

1° MEETING GRUPPO DI ENZIMOLOGIA DEL SUOLO

Piacenza 22 settembre 2010
Sala del Consiglio dell'Università Cattolica del Sacro Cuore

RELAZIONE DELL'INCONTRO

Il primo incontro tra i componenti del gruppo di enzimologia aveva come obiettivi i seguenti punti:

1. bilancio complessivo del primo anno di attività,
2. presentazione dei risultati del ring-test,
3. presentazione dell'esperienza maturata negli anni dai diversi ricercatori,
4. proposta di nuovi argomenti di lavoro.

Tali punti sono stati sviluppati secondo il programma delle relazioni riportato a pagina 2. Per rendere proficuo l'incontro, le relazioni hanno avuto la durata massima di 15 minuti, dopodichè si è lasciato spazio ad una breve discussione. Le singole relazioni vengono riportate sotto forma di abstract alle pagine seguenti.

Alla fine delle presentazioni ha avuto luogo la discussione generale con le conclusioni e le proposte di attività futura.

Di seguito viene riportato brevemente un sunto dell'incontro, con particolare riguardo alle conclusioni.

Prima dell'inizio dei lavori il Prof. Paolo Nannipieri ha accettato molto cortesemente di svolgere la funzione di chairman e ha invitato i partecipanti all'incontro a fare una brevissima presentazione personale, indicando l'Istituzione di appartenenza e ambiti di ricerca specifici.

Erano presenti:



Luciano Cavani - Università di Bologna
Flavio Fornasier - CRA-RPS di Gorizia
Sara Marinari - Università di Viterbo
Grazia Masciandaro - CNR di Pisa
M. Cristina Moscatelli - Università di Viterbo
Paolo Nannipieri - Università di Firenze
Edoardo Puglisi - Università Di Piacenza
Maria Antonietta Rao - Università di Napoli
GianCarlo Renella - Università di Firenze
Rosalia Scelza -Università di Napoli
Riccardo Scotti - Università di Napoli

CONCLUSIONI DELL'INCONTRO

1- Il Prof. Nannipieri ha fatto notare come sia molto importante disporre di dati di confronto interlaboratorio, come quelli prodotti dal ring-test, perché la standardizzazione è importante. Ha anche suggerito di valutare se tali dati inoltre possano essere oggetto di pubblicazione.

A tale proposito, il dott. Renella ha ricordato che in sede ISO si sta operando per quanto riguarda la standardizzazione, ma ha rilevato che ci sono notevoli problemi, notevoli per via di prevedibili interessi da parte del mondo dell'industria.

2- La dott.ssa Marinari ha espresso l'opinione che andrebbero definite metodologie standard per ambiti di ricerca del suolo, in quanto diversi sono gli scopi e quindi diverse sono le esigenze analitiche. A questo proposito il prof. Nannipieri ha lanciato la proposta di scrivere una review confrontando i risultati di attività enzimatica ottenuti utilizzando i *p*-nitrofenil derivati e i derivati del 4-metilumbelliferone.

3- Il Prof. Nannipieri ha fatto presente che a livello internazionale c'è separazione tra le diverse discipline, anche contigue e mancano collegamenti tra ricercatori che vi lavorano. Ad esempio, si nota che i recenti lavori perdono di originalità poiché trascurano la letteratura relativa all'enzimologia del suolo sviluppatasi a partire dagli anni '60/70.

A tale proposito il Prof. Nannipieri ha sottolineato come il non tener conto del lavoro di ricerca pregresso causa forte dispersione di energie e mancato riconoscimento del lavoro fino ad oggi svolto.

4-Ulteriori lacune evidenziate dal Prof. Nannipieri a livello metodologico riguardano i seguenti aspetti:

- le attuali metodiche misurano attività enzimatiche *potenziali* ma manca completamente la stima dell'attività *in situ*.
- non esistono metodiche che possano ripartire l'attività totale in endo ed eso-cellulare
- esistono pochissimi dati per quanto riguarda l'attività enzimatica nel WEOM (water extractable organic matter).

