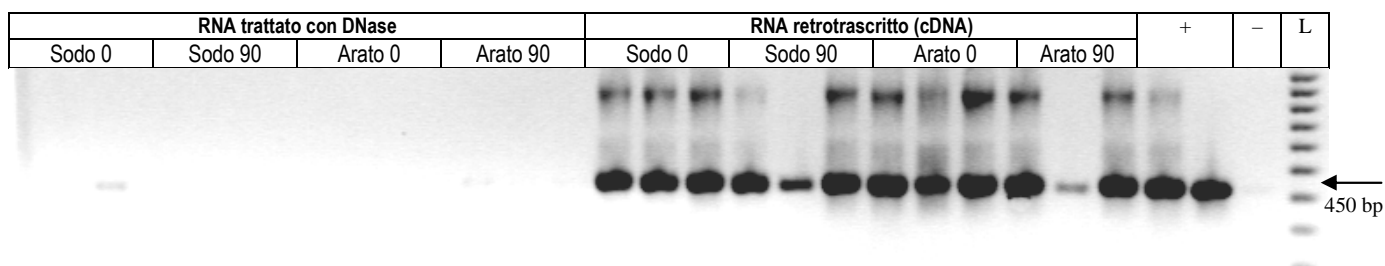


Figura 2. Amplificazione con i primer 968f e 1401r specifici per rDNA 16S eubatterico dell'RNA estratto dai campioni di suolo e del cDNA sintetizzato.

- Sodo 0 = non lavorato/non concimazione; Sodo 90= non lavorato/90 Kg/ha di NH_4NO_3 ; Arato 0 = lavorazione tradizionale/non concimazione; Arato 90= lavorazione tradizionale/90 Kg/ha di NH_4NO_3
- + = controllo positivo; - = controllo negativo; L = ladder 1 Kb

L'RNA ribosomale 16S estratto dai campioni di suolo è stato efficientemente retrotrascritto e l'amplificazione del cDNA ottenuto ha portato alla sintesi di un frammento di DNA delle dimensioni attese in tutti i campioni di suolo analizzati.

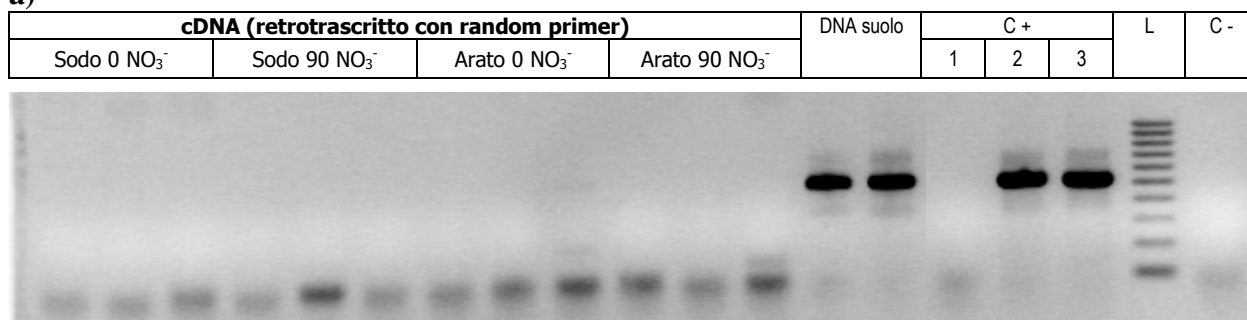
Il cDNA sintetizzato è stato poi utilizzato per l'amplificazione di geni funzionali coinvolti nei processi dei cicli biogeochimici del carbonio e dell'azoto. Essendo però l'mRNA estratto in basse quantità, rispetto anche all'RNA ribosomale, si è reso necessario operare un protocollo di amplificazione "nested" per tutti i geni funzionali analizzati, utilizzando due coppie di primer

diverse, una nel primo step di amplificazione, che amplifica un frammento piu' ampio ed una nel secondo step che riconosce sequenze interne al primo frammento generando così un frammento di minor dimensione.

In figura 2 sono riportati i risultati delle elettroforesi su gel d'agarosio eseguite sulle amplificazione dei cDNA sintetizzati dai campioni di RNA estratto da suolo, utilizzando due coppie di primer specifici per il gene *pmoA* che codifica per la proteina metano-monossigenasi particolata (pMMO) coinvolta nell'ossidazione del metano, importante gas ad effetto serra.

