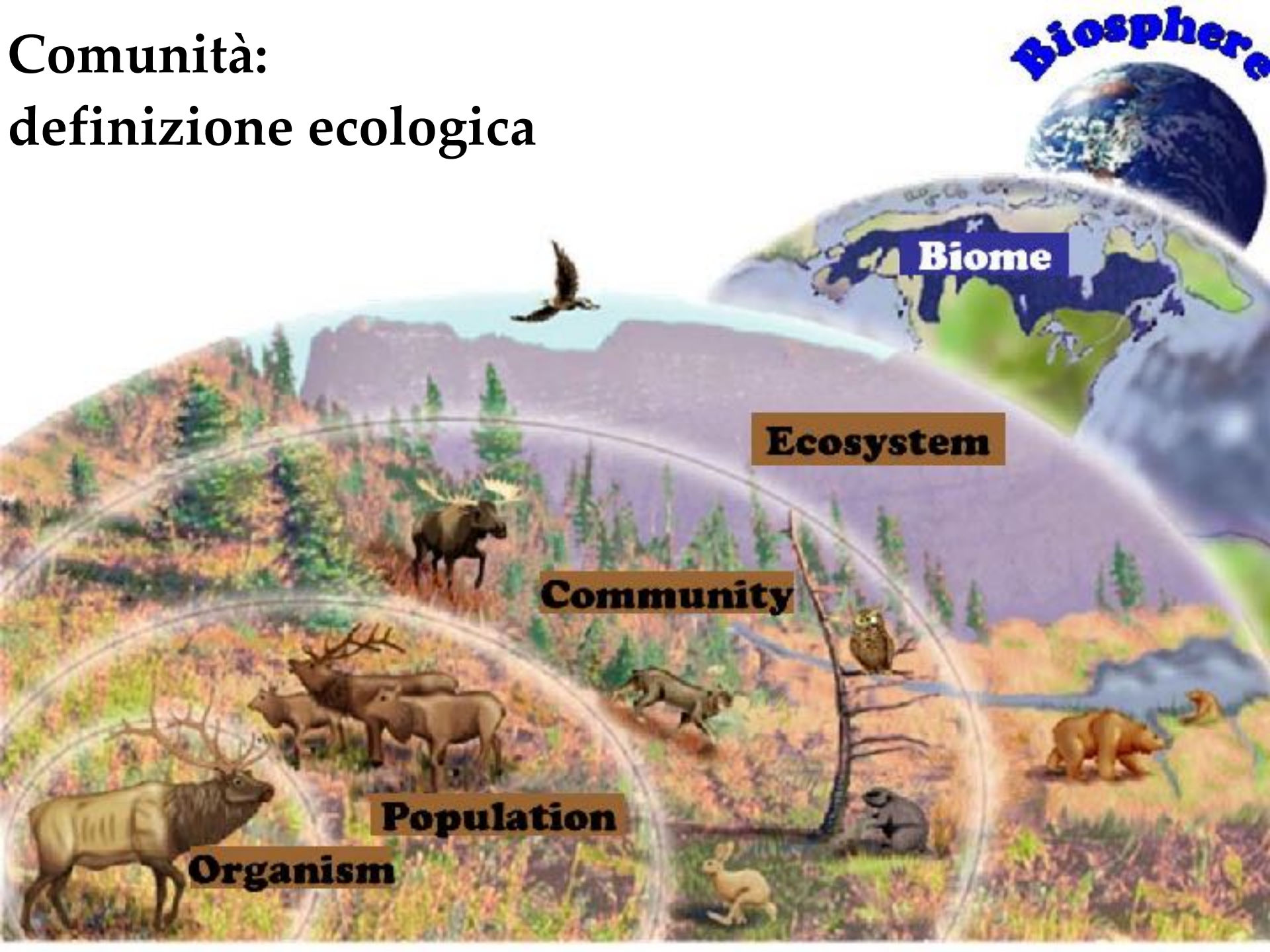
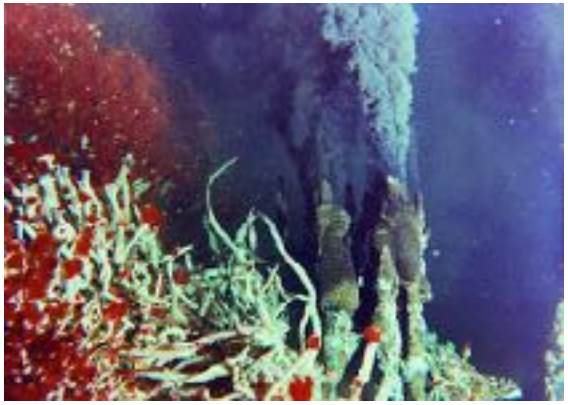
Metodi per lo studio delle comunità microbiche del suolo

Comunità: definizione ecologica



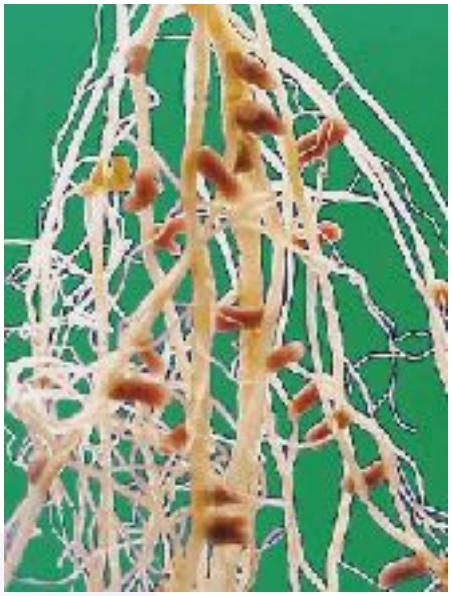
Comunità microbiche

Associazioni di diverse popolazioni microbiche nel medesimo habitat a livello del quale sono possibili interazioni di tipo funzionale



Perché studiare le comunità microbiche?

E’ importante conoscerne la struttura nonché il ruolo, per capire in che modo cambiamenti naturali o antropici possano influenzarne la composizione e soprattutto le funzionalità.



Metodi di studio

METODI CLASSICI CHE SI BASANO SUL NUMERO DEI MICRORGANISMI

- ➢ Conta vitale su piastra
- ➢ Test del Numero più Probabile (MPN)
- ➢ Conta totale

METODI CHE SI BASANO SULL'ATTIVITA' MICROBICA

- ➢ Determinazione dell'ATP
- ➢ Attività enzimatiche
- ➢ Profilo metabolico Biolog

METODI MOLECOLARI

- ➢ Analisi degli acidi grassi::PFLAs (Phospholipid fatty acid analysis) e FAMEs (Fatty acid methyl ester)
- ➢ Approcci che utilizzano l'analisi degli acidi nucleici

Metodi di studio

METODI CLASSICI CHE SI BASANO SUL NUMERO DEI MICRORGANISMI

- ➢ Conta vitale su piastra
- ➢ Test del Numero più Probabile (MPN)
- ➢ Conta totale

METODI CHE SI BASANO SULL'ATTIVITA' MICROBICA

- ➢ Determinazione dell'ATP
- ➢ Attività enzimatiche
- ➢ Profilo metabolico Biolog

METODI MOLECOLARI

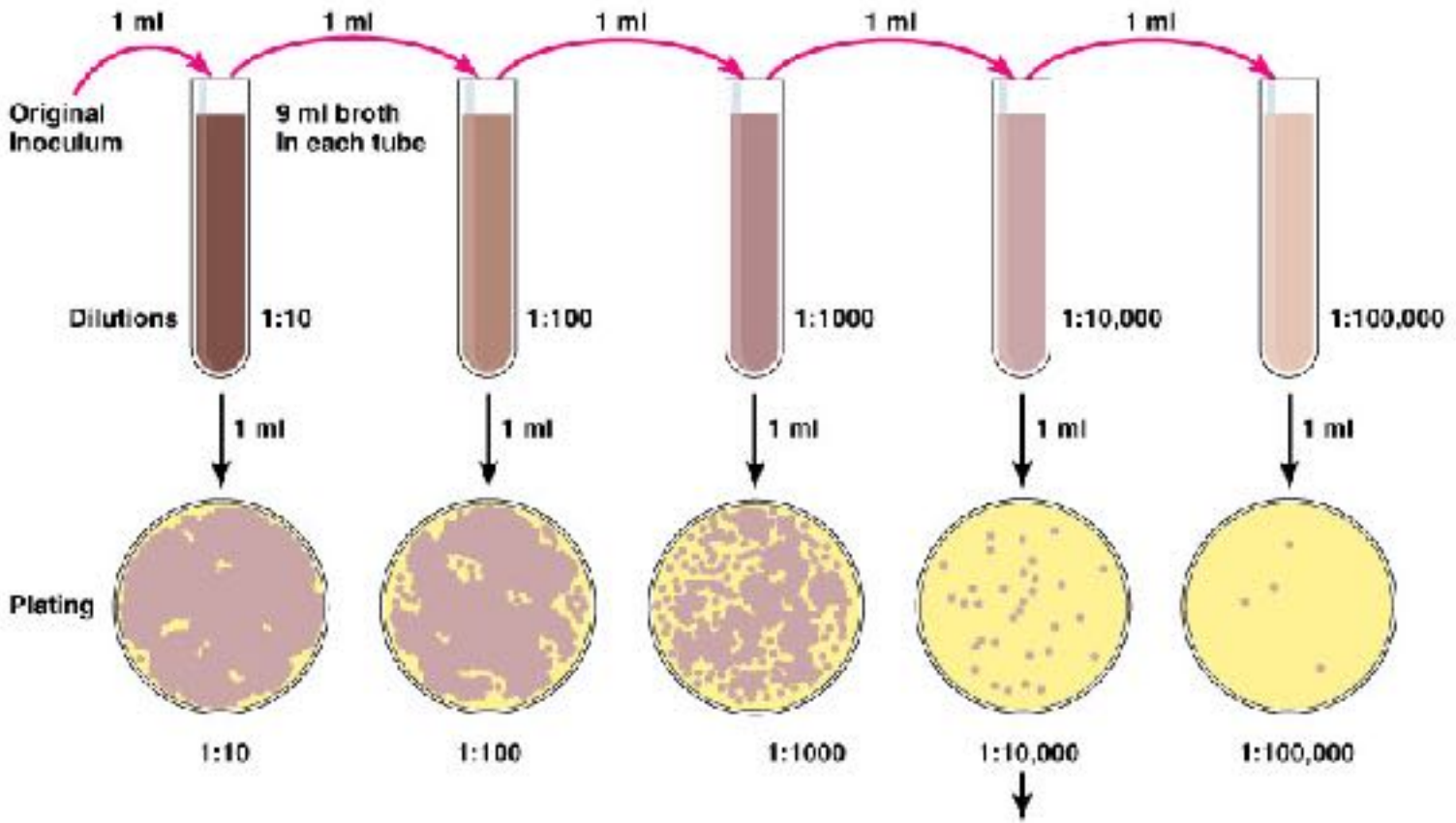
- ➢ Analisi degli acidi grassi::PFLAs (Phospholipid fatty acid analysis) e FAMEs (Fatty acid methyl ester)
- ➢ Approcci che utilizzano l'analisi degli acidi nucleici

CONTA VITALE SU PIASTRA

Questo metodo si basa sulla coltivazione dei microrganismi su differenti mezzi solidi .

Uso tipico

- determinazione del numero dei batteri eterotrofi coltivabili e/o di specifici gruppi. Per la conta si assume che ciascuna colonia si sia originata da una singola cellula.
- Isolamento di batteri da sottoporre a successiva caratterizzazione



CONTA VITALE SU PIASTRA

Vantaggi:

- facile, necessita solamente di piastre e mezzi colturali
- versatile, mezzi specifici e generali
- Isolamento in coltura pura.