5- Il Prof. Nannipieri ha lanciato due proposte di lavoro per il gruppo di enzimologia, che riguardano lo stato attuale dell'enzimologia del suolo: una review e un workshop internazionale. Il prof. Nannipieri si riserva di sottoporre ai presenti una proposta di review a gennaio 2011.

Dalla discussione sono emerse due ulteriori proposte:

a- presentare un contributo (poster o presentazione orale) del nostro gruppo di lavoro al prossimo Congresso Mondiale di Enzimologia del Suolo che si terrà a Bad Nauheim,, Germany dal 17 al 21 Luglio 2011.

b-costituzione di un network europeo di enzimologia del suolo

Alla fine del meeting i partecipanti hanno espresso la loro soddisfazione per l'incontro, per il proficuo scambio di idee e le proposte di lavoro emerse.

Il coordinatore del gruppo di Enzimologia del Suolo
Dott. Flavio Fornasier

Piacenza 22 settembre 2010

1° MEETING GRUPPO ENZIMOLOGIA DEL SUOLO

PROGRAMMA DEGLI INTERVENTI

Fornasier F. - *Coordinatore del Gruppo di Lavoro*

Introduzione al workshop e relazione sull'attività svolta durante il primo anno dal Gruppo di Lavoro. Presentazione dei risultati del ring-test.

Puglisi E., Coppolecchia D., Trevisan M.

Impiego di proprietà biologiche come indicatori d'adattamento microbico in un suolo contaminato da zinco

Marinari S., Moscatelli M.C., Grego S.

Esperienza decennale per lo sviluppo di nuovi approcci analitici volti alla determinazione dell'attività enzimatica del suolo.

Rao M.A., Scelza R.

Le attività enzimatiche come indicatori biologici della qualità del suolo. Casi studio.

Fornasier F.

Saggio multienzimatico mediante estratti di suolo e substrati fluorescenti in micropiastre: potenzialità, limitazioni e prospettive.

Masciandaro G., Doni S., Macci C., Ceccanti B.

Complessi uzo-enzima come marcatori nei sistemi di caratterizzazione e recupero eco-funzionale dei suoli degradati

Renella G., Landi L., Giagnoni L., Nannipieri P.

Diversità microbica, espressione genica ed attività enzimatica del suolo

Nannipieri P.

Relazione conclusiva sulle prospettive di ricerca ed applicazione.

1° MEETING GRUPPO ENZIMOLOGIA DEL SUOLO

RIASSUNTI DELLE RELAZIONI

Relazione sul primo anno di attività del Gruppo di Lavoro di Enzimologia del Suolo

Flavio Fornasier
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura - Gorizia

Principali risultati raggiunti nel primo anno di attività:

- proficuo scambio di idee tra i vari aderenti al gruppo
- il contatto tramite newsletter e proposte di lavoro è stato strumento attraverso i quali ogni partecipante al gruppo è stato non solo informato ma ha anche potuto valutare la propria possibilità e capacità di contributo e arricchimento per il gruppo.
- produzione di dati analitici reali (ring-test) sui quali è possibile avviare una discussione e un confronto produttivo concreto a livello analitico. Inoltre può essere la base per la messa a disposizione di suoli di riferimento (standard) per le analisi enzimatiche.
- si sono fatti i primi tentativi di ricerca di fondi per l'attività di ricerca.

Risultati ring-test.

Possono essere sintetizzati nei seguenti tre punti:

- 1- dei cinque laboratori partecipanti, per ogni terreno e per ognuna delle tre attività enzimatiche testate (β -glucosidasi, fosfatasi alcalina e fosfatasi acida), il laboratorio 3 ha sempre dati risultati inferiori agli altri;
- 2- i laboratori 1,2,4 hanno dato risultati simili per la β -glucosidasi, mentre il laboratorio 5 ha fornito dati sistematicamente superiori;
- 3- per le due fosfatasi i laboratori 2, 4 e 5 hanno fornito risultati simili e il laboratorio 1 sistematicamente superiori.

