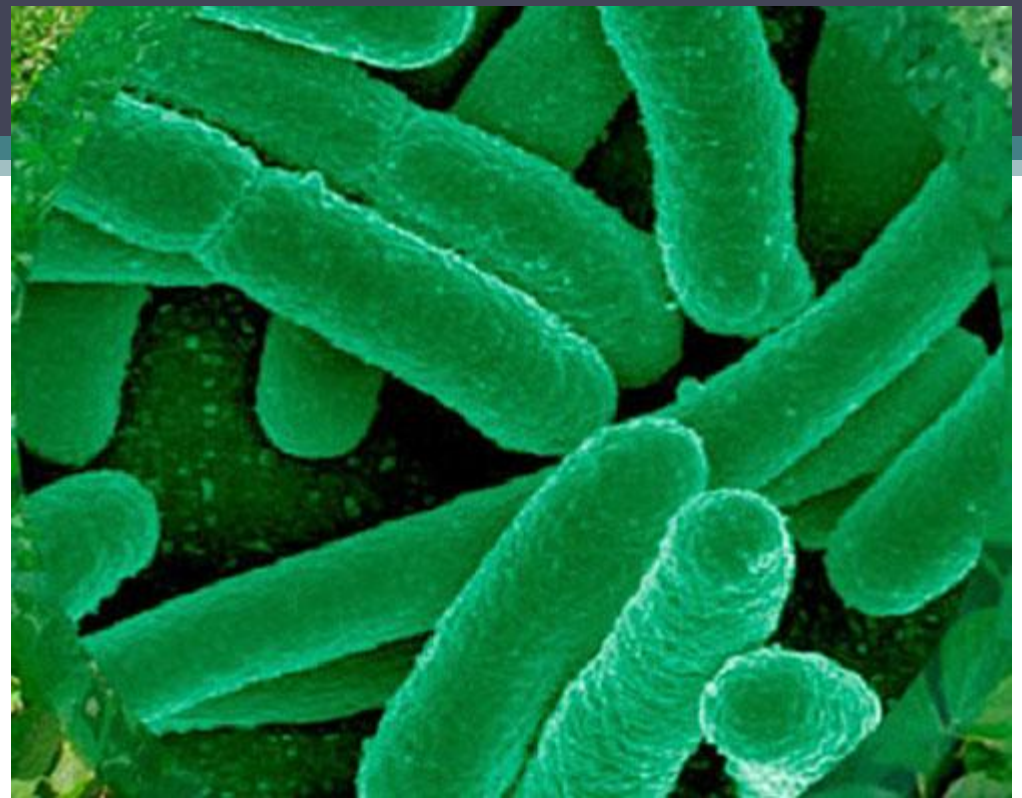
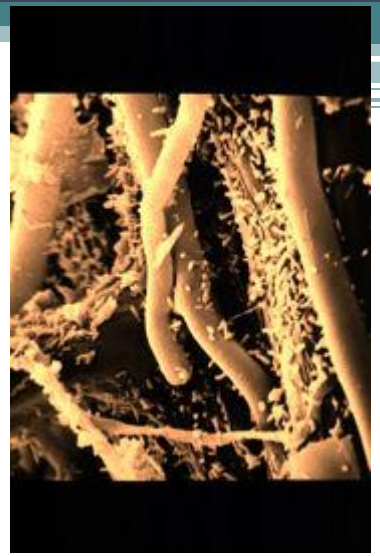
Funzione delle micorrize e dei batteri della rizosfera nei suoli