Con la prima amplificazione non sono stati ottenuti frammenti di DNA in quantità tali da essere visibili tramite elettroforesi su gel d'agarosio pertanto è stata eseguita una seconda amplificazione utilizzando come stampo 2 µl della mix di reazione della prima amplificazione ed una coppia di primer diversi.

a)



b)

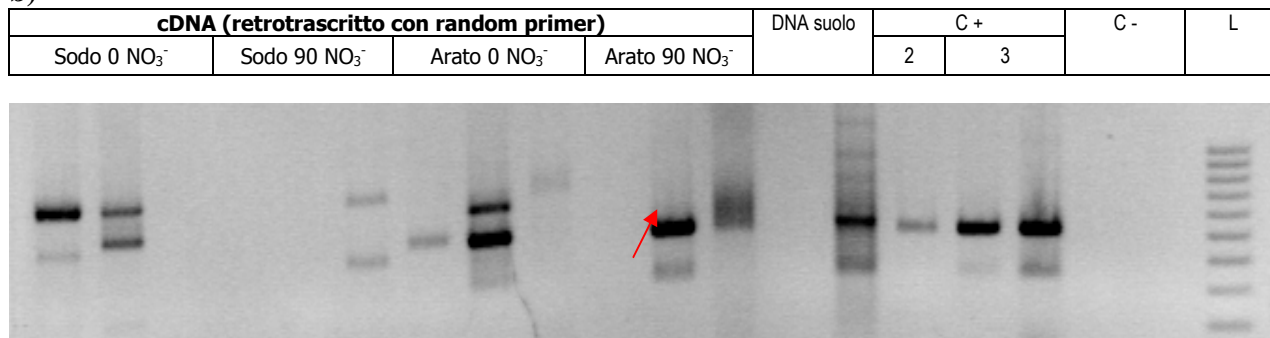


Figura 2. Amplificazione del gene *pmoA* per il gene .

a) Prima amplificazione con i primer A189f e A682r;

b) seconda amplificazione con i primer A189f e mb661r

DNA suolo = DNA estratto dai campioni di suolo 4.1.3. e 4.3.3.;

N = DNA ceppo ammonio-ossidante di riferimento (NCIMB11850) appartenente al genere *Nitrosomonas*;

C + = DNA ceppo metanotrofo di riferimento (DSM13736) appartenente alla specie *Methylosarcina fibrata*;

1- RNA 2- DNA 3- cDNA;

L = ladder 1Kb.

Nella amplificazione nested si ottengono numerosi frammenti di DNA solo uno dei quali della dimensione attesa che corrisponde al campione di suolo arato con 90 NH₄NO₃ Kg/ha 5.1.1.

Un processo chiave del ciclo biogeochimico dell'azoto coinvolto nella produzione di gas ad effetto serra è quello della denitrificazione, tale processo avviene ad opera di batteri che, in carenza o assenza di O₂, utilizzano NO₃⁻ come accettore finale di elettroni portando alla liberazione finale di N₂ ed alla formazione di prodotti intermedi quali NO e N₂O, quest'ultimo in particolare potente gas serra. La capacità di operare i processi di denitrificazione è ampiamente distribuita nella comunità batterica del suolo anche in specie non filogeneticamente correlate e questo, presumibilmente è dovuto ad un diffuso trasferimento di tipo orizzontale.

Numerose coppie di primer sono state disegnate al fine di studiare la presenza, nella comunità batterica dell'ambiente naturale, di geni specifici codificanti per enzimi "chiave" dei vari step del processo di denitrificazione. Essendo comunque poco l'mRNA totale recuperato dai suoli di Agugliano, per poter studiare l'espressione di questi geni mediante RT-PCR, si è reso necessario operare amplificazioni nested, a tal scopo numerose coppie di primer sono state testate al fine di identificare quelle con cui ottenere frammenti delle dimensioni attese.

La prima reazione del processo di denitrificazione, la riduzione del nitrato a nitrito, non sempre è legata alla denitrificazione vera e propria. I geni che codificano per la nitrato-reduttasi specifica del processo dissimilatorio e quindi della denitrificazione sono *narG* (Nitrato-reduttasi di membrana) e *napA* (Nitrato-reduttasi citoplasmatica).

In figura 3 sono riportati i frammenti di DNA ottenuti dai cDNA retrotrascritti, utilizzando una miscela di esameri a sequenza random, dall'RNA estratto dai campioni di suolo di Agugliano ed amplificati con protocollo "nested" utilizzando coppie di primer specifiche per i geni *narG* e *napA*.