Il confronto tra laboratori proseguirà per evidenziare le cause analitiche che hanno condotto alla produzione di dati così diversi, permettendo di giungere alla definizione di metodiche che siano più riproducibili.

Impiego di proprietà biologiche come indicatori d'adattamento microbico in un suolo contaminato da zinco

Damiano Coppolecchia, Edoardo Puglisi, Marco Trevisan

Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29100 Piacenza, Italy

Il gruppo di lavoro dell'Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza ha maturato negli ultimi anni buone esperienze di ricerca in Enzimologia del Suolo. Le attività enzimatiche sono utilizzate oramai da decenni come indicatori di qualità del suolo. Di recente applicazione è l'impiego delle attività enzimatiche anche come indicatori d'adattamento; ma le prove condotte sinora in letteratura si sono concentrate unicamente sull'attività di nitrificazione in quanto ritenuta una delle attività maggiormente sensibili ad una vasta gamma di sostanze tossiche. La nitrificazione potenziale è un'attività rappresentativa solo di un gruppo di microrganismi: da qui la necessità di verificare se altri gruppi microbici che svolgono altrettante importanti funzioni ecologiche siano sensibili allo Zn. A tale scopo si sono valutate le risposte a concentrazioni crescenti di zinco di differenti proprietà biologiche quali l'FDA (fluorescein diacetate hydrolytic activity) ed attività enzimatiche come l'ureasi, la nitrato riduttasi, la fosfatasi, l'arisulfatasi, la β -galattosidasi, la fenolo ossidasi, e la deidrogenasi. Per valutare la loro sensibilità e l'eventuale adattamento si è ricorso a misure eco-tossicologiche come EC_{50} . La stima di questo indice richiede l'applicazione di opportuni modelli di dose e risposta. Quindi il lavoro preliminare ha riguardato la ricerca del modello che meglio descrivesse i dati sperimentali. Sono stati testati sia modelli cinetici proposti da Speir et al. (1995, 1999) che matematici come quello logistico proposto da Haanstra et al. (1985). Quest'ultimo ha fornito i migliori risultati nella maggior parte delle proprietà biologiche. Pertanto tale modello è stato utilizzato anche per la prova di adattamento. I valori di EC_{50} ottenuti dall'applicazione dei modelli hanno permesso di identificare che oltre alla nitrificazione potenziale anche la β -galattosidasi e la nitrato reduttasi sono sensibili allo Zn (Coppolecchia et al., 2010): si è perciò valutato se anche queste attività siano utilizzabili come indicatori di adattamento microbico.

L'esperimento è stato suddiviso in 2 fasi: nella prima è prevista la fase d'incubazione in cui si preparano gli inoculi per la seconda fase di reinocolo.

La prima prova è stata condotta in microcosmi di suolo contaminati con 350 mg kg^{-1} di zinco. Questa concentrazione corrisponde al EC_{50} della nitrificazione potenziale utilizzata come controllo dell'adattamento. Assieme ai microcosmi contaminati sono stati incubati dei microcosmi controllo non contaminati con zinco per un periodo di 4 mesi, ed ad intervalli regolari sono state determinate le risposte della nitrificazione potenziale, nitrato reduttasi e β -galattosidasi. Le 3 attività hanno mostrato immediatamente dopo la contaminazione una significativa riduzione nei microcosmi contaminati rispetto ai controlli, ed un incremento nei campionamenti successivi, sino a raggiungere valori statisticamente non differenti dai controlli a 99 giorni di incubazione per la nitrificazione potenziale, a 71 giorni per la nitrato reduttasi e già a 41 giorni per la β -galattosidasi. Per dimostrare che il recupero delle funzionalità fosse dovuto a reale adattamento e non a fenomeni di aging, si è seguito apportando delle piccole modifiche il protocollo di Rusk et al. (2004). Questo protocollo prevede il reinocolo dei campioni di suolo sterili e contaminati con inoculi precedentemente preparati nella fase precedente. Quindi sia i campioni esposti allo zinco che i campioni di controllo non esposti alla fine del periodo di incubazione (113 giorni) sono stati reinoculati in suoli sterilizzati e contaminati da poche ore con concentrazioni crescenti di zinco.