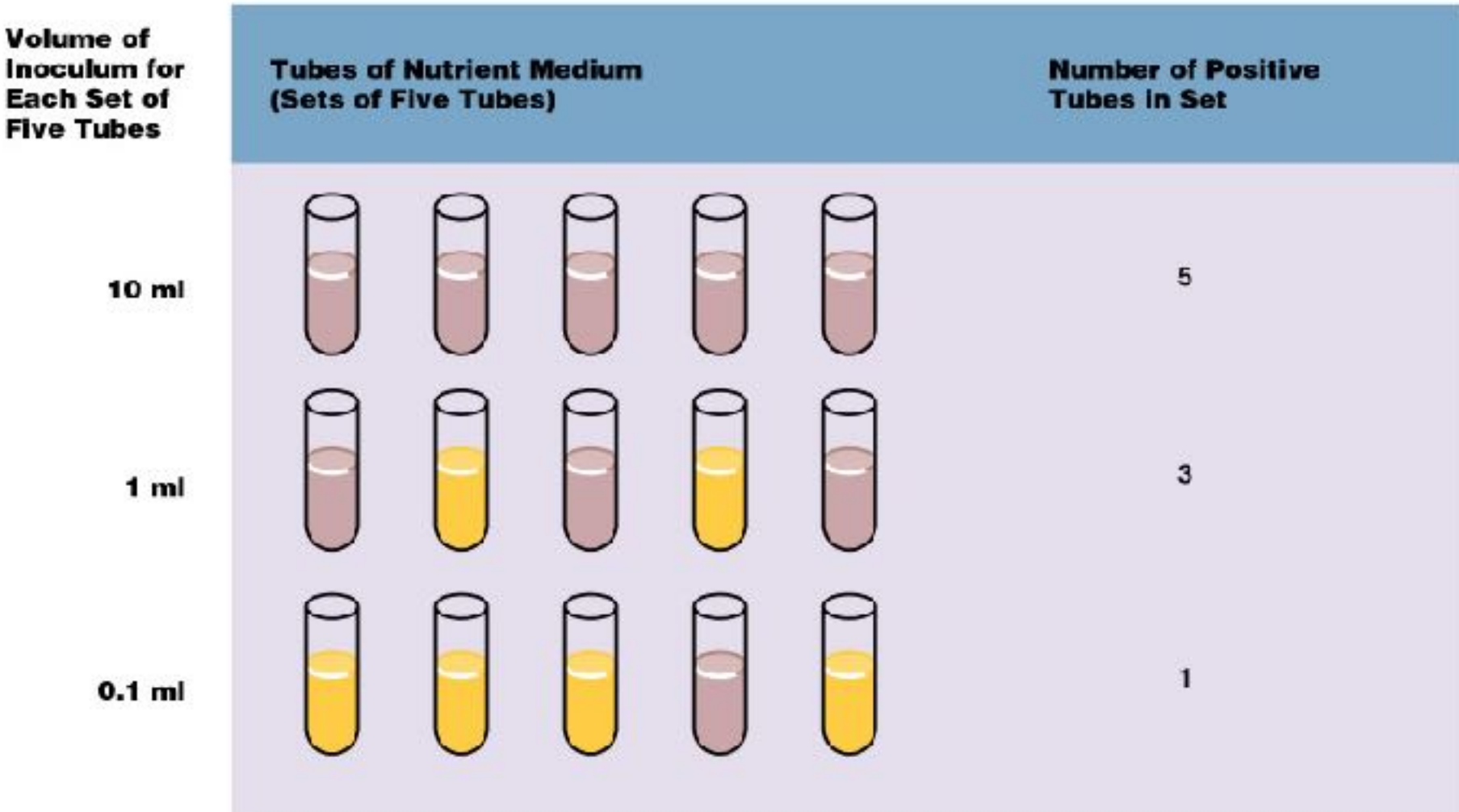
Svantaggi:

- non esistono mezzi universali (è stimato che solamente 1-3%della comunità batterica del suolo è coltivabile con l'uso degli attuali metodi impiegati per la crescita)
- l'incompleto rilascio di cellule dalle particelle di suolo porta ad una sottostima delle popolazioni
- nel caso in cui deve essere saggiata la crescita su specifici composti, contaminanti presenti in alcuni componenti del mezzo possono interferire con il risultato

MPN TEST

Tale approccio metodologico si basa sull'uso delle colture liquide

La determinazione del numero più probabile di microrganismi presenti viene definito mediante specifiche tavole statistiche.



MPN TEST

Tale approccio metodologico si basa sull'uso delle colture liquide

La determinazione del numero più probabile di microrganismi presenti viene definito mediante specifiche tavole statistiche.

Combination of Positives	MPN Index/ 100 ml	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

MPN TEST

Vantaggi:

- consente di contare i microrganismi difficili a crescere su mezzi standard solidi (nitrificanti)

- consente di stimare i microrganismi mediante un processo, metodo non facile utilizzando mezzi solidi (sviluppo dei prodotti gassosi finali del processo di denitrificazione, N_2O e N_2).

Svantaggi:

- E' limitato dalla precisione delle tavole della probabilità e prevede molto lavoro (l'accuratezza del risultato può essere incrementata aumentando il numero dei tubi per ogni diluizione e/o attuando diluizioni intermedie tra i livelli)

- Errori legati ai mezzi di crescita e problemi legati alla dispersione dei campioni

(problemi, comunque legati a tutti i metodi che prevedono la crescita dei mircorganismi)

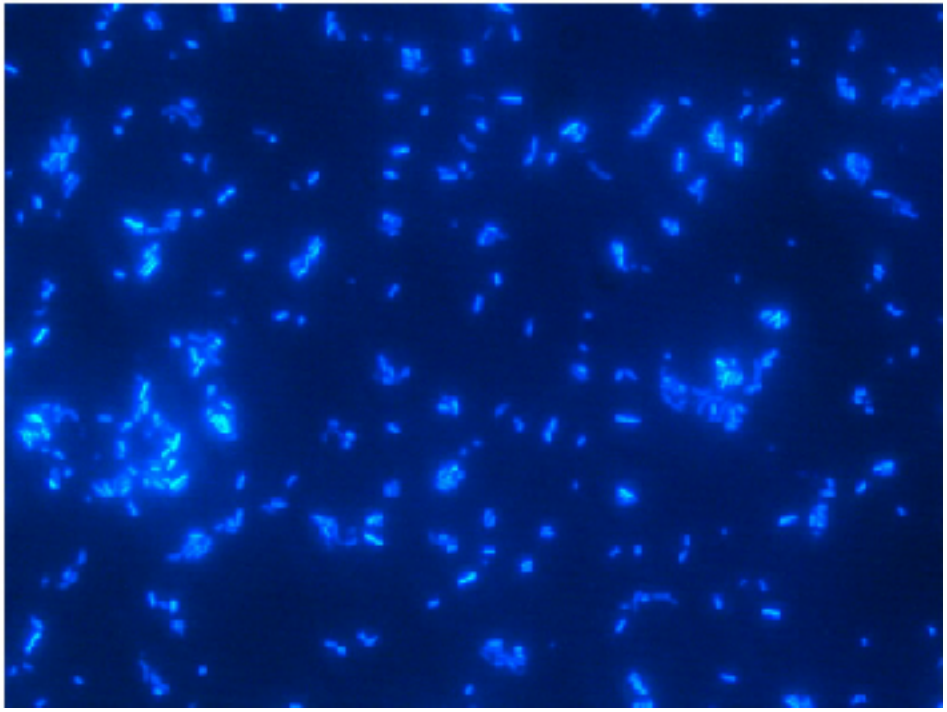
CONTA TOTALE MEDIANTE MICROSCOPIO AD EPIFLUORESCENZA

- Prevede l'uso di coloranti fluorescenti (arancio di acridina, DAPI) che si legano a componenti delle cellule microbiche in modo da evidenziarle

- E' necessario separare i microrganismi dalle particelle di suolo, diluire e recuperare i campioni (microrganismi) su una membrana da filtro, colorare e contare al microscopio

- Non dipende dalla crescita dei microrganismi

DAPI
4',6-diamido-2-fenilindolo



CONTA TOTALE MEDIANTE MICROSCOPIO AD EPIFLUORESCENZA

Vantaggi:

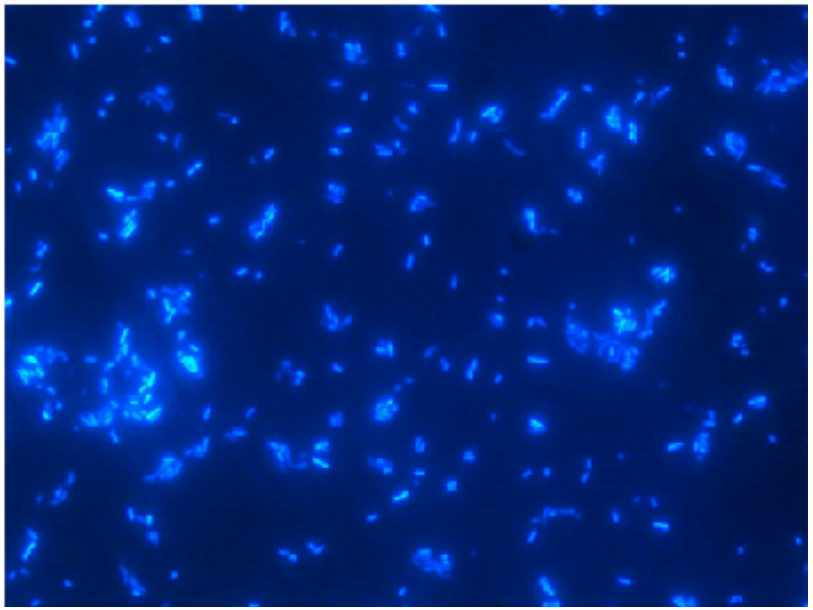
- tutte le cellule visibili possono essere contate

Svantaggi:

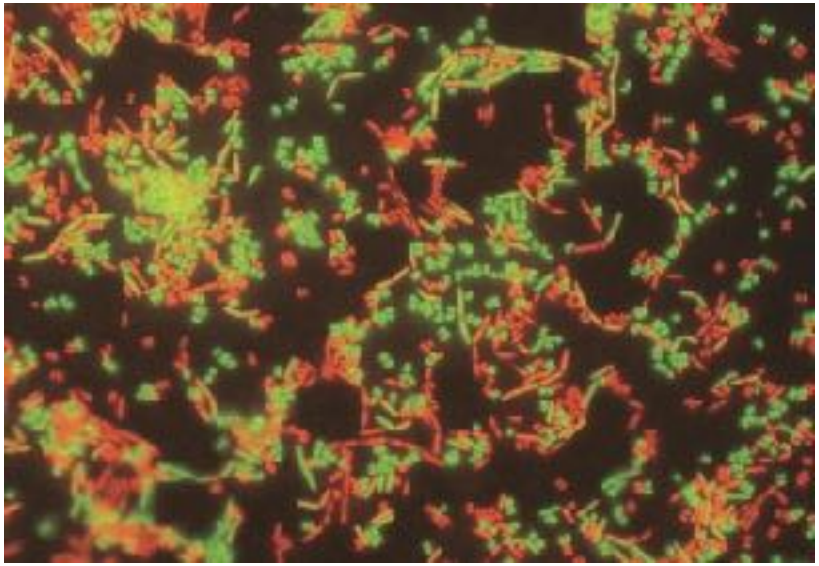
- incapacità di separare le cellule da altri componenti abiotici
- presenza di un sottofondo fluorescente
- non consente di distinguere le cellule vive da quelle morte*
- non consente di distinguere i gruppi fisiologici
- richiede il microscopio a epifluorescenza

CONTA TOTALE MEDIANTE MICROSCOPIO AD EPIFLUORESCENZA

DAPI (4’,6-diamido-2-fenilindolo)
fluorocromo che lega gli acidi nucleici e non reagisce con materiale inerte