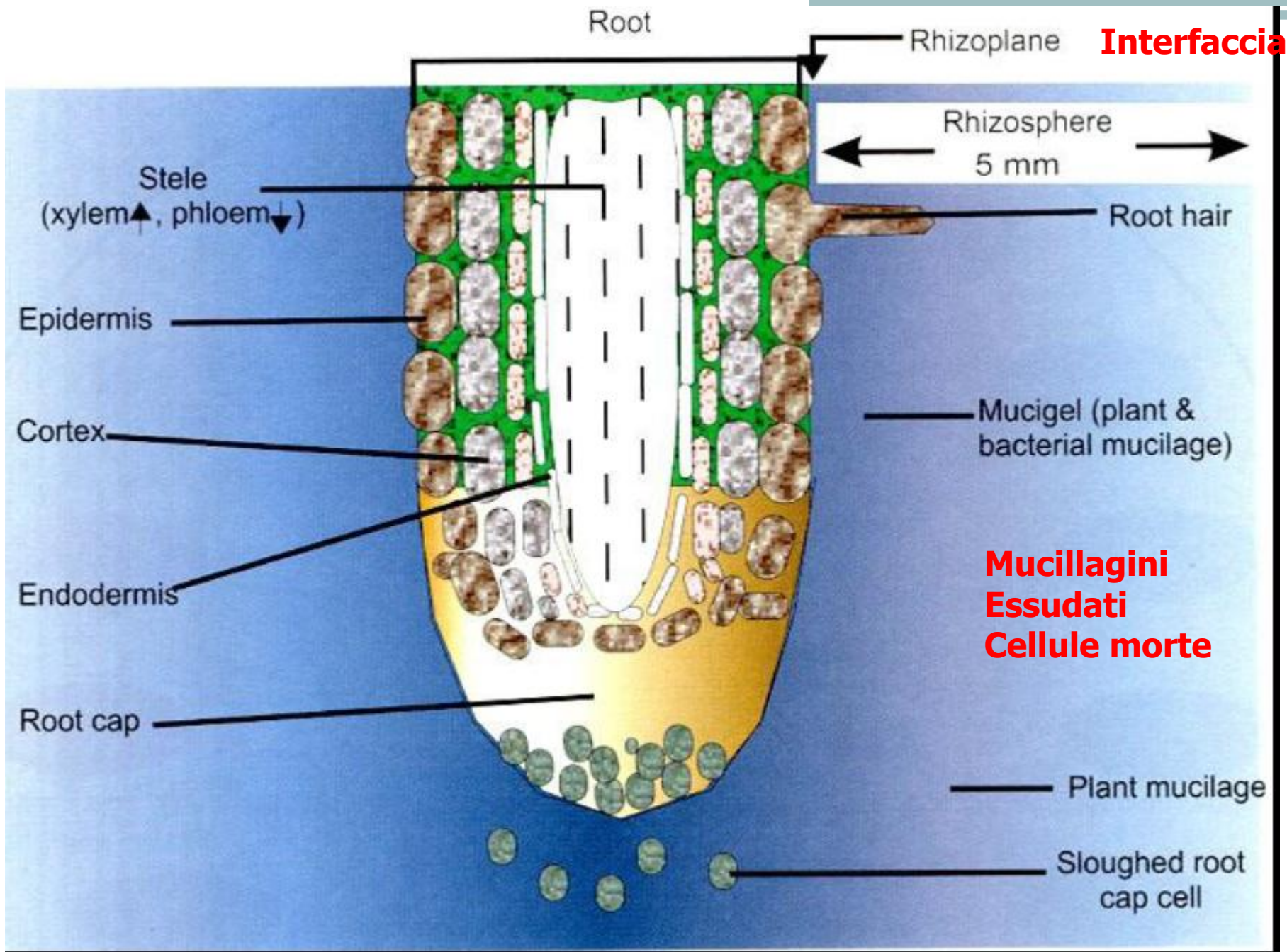
Relatrice: **Dr.ssa Silvia Lampis**





ROOT MICROBIOME

Interfaccia suolo-radice



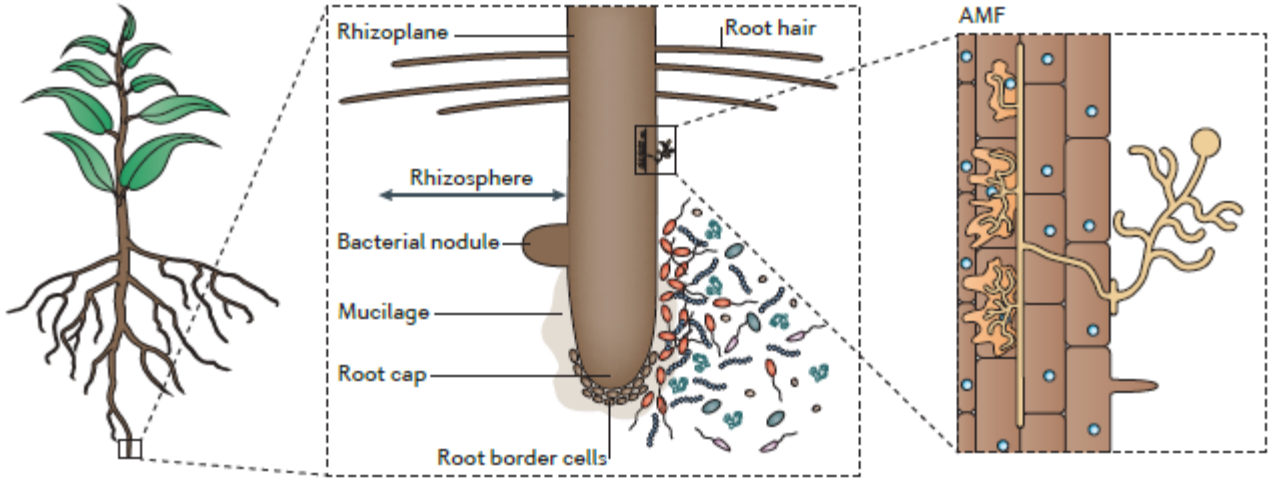
Mucillagini
Essudati
Cellule morte

PLANT RHIZOSPHERE

La rizosfera è una zona ristretta di suolo che circonda ed è influenzata dalle radici della pianta, è il luogo in cui cresce e si stabilizza un immenso numero di **microorganismi** ed invertebrati ed è considerata una delle interfaccie più dinamiche sulla Terra.

Gli organismi che sono presenti nel 'rhizosphere microbiota' possono avere effetti importanti sulla **CRESCITA**, **NUTRIZIONE**, e **SALUTE** delle piante.

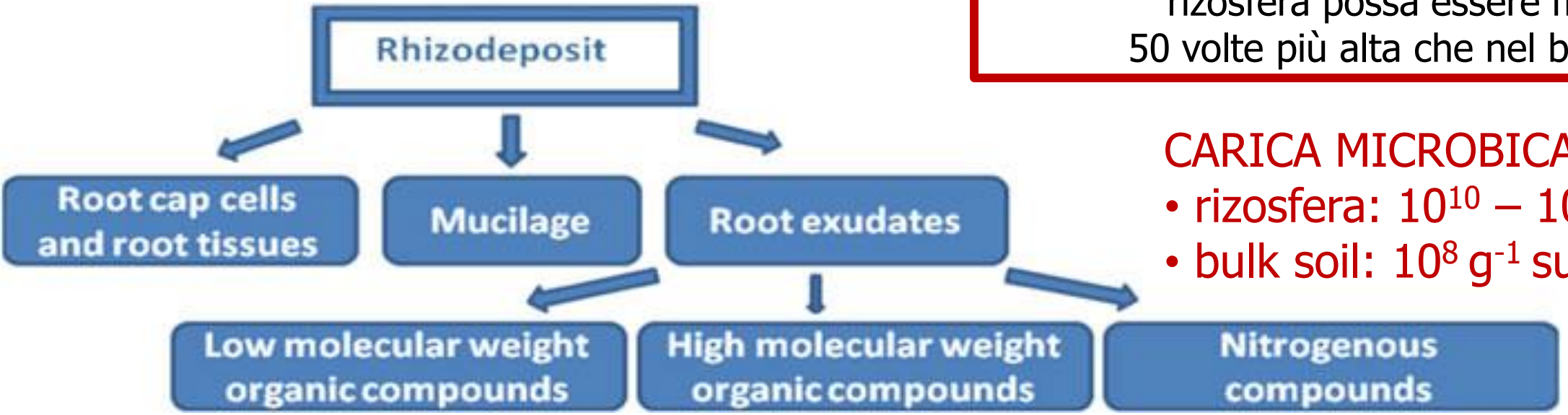
Batteri, funghi (comprese I funghi micorrizzici arbuscolari (AMF)), virus e archea che vivono nella rizosfera sono attratti e si alimentano dei 'rizodepositi' : nutrienti, essudati, cellule e mucillagine rilasciati dalle radici della pianta



RIZODEPOSITI

E' costituito da materiale di origine vegetale (rilasciato dalla pianta).
E' rilasciato dalle radici ed è localizzato nella rizosfera
Contribuisce significativamente al carbonio totale di origine vegetale contenuto nel suolo e allo **sviluppo della ricchezza in diversità microbica della rizosfera**

Si stima che l'attivita' microbica microbica nella rizosfera possa essere fino a 50 volte più alta che nel bulk soil



CARICA MICROBICA TOTALE

- rizosfera: $10^{10} – 10^{12}$ g^{-1} suolo
- bulk soil: 10^{8} g^{-1} suolo

Fattori che determinano la DIVERSITA' microbica nella rizosfera

È determinata da svariati Fattori ABIOTICI e BIOTICI connessi tra loro

1. Le complesse caratteristiche chimico-fisiche del **suolo** influenzano la fisiologia della pianta e il prtofilo di essudati radicali da essa prodotti, che a loro volta influenzano la composizione del 'rhizosphere microbiota'.

2**. La specie vegetale** può fortemente influenzare la composizione e l'attività del 'rhizosphere microbiota'.
L'effetto **specie-specifico** è dato dalla morfologia radicale e dalla quantità e dalla tipologia di rizodepositi prodotti

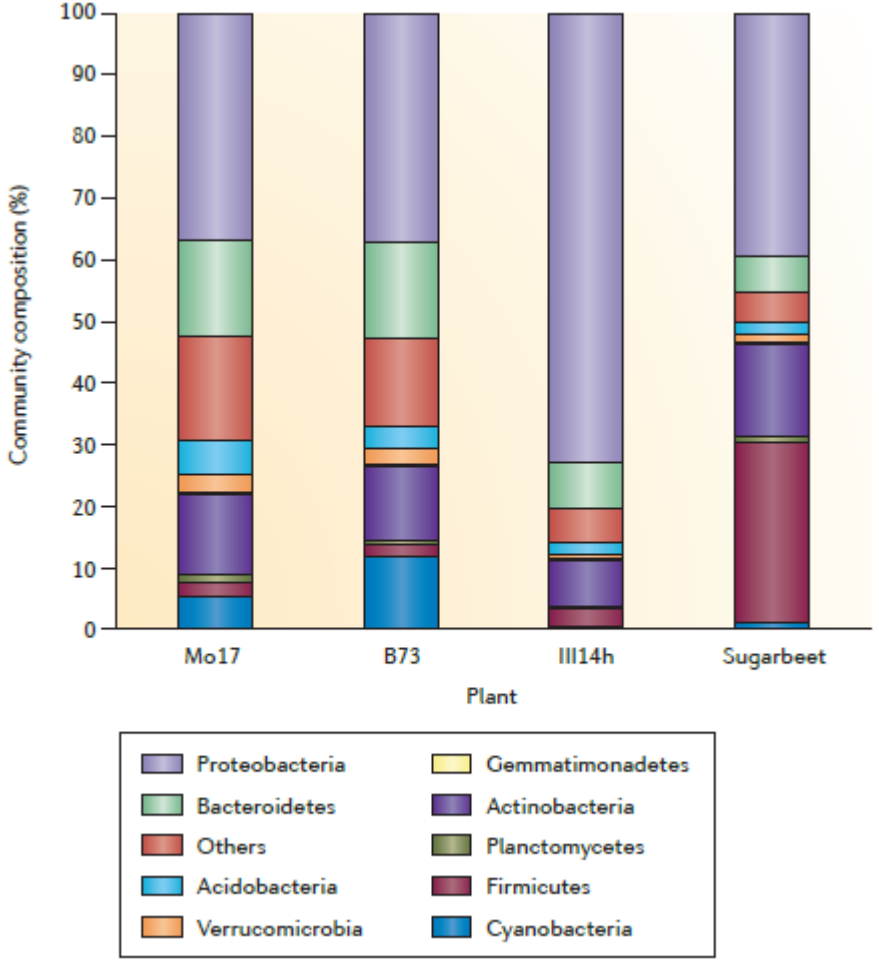
3. L'**età** e lo **stadio di sviluppo** della pianta giocano un ruolo importante nella composizione della struttura della comunità batterica della rizosfera.
Pianta giovane: la rizosfera è principalmente abitata da organismi **r-strategy**, cioè quelle specie batteriche che hanno elevate velocità di crescita e utilizzano substrati semplici forniti dai risodepositi.
Pianta vecchia: La dominanza batterica si sposta verso comunità con velocità di crescita relativamente lente e che hanno la capacità di degradare substrati più complessi (**k-strategist**s).

The PLANT RHIZOBIOME

Phyla dominanti: appartenenti alla classe dei **PROTEOBACTERIA** (per esempio batteri appartenenti alle famiglie delle ***Pseudomonadaceae*** o ***Burkholderiaceae***).