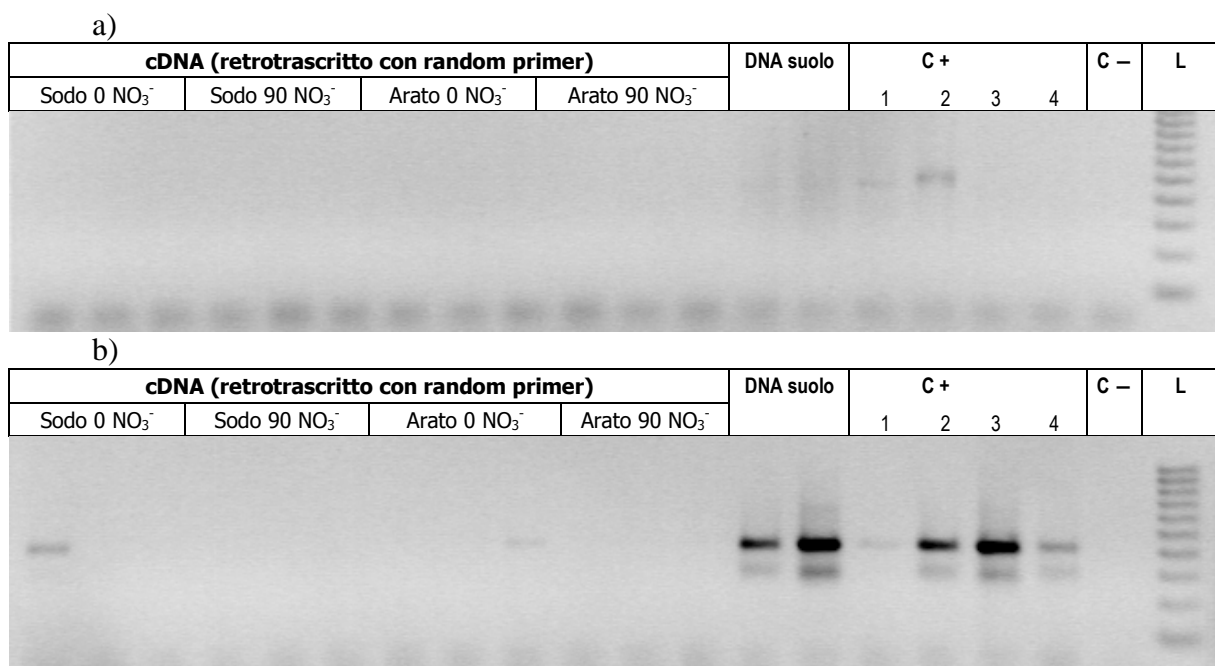


Figura 3. Amplificazione dei gene per la nitrato-reduttasi .

a) amplificazione con i primer specifici per *narG*;

b) amplificazione con i primer specifici per *napA*.

DNA suolo = DNA estratto dai campioni di suolo 4.1.3. e 4.3.3.;

C + = DNA ceppi di riferimento: 1- *Paracoccus pantotrophus* DSM65; 2- *Pseudomonas stutzeri* DSM6084;

3- *P. stutzeri* DSM10701 (DNA); 4- *P. stutzeri* DSM10701 (cDNA, da cultura cresciuta in condizioni di denitrificazione).

L = ladder 1Kb.

In nessun campione di suolo sembra essere espresso il gene per la nitrato-reduttasi di membrana *NarG* anche se il segnale di amplificazione risulta debole anche nei campioni di DNA estratto dal suolo e nei ceppi batterici di riferimento. Al contrario il gene per la nitrato-reduttasi citoplasmatica *NapA* risulta essere presente nei due suoli presi in esame e la sua espressione è stata riscontrata in due repliche delle parcelle senza concimazione azotata, sia nella lavorazione tradizionale sia nella non-lavorazione.

Il secondo step del processo di denitrificazione è operato dall'enzima nitrito-reduttasi e porta alla formazione del primo composto gassoso, NO. Due sono le varianti dell'enzima nitrito-reduttasi,

una dipendente dal citocromo cd1 e codificata dal gene *nirS*, l'altra dipendente dal citocromo da un gruppo prostetico contenente Cu e codificata dal gene *nirK*.

I risultati dell'analisi sull'espressione dei geni *nir* effettuata tramite RT-PCR sull'RNA dei estratto dai campioni di suolo di Agugliano sono riportati in figura 4.