LIVE/DEAD
Bac Light Bacterial Viability Stain
-Colorante verde: penetra in tutte le cellule
-Colorante rosso: penetra solo nelle cellule morte



Metodi di studio

METODI CLASSICI CHE SI BASANO SUL NUMERO DEI MICRORGANISMI

- ➢ Conta vitale su piastra
- ➢ Test del Numero più Probabile (MPN)
- ➢ Conta totale

METODI CHE SI BASANO SULL'ATTIVITA' MICROBICA

- ➢ Determinazione dell'ATP
- ➢ Attività enzimatiche
- ➢ Profilo metabolico Biolog

METODI MOLECOLARI

- ➢ Analisi degli acidi grassi::PFLAs (Phospholipid fatty acid analysis) e FAMEs (Fatty acid methyl ester)
- ➢ Approcci che utilizzano l'analisi degli acidi nucleici

DETERMINAZIONE ATP

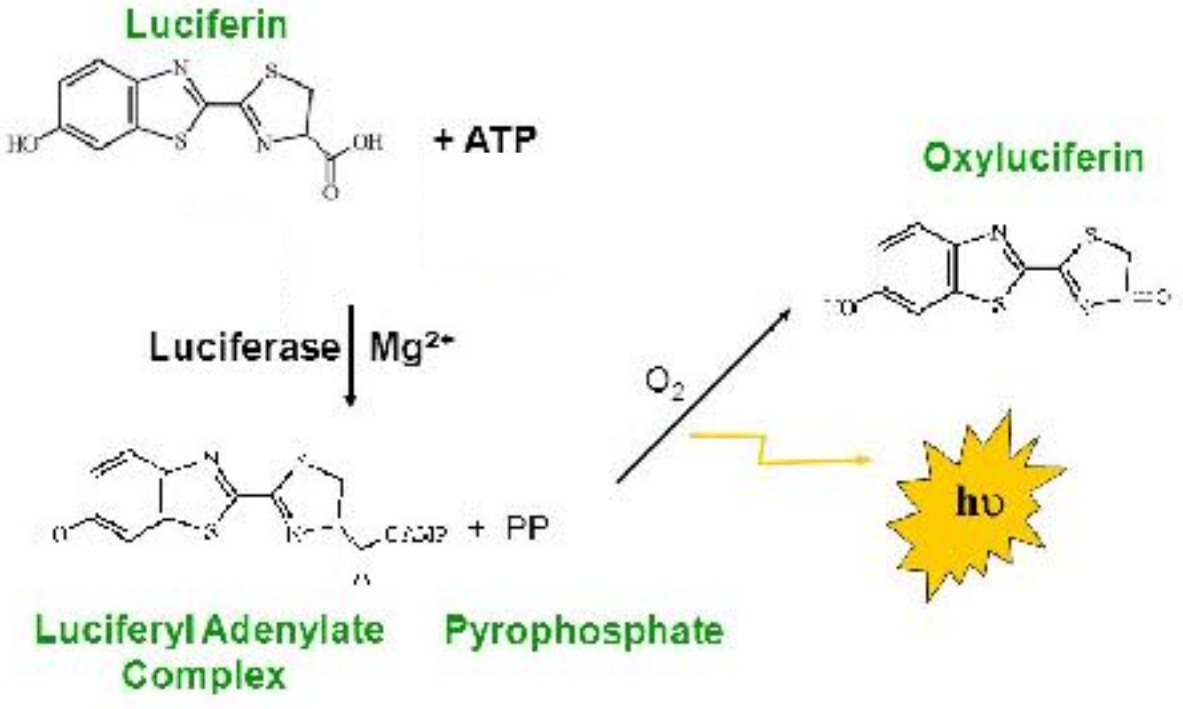
•L'ATP è presente in tutti i microrganismi e può essere misurato con grande sensibilità

•L'ATP è estratto dal suolo (0,5-100 g) e determinato mediante il saggio della luciferin-luciferase:

-luciferina ridotta reagisce con l'ossigeno e forma luciferina ossidata in presenza dell'enzima luciferasi, ioni magnesio e ATP.

-In questa reazione viene emessa luce e la quantità di luce è proporzionale alla concentrazione di ATP.

-La luce emessa è quantificata mediante l'uso di un fotometro e convertita ad ATP mediante una curva di taratura.



DETERMINAZIONE ATP

Vantaggi:

- specifico per le cellule vive
- è una misura diretta
- è molto sensibile (il limite teorico è circa 50-500 cellule)

Svantaggi:

- Il contenuto in ATP delle cellule varia con il tipo di cellula e lo stato fisiologico
- L'estrazione di ATP dal suolo può essere incompleta e contenere ATP di origine non microbica
- I reagenti sono costosi e richiede strumentazione specializzata

ATTIVITA' ENZIMATICHE

Una varietà di enzimi possono essere utilizzati per misurare l'attività metabolica di una comunità microbica (deidrogenasi, fosfatasi, cellulasi, chitinasi, nitrogenasi, etc.)

Vantaggi:

• differiscono in composizione chimica e funzione e sensibilità ai cambiamenti ambientali

• possono essere considerati dei validi indicatori grazie alla loro elevata e differente sensibilità a specifici cambiamenti che avvengono nel suolo

• semplicità dei metodi

Svantaggi:

• è difficile mantenere durante la determinazione le condizioni in situ

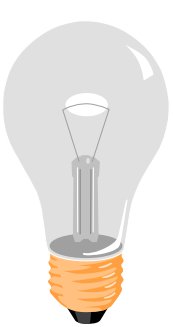
• determinate attività enzimatiche non sono specifiche dei microrganismi

PROFILO METABOLICO BIOLOG

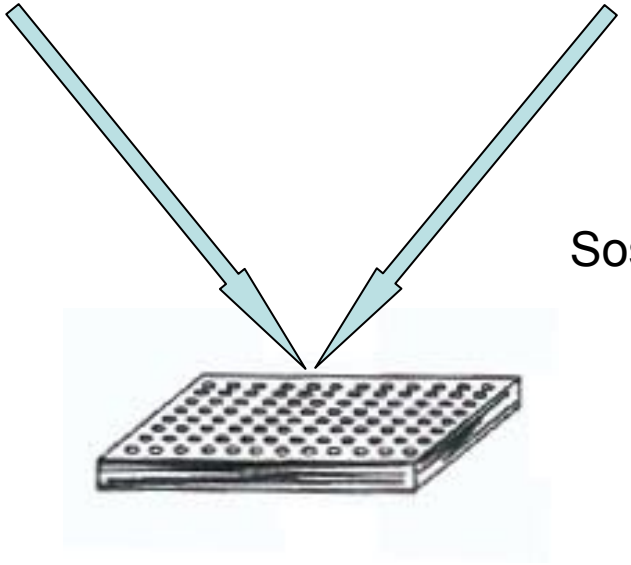
Il metodo si basa sull'utilizzazione da parte della comunità microbica di differenti fonti di carbonio. Ogni piastra Biolog è costituita da 95 pozzetti:

- un pozzetto non contiene nessuna fonte di carbonio,
- ognuno dei rimanenti pozzetti contengono una diversa fonte di carbonio,
- tutti i pozzetti contengono è presente il violetto di tetrazolio che in caso di utilizzazione della fonte di carbonio viene ridotto.
- la riduzione è resa evidente dalla comparsa nel pozzetto di un colore viola

Cosa contengono le piastre Biolog ?



Violetto di tetrazolio



Sostanza organica*

* 28 carboidrati, 24 acidi organici, 20 amminoacidi, 6 ammidi e ammine, 5 polimeri, 4 aromatici, 3 substrati fosforilati, 2 alcoli, 2 esteri, 1 composto alogenato

PROFILO METABOLICO BIOLOG

Profilo metabolico delle comunità microbiche

Inoculo

BiOLOG — Microbial Community Analysis

EcoPlate™

A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

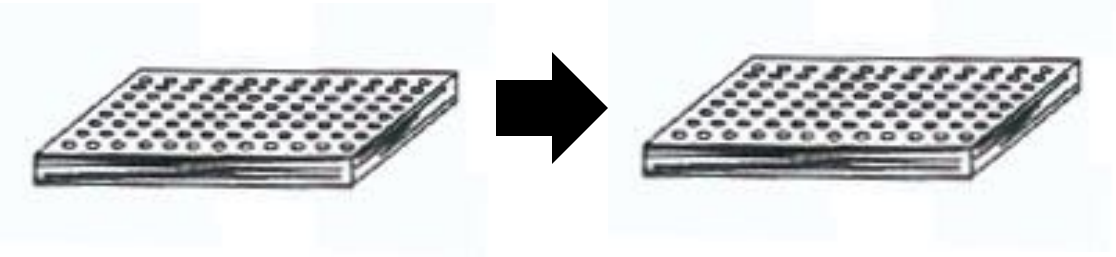
FIGURE 1. Carbon Sources in EcoPlate

PROFILO METABOLICO BIOLOG

Profilo metabolico delle comunità microbiche

Inoculo

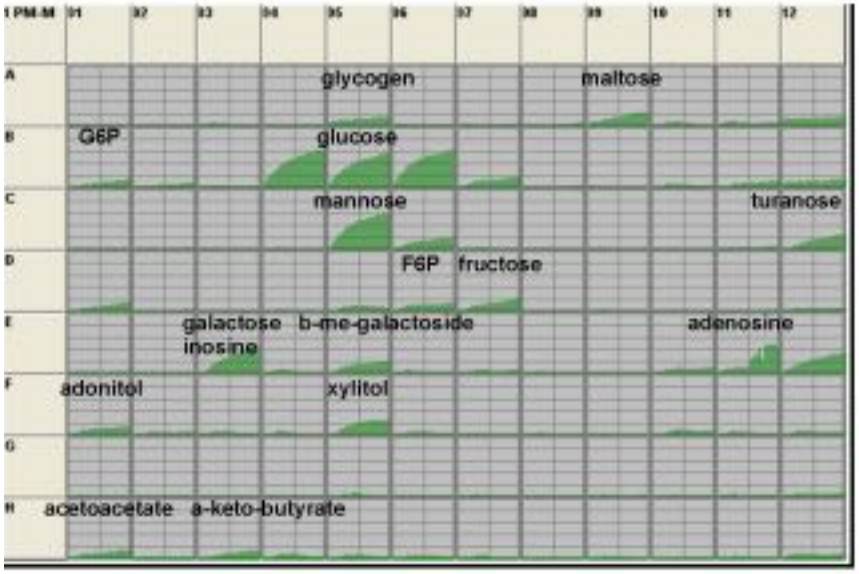
Incubazione

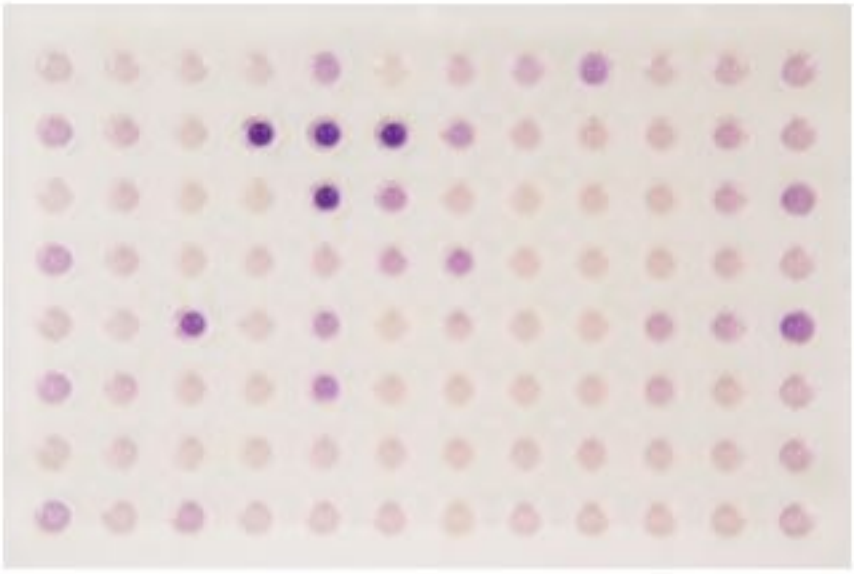


Profilo metabolico delle comunità microbiche

Analisi dei risultati

- Tasso di sviluppo del colore (densità)
- Presenza o assenza di risposta (diversità)
- Analisi multivariata dei profili (similarità)