I proteobacteria sono definiti in generale come microorganismi **fast-growing** , capaci di utilizzare un ampio spettro di substrati carboniosi rilasciati dalle radici.

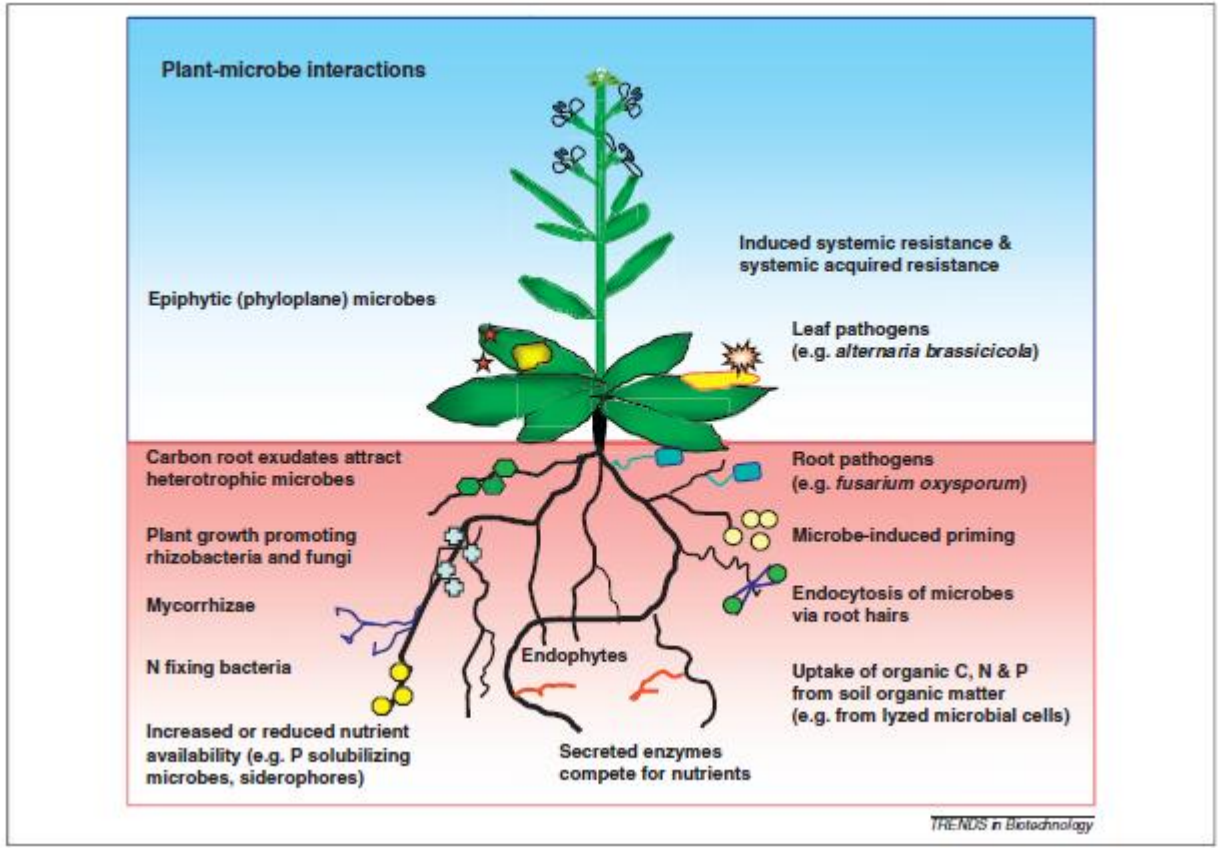
Pseudomonas, Bacillus, Arthrobacter, Rhizobia, Agrobacterium, Alcaligenes, Azotobacter, Mycobacterium, Flavobacter, Cellulomonas e Micrococcus



Composizione della comunità batterica nella rizosfera di tre genotipi di **mais** (Mo17, B73 eIII14h) e della **barbabietola** da zucchero

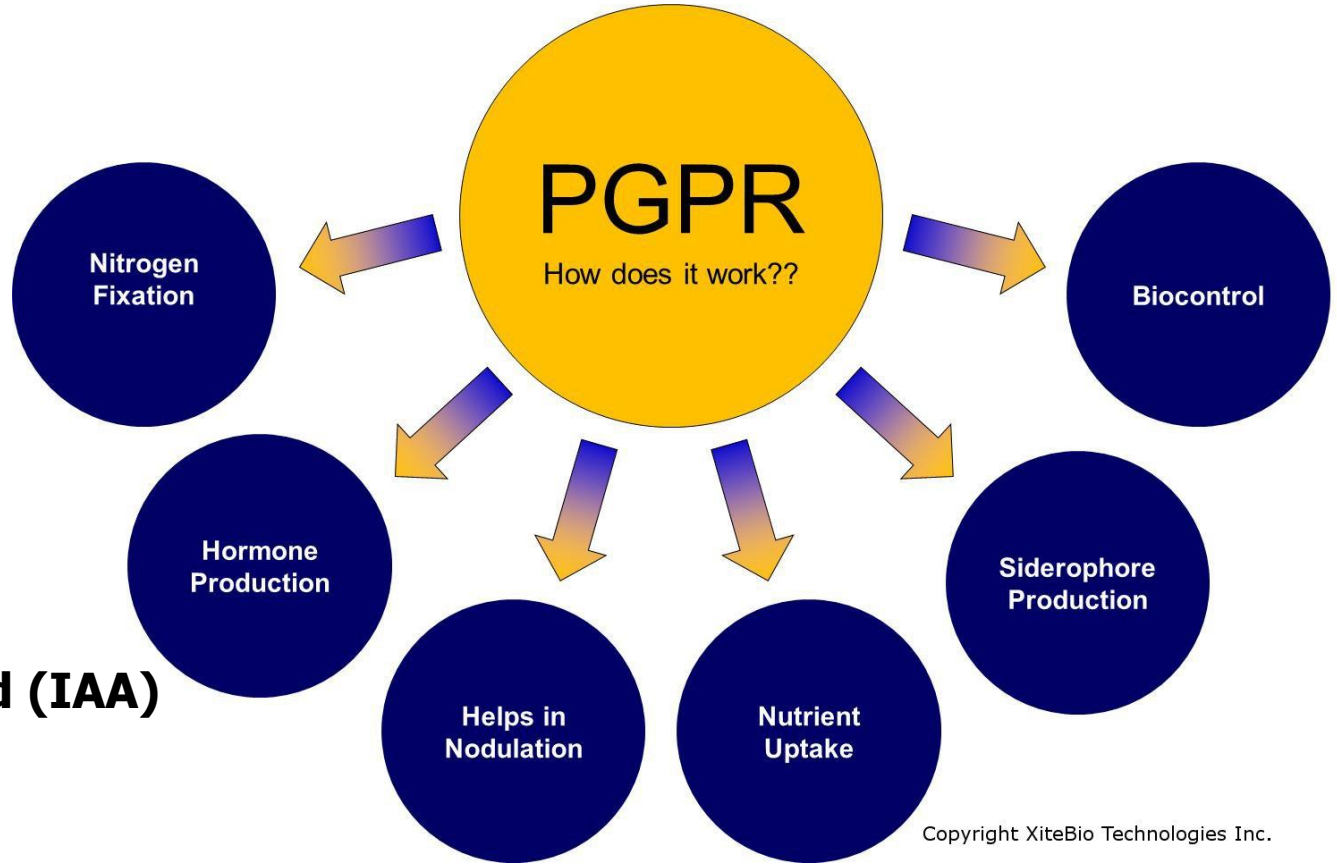
PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA

Plant growth-promoting rhizobacteria (**PGPR**) sono **free-living bacteria** con funzione benefica
I PGPR hanno effetti benefici sulla **salute** della pianta e sulla sua **crescita**, possono antagonizzare microorganismi dannosi e accellerare la disponibilità dei nutrienti e la loro assimilazione.
Inoltre possono aumentare la resistenza a metalli pesanti e la capacità di degradare xenobiotici



Rhizobium
- nodulazione

Azione antagonista vs funghi patogeni



Producione di
Indolacetic acid (IAA)

i) Solubilizzazione del **fosfato**,
ii) Produzione di **acidi organici**, NH3, HCN,
iii) Rilascio di enzimi(soil dehydrogenase, phosphatase, nitrogenase, etc.),
iv) Induzione del systemic disease resistance (ISR).