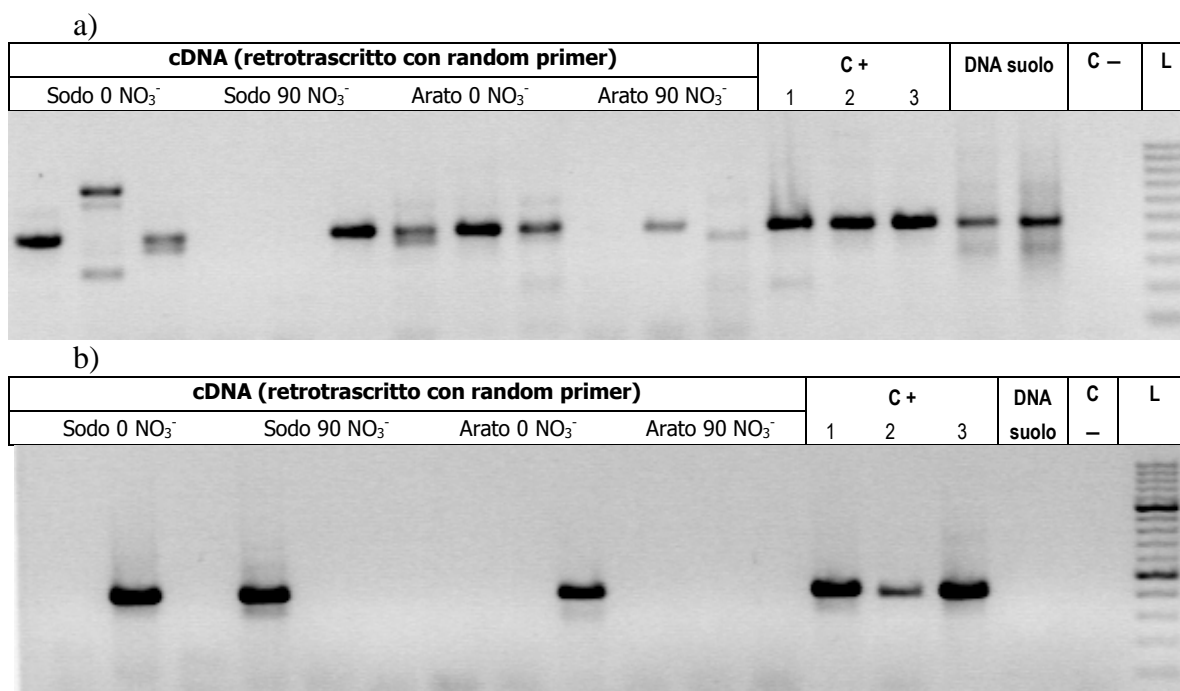


Figura 4. Amplificazione dei gene per la nitrito-reduttasi .

a) amplificazione con i primer specifici per *nirK*;

DNA suolo = DNA estratto dai campioni di suolo 4.1.3. e 4.3.3.;

C + = DNA ceppi di riferimento: 1- *Alcaligenes faecalis* DSM30030 (DNA); 2- *Alcaligenes faecalis* DSM30030 (cDNA, da cultura cresciuta in condizioni di denitrificazione); 3- *Ochrobactrum anthropi* DSM6882 (DNA).

b) amplificazione con i primer specifici per *nirS*.

DNA suolo = DNA estratto dai campioni di suolo 4.1.3.;

C + = DNA ceppi di riferimento: 1- *P. stutzeri* DSM10701 (DNA); 2- *P. stutzeri* DSM10701 (cDNA, da cultura cresciuta in condizioni di denitrificazione); 3- *Pseudomonas stutzeri* DSM6084;

L = ladder 1Kb.

Il gene *nirK* sembra maggiormente espresso rispetto al gene *nirS* nei suoli da noi presi in esame, infatti numerosi campioni hanno dato risultato positivo (7), contro solo 3 campioni positivi se amplificati con i primer specifici per *nirS*. Il gene *nirK* sembra essere inoltre maggiormente espresso nei suoli in cui non è stata aggiunta una concimazione azotata, e nel caso del suolo non lavorato l'espressione del gene *nirS* è presente solo quando non è presente l'espressione del gene *nirK*.

La presenza di una forte espressione dei geni *nir* è in accordo con l'ipotesi che in un terreno argilloso come quello di Agugliano siano favoriti i processi riducenti (necessitano di un ambiente anaerobio) piuttosto che quelli di tipo ossidativo, i nostri risultati sono però in disaccordo con quanto si trova in letteratura riguardo alla diffusione di questi geni, infatti il gene *nirS* dovrebbe essere piu' rappresentato del gene *nirK*, essendo presente in un numerose specie batteriche del suolo tra cui nell'ampio gruppo delle *Pseudomonadaceae*. Altro elemento di disaccordo nei nostri risultati è il fatto che il processo di denitrificazione sia favorito in presenza di elevate concentrazioni di nitrati, nel nostro caso invece troviamo una maggiore presenza di espressione dei geni *nir* nelle parcelle senza concimazione azotata.

Accoppiata all'attività reduttasica degli enzimi Nir è presente l'attività della reduttasi dell'ossido nitrico NorB, i due enzimi infatti possono funzionare come complesso multienzimatico e

l'NO prodotto dalla nitrito-reduttasi viene inviato direttamente al sito catalitico dell'enzima NorB con liberazione di N₂O, potente gas ad effetto serra.