Il confronto delle curve-dose risposta ha mostrato significativi incrementi nell' EC_{50} nei suoli inoculati con i microcosmi pre-esposti allo Zn per tutte le attività. Si è così potuto dimostrare come non solo la nitrificazione ma anche la nitrato reduttasi e la β -galattosidasi siano indicatori di adattamento microbico alla contaminazione da zinco.

Bibliografia

- Coppolecchia, D., Puglisi, E., Suci, N., Vasileiadis, S., Hamon, R., Beone, G.M., Trevisan, M. (2010). Relative sensitivity of different soil biological properties to zinc. *Soil Biology and Biochemistry*, in press.
- Haanstra L., Doelman, P., Oude Voshaar, J.H. (1985) The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxicological research. *PlantSoil* 84:293–297.
- Rusk, J. A., Hamon, R. E., Stevens, D. P., McLaughlin, M. J. (2004) Adaptation of soil biological nitrification to heavy metals. *Environmental Science & Technology* 38, 3092-3097.
- Speir T. W., Kettles H. A., Parshotam A., Searle P. L. and Vlaar L. N. C. (1995) A simple kinetic approach to derive the ecological dose value, ED 50, for the assessment of Cr(VI) toxicity to soil biological properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 801-810.
- Speir T. W., Kettles H. A., Parshotam A., Searle P. L. and Vlaar L. N. C. (1999). Simple kinetic approach to determine the toxicity of As(V) to soil biological properties. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 705-713.

Le attività enzimatiche come indicatori biologici della qualità del suolo: casi di studio

Maria A. Rao, Rosalia Scelza

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali
Università di Napoli Federico II, Via Università 100, Portici

Le caratteristiche e il comportamento delle attività degli enzimi del suolo sono ormai ben noti grazie ai numerosi studi condotti su sistemi naturali e sistemi sintetici modello. Sono state inoltre ampiamente studiate le strette correlazioni tra gli enzimi del suolo e le proprietà fisico-chimiche del suolo così da stabilire l'importante ruolo di bioindicatori di queste componenti di origine microbica, vegetale, animale. La loro risposta, nella maggior parte dei casi, è pronta e immediata al fattore di disturbo che può essere una pratica agricola o un evento di contaminazione. Risulta quindi importante validare, su un numero sempre maggiore di suoli, questa chiave di lettura delle attività enzimatiche e soprattutto questo strumento nei piani di monitoraggio delle aree agricole e di controllo ambientale.

Il gruppo di ricerca della Facoltà di Agraria di Portici è al momento coinvolto in un monitoraggio di una zona ad alta vocazione agricola, la Piana del Sele, e in uno studio più puntuale sugli effetti di ammendanti organici con caratteristiche diverse sulla fertilità di due suoli agricoli con diverse caratteristiche chimico-fisiche nel lungo periodo. I risultati ottenuti confermano l'utilità di misurare l'attività dei principali enzimi del suolo coinvolti nei cicli biogeochimici dei nutrienti, soprattutto se tale misura si inserisce in un'analisi più globale che riguarda altre proprietà biologiche come il carbonio della biomassa, la respirazione, il micelio fungino, nonché le rese produttive delle colture ottenute sui suoli stessi. Sono stati inoltre applicati indici di alterazione dei suoli calcolati in un precedente studio (Puglisi et al. 2003) a partire da suoli che avevano subito eventi particolari di disturbo, quali agricoltura intensiva, uso di reflui zootecnici. Tali indici sono stati validati su un gran numero di suoli, oltre quelli della ricerca, e hanno la capacità di discriminare tra i suoli alterati per qualsivoglia fattore di disturbo da quelli non alterati. Anche nel caso dei suoli recentemente studiati nella Piana del Sele, la applicabilità e validità di tali indici sono state confermate.