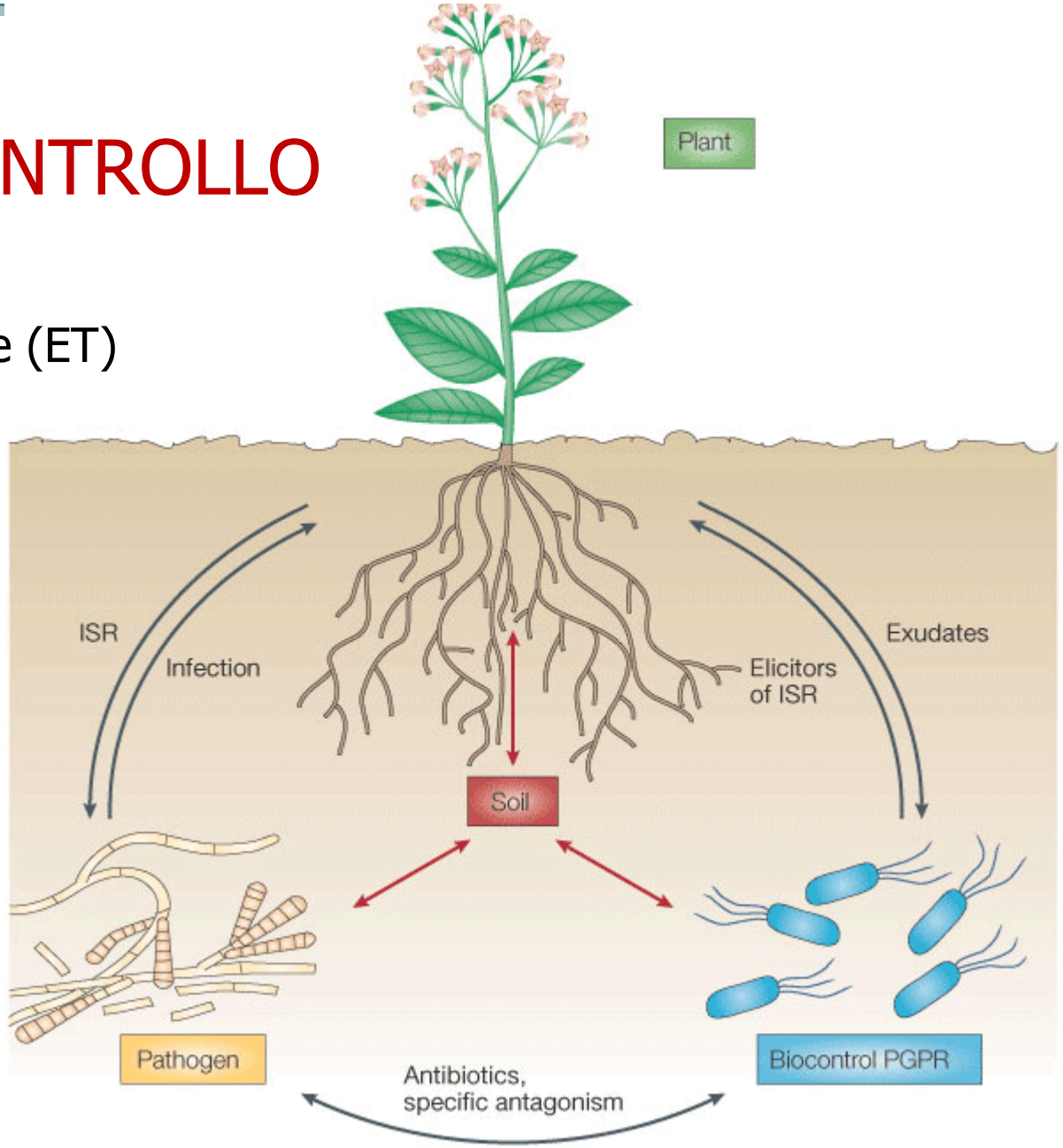
1. **Biocontrollo**: PGPR che sopprimono I patogeni e quindi riescono a controllare le malattie della pianta. La produzione e il rilascio di metaboliti capaci di ridurre la popolazione o l'attività dei patogeni.
   Produzione di: siderofori che chelano gli ioni del Fe rendendoli non più disponibili per la microflora nativa patogena; enzimi litici; antibiotici; composti organici volatili; tossine e biosurfattanti.
   Competizione con I patogeni per I nutrienti.

2. Biofertilizzanti: PGPR che aumentano l'uptake dei nutrienti : fissazione dell'azoto, solubilizzazione del fosfato inorganico e mineralizzazione del fosfato organico , rilascio di acidi organici.

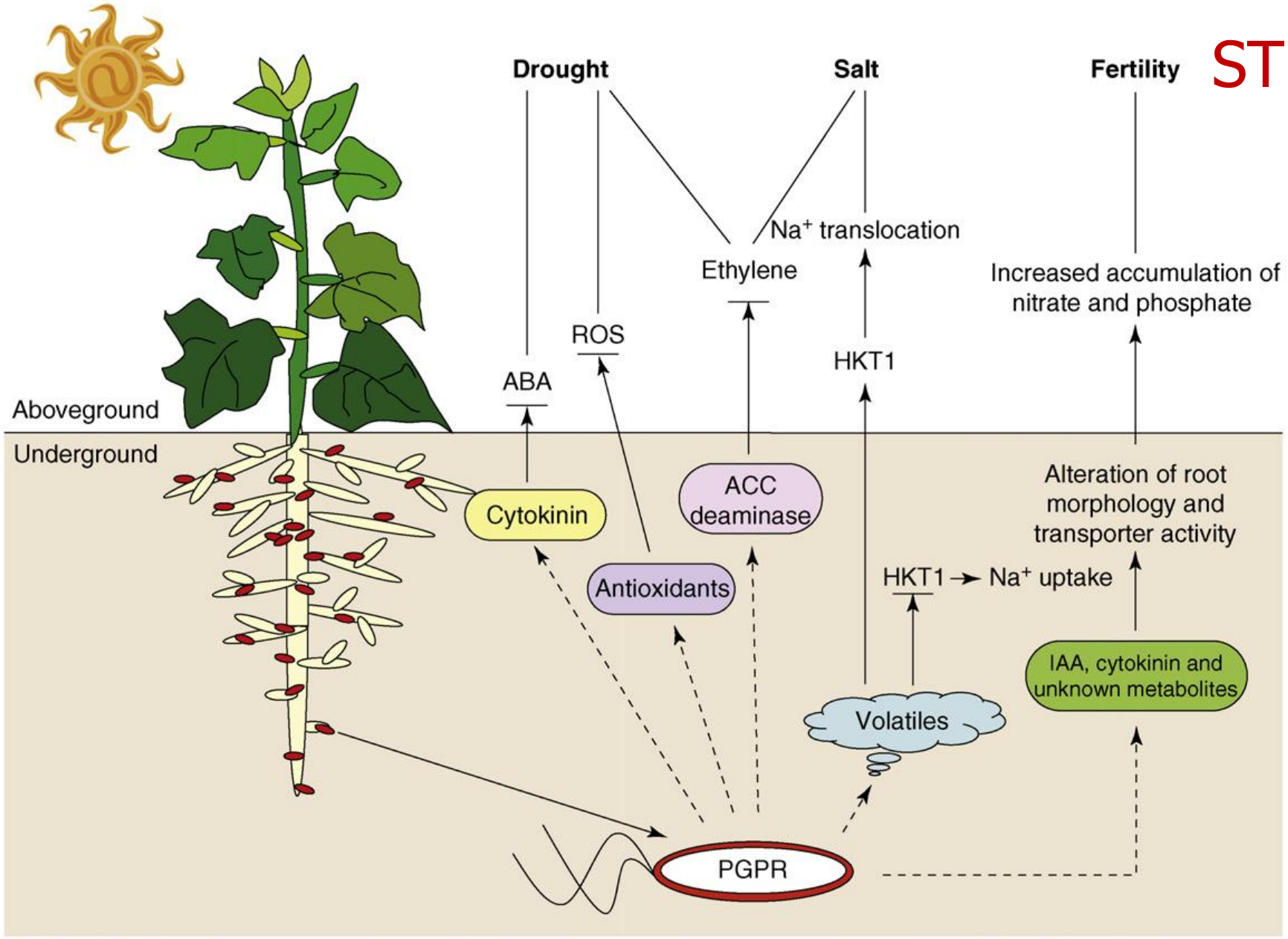
3. Biostimolanti : PGPR che producono fitormoni , auxine, IAA, citochine, riboflavine e vitamine, ACC deaminase