L'ossido nitrico reduttasi è composta da due subunità, una minore ed una maggiore codificate rispettivamente dai geni *norC* e *norB*. Anche in questo caso esistono due diverse proteine Nor, la prima, più diffusa, accetta elettroni provenienti da un citocromo *c* e viene designata cNor mentre una seconda forma qNor, accetta gli elettroni trasferiti da un chinolo. Diverse coppie di primer specifici sia per i geni *cnorB* sia *qnorB* sono state comunque sviluppate e l'analisi di varie combinazioni di primer ci ha permesso di identificare le migliori per lo studio dell'espressione dei geni *nor* mediante amplificazione nested dei cDNA da ottenuti dai suoli di Agugliano (figura 5).

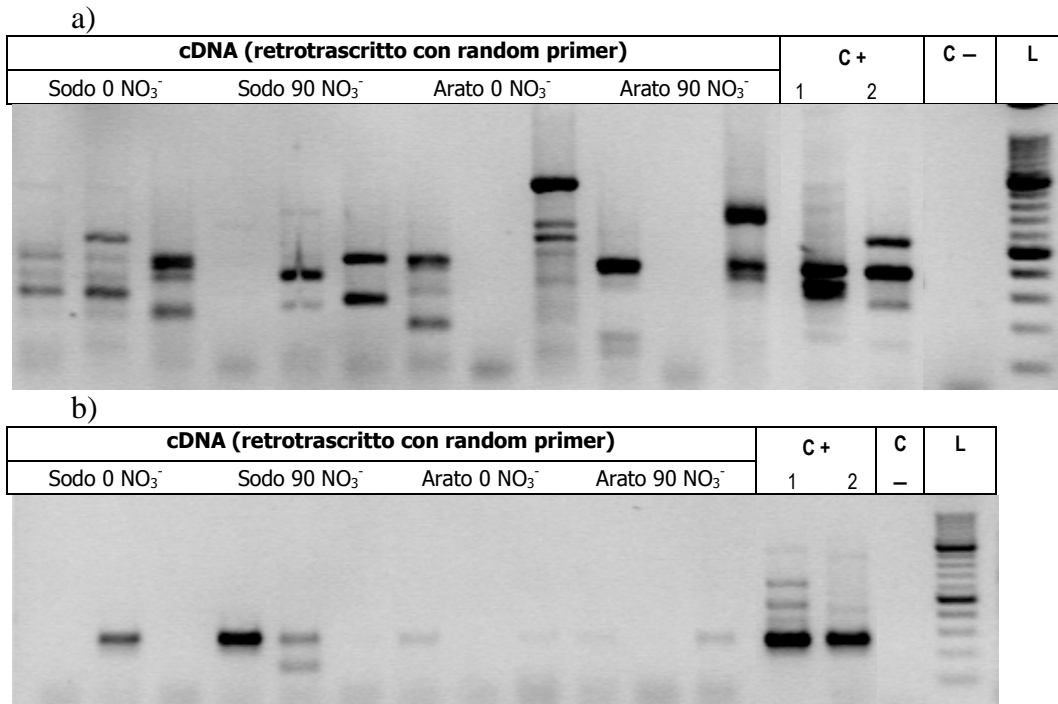


Figura 5. Amplificazione dei gene per la ossido nitrico-reduttasi .

a) amplificazione con i primer specifici per *cnorB*;

C + = DNA ceppi di riferimento: 1- *P. stutzeri* DSM10701 (DNA); 2- *P. stutzeri* DSM10701 (cDNA, da cultura cresciuta in condizioni di denitrificazione).

b) amplificazione con i primer specifici per *qnorB*.

C + = DNA ceppi di riferimento: 1- *Alcaligenes faecalis* DSM30030 (DNA); 2- *Alcaligenes faecalis* DSM30030 (cDNA, da cultura cresciuta in condizioni di denitrificazione).

L = ladder 1Kb.

Nell'amplificazione avvenuta utilizzando i primer specifici per il gene *cnorB* si ottengono delle bande delle dimensioni attese ma anche numerose bande aspecifiche, anche nel caso dei ceppi di riferimento, andranno quindi ancora determinate le condizioni migliori per ottenere risultati inequivocabili mediante RT-PCR.

Nel caso invece dell'amplificazione con i primer specifici per il gene *qnorB* si ottengono, in numerosi casi, bande delle dimensioni attese. Anche in questo caso il gene che presenta una minor diffusione nell'ambiente naturale sembra essere più ampiamente espresso.

In figura 6 infine è riportato il risultato della RT-PCR per l'analisi dell'espressione del gene *nosZ*, che codifica per l'enzima, reductasi dell'ossido nitroso, che completa il processo di denitrificazione mediante la conversione di N_2O a N_2 .