PROFILO METABOLICO BIOLOG

Vantaggi:

• Il metodo fornisce un fingerprint dell'attività metabolica della comunità microbica. Si deve tenere presente che il profilo metabolico non rispecchia lo stato dell'attività di una comunità microbica in situ, tuttavia è un valido strumento per paragonare comunità microbiche di suoli diversi o comunità di un stesso tipo di suolo sottoposto a differenti trattamenti

Svantaggi:

• Il metodo si basa sulla crescita microbica

• Standardizzazione del metodo

•Le fonti di carbonio usate sono solamente in parte rappresentative dei substrati disponibili in ambienti naturali

•Ridondanza metabolica dei microrganismi

Metodi di studio

METODI CLASSICI CHE SI BASANO SUL NUMERO DEI MICRORGANISMI

- ➢ Conta vitale su piastra
- ➢ Test del Numero più Probabile (MPN)
- ➢ Conta totale

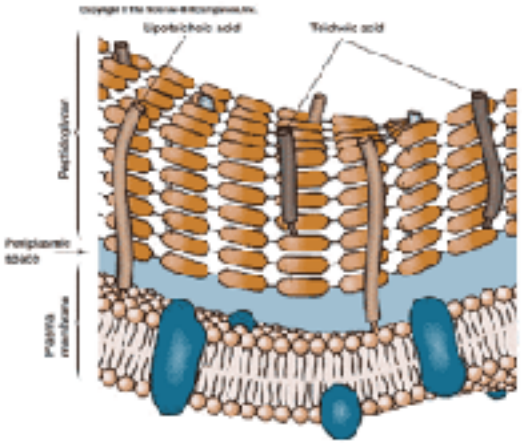
METODI CHE SI BASANO SULL'ATTIVITA' MICROBICA

- ➢ Determinazione dell'ATP
- ➢ Attività enzimatiche
- ➢ Profilo metabolico Biolog

METODI MOLECOLARI

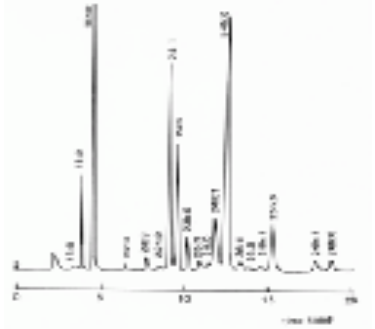
- ➢ Analisi degli acidi grassi::PFLAs (Phospholipid fatty acid analysis) e FAMEs (Fatty acid methyl ester)
- ➢ Approcci che utilizzano l'analisi degli acidi nucleici

FATTY ACID METYL ESTER ANALYSIS (FAME)

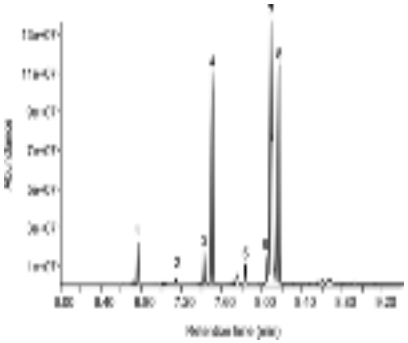


gli acidi grassi sono diversi in specie diverse

gas cromatografo



profilo comunità A



profilo comunità B

Vantaggi:

- Buona discriminazione tra diversi campioni

Svantaggi:

- Richiede molta biomassa

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-indipendenti
  - Contenuto in G+C
  - DNA reassociation
  - DNA hybridization
- Metodi PCR-dipendenti
  - DGGE/TGGE
  - T-RFLP
  - SSCP
  - RISA-ARISA

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

Estrazione e purificazione del DNA

- Metodi PCR-indipendenti
- Metodi PCR-dipendenti

Estrazione e purificazione del DNA

A) Estrazione cellule dal suolo e successiva estrazione DNA

B) Estrazione DNA direttamente dal suolo

Estrazione DNA da suolo

L'estrazione di DNA da suolo condivide alcune problematiche con l'estrazione delle cellule

Problematiche :

1. Legame DNA/cellule con particelle del suolo
2. Efficiente lisi cellulare per tutti i microorganismi
3. Enzimi cellulari che tagliano il DNA
4. Purificazione da sostanze indesiderate

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

Estrazione DNA da suolo

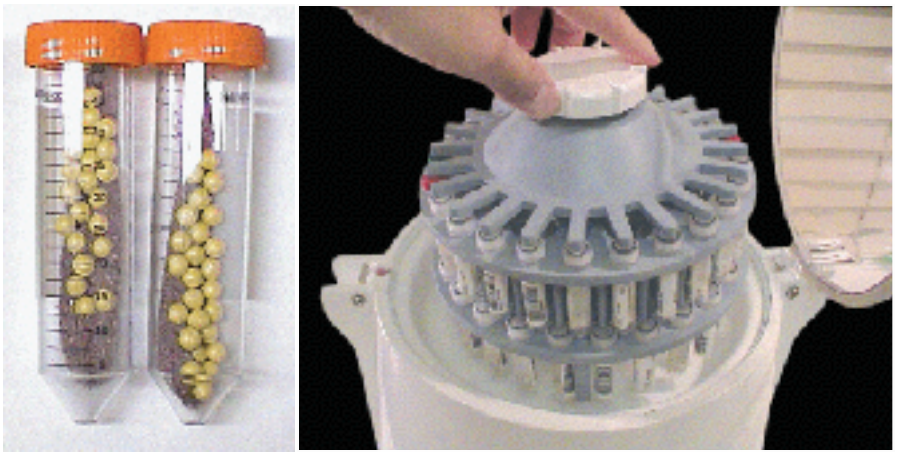
2 - Lisi cellulare

1. Lisi Chimica o Enzimatica

Utilizzo di sostanze come lisozima, SDS o CTAB per rottura involucro cellulare

1. Lisi con metodi fisici

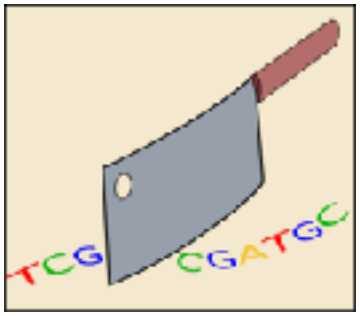
Utilizzo di omogenizzatori, tritatori, sonicatori, o metodo BEAD BEATING



Metodo bead beating

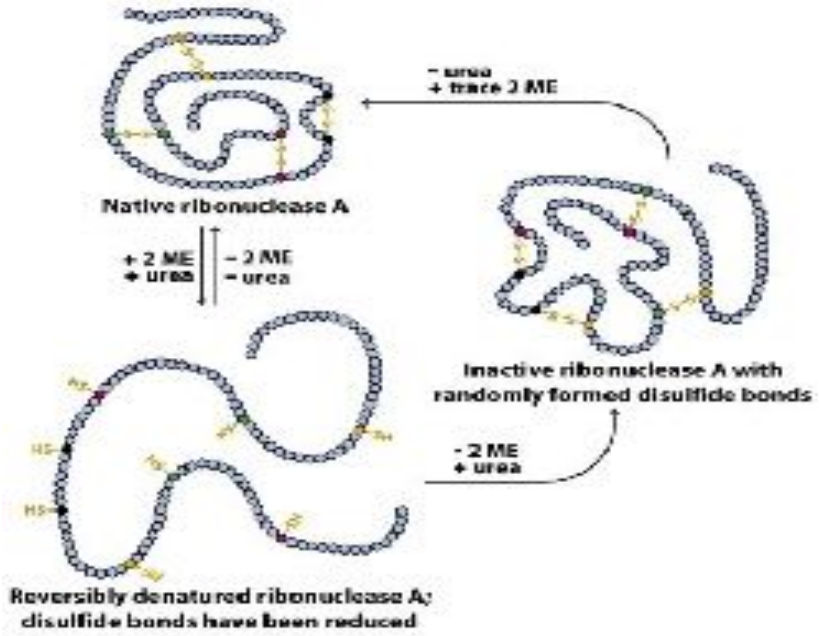
Estrazione DNA da suolo

3 – Protezione del DNA



nucleasi

Per evitare la degradazione enzimatica del DNA estratto si associano metodi fisici e chimici che puntano ad una DENATURAZIONE delle nucleasi <u>rapida</u> ed <u>efficiente</u>



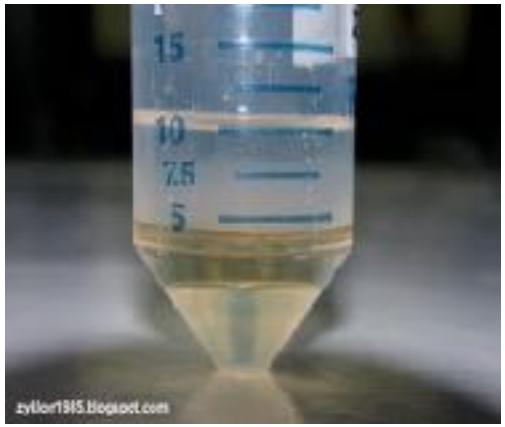
1. EDTA
2. calore
3. urea
4. EtOH
5. DTT o BME

Estrazione DNA da suolo

4 – Purificazione del DNA

Proteine e Acidi Grassi

Utilizzo fenolo cloroformio e successiva precipitazione in EtOH

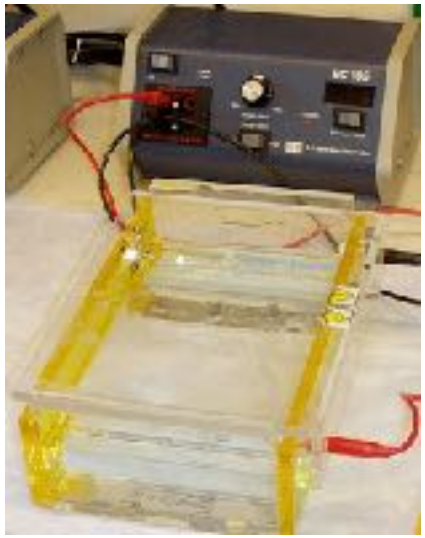


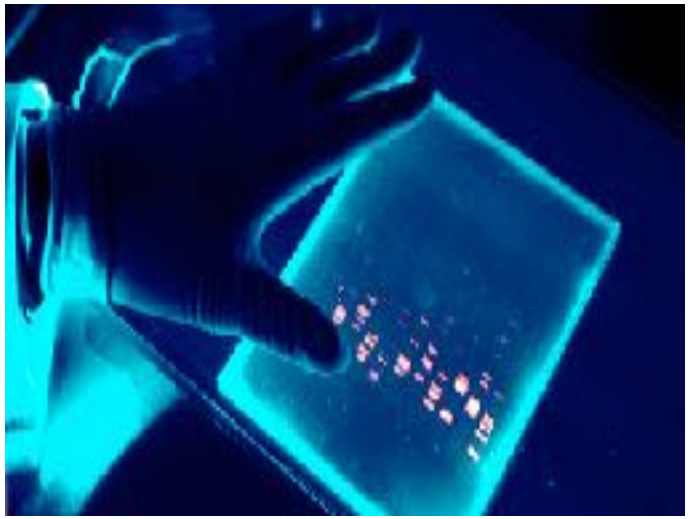
Acidi Umici

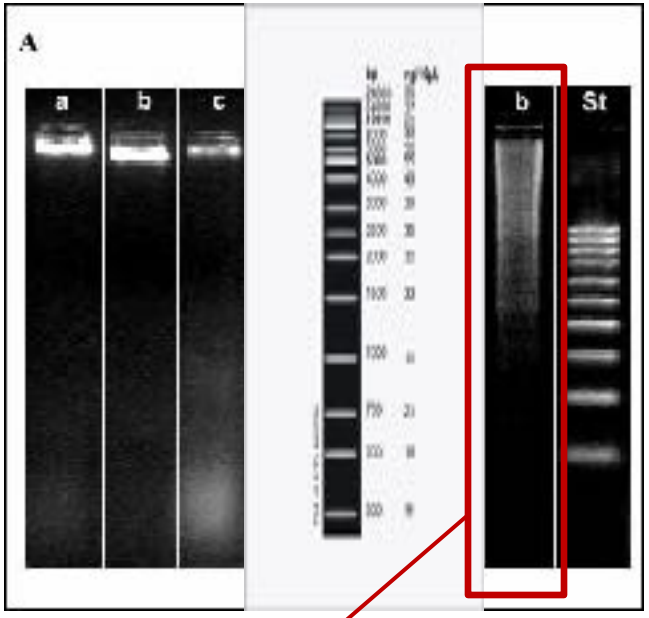
Utilizzo sostanze che sequestrano gli acidi umici come PVP, Skim Milk, BSA