Un'altra interessante applicazione delle attività enzimatiche dei suoli è stata realizzata nello studio di un sito industriale in Val Basento (Basilicata), inquinato da composti organici e inorganici, ma in particolare da mercurio. Nell'approccio multidisciplinare è stato possibile giungere alla conclusione che tale metallo seppur presente ad elevate concentrazioni non determinava particolari effetti negativi sulle proprietà biochimiche e biologiche dei suoli in quanto presente solo in minima parte (ppb) in forma biodisponibile. Le differenze dei livelli di attività enzimatica rilevate erano dovute essenzialmente al diverso contenuto in C organico dei suoli campionati. Prove di laboratorio di contaminazione artificiale con forme solubili e quindi biodisponibili di Hg hanno confermato, in accordo con la letteratura, il negativo effetto di tale elemento sulle attività di tutti gli enzimi studiati.

Esperienza decennale per lo sviluppo di nuovi approcci analitici volti alla determinazione dell'attività enzimatica del suolo

Sara Marinari, Maria Cristina Moscatelli, Stefano Grego
Dipartimento Agrobiologia Agrochimica
Università degli Studi della Tuscia – via S. Camillo de Lellis, 01100 - Viterbo

Il gruppo di lavoro di Biochimica del Suolo dell'Università della Tuscia ha maturato negli ultimi decenni varie esperienze di ricerca in Enzimologia del Suolo. In virtù delle suddette esperienze sono stati confrontati due approcci analitici per la determinazione dell'attività enzimatica nel suolo. In particolare sono stati messi a confronto i saggi enzimatici che prevedono l'uso di substrati derivati o del p-nitrofenolo o del metilumbelliferone il cui prodotto di reazione è rispettivamente rilevato con letture di assorbanza e fluorescenza (Tabella 1). Come riportato nel lavoro di Marinari et al. (2008) utilizzando i derivati del pNP, per rilevare l'attività associata alla sostanza organica estratta in CaCl_2 (WEOM) è necessario concentrare notevolmente la soluzione attraverso una membrana (<5000 MWCO); pertanto, lo studio dei parametri cinetici dell'enzima associato a varie frazioni del suolo, nonché dell'enzima presente nella soluzione del suolo risulta estremamente laborioso. Da qui la necessità di riscoprire il metodo fluorimetrico sufficientemente sensibile per rilevare le attività enzimatiche in soluzioni acquose. Tale metodo nasce nel 1983, introdotto da Hoppe per la determinazione dell'attività enzimatica nelle acque, è stato esteso al suolo nel 1986 da Darrah e Harris. Il metodo fluorimetrico ha trovato una più ampia applicazione alla matrice del suolo dopo la messa a punto di un procedimento che consente la lettura simultanea del prodotto di reazione ottenuto nei 96 pozzetti (tecnica della micropiastra) (Marx et al., 2001). Tale tecnica consente di processare un numero di campioni elevato in tempi relativamente brevi e di eseguire 5-6 letture del prodotto di reazione durante un tempo di incubazione stabilito 3-4 ore.

Questa metodologia applicata ad una matrice complessa come il suolo presenta l'inconveniente del *quenching* della fluorescenza dovuto alle particelle di suolo e ai composti fenolici. È stato dimostrato che la sottostima del prodotto di reazione dovuta al *quenching* può essere ovviata prevedendo una retta di calibrazione con concentrazione crescenti del prodotto di reazione (MUF) per ogni tipologia di suolo. Infatti, il metodo generalmente prevede due rette di calibrazione (Kandeler et al., 1996): (1) attività nel tempo (3 ore), (2) concentrazioni crescenti del MUF. Dal rapporto delle pendenze delle due rette si ottiene il risultato espresso in $\text{nmoli MUF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

La sensibilità del metodo fluorimetrico associato all'uso della micropiastra ha aperto nuovi ambiti di studio al gruppo di Biochimica del Suolo di Viterbo, trovando numerose applicazioni nelle seguenti linee di ricerca:

1. Attività enzimatica associata a frazioni granulometriche e aggregati
2. Calcolo degli indici di diversità funzionale
3. Attività enzimatica nell'ambiente rizosferico

I due approcci analitici evidenziano differenti potenzialità di applicazione pertanto si rileva la necessità di verificare gli standard metodologici per ambiti di ricerca nel suolo.