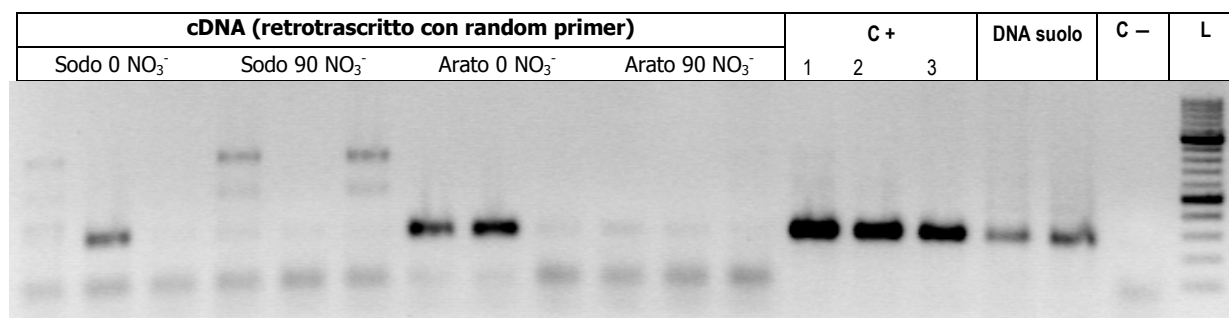


Figura 6. Amplificazione con i primer specifici per il gene *nosZ*.

DNA suolo = DNA estratto dai campioni di suolo 4.1.3. e 4.3.3.;

C+ = DNA dei ceppi di riferimento appartenenti ai generi: 1- *P. stutzeri* DSM10701 (DNA); 2- *P. stutzeri* DSM10701 (cDNA, da cultura cresciuta in condizioni di denitrificazione), 3- *P. stutzeri* DSM6082 (DNA).

L = ladder 1Kb

In molti campioni di cDNA sono stati ottenuti dei frammenti di DNA delle dimensioni attese anche se i campioni che presentano bande di maggior intensità appartengono come sempre a parcelle che non hanno ricevuta alcuna concimazione azotata.

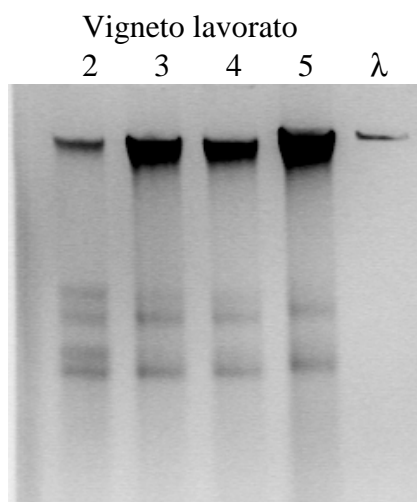
Per quanto riguarda l'espressione di altri geni che codificano per altri enzimi "chiave" in studi ecologici sul ciclo dell'azoto, il gene *nifH* (subunità maggiore della proteina nitrogenasi, processo azotofissazione) ed il gene *amoA* (ossidazione dell'ammonio) non è stato possibile, utilizzando i primer descritti in letteratura, individuare una combinazione di primer adatta allo studio dell'espressione genica nel suolo mediante RT-PCR con amplificazione nested.

Al fine poi di confermare i risultati ottenuti, per ciascun gene analizzato è stato scelto un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese che è stato clonato e sottoposto a sequenziamento genico. Le sequenze ottenute sono state paragonate a quelle presenti in Gene-bank ed in tutti i casi eccetto *cnorB* i frammenti amplificati da noi ottenuti erano omologhi alle sequenze dei geni che intendevamo analizzare.

In conclusione dagli esperimenti di RT-PCR condotti si può affermare che nei campioni di suolo raccolti ad Agugliano sembrerebbero maggiormente espressi i geni funzionali coinvolti in quei processi che necessitano, per la loro induzione, di un ambiente con bassa tensione di ossigeno, quali la denitrificazione (in cui sono coinvolti rispettivamente i geni *nir*, *nos* e *nor*), mentre i geni coinvolti in processi "aerobi", come l'ossidazione del metano (geni *pmo*), sembrano essere meno espressi. Questo è in accordo con la tipologia del suolo in esame che, essendo molto argilloso, con molta probabilità crea un ambiente più favorevole allo sviluppo processi riducenti piuttosto di quelli che necessitano ossidativi.

In maggio è stato eseguito un secondo campionamento, questa volta in Sardegna, presso Berchidda (Olbia), in condizioni completamente diverse da quelle trovate ad Agugliano. In questo caso infatti si trattava di analizzare 5 diverse gestioni di suolo: vigneto inerbito, vigneto lavorato, sughereta, pascolo ed erbario. Sono state raccolte 5 repliche randomizzate in ciascun sito che sono state congelate immediatamente a $-80^{\circ}C$ per una miglior conservazione dell'RNA presente.