AZIONE DI BIOCONTROLLO

jasmonic acid (JA) and ethylene (ET)
Signaling pathways



STRESS ABIOTICI



LE MICORRIZE

Le **MICORRIZE** sono strutture costituite dall'unione **simbiotica** tra funghi del terreno e radici non lignificate delle pian

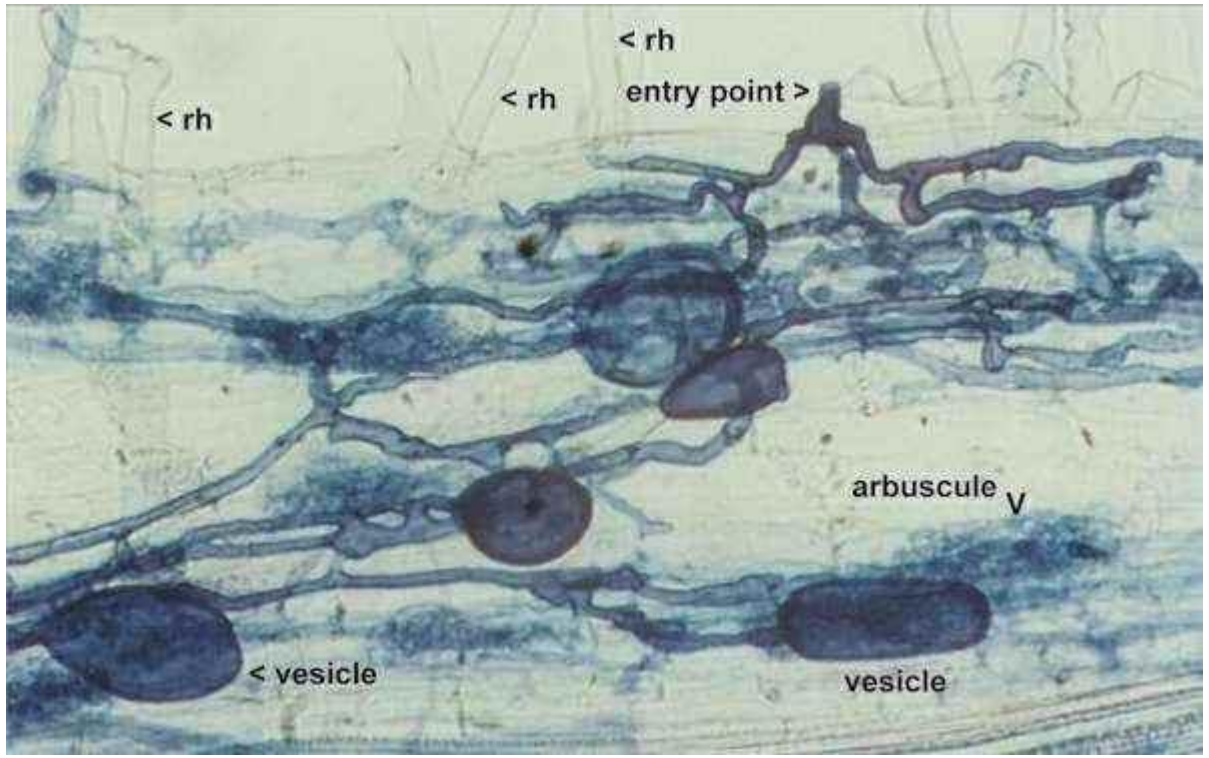
Le **Micorizze** vengono suddivise in due grandi gruppi: **ECTOMICORRIZE** ed **ENDOMICORRIZE**.

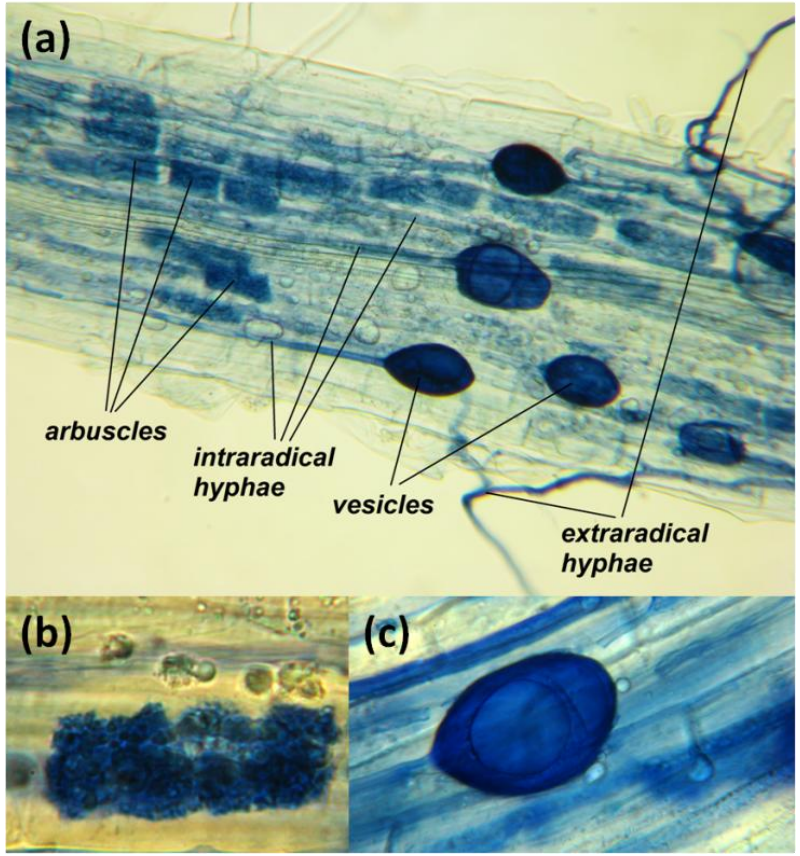
Le **Ectomicorrize** sono in grado di colonizzare poche specie di piante, quasi tutte essenze forestali (conifere e latifoglie) ma rivestono poca importanza per le colture agrarie. Sono così definite perché non penetrano all'interno dei tessuti ma formano uno spesso strato di micelio (**mantello)** attorno alle radici. Sono circa 5000 le specie di ectomicorrize conosciute. Generano spore come forma di sopravvivenza e diffusione, le quali sono trasportate dal vento, animali o dall'azione dell'uomo. I **tartufi** sono l'espressione più conosciuta di questa simbiosi micorrizica

Le **Endomicorrize s**ono simbionti obbligati. Penetrano all'interno dei tessuti e delle cellule dell'ospite ma non formano un mantello fungino esterno. All'interno delle cellule formano delle strutture ovoidali dette **vescicole** e delle strutture ramificate dette **arbuscoli**.

Le specie conosciute sono circa 150 e sono in grado di colonizzare circa il 95% delle specie vegetali

Micorrize vescicoloarbuscolari (VAM): E' negli arbuscoli che avvengono gli scambi nutrizionali: il fungo assorbe gli elementi nutritivi dal terreno , in particolare P, K ed alcuni microelementi, e li cede alla pianta.
La formazione di micorrize conferisce alla pianta una maggiore capacità di assorbimento dell'acqua e la protezione dall'attacco di alcuni patogeni radicali. La somma di questi effetti garantisce una crescita migliore nelle piante micorrizate.





R•E•P•E•T project
Rhizosphere-Enhanced Phyto-Extraction Technology

Founded by Regione Toscana,
in collaboration with University of Pisa and University of Florence

CASE OF STUDY: SCARLINO'S AREA (Tuscany)
As-contaminated **cinders from arsenopyrite roasting** for sulfur extraction were discharged for 30 years adjacent to the chemical farm

Waste disposal of 800.000 t of arsenopyrite cinders
Inorganic [As] 300-600 mg/kg
(70% AsV and 30% AsIII)

iAsV – ARSENATE

- It's analogous to PO_4^{2-}, substitutes it in ATP and DNA
- DNA mutations and cell energy loss

iAsIII – ARSENITE

- More soluble, bioavailable and more toxic
- It binds to sulfhydryl groups of biomolecules
- Inhibition of several enzymes

Microbe-Enhanced Phytoextraction

Low-cost and eco-friendly technology that uses vegetal species for concentration and removal of metals into the harvestable parts of the plants

Hyperaccumulator fern
Pteris vittata

MICROORGANISMS' ROLE IN PHYTOEXTRACTION PROCESS

Efficiency Of Phytoextraction =
BIOMASS X [As] EPIGEOUS TISSUES

PGP bacteria enhance the biomass of the plants

Bacteria can enhance the mobility of metals

Isolation of autochthonous As-resistant bacterial strains

- Enrichment cultures with 2 mM AsV or AsIII

Samples from:

- Arsenopyrite Cinders Pile (AP)
- rhizosphere of different autochthonous plants

201 isolates in total

BOX

55 OTUs
Operational Taxonomic Units
22 As(III)- and 33 As(V)-enrichments

16S rRNA gene sequencing
taxonomic identification

Sampling point	OTUs	As(III)	As(V)	Main genera
Arsenopyrite Ash Pile (AP)	12	4	8	*Bacillus* sp. and *Ochrobactrum* sp.
Graminaceae (P1)	6	3	3	*Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp.
Umbrelliferae (P2)	9	2	7	*Microbacterium* sp.
Trifolium sp.(P3)	11	6	5	*Brevundimonas* sp.
Populus sp (P4)	8	3	5	*Delftia* sp. and *Acidovorax* sp.
Crassulaceae (P5)	9	4	5	*Microbacterium* sp. and *Stenotrophomonas* sp.