Estrazione DNA da suolo

Controllo Qualita' DNA Estratto I





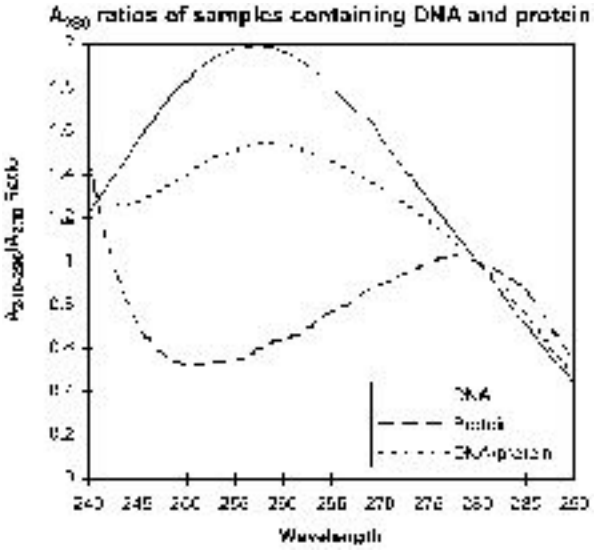


Smear = <u>DNA degradato</u>

Estrazione DNA da suolo

Controllo Qualita' DNA Estratto II

1. Valore A λ=260nm
2. Rapporto 260/280 (PROTEINE)
3. Rapporto 260/230 (SOST.ORGANICA)



METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

1. Metodi PCR-indipendenti

    1. Contenuto in G+C
    2. DNA reassociation
    3. DNA hybridization

1. Metodi PCR-dipendenti

    1. DGGE/TGGE
    2. SSCP
    3. T-RFLP
    4. RISA-ARISA
    5. Deep Sequencing

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-indipendenti

1. Contenuto in G+C
2. DNA reassociation
3. DNA hybridization

- Metodi PCR-dipendenti

- DGGE/TGGE
- SSCP
- T-RFLP
- RISA-ARISA
- Deep Sequencing

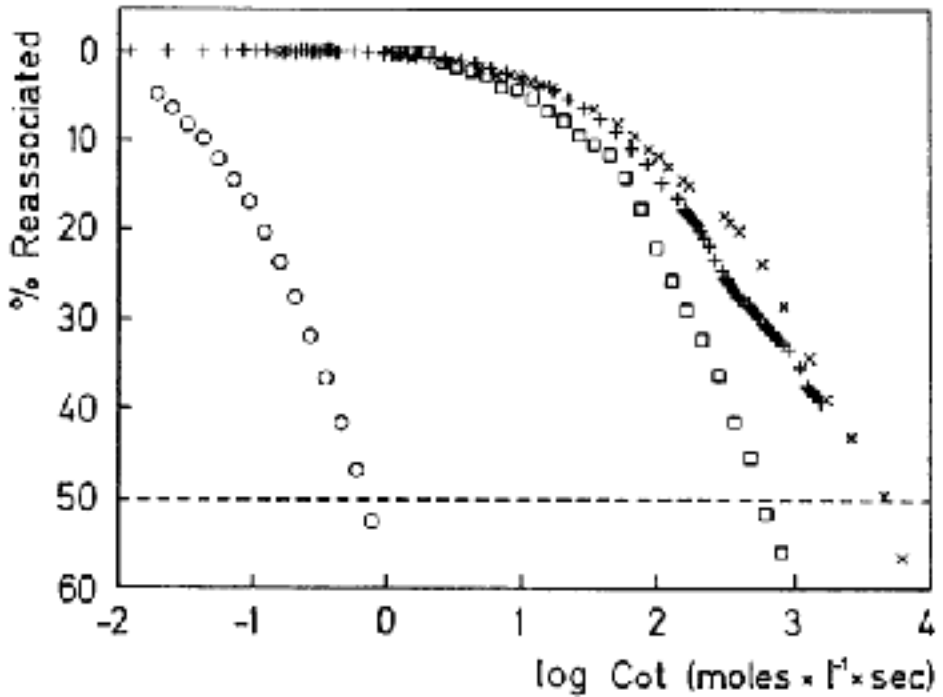
METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

❑ Metodi PCR-indipendenti

Riassociazione DNA-DNA

➢ La il tempo di riassociazione del DNA dopo la denaturazione è un indice della complessità genetica della comunità microbica

➢ Prende in considerazione tutte le sequenze ma non è un metodo ad alta sensibilità.



METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-indipendenti

DNA Hybridization

L'uso di specifiche sonde marcate consente di ricercare sequenze desiderate di DNA nella frazione totale estratta, come determinati gruppi microbici o geni di particolare interesse.

Southern blot

Dot blot

FISH

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

❑ Metodi PCR-indipendenti

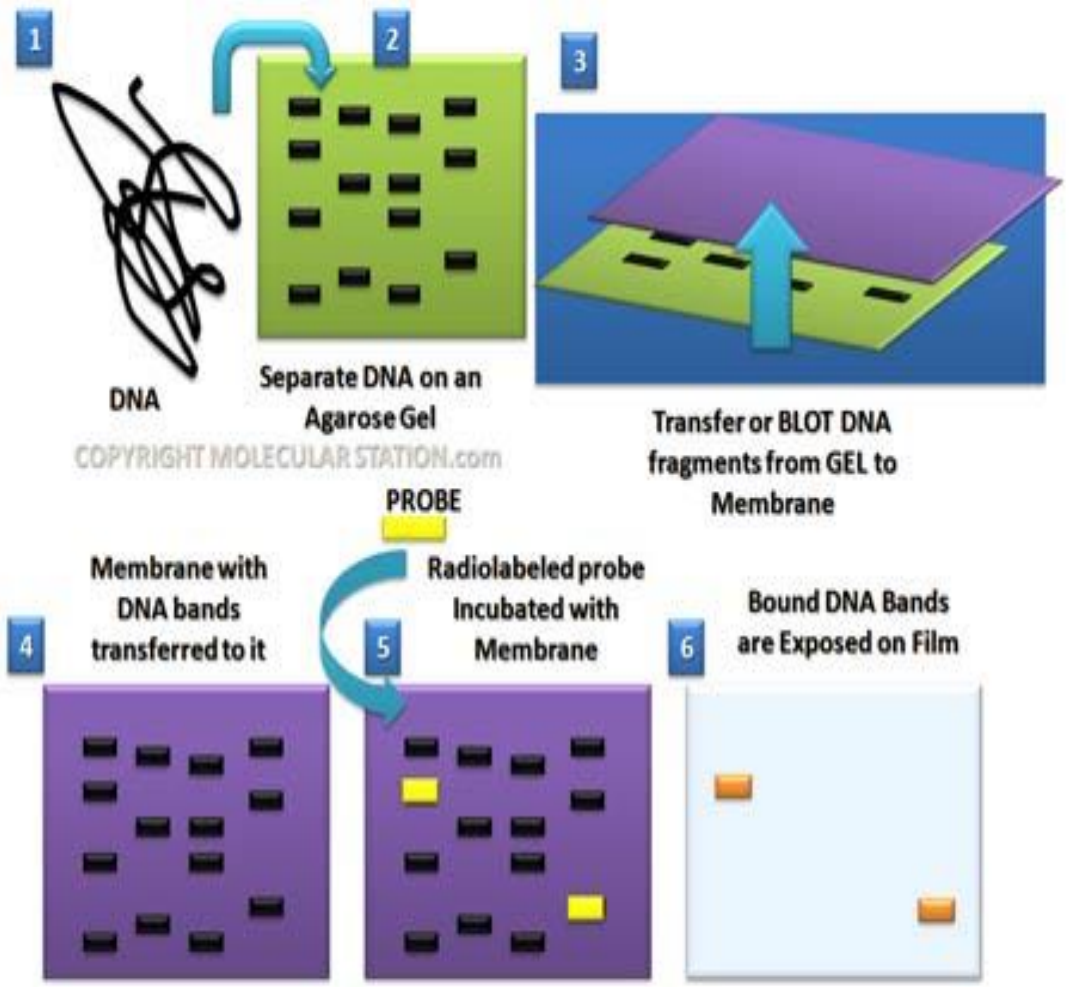
DNA Hybridization

L'uso di specifiche sonde marcate consente di ricercare sequenze desiderate di DNA nella frazione totale estratta, come determinati gruppi microbici o geni di particolare interesse.

Southern blot

Dot blot

FISH



METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

❑ Metodi PCR-indipendenti

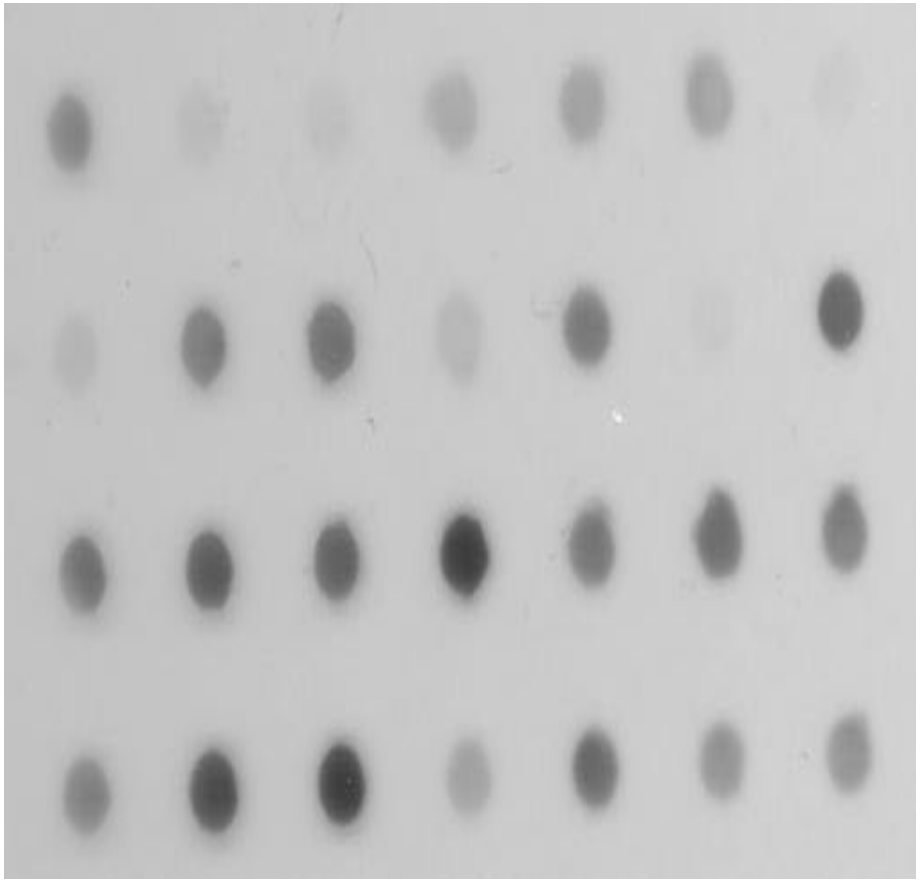
DNA Hybridization

L'uso di specifiche sonde marcate consente di ricercare sequenze desiderate di DNA nella frazione totale estratta, come determinati gruppi microbici o geni di particolare interesse.