Il tipo di terreno dei campioni sardi risulta con una maggior componente sabbiosa rispetto quello di Agugliano e questo ha portato ad una resa maggiore di RNA totale estratto.



Sono ben visibili le bande dell'RNA ribosomale 23S e 16SS di origine procariotica (batteri) e nel caso del campione 2 anche le bande dell'RNA ribosomale 28S e 18S di origine eucariotica (funghi).

Dopo trattamento con DNase e conferma mediante amplificazione con primer specifici per il 16S rDNA (figura 7), dell'assenza di DNA contaminante, le miscele di RNA sono state sottoposte a retrotrascrizione mediante esameri a sequenza random.

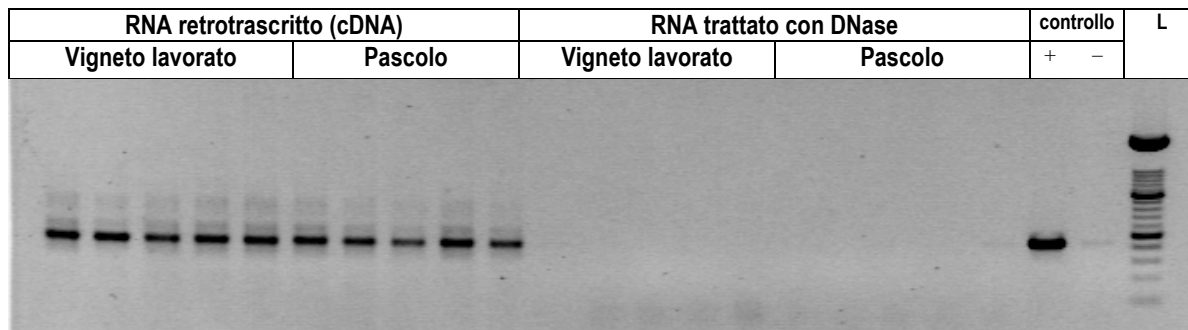


Figura 7. Amplificazione con i primer 968f e 1401r specifici per rDNA 16S eubatterico dell'RNA estratto dai campioni di suolo e del cDNA sintetizzato.

+ = controllo positivo; - = controllo negativo; L = ladder 1 Kb

Attualmente è in corso l'analisi della biodiversità funzionale della comunità batterica dei suoli della Sardegna mediante RT-PCR e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e dell'espressione dei geni legati al ciclo del carbonio (*pmoA*) ed al ciclo dell'azoto (*nirK*, *nirS* e *nosZ*), utilizzando le combinazioni di coppie di primer ed i protocolli messi a punto sui campioni di Agugliano.

A margine del campionamento per l'attività prevista, di cui sopra, si è proceduto ad un ulteriore campionamento negli stessi siti per la valutazione di alcune proprietà fisiche del suolo da correlare poi sia con gli aspetti biologici, sia con gli aspetti agronomici che emergeranno dall'intera ricerca.

Le proprietà fisiche in questione sono la porosità e la stabilità degli aggregati. Per quanto concerne la porosità, sono stati prelevati campioni indisturbati di suolo dai quali, mediante le ormai collaudate tecniche di micromorfologia del suolo, sono state preparate sezioni sottili di 6x7 cm e 30 micron di spessore, analizzate poi mediante un analizzatore di immagine al fine di caratterizzare il sistema dei pori. I pori del terreno vengono infatti caratterizzati secondo la loro forma in tre gruppi principali: regolari, irregolari e allungati. I pori di ciascun gruppo vengono poi ulteriormente suddivisi in classi dimensionali secondo il loro diametro equivalente per i regolari e irregolari e secondo la loro larghezza per quelli allungati.

Come è noto la porosità è uno dei principali indicatori delle qualità suolo. Dalla porosità dipendono, ad esempio, i movimenti dell'acqua i quali necessitano di una adeguata quantità di "pori di trasmissione" cioè di pori allungati e continui di dimensioni comprese fra 50 e 500 micron. E' stata dimostrata la correlazione fra questo tipo di pori e la conducibilità idraulica del suolo ed è stato altresì dimostrato che la maggiore attività microbica si sviluppa sulle pareti dei piccoli pori (pori inferiori a 200 micron). Sono state trovate infatti correlazioni fra questi pori e le attività enzimatiche che si sviluppano nel suolo.

Lo scopo di tali indagini in questo progetto è proprio quello di quantificare dette correlazioni. Al momento non sono ancora disponibili i dati completi della porosità (la tecnica delle sezioni sottili, purtroppo, richiede tempi lunghi), ma le prime impressioni sembrano indicare l'assenza di differenze eclatanti fra il terreno lavorato e non lavorato anche se in quest'ultimo sembra migliore la qualità del sistema dei pori: maggiore proporzione dei pori di trasmissione. Altrettanto minime sembrano le differenze nella stabilità degli aggregati (la capacità degli aggregati di suolo di resistere all'azione disgregante dell'acqua). Da sottolineare che in questi tipi di suoli, proprio per le caratteristiche pedologiche intrinseche, i processi, e quindi i cambiamenti, avvengono nel lungo termine; il ripristino della sostanza organica è molto lento, per cui le differenze saranno minime e andranno interpretate nel dettaglio.