- High degree of biodiversity (25 different *genera*);
- High homology to bacterial *genera* diffused within contaminated soils;
- Highly resistant strains to arsenic and heavy metals;
- Species reporting interesting metabolic capabilities.

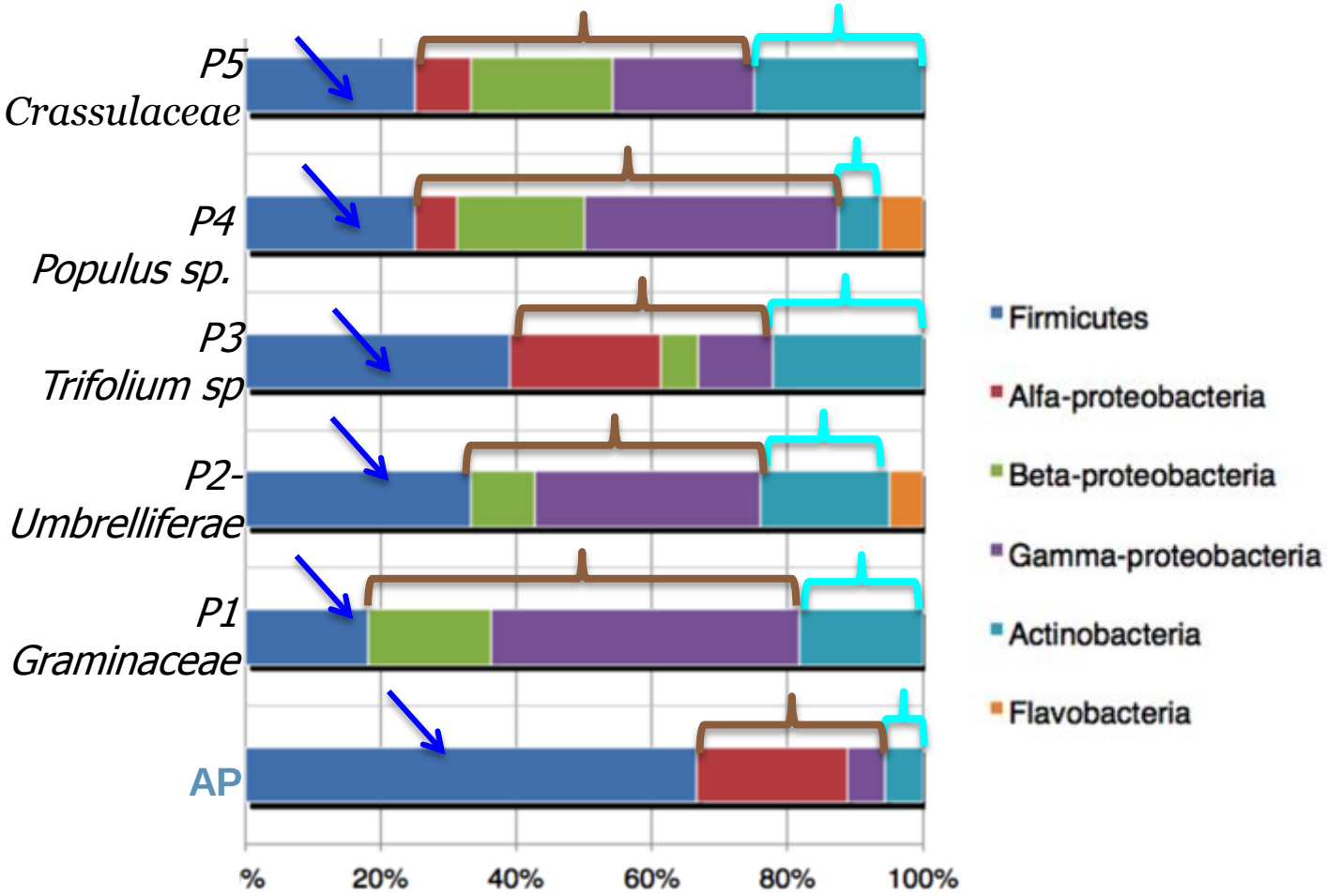
High resistance and metabolic potential within the indigenous bacterial community.

Phyla Distribution In The Different Samples

Proteobacteria:
- Gamma-protebacteria most abundant
- Predominant in the plants' rhizosphere
- Less abundant in the PA

Actinobacteria:
- Almost absent in the PA
- Relevant presence in the plants' rhizosphere

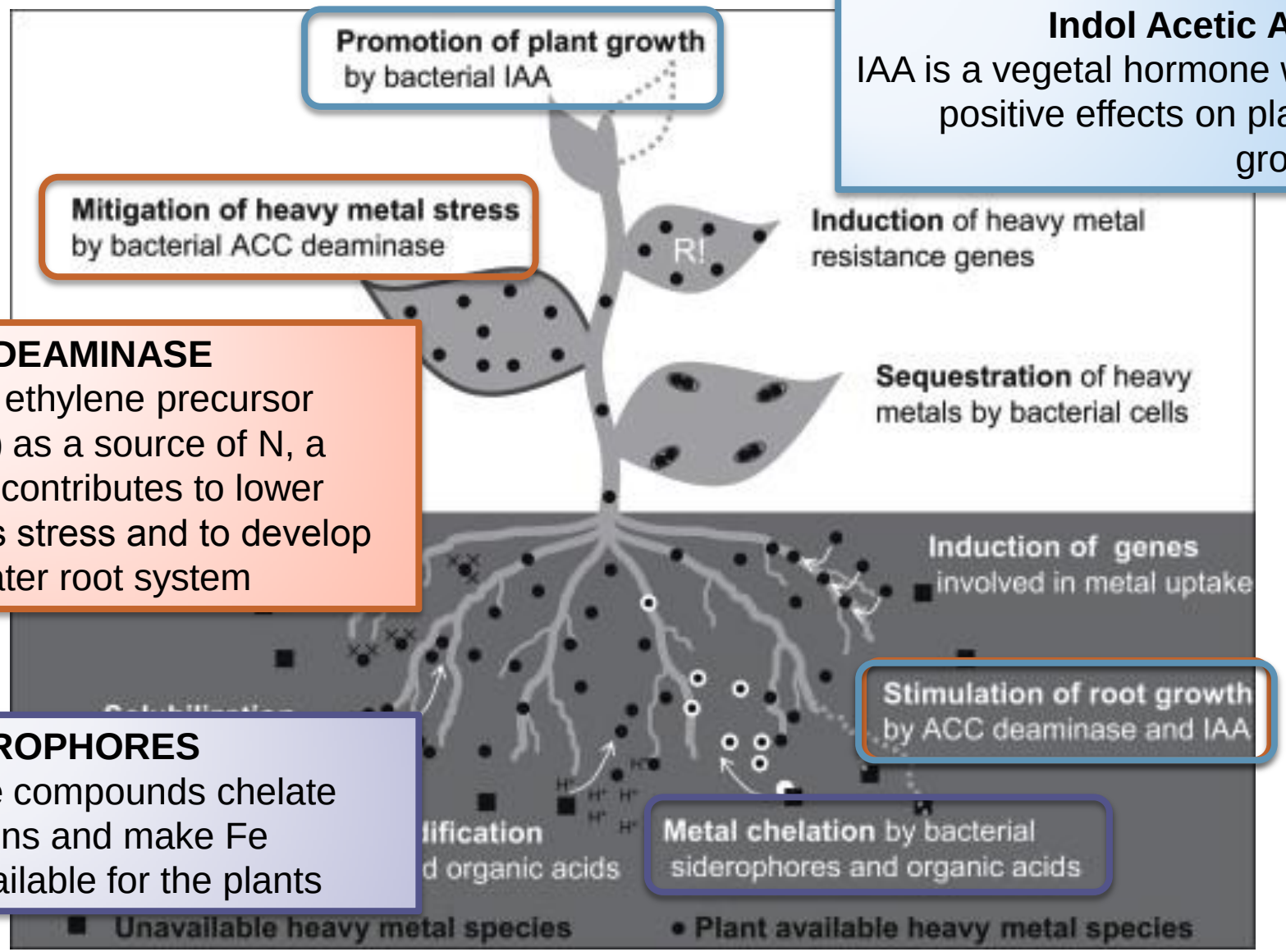
Firmicutes:
- Predominant in the AP
- Minor part in plants' rhizosphere