Southern blot

Dot blot

FISH



METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

❑ Metodi PCR-indipendenti

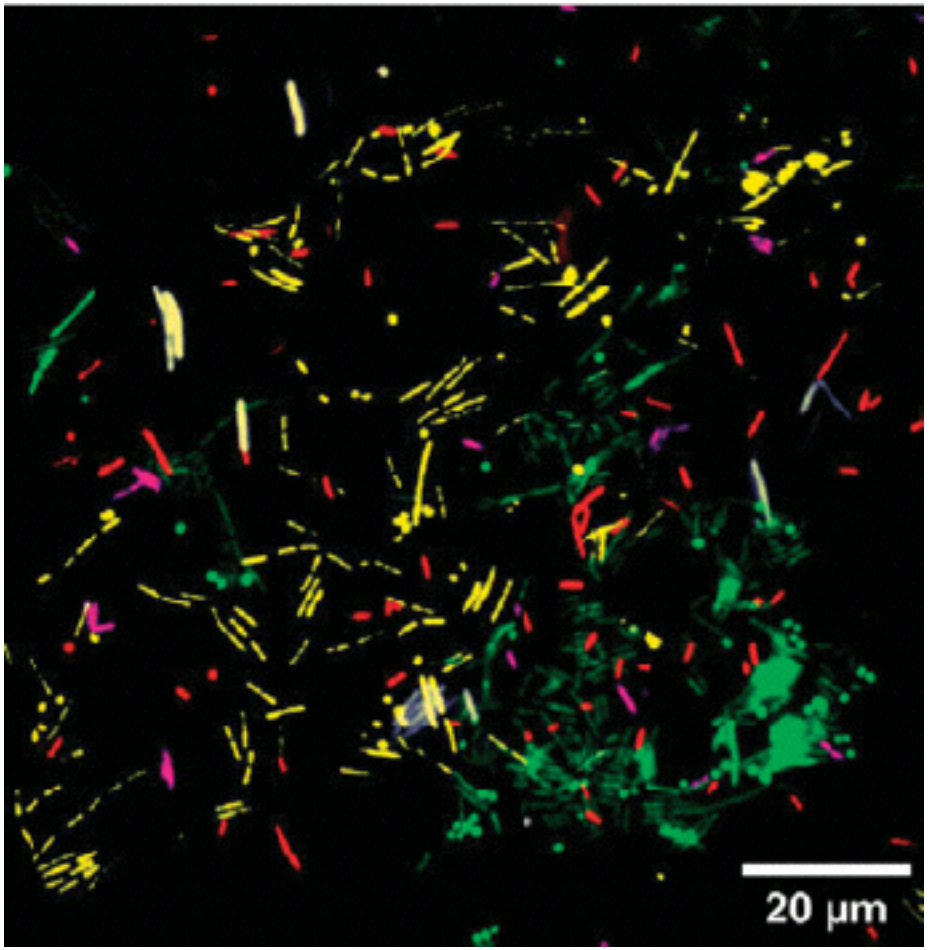
DNA Hybridization

L'uso di specifiche sonde marcate consente di ricercare sequenze desiderate di DNA nella frazione totale estratta, come determinati gruppi microbici o geni di particolare interesse.

Southern blot

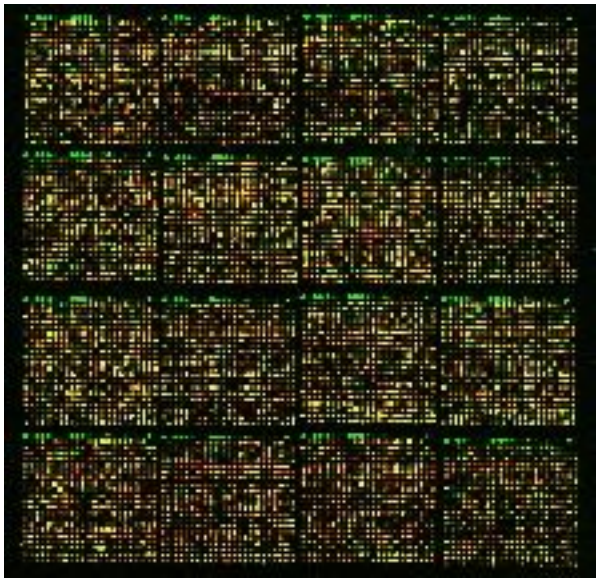
Dot blot

FISH
(fluorescence in situ hybridization)



METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

DNA MICROARRAY



➢ Applicazione di migliaia di sonde su un supporto solido
➢ Il DNA estratto viene marcato con fluorofori
➢ Uno scanner laser registra le eventuali ibridazioni

Migliaia di informazioni nello stesso tempo, ma il DNA deve essere privo di contaminanti. Inoltre spesso si rivelano solo le sequenze più abbondanti.

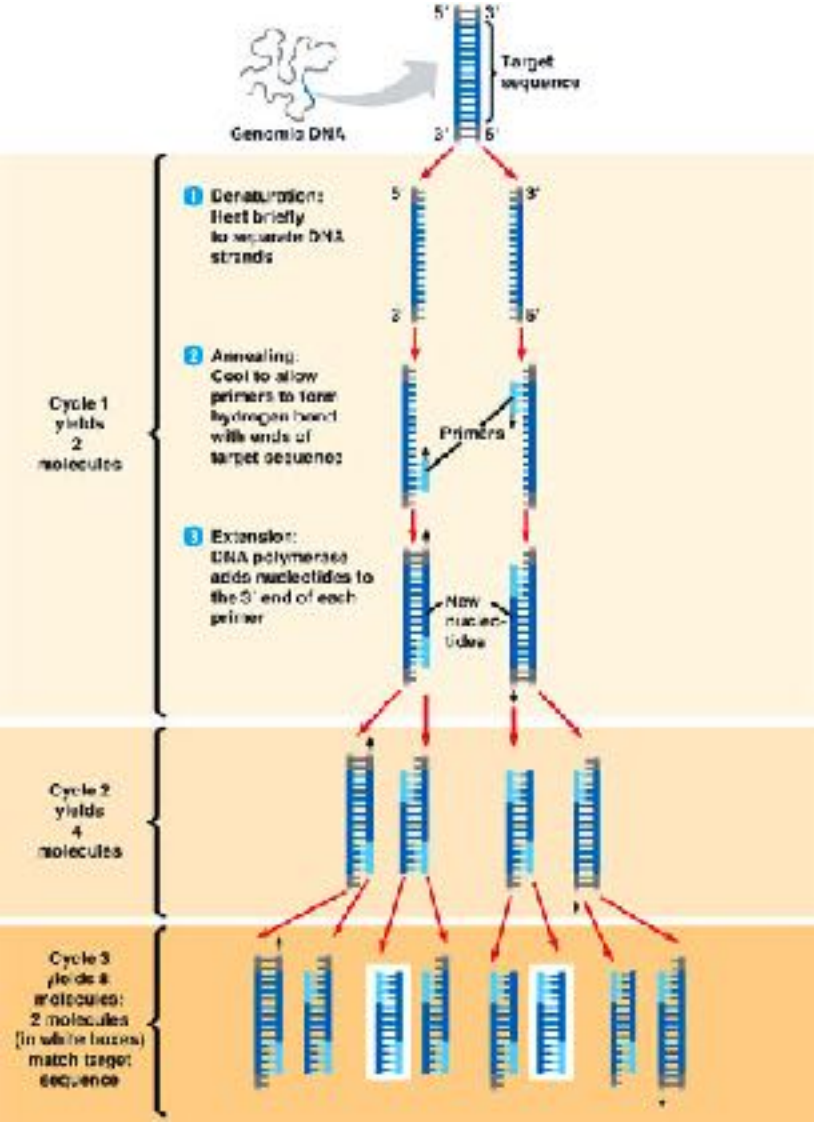
METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-indipendenti
  - Contenuto in G+C
  - DNA reassociation
  - DNA hybridization
- Metodi PCR-dipendenti
  - DGGE/TGGE
  - SSCP
  - T-RFLP
  - RISA-ARISA
  - Deep Sequencing

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

PCR- Polymerase Chain Reaction



La PCR consente l'amplificazione di desiderate sequenze di DNA presenti un campione complesso come DNA estratto da suolo.

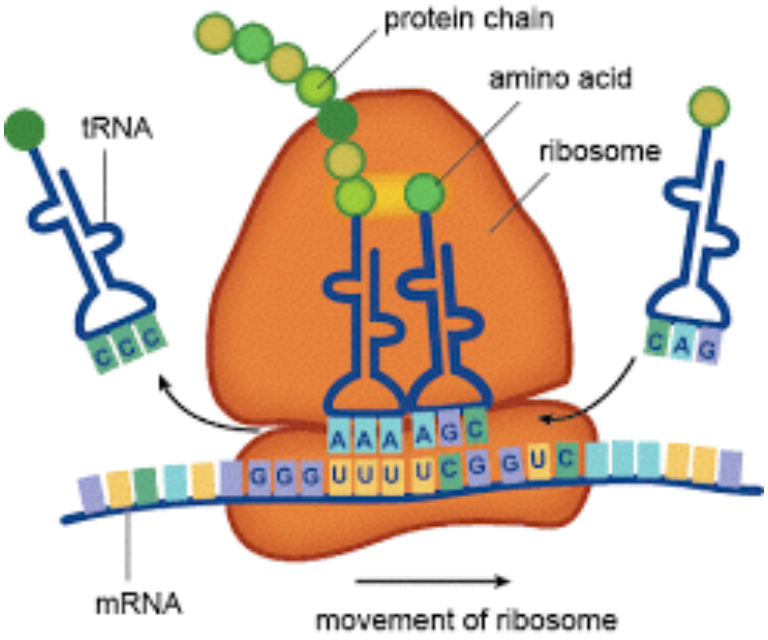
METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

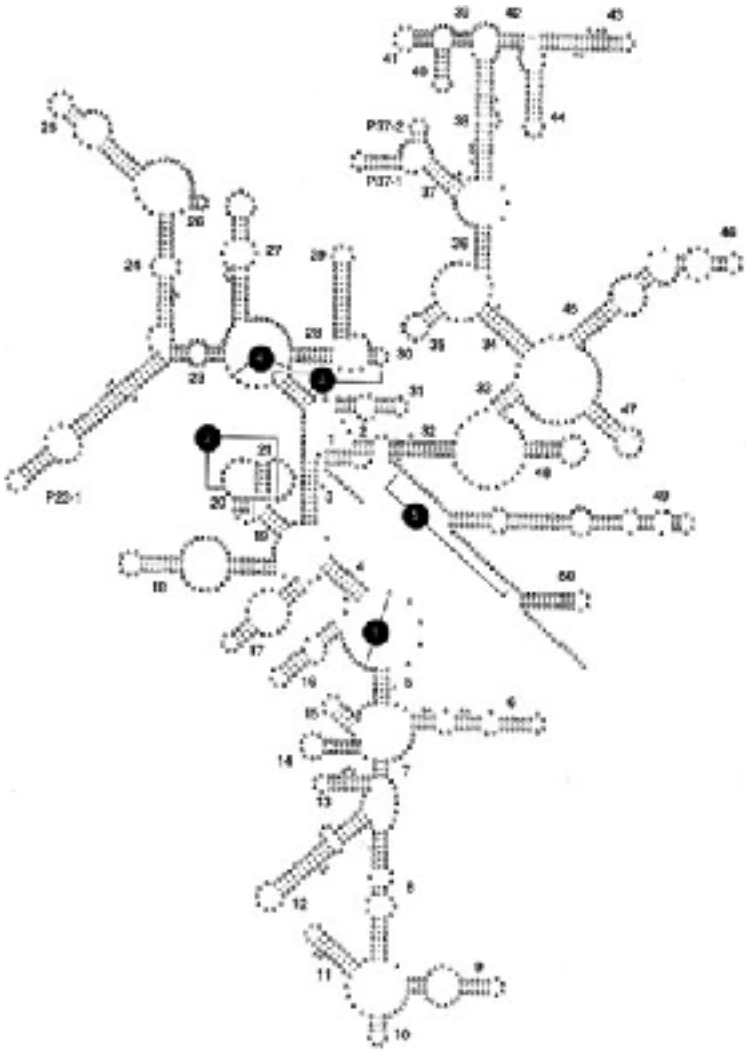
- Metodi PCR-dipendenti

Nell'ecologia microbica molecolare sono molte le sequenze che possono essere oggetto di studio (sequenze di geni ribosomiali, sequenze di geni funzionali)