Relazione attività svolta dal Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze, gruppo di Genetica, prof. M. Bazzicalupo

L'attività 2 prevede il monitoraggio della microflora batterica del suolo coinvolta in funzioni chiave nei cicli biogeochimici legati ai gas serra. In particolare la funzionalità della microflora batterica viene investigata dal gruppo del Dipartimento di Biologia Animale e Genetica mediante l'identificazione, a livello del DNA totale estratto dal suolo, di sequenze specifiche dei gruppi funzionali. Tra questi i geni *mmo*, *pmo* e *mx* per la metano monossigenasi e la metanolo deidrogenasi, *nif*, *nir* e *amo* per nitrogenasi, la nitrato reductasi e l'ammonio ossidasi.

Nel periodo di progetto preso in considerazione dalla presente relazione il gruppo di Genetica del Dipartimento di Biologia Animale e Genetica si sono svolte le seguenti attività:

1. Raccolta di materiale bibliografico relativo all'impatto delle variazioni climatiche e dei gas serra sulla comunità batterica del suolo.
2. Raccolta di materiale bibliografico specifico per l'analisi selettiva dei gruppi batterici implicati nel ciclo del metano e dell'azoto (geni *mmo*, *pmo* e *mx* *nif*, *nir* e *amo*).
3. Partecipazione al convegno della Società Internazionale di Ecologia Microbica (ISME) nell'agosto 2006 ed al convegno su Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO) a giugno 2007 al fine di allacciare relazioni internazionali per contribuire al successo scientifico del progetto SOILSINK.
4. Il DNA totale è stato estratto dai campioni di suolo provenienti dai campionamenti di Ancona e Berchidda e quantificato mediante analisi spettrofotometrica ed elettroforesi su gel di agarosio.
5. Su tutti i campioni di DNA estratto sono state effettuate le amplificazioni PCR relative ai geni per la metano monossigenasi (coppia di primer A189F/Mb661r, *pmoA*), alla subunità omologa dell'ammonio monossigenasi nei batteri nitrificanti (coppia di primer A189F/A682r, *amoA/pmoA*) (Horz et al 2005 Applied and Environmental Microbiology 71, 29642-2652) e *nirS*, *nirK* (nitrito reductasi), *nosZ* (ossido nitroso reductasi), utilizzando come controlli positivi il DNA estratto dai ceppi forniti dall'ISSDS (*Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* DSM30030 per *nirK* e *nosZ*, *Ochrobactrum anthropi* DSM6882 per *nirK*, *Pseudomonas stutzeri* DSM50238 e *Paracoccus pantotrophus* DSM65 per *nirS* e *nosZ*). Tutti i campioni di DNA estratto da suolo hanno dato una reazione positiva (presenza di batteri aventi geni per ammonio monossigenasi, nitrito reductasi e ossido nitroso reductasi) eccetto che con i primer per il gene della metano monossigenasi. La funzione genica di metano monossigenasi specifica dei metanotrofi non risulta quindi presente in nessuno dei due tipi di suolo al nostro livello di analisi.
6. Per il gene dell'ammonio monossigenasi e della metano monossigenasi sono stati acquistati dei primer marcati con fluorocromi per sviluppare su tali geni dei protocolli T-RFLP in quanto dalla letteratura (Horz et al 2005, op. cit.) risulta esserci polimorfismo di restrizione a carico dei siti per l'enzima *MspI*. Gli amplificati prodotti hanno dato risultato positivo come già evidenziato con i primer non marcati (punto 5). Tuttavia l'assenza di amplificazione relativa allo specifico gene *pmoA* non ha al momento consentito uno sviluppo ulteriore di questa linea di indagine per quanto riguarda il gene per la metano monossigenasi. Sono in corso di messa a punto dei protocolli sperimentali per lo sviluppo della tecnica T-RFLP a carico del gene dell'ammonio monossigenasi.
7. Sui geni *nosZ*, *nirS* e *nirK* amplificati sono state effettuate delle digestioni con gli enzimi di restrizione *MspI* e *RsaI* al fine di valutare la presenza di bande diverse (e quindi forme alleliche diverse del gene) nei diversi siti e campioni di suolo. Al momento il solo enzima *RsaI* è stato in grado di evidenziare la presenza di forme alleliche diverse tra i campioni di suolo di Ancona e di Berchidda.