- *High contamination in the **ARSENOPYRITE CINDERS PILE** promoted the proliferation of **Bacillus sp**. The **sporulated** form and the **Gram + bacterial wall** confer higher resistance to As;*
- *Presence of the **PLANTS** promoted the proliferation **Proteobacteria** (**Stenotrophomonas sp., Pseudomonas sp., Delftia sp.**)*

Plant Growth Promoting (PGP) traits

Indol Acetic Acid
IAA is a vegetal hormone with positive effects on plants growth

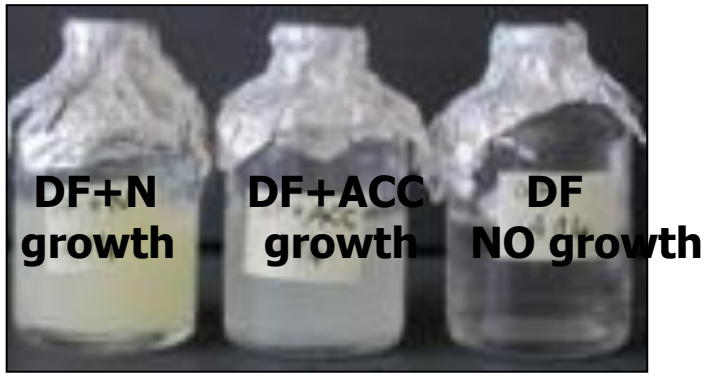


ACC DEAMINASE
Using ethylene precursor (ACC) as a source of N, a strain contributes to lower plant's stress and to develop a greater root system

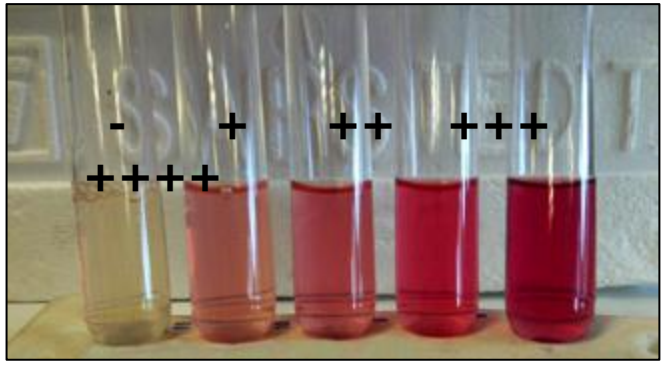
SIDEROPHORES
These compounds chelate iron ions and make Fe bioavailable for the plants

Plant Growth Promoting (PGP) traits and ARSENATE reduction

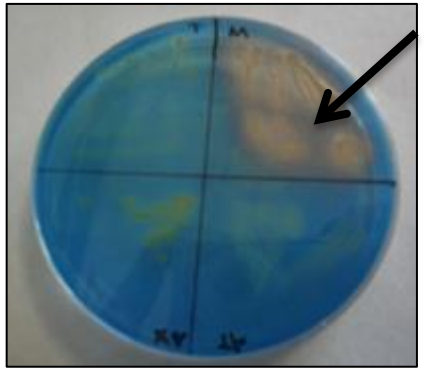
ACC DEAMINASE TEST
1 ACC-deaminase producer



IAA PRODUCTION TEST
24 IAA producers



SIDEROPHORES PRODUCTION TEST
24 Siderophores producers



ARSENATE REDUCTION

- Tris Minimal Medium supplemented with **As(V) 5 mM**
- **Aerobic conditions**
- [As] determined by spectrophotometric method (Cummings *et al.*, 2009)

Selected bacterial strains

Strain	Most related strain in Ez-Taxon Database	Identity	MIC (mM)		PGP traits		As (V) reduction	*ars/aox*	Inoculum
			As(V)	As(III)	IAA	Siderophores			
P1III2	*Pseudomonas putida* AP013070 *Pseudomonas asplenii* Z76655	99.83 % 99.50 %	>100	25	-	+	Reduction of 100% of 5 mM As(V) to As(III) in 48 h	*ars*	A
P2III5	*Delftia lacustris* EU888308	98.73 %	>100	10	-	+	Reduction of 100% of 5 mM As(V) to As(III) in 72 h	*ars*	A
P4III4	*Variovorax boronicumulans* AB300593	99.50 %	>100	5	+	+	-	*ars*	B
P4V6	*Pseudoxanthomonas mexicana* AF273082	100 %	>100	5	17.38 ± 1.86 µg ml^{-1}	+	-	*ars*	B
MPV12	*Bacillus thuringiensis ACNF01000156* *Bacillus toyonensis CP006863*	100 %	>100	11	12.76 ± 2.12 µg ml^{-1}	+	Reduction of 60% of 5 mM As(V) to As(III) in 48 h	*ars/aox*	B

Pot experiments with *P. vittata* plants

P. vittata plants were cultivated either in **unpolluted soil** (agricultural cover soil, **C**) or in the **contaminated soil (M**) consisting of soil surrounding arsenopyrite cinders from the Scarlino site mixed with mature compost

EXPERIMENTAL SET UP

4 different treatments, each with five replicates:

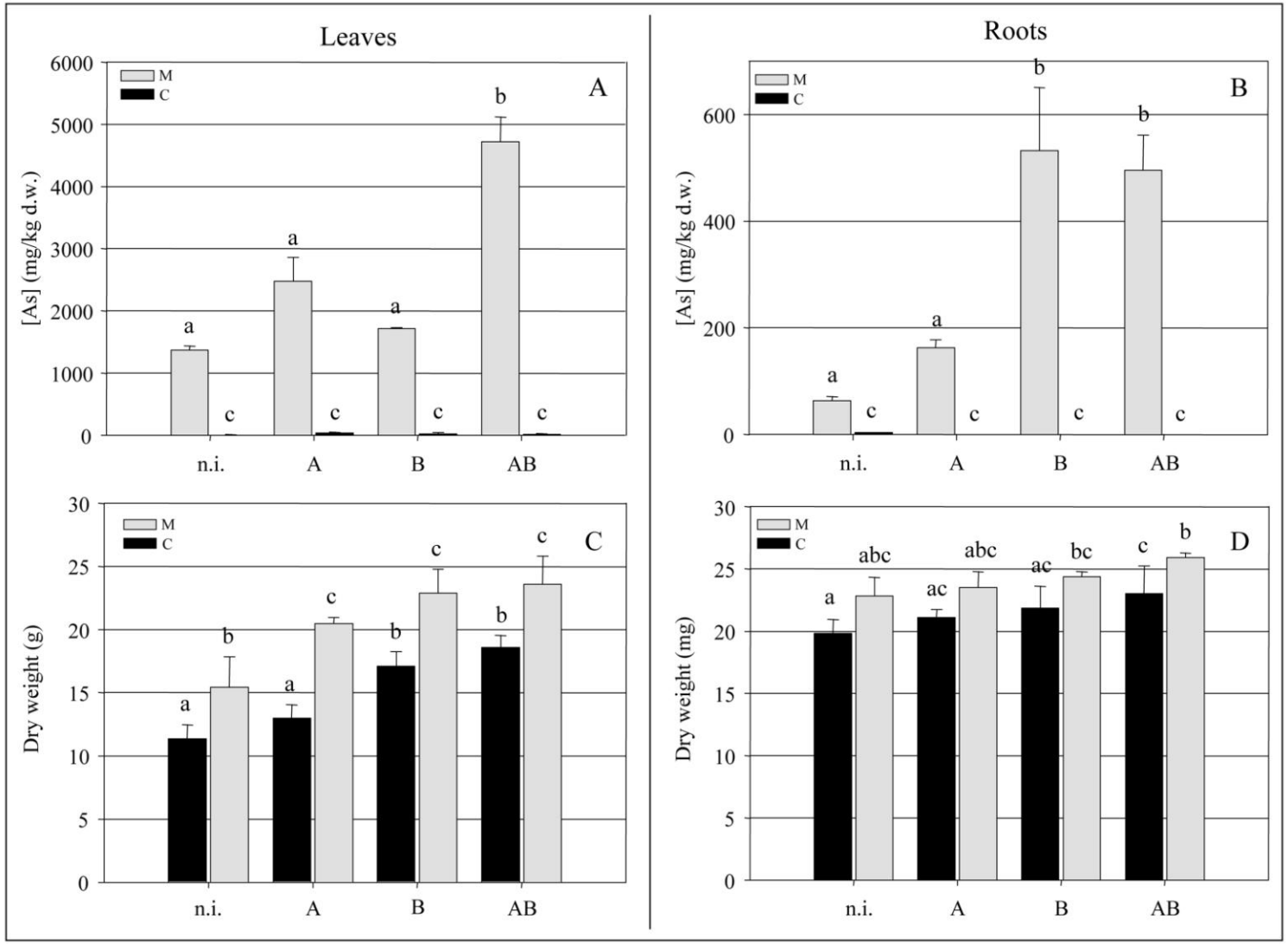
i) non-inoculated plants;
ii) plants inoculated with the siderophore-producing, arsenate-reducing bacterial strains **P1III2** and **P2III5** (**inoculum A**);
iii) plants inoculated with the siderophore and IAA-producing bacterial strains **MPV12**, **P4III4** and **P4V6** (**inoculum B**);
iv) plants inoculated with **A + B** (**inoculum AB**).