Bibliografia

- Cervelli, S., Nannipieri, P., Ceccanti, B. and Sequi, P., (1973). Michaelis constant of soil acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry* **5**: 841–845.
- Darrah, P.R. and Harris, P.J., (1986). A fluorimetric method for measuring the activity of soil enzymes. *Plant and Soil* **92**: 81–88.
- Freeman, C., Liska, G., Ostle, N.J., Jones, S.E. and Lock, M.A., (1995). The use of fluorogenic substrates for measuring enzyme activity in peatlands. *Plant and Soil* **175**: 147–152.

- Hoppe, H-G., (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurement by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series* 11: 299–308.
- Kandeler, E., Kampichler, C., Horak, O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23 (3): 299-306.
- Marinari S., Masciandaro G. Ceccanti B., Grego S. (2008). Kinetics of acid phosphatase in calcium chloride extractable soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2078-2078.
- Marx, M.-C., Wood, M., Jarvis, S.C. (2001). A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33 (12-13): 1633-1640

Tabella 1: Confronto tra la determinazione dell'attività enzimatica con i derivati del metilumbelliferone in micropiastra e del p-nitrofenolo

| | |
|--|---|
| 4-metilumbelliferone | <i>p</i> -nitrofenolo |
| Il prodotto di reazione | |
| Quantificazione al fluorimetrico | Quantificazione allo spettrofotometro |
| Eccitazione a 365 emissione a 460 nm | Assorbanza a 400-410 nm |
| Fluorescenza del MUB dipendente dal pH | Assorbanza del pNP dipendente dal pH |
| Elevata sensibilità specialmente a basse concentrazioni | Bassa sensibilità |
| Quenching della fluorescenza dovuto alle particelle di suolo e ai composti fenolici | pNP può interferire con la sostanza organica |
| (Freeman <i>et al.</i> , 1995) | |
| La molecola del MUB è altamente mobile | Il pNP è soggetto ad adsorbimento |
| | (Cervelli <i>et al.</i> , 1973) |
| 4-metilumbelliferone | <i>p</i> -nitrofenolo |
| Il saggio enzimatico | |
| E' necessaria una piccola quantità di substrato (100 ml) | Si richiede una quantità di substrato più elevata (1 ml) |
| Breve tempo di incubazione (30 min) | Tempo di incubazione variabile da 30 min a 1-2 ore |
| Dissoluzione del substrato difficoltosa | Dissoluzione del substrato istantanea |
| Lecture in continuo del prodotto di reazione (1 ciclo di lettura al minuto) | Una lettura unica al termine dell'incubazione |
| Misura diretta nel mezzo di reazione | La reazione deve essere arrestata e il prodotto di reazione separato per centrifugazione |
| (Darrah e Harris, 1986) | |
| Numero elevato di campioni e repliche possono essere letti simultaneamente (96 pozzetti) | Numero massimo di campioni per saggio pari a 50 |
| Allestimento della piastra veloce (< 1 h) | Preparazione del materiale, incubazione, separazione del pNP e misura (>3,5 h) |
| Materiale monouso (micropiastre, puntali) | Tempo richiesto per la preparazione della vetreria o altro materiale necessario |
| Risultati | |
| Calcolo automatico dell'attività enzimatica per unità di fluorescenza | Sottrazione dell'assorbanza di background |
| Espressi in nmoli MUFg ⁻¹ h ⁻¹ | Espressi in mmoli pNP g ⁻¹ h ⁻¹ |
| Dal rapporto delle pendenze delle rette: (1) attività nel tempo (3 ore), (2) concentrazione crescenti di MUF (media delle lecture nel tempo) | Retta di calibrazione a concentrazioni crescenti di pNP al termine del periodo di incubazione |
| (Kandeler <i>et al.</i> , 1996) | |

Saggio multienzimatico mediante estratti di suolo e substrati fluorescenti in micropiastre: potenzialità, limitazioni e prospettive.