Geni ribosomiali:

- ubiquitari
- necessari per la sintesi proteica



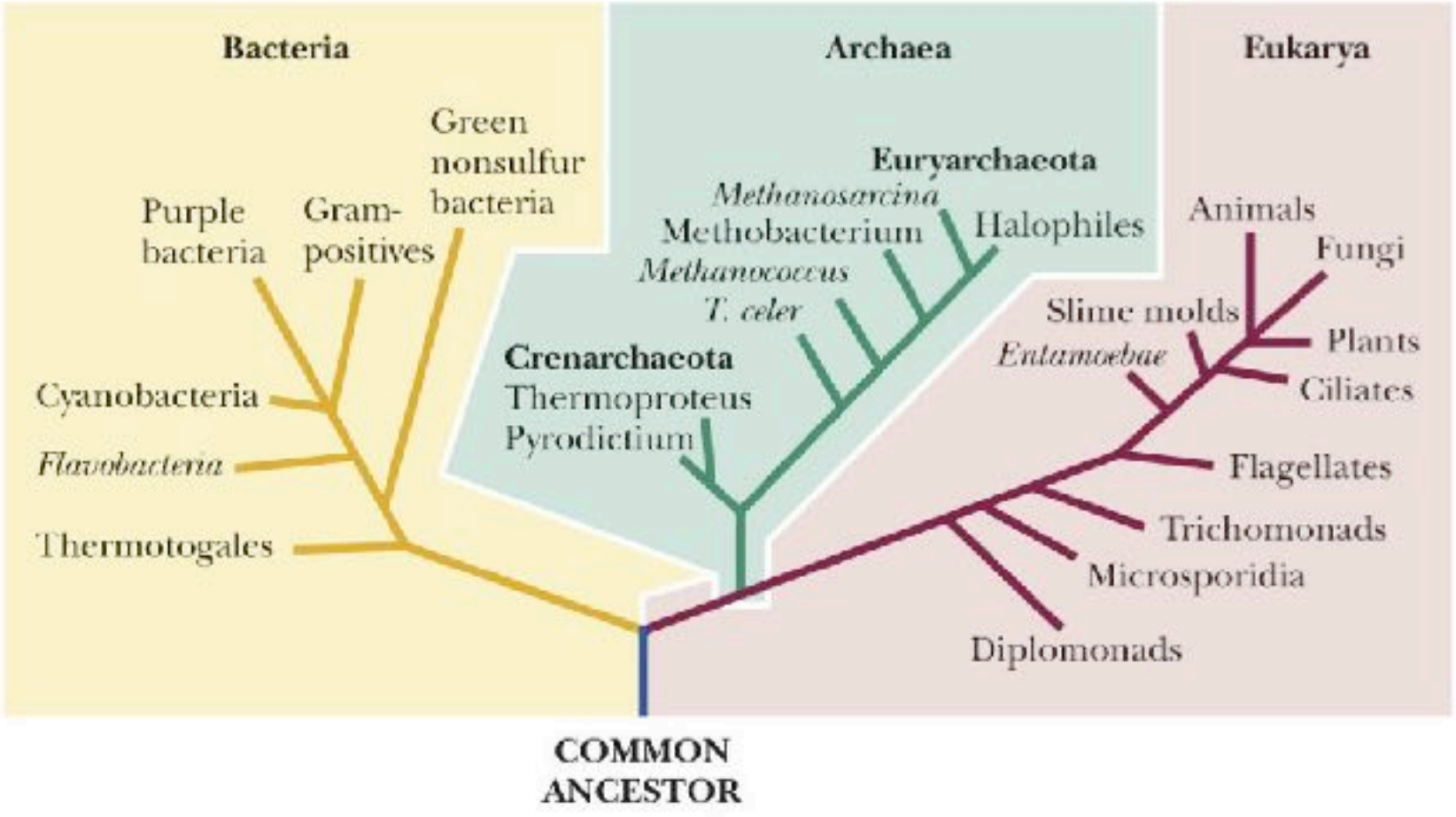


METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

Geni Ribosomiali Utilizzati Come Orologi Molecolari

Visto il ruolo cruciale sono geni utilizzati per inferenze filogenetiche, ossia in grado di dare informazioni su QUANDO due organismi si sono differenziati e QUANTO sono vicini.



METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

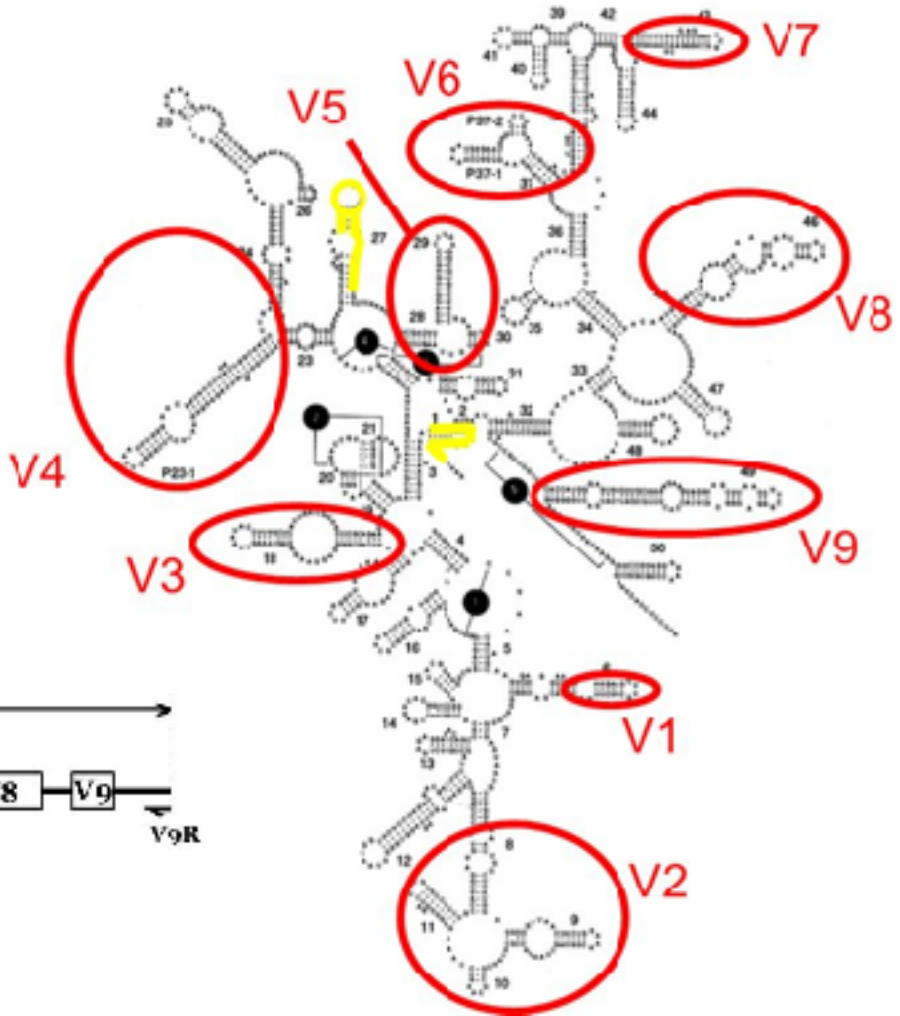
- Metodi PCR-dipendenti

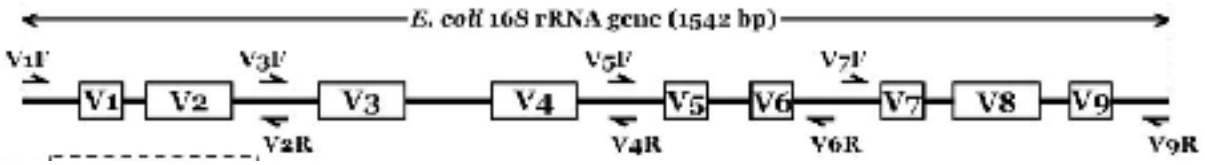
Geni Ribosomiali Utilizzati Come Orologi Molecolari

I geni ribosomiali sono ampliamente utilizzati in studi di comunità microbiche non solo per la loro valenza filogenetica ma anche per le proprietà tassomiche dovute a:

- sequenze variabili

- sequenze conservate

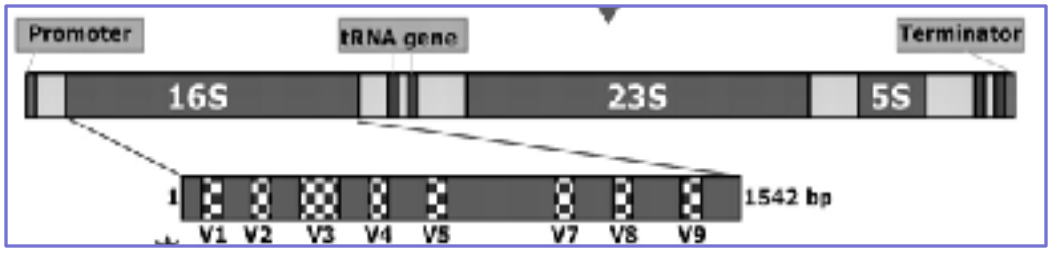




METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

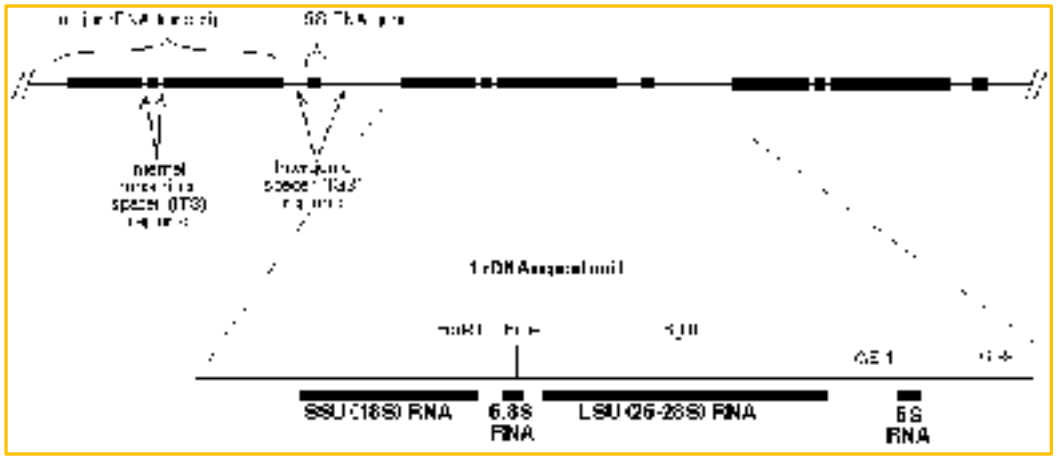
Geni Ribosomiali Utilizzati Come Orologi Molecolari