3 kg soil under **glasshouse conditions** (25°C, 65–70% relative humidity, 350 μmol m^{-2} s^{-1} photosynthetically active radiation, 16-h photoperiod)

The experiment lasted **4 months** and the inoculums were applied at a final concentration of **10^8 CFU g^{-1} soil**, either at the beginning of the experiment or after **2 months**

Pot experiments with *P. vittata* plants

As content in plant tissues



Biomass (dry weight)

Significant increase ($P < 0.05$) of ~35% in the frond biomass of plants grown in the M soil in the presence of bacteria compared to the non-inoculated plants.

The bacteria also promoted frond growth in the C soil, with the greatest enhancement of ~30% achieved by inoculum B and inoculum AB ($P < 0.05$).

Inoculum AB promoted a significant increase ($P < 0.05$) in the accumulation of arsenic in the fronds of plants grown in the M soil, resulting in an average concentration of 4700 mg kg^{-1} which represented a 3.5-fold increase over the non-inoculated plants .

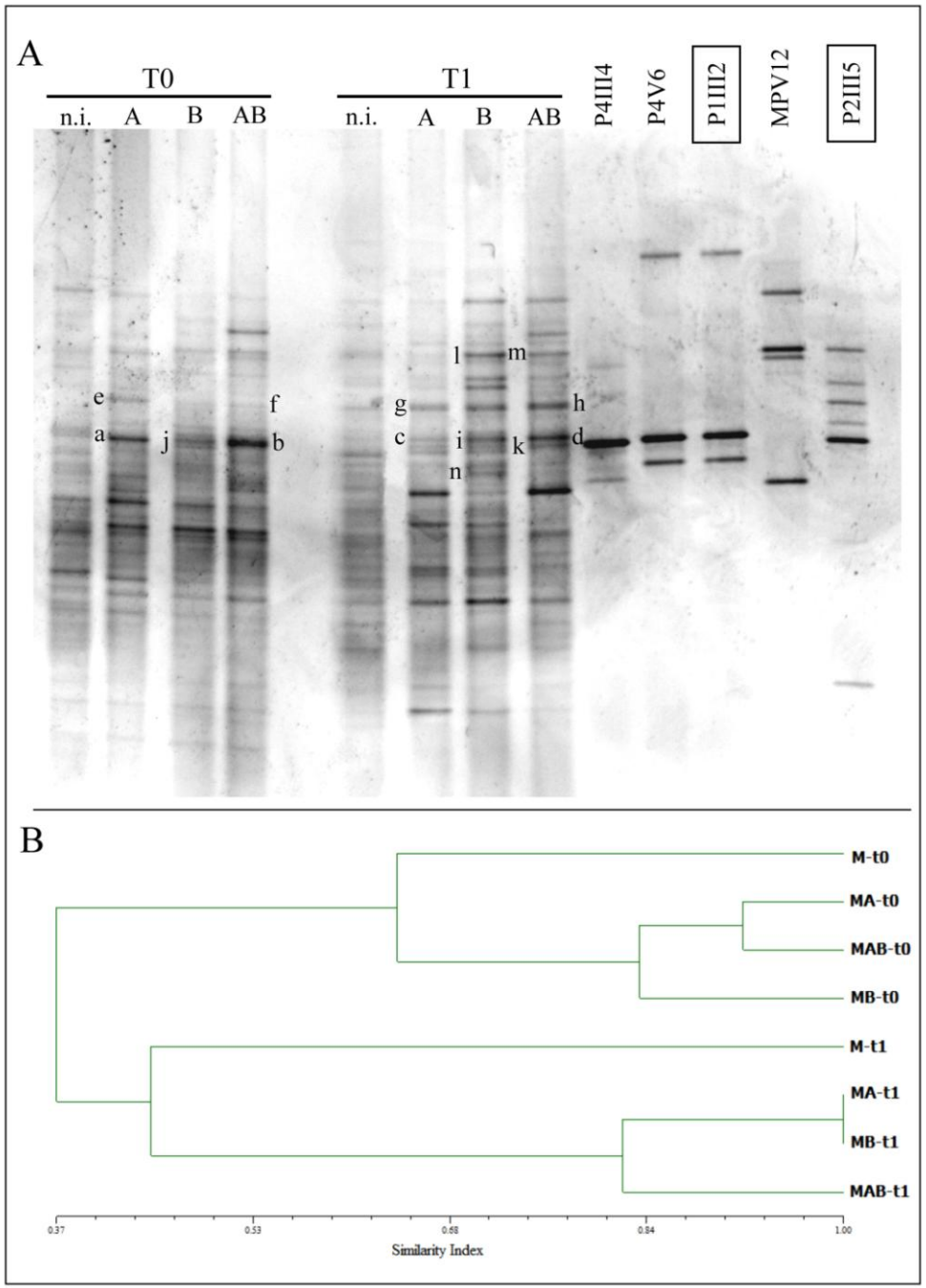
The arsenic content of the roots was enhanced by inoculum B and inoculum AB, reaching concentrations of up to 500 mg kg^{-1} which represented an 8-fold increase over the non-inoculated plants.

Pot experiments with *P. vittata* plants

Effects of different bacterial inocula (A, B and AB) on:
the final As content either in leaves or in roots of *P. vittata* plants,
the bioconcentration factor (BCF),
the phytoremediation efficiency (PE),
the translocation factor (TF).

	As CONTENT		**BCF**	**PE**	**TF**
	LEAVES (mg)	**ROOTS (µg)**			
M	21.1±1.9a	1.44±0.16a	7.48±0.97a	13.6±0.9a	21.69±1.56a
MA	50.59±0.72b	3.82±0.35b	13.52±3.4b	21.34±0.34b	15.21±2.56b
MB	39.33±1.88b	12.96±0.41c	9.39±2.86a	21.26±0.89b	3.23±0.87c
MAB	134.17±7.29c	12.79±0.37c	31.08±5.48b	35.37±1.45c	11.48±1,34b

Within each column, means with the same letter are not significantly different according to Tuckey's test (P<0.05)



Analysis of the soil bacterial community by PCR-DGGE

carried out on soil samples collected at the beginning and end of the experimental trials to monitor the persistence of the inoculated strains and to evaluate potential changes in the bacterial community

the five inoculated strains persisted in the soil and remained part of the community at the end of the experiment

Similarity indices were calculated using the Pearson correlation coefficient and a dendrogram was constructed based on the UPGMA method (Fig. 5B) revealing a change in the structure of the bacterial community caused by the presence of the plants and/or the five inoculated bacterial strains.

CONCLUSIONI

- La rizosfera è sede di elevata biodiversità microbica: alta ricchezza di specie microbiche
- Microorganismi autoctoni o non, selezionati per I loro tratti PGP e inoculati nella rizosfera in dosi massive aumentano la crescita della pianta anche in presenza di elementi tossici (metalli pesanti)
- Microorganismi della rizosfera possono fornire alla pianta anche resistenza a metalli o tossici (xenobiotici).

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Pot experiments with *P. vittata* plants

M soil

C soil