Flavio Fornasier
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura - Gorizia

Ogni enzima catalizza solo una specifica reazione biochimica, per cui è necessario misurare simultaneamente più attività enzimatiche per avere una adeguata informazione circa i processi che avvengono nel suolo. Purtroppo ciò richiede un notevole lavoro con le metodiche classiche di saggio enzimatico sul suolo che utilizzano suolo in sospensione, utilizzando substrati cromogenici o fluorogenici. Un'alternativa alle tecniche classiche, routinariamente usata nel laboratorio del Dr. Fornasier, si basa sull'estrazione ad alta resa degli enzimi dal suolo, mediante l'uso di un tampone contenente detergente e albumina di siero bovino (Fornasier e Margon, 2007). La procedura di estrazione, estremamente rapida (alcuni minuti) porta all'ottenimento di un estratto che è praticamente privo di sostanze umiche pur essendo molto più ricco di attività enzimatica rispetto a tutte le altre procedure di estrazione. L'estratto viene poi utilizzato per determinare molteplici attività enzimatiche su micropiastra con substrati fluorescenti mediante l'uso di un manipolatore di liquidi automatizzato. La procedura nell'attuale stato di sviluppo permette una velocità di analisi che è circa 8-10 volte maggiore rispetto ai saggi tradizionali in provetta, con la potenzialità di poter arrivare a circa 40-50 volte.

Il Dr. Fornasier ha infine mostrato i risultati di un lavoro svolto in collaborazione con il gruppo di enzimologia di Viterbo (dott.ssa Marinari e collaboratori) riguardante la percentuale di estrazione degli enzimi mediante la tecnica sopraesposta, in 10 diversi terreni e per tre enzimi. I risultati hanno evidenziato che l'attività enzimatica viene estratta in percentuali varianti dall'uno al 20%.

Complessi umo-enzima come marcatori nei sistemi di caratterizzazione e recupero eco-funzionale dei suoli degradati

Grazia Masciandaro, Serena Doni, Cristina Macci, Brunello Ceccanti
Consiglio Nazionale delle Ricerche - ISE - Pisa

L'interazione degli enzimi con le sostanze umiche (complessi umo-enzimatici) consente il mantenimento dell'attività catalitica degli enzimi proteggendoli dalla proteolisi e da altri agenti denaturanti. La porzione di enzimi stabilizzati ed attivi nel terreno può essere considerata una riserva di energia biochimica e nutrienti capace di riattivare la funzionalità dell'ecosistema anche in situazioni di forte stress, rappresentando quindi una condizione necessaria per la resilienza del suolo. Lo studio dei complessi umo-enzimatici può quindi fornire informazioni a lungo termine delle proprietà ambientali e della diversità microbiologica del campione.

La tecnica biochimica per lo studio di tali complessi umo-enzimatici attivi è basata su quattro fasi: 1) estrazione delle sostanze umiche in sodio pirofosfato (pH 7.1), 2) purificazione per mezzo di ultrafiltrazione degli estratti su membrana ad esclusione di massa molecolare (peso molecolare > 10⁴Da), 3) frazionamento mediante focalizzazione isoelettrica seguito da 4) saggi di attività enzimatica sulle bade umiche focalizzate.

I complessi umo-enzimatici, in associazione con altri parametri biologici, sono risultati buoni indicatori dei cambiamenti dell'ecosistema suolo *naturale* (supportando l'attività microbica e contribuendo alla fertilità biologica del suolo), *stressato* (costituendo una condizione necessaria per la resilienza del suolo) e *recuperato* (indicando la capacità reale o potenziale del suolo di reagire alle pratiche di rigenerazione).