Geni ribosomiali batterici

➢ le sequenze conservate servono per disegnare i primers da PCR

➢ le sequenze variabili differenziano le specie tra loro



Geni ribosomiali dei funghi

<u>Con una singola PCR è possibile amplificare migliaia di geni ribosomiali diversi</u>

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-indipendenti
  - Contenuto in G+C
  - DNA reassociation
  - DNA hybridization
- Metodi PCR-dipendenti
  - DGGE/TGGE
  - SSCP
  - T-RFLP
  - RISA-ARISA
  - Deep Sequencing

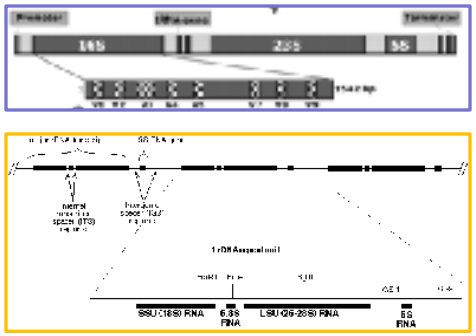
METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

DGGE/TGGE

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Temperature Gradient Gel Electrophoresis

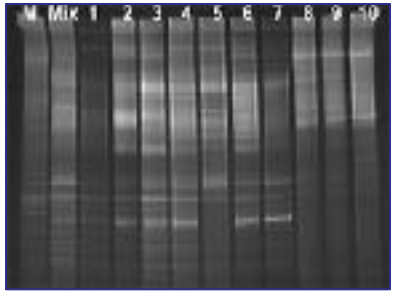
Utilizzo di agenti denaturanti o del calore per forzare il DNA amplificato a separare le proprie eliche. In base alla differente sequenza le molecole di DNA avranno separazione diversa e “migreranno” ad una velocità distinta nel gel.



PCR amplification

Denaturing Electrophoresis

differenti campioni ambientali



Visualization of bands profiles

excision of selected bands

Si possono analizzare molti campioni diversi in maniera riproducibile ed ottenere informazioni tassonomiche, ma si visualizzano solo le specie dominanti e una banda può nasconderne altre sotto.

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

T-RFLP

Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorphism

Prevede l'utilizzo di ENZIMI DI RESTRIZIONE che tagliano il DNA.

Enzima di restrizione come forbice molecolare

Enzimi di restrizione diversi tagliano il DNA in zone diverse
(SITI DI RESTRIZIONE)

L'analisi T-RFLP si basa sul polimorfismo dei siti di restrizione in sequenze ribosomiali (e non) di organismi diversi

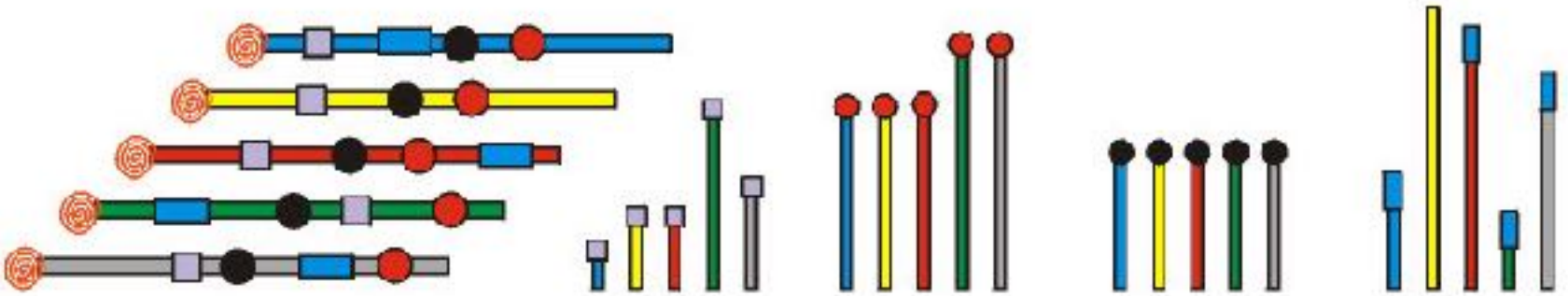
METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

T-RFLP

Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorphism

La tecnica dei T-RFLP si avvale di amplificazioni PCR con primers fluorescenti



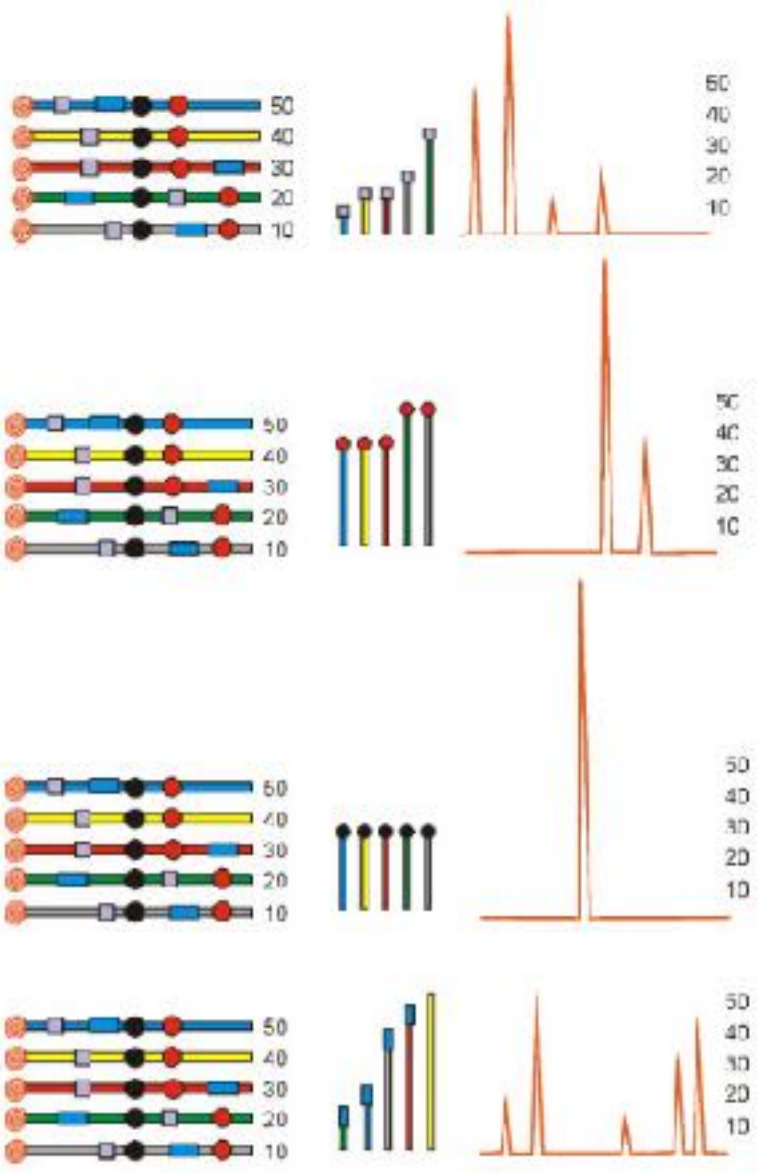
Differenti sequenze di DNA tagliate dagli enzimi di restrizione possono differire in lunghezza o essere uguali. Questa eterogeneità è messa in evidenza mediante elettroforesi capillare.

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

T-RFLP

Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorphism



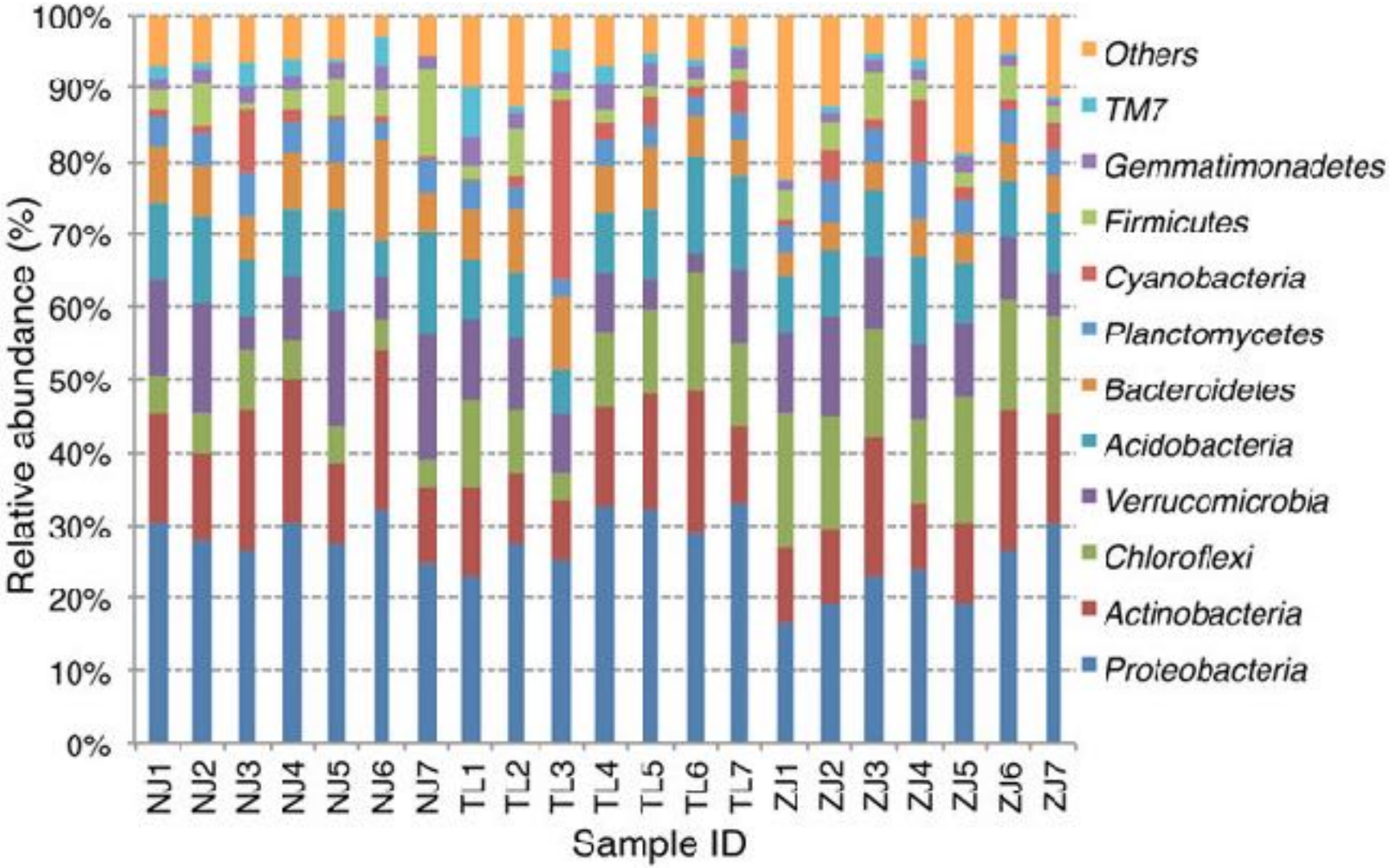
Il metodo è semi quantitativo,
altamente riproducibile
e ha un'alta sensibilità

Necessità dell'uso di più enzimi
e può dare informazioni tassomiche
solo con approcci in silico o con
costruzione di librerie genomiche

METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

- Metodi PCR-dipendenti

Sequenziamento massivo



METODI MOLECOLARI CHE UTILIZZANO ACIDI NUCLEICI

❑ Metodi PCR-dipendenti

Vantaggi:

- Facile
- Riproducibile
- Altamente informativo
  - ➢ ricchezza specie presenti
  - ➢ abbondanza relativa
  - ➢ (composizione delle specie)

Svantaggi:

- Amplificazione preferenziale
- Scelta dei primer