La caratterizzazione di questi enzimi mediante studi di proteomica del suolo potrebbe aprire importanti prospettive per la comprensione delle relazioni tra le comunità microbiche e la loro funzione. Tali studi sono molto promettenti ma ancora ad un primo stadio a causa dei numerosi interferenti che ostacolano la purificazione e la successiva identificazione delle proteine estratte dal suolo.

Espressione genica e funzionalità del suolo

Giancarlo Renella, Loretta Landi, Laura Giagnoni, Paolo Nannipieri

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali, del Suolo e dell'Ambiente Agroforestale, Piazzale delle Cascine
16, 50144, Firenze

Attività svolta

Il gruppo di lavoro dell'Università di Firenze (UniFi) ha lavorato negli ultimi anni sui seguenti aspetti di enzimologia del suolo:

1. ricerca e sistemazione della letteratura disponibile in formato cartaceo ed elettronico
1. ricerca di metodi per la discriminazione tra attività enzimatica extracellulare ed intracellulare, con l'approccio della fumigazione (Renella et al., 2002), della crescita indotta da substrato (Renella et al., 2006, 2007b)
2. Relazione tra attività enzimatica del suolo e diversità microbica (Renella et al., 2006) e tra attività enzimatica e stress indotto da metalli pesanti (Renella et al., 2005, 2007a)
3. Messa a punto di nuovi protocolli per la determinazione attività specifiche enzimatiche (Zornoza et al., 2009)

Attività pianificata

La ricerca in enzimologia del suolo da parte dell'unità di ricerca UniFi proseguirà nei prossimi anni sulle seguenti tematiche e secondo gli approcci di seguito elencati:

- A) ricerca di letteratura disponibile in formato cartaceo ed elettronico. Lo scopo della ricerca bibliografica sarà quello di individuare le tematiche affrontate in passato, una valutazione critica delle metodologie maggiormente utilizzate, e le eventuali lacune nella ricerca e nella metodologia
- B) Messa a punto di nuovi metodi per la determinazione di specifiche attività idrolasiche (es. esterasi)
- C) Determinazione della relazione tra attività enzimatica e diversità microbica mediante misurazione di specifiche attività enzimatiche e analisi di geni funzionali, con particolare riguardo a suoli inquinati da metalli pesanti e recuperati mediante phytoremediation
- D) Utilizzo della tecnica proteomica per lo studio della relazione tra l'attività di specifici enzimi (es. glicosidasi) e l'estraibilità degli enzimi direttamente dal suolo. Inoltre, l'unità di ricerca UniFi, utilizzerà la tecnica della microbilancia al quarzo per valutare le interazioni tra specifici enzimi e le sostanze umiche, e i loro effetti sull'attività enzimatica specifica e le caratteristiche spettrometriche degli enzimi.

Letteratura citata

- RENELLA G., L. LANDI, P. NANNIPIERI (2002). Hydrolase activity during and after the chloroform-fumigation of soils as affected by protease activity. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY* 34, 51-60.
- ZORNOZA, R., L. LANDI, P. NANNIPIERI, RENELLA G. (2009). A protocol for the assay of arylesterase activity in soil. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY*, 41; 659-662.
- RENELLA G., CHAUDRI AM, FALLOON CM, LANDI L, NANNIPIERI P, BROOKES PC (2007). Effects of Cd, Zn, or both on soil microbial biomass and activity in a clay loam soil. *BIOLOGY AND FERTILITY OF SOILS*, 43, 751-758.
- RENELLA G., U. SZUKICS, L. LANDI, P. NANNIPIERI (2007). Quantitative assessment of hydrolase production and persistence in soil. *BIOLOGY AND FERTILITY OF SOILS* 44, 312-329.
- RENELLA G., L. LANDI, J. ASCHER, M.T. CECCHERINI, G. PIETRAMELLARA, P. NANNIPIERI (2006). Phosphomonoesterase production and persistence and composition of bacterial communities during plant material decomposition in soils with different pH values. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY* 38, 795-802.
- RENELLA G., M. MENCH, L. LANDI, P. NANNIPIERI (2005). Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY* 37, 133-139.